

**Analysen zur Expression des Chromatingens *E(var)3-93D* von
Drosophila melanogaster mit Hilfe spezifischer Antikörper**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Kerstin Büchner
geb. am: 24.12.1966 in: Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Reuter

2. Dr. habil. I. Schubert

3. Prof. Dr. H. Saumweber

Halle (Saale), den 29.4.1999

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Anzucht und Haltung der Fliegen	11
2.2. Charakterisierung der untersuchten Mutanten.....	11
2.3. Verwendete Stabilisierungschromosomen.....	12
2.4. Verwendete Bakterienstämme, Plasmide, Phagen, Oligonukleotide	12
2.4.2. Plasmide.....	12
2.4.3. Verwendete Phagenstämme	14
2.4.4. Oligonukleotide	14
2.5. Bakterien-Nährmedien, Bakteriophagenmedien.....	15
2.6. Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren.....	16
2.6.1. Isolierung genomischer DNA aus <i>Drosophila melanogaster</i>	16
2.6.2. Extraktion von Plasmid-DNA.....	17
2.6.3. DNA-Präparation aus λ -Phagen.....	18
2.6.4. DNA-Restriktionsanalyse.....	19
2.6.5. DNA-Agarosegelelektrophorese.....	19
2.6.6. Phosphatasebehandlung von DNA	19
2.6.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.6.8. Ligation.....	20
2.6.9. <i>E.coli</i> -Transformation	20
2.6.10. PCR.....	21
2.6.11. Herstellung einer rekombinanten genomischen Phagenbibliothek.....	22
2.6.12. Isolation rekombinanter λ -Phagen.....	23
2.6.13. Southern-Transfer von DNA.....	23
2.6.14. Radioaktive Markierung von DNA.....	23
2.6.15. Hybridisierungs-und Waschbedingungen.....	24
2.6.16. Autoradiographie.....	24
2.6.17. Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten	24
2.6.18 Computergestützte Auswertung von Sequenzdaten.....	24
2.7. Isolierung und Charakterisierung von Proteinen	25
2.7.1. Expression der GST-Fusionsproteine in <i>E.coli</i>	25
2.7.2. Herstellung von Proteinextrakten aus <i>E.coli</i>	25
2.7.3. Affinitätschromatographie von GST-Fusionsproteinen	26
2.7.4. Thrombinspaltung von GST-Fusionsproteinen	26
2.7.5. Harnstoffextraktion unlöslicher Fusionsproteine	26

2.7.6. Herstellung von polyklonalen Antikörpern	27
2.7.7 Dechorionisierung von <i>Drosophila</i> embryonen.....	27
2.7.8 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>Drosophila melanogaster</i>	27
2.7.9 Immunopräzipitation	29
2.7.10 Elektrophorese von Proteinen	29
2.7.11 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	30
2.7.12 Nachweis von Proteinen im Westernblot	30
2.7.13 Aufreinigung von Antikörpern über Affinitätschromatographie.....	31
2.7.14 Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.8. Immunozytologische Methoden	32
2.8.1. Antikörpermarkierung von Ovarien von <i>Drosophila melanogaster</i>	32
2.8.2. Antikörperfärbung von Polytäanchrosomen	33
2.8.3. Immunmarkierung von <i>Drosophila</i> embryonen	34
3. ERGEBNISSE	35
3.1. Molekulare Charakterisierung der Mutante <i>E(var)3-93D⁷¹⁻⁴</i>	35
3.1.1. Eingrenzung des Mutationsortes	35
3.1.2. Isolation und Charakterisierung rekombinanter genomischer Phagen	36
3.1.3. Sequenzanalyse.....	37
3.1.4. Transkriptanalyse	39
3.2. Charakterisierung der E(VAR)3-93D-Proteine	41
3.2.1. Proteinbiochemische Analysen der E(VAR)3-93D-Proteine	42
3.2.1.1. Überexpression ausgewählter E(VAR)3-93D-Proteine in <i>E.coli</i> , Induktion polyklonaler Antikörper und Nachweis der Spezifität der Antikörper.....	42
3.2.1.2. Nachweis und Reinigung von Antikörpern, die Epitope innerhalb der BTB-Domäne erkennen	43
3.2.1.3. Nachweis der E(VAR)3-93D-Proteine bei <i>Drosophila melanogaster</i>	45
3.2.1.4. Nachweis von E(VAR)3-93D-Proteinen durch Immunopräzipitation	49
3.2.2. Immunozytologische Charakterisierung der E(VAR)3-93D-Proteine	52
3.2.2.1. Charakterisierung der Expression der E(VAR)3-93D-Proteine in Ovarien adulter Weibchen	53
3.2.2.2. Analyse der E(VAR)3-93D-Proteinexpression während der Embryonalentwicklung	55
3.2.2.3. Die Lokalisation der E(VAR)3-93D-Proteine während des Zellzyklus	58

3.2.2.4. Nachweis der räumlichen Verteilung der E(VAR)3-93D-Proteine im Interphasekern.....	62
3.2.2.5. Analyse von homozygoten <i>E(var)3-93D^{neo129}</i> -Tieren mit zusätzlichem genomischem 7,5kb <i>Bam</i> HI-Fragment	65
3.2.2.6. Analyse des Bindungsverhaltens der E(VAR)3-93D-Proteine an Polytänchromosomen.....	67
3.2.2.7. Nachweis der E(VAR)3-93D-Proteine an Polytänchromosomen homozygoter insertioneller Mutanten	73
4. DISKUSSION.....	76
4.1. Der <i>E(var)3-93D</i> -Locus kodiert für Kernproteine	76
4.2. Die E(VAR)3-93D-Proteine werden maternal exprimiert und sind während der Embryogenese ab dem 9. Kernteilungszyklus mit dem Interphasechromatin assoziiert.....	78
4.3. Die E(VAR)3-93D-Proteine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation im Interphasekern.....	79
4.4. Die Mutation <i>E(var)3-93D⁷¹⁻⁴</i> wurde durch die Insertion eines <i>gypsy</i> -ähnlichen Retrotransposons in das 3. Intron verursacht	82
4.5. Die Expression der E(VAR)3-93D-Proteine in ausgewählten Mutanten.....	84
5. ZUSAMMENFASSUNG	87
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	88
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	100

1. EINLEITUNG

Die DNA von Eukaryonten liegt im Zellkern in Form von Chromatin vor, welches aus DNA, RNA, Histon- und Nichthistonproteinen besteht. Die Nucleosomen stellen dabei die erste Ebene der Verpackung dar. Hierbei wird das doppelsträngige DNA-Molekül zwei mal um das Histonoktamer gewunden und es entsteht durch die perlschnurförmige Anordnung der Nucleosomen die 10nm Faser. Die Nucleosomen werden dann weiter über die sogenannte 30nm Faser in die Chromosomen verpackt. Der höchste Kondensationsgrad wird in den mikroskopisch sichtbaren Metaphasechromosomen erreicht.

Eine differentielle Verpackung des Chromatins eukaryontischer Zellen wurde zuerst von Heitz (1928) beschrieben. Während das Heterochromatin über den gesamten Zellzyklus in der kondensierten Form vorliegt, decondensiert das Euchromatin in der Interphase. Im Gegensatz zum Euchromatin enthält das Heterochromatin nur wenige Gene und besteht zu einem großen Anteil aus mittel- und hochrepetitiven Sequenzen.

Normalerweise transkriptionsaktive euchromatische Bereiche können durch Heterochromatisierung inaktiviert werden. Bei weiblichen Säugern wird zur Dosiskompensation ein X-Chromosom durch Heterochromatisierung inaktiviert, dies ist zytologisch als Barr- Körperchen sichtbar (Lyon 1972). In *Drosophila melanogaster* kann ein ähnliches Verhalten bei der Positioneffekt-Variegation (PEV) beobachtet werden. Das Phänomen der PEV wurde zuerst von Muller (1930) beschrieben. Nach Röntgenstrahlmutagenese isolierte er Fliegen, die einen rot-weiß gefleckten Augenphänotyp zeigten. Durch Schultz konnte 1936 gezeigt werden, daß der Phänotyp infolge eines Rearrangements des X-Chromosoms mit einem Bruchpunkt im Heterochromatin auftrat. Das *white*-Gen, welches für die Pigmenteinlagerung in den Ommatidien benötigt wird, kommt dadurch in unmittelbare Nachbarschaft zum zentromerischen Heterochromatin. In einigen Zellen wird daraufhin das *white*-Gen exprimiert, in anderen bleibt es inaktiv, was zum Mosaikphänotyp führt. Analysen transgener Linien mit heterochromatischem Positionseffekt zeigten, daß die Inaktivierung durch Heterochromatisierung während der Embryogenese nach dem Blastodermstadium beginnt und bis zum späten 3. Larvenstadium erhalten bleibt. Während der darauffolgenden terminalen Differenzierung kommt es zur teilweisen Relaxation des Chromatins und zur Ausbildung des Mosaikphänotyps (Lu *et al.* 1996). Es existieren zur Zeit 3 Modelle, die die Entstehung der PEV beschreiben. Der Verlust der Genexpression wird durch DNA-Elimination verursacht (Karpen 1994). Die Inaktivierung des von PEV betroffenen Gens erfolgt durch dessen Lokalisation in heterochromatische Kompartimente des Zellkerns (Wakimoto und Hearn 1990). Eine dichtere Verpackung des betroffenen Gens in heterochromatische Strukturen führt zu dessen Inaktivierung. Diese Heterochromatisierung erfolgt durch multimere Proteinkomplexe nach dem Massenaktionsmodell (Locke *et al.* 1987) oder nach dem alternativen Modell der multiplen Bindungsstellen (Henikoff 1996). Daß die Geninaktivierung durch eine Modifikation der Chromatinstruktur hervorgerufen wird, konnte durch Untersuchungen an polytären Speicheldrüsenchromosomen gezeigt werden. Der vom Rearrangement betroffene Locus

verhält sich zytologisch wie das benachbarte Heterochromatin (Reuter *et al.* 1982). Außerdem konnten nach Insertionen eines Reportergens in heterochromatische Regionen auf molekularer Ebene Veränderungen in der Chromatinstruktur dieses Reportergens nachgewiesen werden (Wallrath und Elgin 1995).

In den letzten Jahren wurden ca. 200 Mutationen isoliert, die das Ausmaß der Variegation beeinflussen (Reuter und Wolff 1981, Sinclair *et al.* 1983, Dorn *et al.* 1993). Wenn PEV durch eine Veränderung in der Chromatinstruktur hervorgerufen wird, sollten diese Gene für strukturelle und regulatorische Chromatinbestandteile kodieren (Reuter und Spierer 1992). Während Suppressormutationen zu einer Verringerung der Variegation führen, verstärken Enhancermutationen das Ausmaß der Variegation. Nach zytologischen und genetischen Untersuchungen können Enhancer- und Suppressormutationen in 4 Klassen eingeteilt werden (Wustmann *et al.* 1989):

1. Haplo-Suppressoren mit Triplo-Enhancereffekt: Der Ausfall einer Genkopie führt zum Suppressoreffekt, während eine zusätzliche Genkopie einen Enhancereffekt zur Folge hat.
2. Haplo-Enhancer mit Triplo-Suppressoreffekt: Der Ausfall einer Genkopie hat einen Enhancereffekt zur Folge, eine zusätzliche Kopie einen Suppressoreffekt.
3. Haplo-Suppressoren ohne Triplo-Enhancereffekt
4. Haplo-Enhancer ohne Triplo-Suppressoreffekt

Die Klassifizierung der Gene erfolgte nach dem zu beobachtenden Mutantenphänotyp. Demzufolge sollten die Suppressorgenprodukte ursächlich an der Kondensation und die Enhancergenprodukte an der Dekondensation des Chromatins beteiligt sein.

Strukturelle Bestandteile des Heterochromatins wurden durch die Analyse von Suppressorgenprodukten identifiziert.

Das heterochromatische Protein 1 (HP1) konnte durch seine Bindung an perizentromerisches Heterochromatin und das zum großen Teil heterochromatisierte 4. Chromosom identifiziert werden (James *et al.* 1989). Es wird vom *Su(var)205*-Locus kodiert, einem dosisabhängigen Modifikator für PEV (Eissenberg *et al.* 1990). Die im HP1 enthaltene Chromodomäne zeigt Homologie zum Polycomb-Protein, einem Repressor der homöotischen Gene (Paro und Hogness 1991). Ebenso wie bei PEV wird der aktive oder reprimierte Zustand der homöotischen Gene von einer Zellgeneration stabil auf die nächste weitervererbt (Paro 1990). Mutationen im HP1-Protein verursachen rezessive embryonale Letalität, die mit Defekten in Morphologie und Segregation der Chromosomen assoziiert ist (Kellum und Alberts 1995).

Während für das HP1 kein DNA-bindendes Motiv identifiziert werden konnte, enthält das SU(VAR)3-7 Protein sieben putative Zinkfingerstrukturen, die durch 40-107 Aminosäurereste voneinander getrennt sind. Durch diese putativen Zinkfinger könnte DNA in heterochromatische Strukturen verpackt werden (Reuter *et al.* 1990). Das SU(VAR)3-7 Protein ist ebenfalls mit dem perizentromerischen Heterochromatin und dem Chromosom 4 assoziiert. Eine Interaktion mit HP1 konnte sowohl genetisch als auch durch Ko-Immunopräzipitation beider Proteine aus embryonalen

Kernextrakten bewiesen werden (Cleard *et al.* 1997). Multimere Proteinkomplexe wurden ebenfalls für Proteine der Polycombgruppe identifiziert (Franke *et al.* 1992), die an der Repression homöotischer Gene beteiligt sind.

Die in HP1 und Polycomb enthaltene Chromodomäne wurde ebenfalls im SU(VAR)3-9 Protein identifiziert (Tschiersch *et al.* 1994). Das SU(VAR)3-9-Protein besitzt zusätzlich die SET-Domäne, die Homologie zum Polycombgruppenprotein Enhancer of zeste (Jones und Gelbart 1993) und zum antagonistisch agierenden Protein Trithorax (Mazo *et al.* 1990) aufweist. Die im Hefe-Dihybridensystem nachgewiesene Interaktion mit HP1 (Fischer 1997) zeigt, daß auch das Protein SU(VAR)3-9 möglicherweise ein Bestandteil multimerer heterochromatischer Proteinkomplexe ist.

Vom *Su(var)3-6* und *Su(var)2-1*-Locus werden regulatorische Chromatinbestandteile kodiert, die wahrscheinlich chromosomale Proteine modifizieren. Der *Su(var)3-6*-Locus kodiert für die Proteinphosphatase 1 (Baksa *et al.* 1993). Es wurden genetische Wechselwirkungen des *Su(var)3-6*-Locus mit dem *Su(var)3-7*-Locus nachgewiesen. Möglicherweise wird das SU(VAR)3-7- Protein durch die Proteinphosphatase 1 modifiziert (Reuter und Spierer 1992).

In homo- und heterozygoten Mutanten des *Su(var)2-1*-Locus ist die Histon H4-Deacetylierung signifikant reduziert und die Empfindlichkeit gegenüber endogenen Nucleasen erhöht (Dorn *et al.* 1986).

Während die Genprodukte der Suppressorgene für strukturelle und regulatorische Chromatinbestandteile kodieren, die dessen Kondensation zur Folge haben, sollten die Enhancergenprodukte für Komponenten kodieren, die zur Dekondensation von Chromatin führen. Die Chromatindekondensation ist eine essentielle Voraussetzung für jede Transkriptionsaktivierung. Von besonderem Interesse sind Enhancergene, die auch Aktivatoren der homöotischen Gene darstellen und deshalb in die Gruppe der Trithoraxgruppengene eingeordnet werden können. Zu dieser Gruppe gehören die Enhancergene *Trithorax-like (Trl)* und *E(var)3-93D*.

Mutationen von Trithoraxgruppengenen wurden durch deren suppressorische Wirkung auf Polycomb- und Antennapedia Mutationen isoliert (Kennisson und Tamkun 1988). Die molekulare Analyse einiger Vertreter dieser Gengruppe läßt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Aktivierung homöotischer Gene und der Herstellung einer offenen, transkriptionsaktiven Chromatinstruktur erkennen.

Das *Trithorax*-Gen kodiert für 2 Proteine, die N-terminal verschieden sind. Die Proteine enthalten Zinkfingerstrukturen und es konnte auch eine Zinkbindung *in vitro* nachgewiesen werden (Mazo *et al.* 1990). Trithorax ist ein chromosomales Protein und kolokalisiert mit dem antagonistisch wirkenden Protein Polycomb an ca. 30 Bindungsstellen an Polytänochromosomen von *Drosophila melanogaster* (Chinwalla *et al.* 1995). Durch Immunopräzipitation von Chromatin nach Formaldehyd-Crosslinking konnte eine Bindung des Trithorax-Proteins an PREs (Polycomb group response elements) nachgewiesen werden (Orlando *et al.* 1998). PREs sind *cis*-regulatorische Elemente, die für die Aufrechterhaltung des reprimierten Zustandes der homöotischen Gene verantwortlich sind (Chan *et al.*

1994). Komplexe aus Polycombgruppenproteinen binden an diese PREs und verpacken sie in höhergeordnete Chromatinstrukturen, die dann für *trans*-Aktivatoren nicht mehr zugänglich sind (Zink und Paro 1995). Die Bindung des Trithorax-Proteins an diese PREs könnte der von den Polycombgruppenproteinen vermittelten Repression durch Verpackung in heterochromatische Strukturen entgegenwirken.

Vom *zeste*-Locus wird ein DNA-bindendes Protein kodiert, welches einen Einfluß auf Transvection zeigt (Kennison 1993, Judd 1995). Transvection ist eine von der homologen Chromosomenpaarung abhängige Regulation der Genaktivität. Dieses Phänomen beruht wahrscheinlich auf der Fähigkeit von *cis*-regulatorischen Elementen auf einem Chromosom mit dem Promotor auf dem gepaarten homologen Chromosom zu reagieren (Kennison 1993).

Das *Brahma*-Gen kodiert für ein Protein mit Homologie zum Transkriptionsaktivator SNF2/SWI2 von *Saccharomyces cerevisiae* (Tamkun *et al.* 1992). Beide Proteine besitzen ein Sequenzmotiv, welches für DNA-abhängige ATPasen beschrieben wurde (Kingston *et al.* 1996). *Brahma* wurde zusammen mit SNR1 als Bestandteil eines multimeren Proteinkomplexes identifiziert, der homolog zu dem Proteinkomplex SNF/SWI (der auch das Protein SNF2/SWI2 enthält) von *Saccharomyces cerevisiae* ist (Dingwall *et al.* 1995). Mutationen in der ATPase-Domäne von *Brahma* führen zu dessen Funktionsverlust *in vivo* (Elfring *et al.* 1998). Bisherige Daten zeigen, daß die evolutionär konservierte Funktion des SNF/SWI-Komplexes bei *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* und auch bei Säugern (Wang *et al.* 1996) in einer ATP-abhängigen Disruption der Nucleosomenstruktur besteht, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren erleichtert wird (Kingston *et al.* 1996, Pazin und Kadonaga 1997). Daß *Brahma* an der Schaffung oder Aufrechterhaltung einer offenen Chromatinstruktur bei *Drosophila melanogaster* beteiligt ist, zeigt auch seine Homologie zu dem Protein ISWI (Elfring *et al.* 1998). ISWI und *Brahma* weisen nur Homologie im Bereich der ATPase-Domäne auf (Tsukiyama *et al.* 1995). ISWI wurde als Bestandteil der Chromatinremodellingkomplexe NURF, CHRAC und ACF identifiziert (Tsukiyama *et al.* 1995, Ito *et al.* 1997, Varga-Weisz *et al.* 1997), in denen es eine ATPase-Funktion besitzt. Chromatinremodellingkomplexe sind multimeren Proteinkomplexe, die Chromatinstrukturen modifizieren können. ACF kann in einem ATP-abhängigen Mechanismus sowohl Nucleosomen positionieren, als auch deren Spacing *in vitro* modifizieren (Ito *et al.* 1997). CHRAC ist in der Lage, Nucleosomen in regulären Abständen zu positionieren, kann aber auch ebenso die Empfindlichkeit von DNA im Chromatin gegenüber Endonucleasen erhöhen (Varga-Weisz *et al.* 1997). Rekonstituierte Nucleosomen werden durch NURF und ATP in ihrer Struktur verändert, wodurch die Bindung des GAGA-Faktors an seine Bindungsstellen am *hsp70*-Promotor ermöglicht wird (Tsukiyama *et al.* 1995). Ebenso ermöglicht das durch den GAGA-Faktor und ISWI verursachte Chromatinremodelling eine Aktivierung des Promotors des Segmentierungsgens *fushi tarazu* *in vitro* (Okada und Hirose 1998). Es wurden Mutanten für ISWI identifiziert, bei denen die Expression des Segmentierungsgens *engrailed* und des homöotischen Gens *Ubx* in larvalen Imaginalscheiben reduziert ist (Tamkun, persönliche Mitteilung).

Der GAGA-Faktor wurde ursprünglich als Transkriptionsaktivator, der an GA/TC-reiche Elemente in den Promotorregionen vieler Gene bei *Drosophila melanogaster* bindet, identifiziert (Biggin und Tijan

1988, Soeller *et al.* 1993). Er besitzt ein putatives Zinkfingermotiv (Soeller *et al.* 1993). Es konnten 4 verschiedene Klassen von cDNA-Klonen identifiziert werden, die C-terminal verschieden sind (Benyajati *et al.* 1997). Am *hsp70*-Promotor bindet der GAGA-Faktor und öffnet die Nucleosomenstruktur des inaktiven Promotors (Brien *et al.* 1995). Der GAGA-Faktor wird vom *Trithorax-like Gen (Trl)* kodiert (Farkas *et al.* 1994). *Trl* gehört zur Klasse der Trithoraxgruppengene und ist außerdem ein Enhancergen für PEV (Farkas *et al.* 1994). Neben der Transkriptionsaktivierung besitzt er aufgrund seiner Lokalisation im zentromerischen Heterochromatin auch Funktionen während der Zellteilung (Bhat *et al.* 1996). Wie das Protein Trithorax konnte auch der GAGA-Faktor an PREs nachgewiesen werden (Strutt *et al.* 1997).

Das Enhancergen *E(var)3-93D* wurde nach Insertionsmutagenese durch das *pUChsneory⁺*-Transposon identifiziert (Dorn *et al.* 1993a). Vorteile der Mutagenese durch modifizierte P-Elemente sind zum einen die mögliche Lokalisation des betroffenen Locus auf Polytänychromosomen durch *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde aus dem Transposon und die Klonierung von genomischen Sequenzen aus dem unmittelbaren Insertionsbereich durch Plasmidrescue (Steller und Pirotta 1985). Die durch das *pUChsneory⁺*-Transposon induzierte Mutante *E(var)3-93D^{neo129}* weist interessante Eigenschaften auf. Die Tiere üben einen starken dominanten Enhancereffekt auf PEV aus. Der Enhancereffekt wird als paternaler Effekt von den Männchen auf deren Söhne stabil über mehrere Generationen weitergegeben, auch wenn diese selbst nicht mehr Träger der Mutation sind. Genetische Analysen haben gezeigt, daß das Y-Chromosom für diesen imprintingähnlichen Effekt verantwortlich ist (Dorn *et al.* 1993b). Die insertionelle Mutation *E(var)3-93D^{neo129}* ist wie fast alle bekannten Mutantenallele dieses Locus rezessiv letal bei 18°C und 25°C. Bei 29°C ist sie sehr stark semiletal. Die homozygoten Weibchen sind steril. Homozygote *E(var)3-93D^{neo129}*-Männchen zeigen eine signifikante Transformation des 5. in das 4. Abdominalsegment, die bei den heterozygoten Tieren nur schwach ausgeprägt ist. Additive Effekte für die homöotische Transformation wurden in transheterozygoten *E(var)3-93D^{neo129} / Df(3R)red^{P52}*-Tieren gefunden (Dorn *et al.* 1993b). Die Defizienz *Df(3R)red^{P52}* schließt das *Trithorax*-Gen ein, einen positiven Regulator des Bithorax-Komplexes. Dies zeigt, daß auch der Enhancer *E(var)3-93D* ein positiver Regulator des Bithorax-Komplexes ist (Dorn *et al.* 1993b). Es wurden, ausgehend von der *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutation, lebensfähige Revertanten isoliert, die auch keinen Enhancerphänotyp mehr ausprägen. Bei ihnen erfolgte ein präziser Ausbau des Transposons. Deshalb kann die Insertion des *pUChsneory⁺*-Transposons als Ursache für die zu beobachtenden Mutantenphänotypen betrachtet werden (Dorn *et al.* 1993b).

Ausgehend von der insertionellen Mutation *E(var)3-93D^{neo129}* konnte der Locus molekular charakterisiert werden. Im Northernblot wurden 2 Transkripte von 2,3 und 2,0 Kilobasen (kb) nachgewiesen, die besonders abundant im frühen Embryonalstadium sind (Dorn, persönliche Mitteilung). Es wurden bisher 22 alternative Spleißprodukte identifiziert (Dorn *et al.* 1993b, Roth, persönliche Mitteilung). Die Struktur des *E(var)3-93D*-Locus ist in Abb. 1 zu sehen. Alle bisher identifizierten Transkripte besitzen die ersten vier Exonen und unterscheiden sich nur in ihren 3´-

Bereichen (Dorn und Roth, persönliche Mitteilung). Zwei Transkripte konnten bisher auf der genomischen Karte lokalisiert werden. Die 3'-Exonen werden durch ein ca. 10kb großes Intron von den gemeinsamen distal gelegenen Exonen getrennt. Bisher konnten in diesem Intron noch keine Exonen alternativ gespleißter Transkripte des *E(var)3-93D*-Gens identifiziert werden (Dorn, persönliche Mitteilung).

Im gemeinsamen N-terminalen Bereich der E(VAR)3-93D-Proteine konnte eine 120 Aminosäuren umfassende hydrophobe Domäne identifiziert werden, die bei *Drosophila melanogaster* konserviert ist (Dorn *et al.* 1993b). Aufgrund des gemeinsamen Vorkommens bei den Genprodukten von *Br-Core* des *Broad*-Komplexes, *tramtrack* und *bric a brac* wurde sie auch als BTB-Domäne bezeichnet (Zollman *et al.* 1994). Die beiden Tramtrack-Proteine entstehen durch alternatives Spleißen und stellen Repressoren der Segmentierungsgene *even skipped*, *odd skipped*, *hairy*, *runt*, *engrailed* und *fushi tarazu* dar (Read und Manley 1992; Harrison und Travers 1990; Brown und Wu 1993). Auch die *Br-Core*-Transkripte entstehen durch alternatives Spleißen. Sie sind an der durch Ecdyson ausgelösten Kaskade der Metamorphose beteiligt (Di Bello *et al.* 1991). *Bric a brac*-Mutanten weisen homöotische Transformationen auf (Zollman *et al.* 1994). Auch dieses Gen ist an der Kontrolle von Entwicklungsvorgängen bei *Drosophila melanogaster* beteiligt.

Interessanterweise besitzt auch der GAGA-Faktor die BTB-Domäne (Soeller *et al.* 1993, Farkas *et al.* 1994). Ebenso wie der Enhancer *E(var)3-93D* kann er in die Gruppe der Trithoraxgruppengene eingeordnet werden und Mutationen dieses Locus zeigen einen Enhancereffekt auf PEV (Farkas *et al.* 1994). Für den GAGA-Faktor konnte gezeigt werden, daß er ein Transkriptionsaktivator ist, der auch Chromatinstrukturen modifizieren kann (Biggin und Tijan 1988, Soeller *et al.* 1993, Brien *et al.* 1995, Tsukiyama *et al.* 1995, Okada und Hirose 1998). Die BTB-Domäne wurde nicht nur bei *Drosophila melanogaster*, sondern auch bei Poxviren und beim Menschen identifiziert. Aufgrund des Vorkommens bei Poxviren und der zusätzlichen Zinkfingerstrukturen bei vielen Vertretern dieser Proteinfamilie wird die Domäne auch als POZ-Domäne (poxvirus and zinc finger) bezeichnet (Bardwell und Treisman 1994).

Beim Menschen wurden Vertreter der BTB-Domänenfamilie identifiziert, die in engem Zusammenhang mit der Onkogenese stehen. Durch eine Translokation t(11;17) entsteht das Fusionsprotein PLZF-RAR α (promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor α). Die POZ-Domäne des PLZF-RAR α ist wahrscheinlich an der Transformation der Zellen (Dong *et al.* 1996) beteiligt. Das *LAZ3/BCL6*-Gen (lymphoma-associated zinc finger 3 / B cell lymphoma 6) ist in einigen Non-Hodgkin-Lymphomen mutiert (Dhordain *et al.* 1997). Eine Integration des humanen Papillomavirus *HPV68* in das BTB-Domänengen *APM-1* führt zu einem Fusionstranskript in einer Zervixkarzinomzelllinie (Reuter *et al.* 1998).

Die BTB-Domäne ist eine Protein-Proteinwechselwirkungsdomäne (Bardwell und Treisman 1994, Chen *et al.* 1995, Dong *et al.* 1996, Dhordain *et al.* 1997), die im N-Terminus der Proteine lokalisiert ist. Anhand der *Bric a brac*-BTB-Domäne wurde eine Homodimerisierung nachgewiesen (Chen *et al.* 1995), es können aber auch, wie für *Tramtrack* und GAGA gezeigt, (Bardwell und Treisman 1994) Heterodimere gebildet werden. Eine extrem stabile Dimerbildung wurde für die BTB-Domäne des

PLZF-Proteins durch biochemische Untersuchungen nachgewiesen (Li *et al.* 1997). Unter physiologischen Bedingungen sollte das PLZF-Protein als Dimer vorliegen. Da auch die E(VAR)3-93D-Proteine die BTB-Domäne besitzen, kann auch für sie eine Protein-Proteinwechselwirkung postuliert werden.

Mit einem Antikörper, der gegen das gesamte E(VAR)3-93D-Protein 23gt gerichtet ist, konnte an Polytänchromosomen eine Chromatinbindung nachgewiesen werden (Dorn *et al.* 1993b). Da in keinem der bisher abgeleiteten Proteine ein DNA-bindendes Motiv identifiziert werden konnte (Roth, persönliche Mitteilung), sollte die Chromatinbindung direkt oder indirekt über eine Wechselwirkung mit anderen DNA-bindenden Proteinen erfolgen.

Vom *E(var)3-93D*-Locus werden, ausgehend von der Transkriptanalyse, ca. 22 Proteine gebildet, die C-terminal verschieden sind. Im gemeinsamen N-Terminus sind die BTB-Domäne und eine Kernlokalisationssequenz enthalten (siehe Abb. 1). Daraus ergibt sich die Frage, ob die Proteine verschiedene Funktionen besitzen oder funktionell austauschbar sind. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß 2 alternative Spleißprodukte in funktionell unterschiedlichem Hintergrund identifiziert werden konnten. *Mod(mdg4)2,2* ist identisch mit dem 38gt-Transkript (Gerasimova *et al.* 1995). Einige Mutationen infolge von Insertionen durch das Retrotransposon *gypsy (mdg4)* werden durch Mutationen im *Suppressor of Hairy-wing-Locus (Su(Hw))* revertiert. *Su(Hw)* kodiert für ein Protein mit 12 Kopien eines Zinkfingermotivs, welches charakteristisch für einige Transkriptionsfaktoren ist (Harrison *et al.* 1989). Im 5'-nichttranslatierten Bereich des *gypsy*-Elementes wurde eine *Su(Hw)*-Bindungsregion identifiziert, die für die Mutagenese durch das *gypsy*-Element essentiell ist (Smith und Corces 1992). Am *yellow*-Locus führen Mutationen im *mod(mdg4)*-Gen zu einer Verstärkung der durch die *Su(Hw)*-Bindung am *gypsy*-Element verursachte Transkriptionsinaktivierung (Gerasimova *et al.* 1995). *Doom* wurde als Interaktionspartner mit dem *IAP (inhibitor of apoptosis)* von Baculovirus identifiziert (Harvey *et al.* 1997) und ist identisch mit dem *E(var)3-93D*-Transkript 4(4). Für die Interaktion von *Doom* mit *IAP* ist nur der spezifische C-Terminus verantwortlich, nicht die BTB-Domäne. Eine Überexpression von *Doom* in Zellkultur löst Apoptose aus, die von *IAP* geblockt werden kann (Harvey *et al.* 1997).

Für eine funktionelle Analyse der verschiedenen E(VAR)3-93D-Proteine sind Antikörper, die nur gegen die spezifischen C-Termini der einzelnen Proteine gerichtet sind, ein wichtiges Hilfsmittel. In Abb. 1 sind die E(VAR)3-93D-Proteine dargestellt, die mit Hilfe von Antikörpern analysiert werden sollten. Die E(VAR)3-93D-Proteine 23gt-gesamt und 38gt-spezifisch konnten bereits in *E.coli* überexprimiert werden, um polyklonale Antikörper in Maus und Kaninchen gegen diese Proteine zu induzieren (Büchner 1994). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten außerdem die E(VAR)3-93D-Proteine 23gt-spezifisch, 1(8)-spezifisch und 4(4)-spezifisch in *E.coli* überexprimiert werden, um auch gegen sie polyklonale Antikörper zu erhalten. Die Antikörper gegen 4 spezifische C-Termini und das E(VAR)3-93D-Protein 23gt-gesamt erlauben eine vergleichende Analyse der Expression aller Proteine dieses Locus, sowie 4 individueller E(VAR)3-93D-Proteine. Durch Westernblotanalysen sollten zunächst die einzelnen E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen und eine mögliche Kernlokalisation gezeigt werden. Auch erlauben Westernblotanalysen Aussagen über die entwicklungspezifische

Expression und Abundanz der individuellen E(VAR)3-93D-Proteine. Immunozytologische Analysen ermöglichen eine zeitliche und räumliche Feinlokalisierung von Proteinen. Mit Hilfe dieser Techniken sollte untersucht werden, wann die E(VAR)3-93D-Proteine während der Entwicklung exprimiert werden und ob sie chromatinassoziiert sind. Eine maternale Komponente für den *E(var)3-93D*-Locus konnte aufgrund genetischer Analysen und "whole mount" *in situ* Hybridisierungen nachgewiesen werden (Dorn, persönliche Mitteilung). Interessant ist, ob auch die E(VAR)3-93D-Proteine maternale Produkte sind, die in die Eizelle gegeben werden und frühe embryonale Funktionen kontrollieren. Besonders wichtig ist das Verhalten der individuellen E(VAR)3-93D-Proteine. Werden sie zu unterschiedlichen Zeiten in verschiedenen Geweben exprimiert? Antikörpermarkierungen polytärer Riesenchromosomen von *Drosophila melanogaster* ermöglichen unter lichtmikroskopischen Bedingungen eine Feinlokalisierung chromosomaler Proteine an Interphasechromosomen. Es können Aussagen über die Lokalisation im Hetero- und Euchromatin aber auch über die Bindung an bestimmte Loci getroffen werden. Interessant ist, ob die einzelnen E(VAR)3-93D-Proteine unterschiedliche Bindungsstellen an den Polytänchromosomen besitzen und damit an der Regulation unterschiedlicher Loci beteiligt sind.

Es wurden für den *E(var)3-93D*-Locus Mutanten isoliert, die ebenfalls eine funktionelle Analyse der Genprodukte erlauben. Bis auf eine Ausnahme sind alle bisher bekannten Mutanten rezessiv letal. Dies ist ein Hinweis für die essentielle Funktion dieses Locus. Es konnten 2 Mutationen isoliert werden, die homozygot bis zum 3. Larvenstadium lebensfähig sind, die *E(var)3-93D^{neo129}*- und *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutation. Alle anderen homozygoten Mutanten sind im 1. bis 2. Larvenstadium letal.

Die Insertion des *pUChsneory⁺*-Transposons bei der Mutation *E(var)3-93D^{neo129}* erfolgte im 3. Intron, 121 Basen nach dem 3. Exon (Dorn *et al.* 1993b). Durch Reverse Transkription mit anschließender PCR konnte ein abberantes Transkript identifiziert werden. Es setzt sich aus den ersten 3 Exonen, Sequenz des 3. Introns und 5'-Sequenzen des *pUChsneory⁺*-Transposons zusammen. Es wird ein im 5'-Bereich des Transposons lokalisiertes Polyadenylierungssignal genutzt (Schotta 1997, siehe auch Abb. 1). Dieses Transkript kodiert für ein verkürztes Protein, welches sich aus der BTB-Domäne und weiteren 9 Aminosäuren aus der Intronsequenz zusammensetzt. Die rezessive Letalität der *E(var)3-93D^{neo129}* Mutation konnte durch P-elementvermittelte Transformation des genomischen 7,5kb *Bam*H1-Fragmentes partiell gerettet werden, nicht aber die weibliche Sterilität (Dorn, persönliche Mitteilung). Im 7,5kb *Bam*H1-Fragment sind nur die ersten vier Exonen enthalten (siehe Abb. 1). Im Gegensatz zu dem putativen Protein, welches für die *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutation postuliert wurde, könnte dieses Protein neben der BTB-Domäne eine Kernlokalisationssequenz besitzen. Es fehlen aber die proximal gelegenen Exonen, die für die spezifischen C-terminalen Bereiche der E(VAR)3-93D-Proteine kodieren. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die Proteinexpression in *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutanten, vor allem im Hinblick auf die weibliche Sterilität, analysiert werden. Auch sollte untersucht werden, wieso eine Rettung der rezessiven Letalität, aber nicht der Sterilität homozygoter *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutanten bei 18°C und 25°C durch das genomische 7,5kb *Bam*HI-Fragment erfolgen kann.

Die Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* wurde auch nach Insertionsmutagenese durch ein modifiziertes P-Element, das *Icarus-neo*-Element (Steller und Pirotta 1986), erhalten. Da aber in der induzierten Mutante keine Transposition des zu mobilisierenden *Icarus-neo*-Elementes nachgewiesen werden konnte (Dorn, persönliche Mitteilung), sollten die zu beobachtenden Mutantenphänotypen eine andere Ursache besitzen. Im Northernblot konnte bei heterozygoten Mutanten neben den 2,3 und 2,0kb Transkripten noch ein verkürztes Transkript mit einer Größe von 1,0kb detektiert werden (Dorn, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit sollte die molekulare und immunozytologische Analyse dieser Mutante erfolgen.

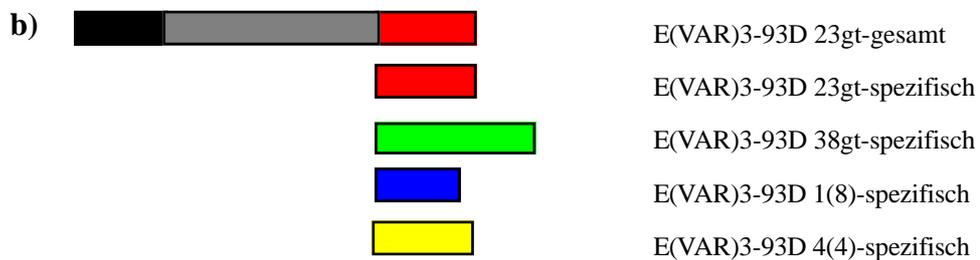
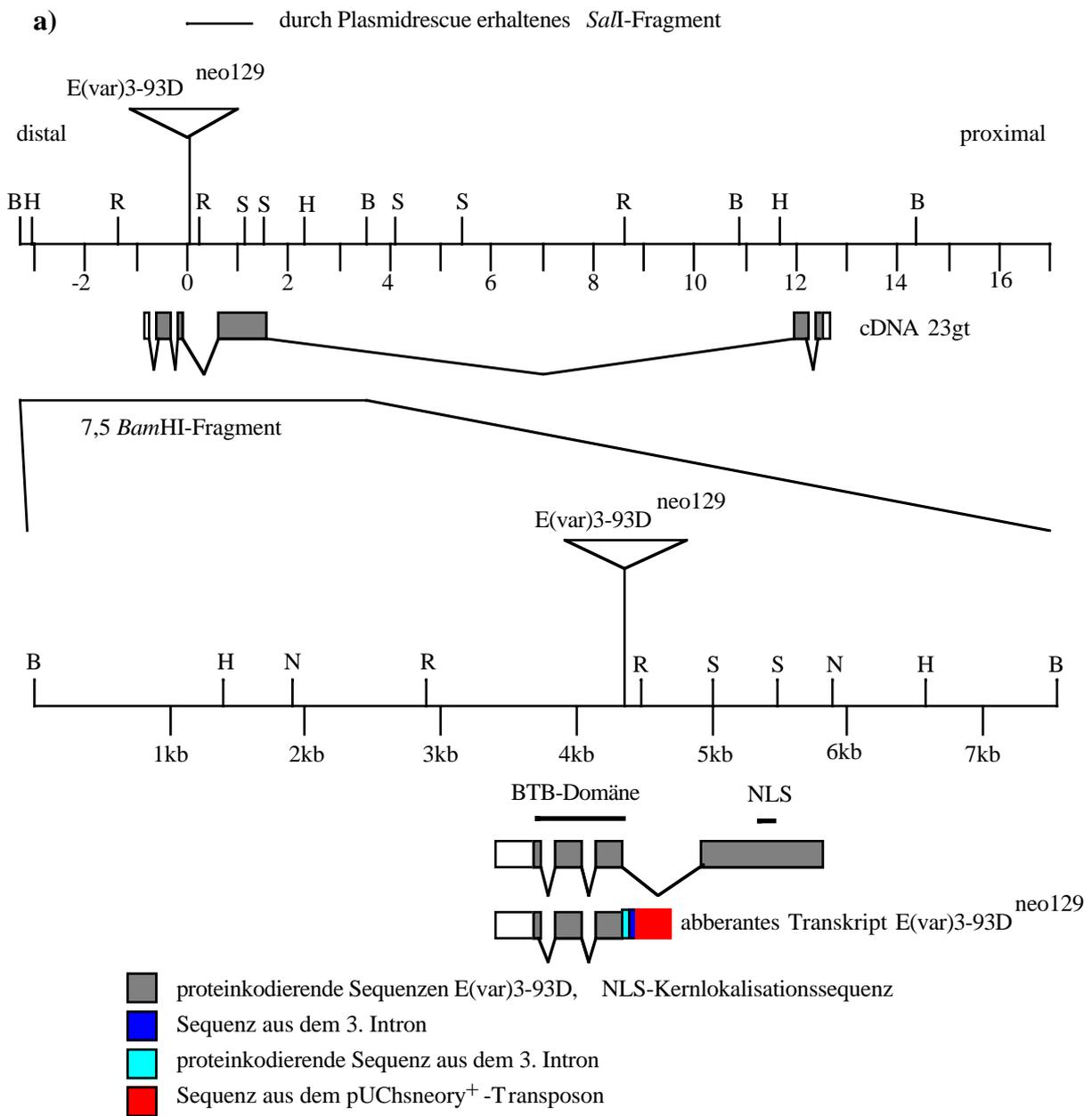


Abb. 1: Die genomische Region des E(var)3-93D-Locus (Dorn et al. 1993b, Schotta 1997) und die E(VAR)3-93D-Proteine:

- a) Dargestellt wurde die Exon-Intronstruktur, sowie Insertionsort und resultierendes abberantes Transkript für die insertionelle Mutante E(var)3-93D^{neo129}.
- b) Gegen die dargestellten E(VAR)3-93D-Proteine wurden Antikörper induziert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Anzucht und Haltung der Fliegen

Die Anzucht und Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgte auf einem Standardmedium (1% Agar, 2,5% Sirup, 3,5% Rosinen, 3% Grieß und 5% Hefe), dem zur Vermeidung von Schimmelbildung 0,1% Nipagin zugesetzt wurde. Die Haltung der Stämme erfolgte bei 18°C, Kreuzungen wurden bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt.

Für Eiablagen (Präparation von Proteinextrakten, zytologische Methoden) wurde ein spezielles Nährmedium, das sich aus 2% Agar, 10% Zucker, 0,1% Essigsäure und 2,25% Nipagin zusammensetzt, verwendet. Zur Stimulation der Eiablage der Weibchen wurde Hefe auf die Platten gegeben.

2.2. Charakterisierung der untersuchten Mutanten

Mutante	Bemerkung	Referenz
<i>E(var)3-93D^{neo129}</i>	<i>pUChsneory⁺</i> -Insertion im 3. Intron von <i>E(var)3-93D</i>	Dorn <i>et al.</i> 1993b, Schotta 1997
<i>E(var)3-93D⁷¹⁻⁴</i>	als spontane Mutation infolge der Mobilisation des <i>Icarus neo</i> -Elementes entstanden	Dorn <i>et al.</i> 1993a; Reuter, Dorn, persönliche Mitteilung
<i>E(var)3-93D^{neo129}, w⁺(7,5 BamHI)</i>	trägt auf dem 2. Chromosom das 7,5kb <i>BamHI</i> -Fragment, was die ersten 4 Exonen des <i>E(var)3-93D</i> -Gens enthält (siehe Abb. 1), das <i>white</i> -Gen dient als Marker	Dorn, persönliche Mitteilung

2.3. Verwendete Stabilisierungschromosomen

Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Stabilisierungschromosomen für das 3. Chromosom kann Lindsley und Zimm (1992) entnommen werden.

Stabilisierungs- chromosom	Mutationen	Phänotyp
TM3,Sb Ser	<i>Sb</i> <i>Ser</i>	<i>Stubble</i> - verkürzte Borsten <i>Serate</i> - gekerbte Flügelspitzen
TM6B	<i>Tb</i>	<i>Tubby</i> - Körper von Larven, Puppen, Adulten verkürzt und verdickt

2.4. Verwendete Bakterienstämme, Plasmide, Phagen, Oligonukleotide

2.4.1. Bakterienstämme (*E.coli*)

Bakterienstamm	Genetische Marker	Referenz
DH5 α	supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Gibco/BRL (1987)
XL-1Blue MRA	Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac ^c	Jerpseth <i>et al.</i> 1993
JM 101	supE thi Δ (lac-proAB) F ^c (traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZ Δ M15)	Yanisch-Perron; Viera; Messing (1985)

2.4.2. Plasmide

Der Plasmidvektor pBluescript II KS (Stratagene) wurde zum Subklonieren verwendet. Für die Expression der rekombinanten Proteine wurde der Expressionsvektor pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt.

Das Plasmid pGST-23gts, welches den spezifischen 3'-Bereich des cDNA-Klons 23gt im Expressionsvektor pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech) enthält (Büchner 1994), wurde für die Proteinexpression verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende weitere Plasmide über PCR-Klonierung der entsprechenden cDNA-Abschnitte in den Vektor pGEX-2T konstruiert:

pGST-1(8)s: enthält die spezifische proteinkodierende 3`-Region des cDNA-Klons 1(8) (siehe Abb. 2).

pGST-4(4)s: enthält die spezifische proteinkodierende 3`-Region des cDNA-Klons 4(4), der identisch mit *Doom* ist (Harvey *et al.* 1997). Diese wurde mit den Primern 4(4) forward-*Bam*HI und 4(4) back-*Bam*HI amplifiziert (siehe 2.4.4.).

pGST-BTB: enthält den Teil des offenen Leserahmens des cDNA-Klons *E(var)3-93D-23gt*, der für die BTB-Domäne kodiert (siehe Abb. 1). Die Amplifikation erfolgte mit den Primern 129 forward-*Bam*HI und 129 back-*Bam*HI (siehe 2.4.4.)

```

V V L A N D E V P N P E D V L V F F T Q      60
GTTGTTCTGGCCAACGACGAGGTGCCCAATCCGGAAGATGTGCTGGTCTTCTTTACGCAA

S L R G R P A I M A N G I R F L I M S E      120
TCGCTGCGCGGTGCCCCGCCATCATGGCCAATGGCATTGCTTTCTGATCATGAGCGAG

N K K K I L W R C S S M A T K K L K C P      180
AACAAAAGAAGATCCTGTGGCGATGCAGCTCGATGGCCACCAAGAAGCTCAAGTGTCTCT

A R I T M L K E T P P K F I I N K A E H      240
GCACGCATCACCATGTTAAAGGAGACGCCGCTAAGTTCATCATCAACAAGGCGGAGCAC

L H A E L K R N K Y S S S K A Q T L R D      300
CTGCACGCCGAGCTCAAGCGGAACAAGTACAGCTCCAGCAAGGCGCAAACGCTGAGGGAT

P H Q M A T K L D C E M E G A G G V T F      360
CCGCACCAAATGGCCACCAAATTGGACTGCGAGATGGAGGGAGCTGGCGGCGTACAGTTC

D L H E E E L N E L T H D V                  402
GATCTGCACGAGGAGGAGCTCAATGAACTTACTCACGAGTTC

```

Abb. 2: Darstellung der DNA- und der daraus resultierenden Proteinsequenz im Bereich des offenen Leserahmens des spezifischen Teils des cDNA-Klons 1(8) (Dorn und Roth, persönliche Mitteilung). Diese wurde mit den Primern 1(8)forward-*Bg*III und 1(8)back-*Bg*III amplifiziert (siehe 2.4.4.)

Für die molekulare Analyse der Mutation *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* wurden folgende Plasmide durch Subklonierung von rekombinanten Phagenfragmenten in den Vektor pBluescript II KS (Stratagene) konstruiert:

- pBS-6,3X: enthält das 6,3kb *Xba*I-Fragment des rekombinanten Phagen 2
- pBS-7,5X: enthält das 7,5kb *Xba*I-Fragment des rekombinanten Phagen 2
- pBS-2,4X: enthält das 2,4kb *Xba*I-Fragment des rekombinanten Phagen 2
- pBS-2,5N: enthält das 2,5kb *Nsi*I-Fragment des rekombinanten Phagen 2
- pBS-3,3N: enthält das 3,3kb *Nsi*I-Fragment des rekombinanten Phagen 2
- pBS-3,5N: enthält das 3,5kb *Nsi*I-Fragment des rekombinanten Phagen 2
- pBS-2,3N: enthält das 2,3kb *Nsi*I-Fragment des rekombinanten Phagen 2

2.4.3. Verwendete Phagenstämme

Für die Herstellung einer rekombinanten genomischen Phagenbank wurde der Stamm λ -DASH[®] II (Stratagene) verwendet.

2.4.4. Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden bei MWG Biotech. synthetisiert.

Primer für die Konstruktion der Expressionsvektoren:

1(8) forward- <i>Bgl</i> III	5'-ACA <u>AGATCT</u> GTTGTTCTGGCCAACG-3'
1(8) back- <i>Bgl</i> III	5'-ACA <u>AGATCT</u> ACGTCGTGAGTAAGTTC-3'
4(4) forward- <i>Bam</i> HI	5'-AC <u>AGGATCC</u> GATTTAGGTGAACTCAA-3'
4(4)back- <i>Bam</i> HI	5'-AC <u>AGGATCC</u> AAATGGTTGTGAACGCC-3'
129 forward- <i>Bam</i> HI	5'-AC <u>AGGATCC</u> ATGGCGGACGACGAGCAAT-3'
129 back- <i>Bam</i> HI	5'-AC <u>AGGATCC</u> ATCCGTTAGCCCCCTTGATTTG-3'

Die durch die PCR-Primer eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

Primer für PCR- und Sequenzanalysen der Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*:

1 forward	5'-TTGCCATCGCCAGCAATCTC-3'
1 back	5'-TCGTGTTGAAGTTGTTCCAGCAC-3'
2 forward	5'-GCAATTCAGCTTGTGCTGGAAC-3'
2 back	5'-CCCCTTGATTTGCAGCGATTC-3'
3 forward	5'-GGAATCGCTGCAAATCAAGGG-3'
3 back	5'-TTCCGATGCCTGTTTCTTTAGG-3'
4 forward	5'-CCTAAAGAAACAGGCATCGGAAC-3'
4 back	5'-TCGTCCACGGTCTCGATCTTGTA-3'
5 forward	5'-ACAAGATCGAGACCGTGGAC-3'
5 back	5'-TGGGCAGAGCGTTTGTGTTG-3'
6 forward	5'-CGACAAACAAACGCTCTGCC-3'
6 back	5'-TGTAGTTCTGGGACTGTTGCTTGAC-3'
7 forward	5'-CAGGAGGAAGCCGAGTACATTG-3'
7 back	5'-ATTAACGCACTTTGCCGAATC-3'
Oligo-dT	5'-ACAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
KSmod.	5'-CGAGGTCGACGGTATCGATAAGC-3'
M13mod.	5'-GTAAAACGACGGCCAGTAGCG-3'
Pr.42-4	5'-TATGGCGTGATGCATTGGAGCC-3'
MP42-882	5'-TACTTTGAACTACTGCCCAAACG-3'
Pr.42KS-452	5'-CGCCTGGAAATCCCTCTTAAGTC-3'
Pr.42-3	5'-CACACGCAGCGACGTTTTGTCCGCG-3'

Zur Durchführung der PCR wurden jeweils die forward- und back-Primer gepaart eingesetzt (PP1: Primer 1 forward + Primer 1 back).

2.5. Bakterien-Nährmedien, Bakteriophagenmedien

LB-Medium (Sigma)	Bactotrypton	10,0g/l
	Bacto Yeast Extrakt	5,0g/l
	NaCl	5,0g/l
LB-Agar (Sigma)	Bactotrypton	10,0g/l
	Bacto Yeast Extrakt	5,0g/l
	NaCl	5,0g/l
	Agar	12g/l

SOC-Medium	Bactotrypton	2%
	Bacto Yeast Extract	0,5%
	NaCl	10mM
	KCl	2,5mM
	MgSO ₄	10mM
	MgCl ₂	10mM
	Glucose	20mM
Topagar	NaCl	5,0g/l
	Bactotrypton	10,0g/l
	Bacto Yeast Extrakt	5,0g/l
	MgSO ₄	0,1g/l
	Agar	7g/l
SM-Puffer	NaCl	100mM
	MgSO ₄	10mM
	Tris-HCl pH 7,5	50mM
	Gelatine	0,01%

2.6. Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

2.6.1. Isolierung genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster*

Zur Isolierung genomischer DNA für die rekombinante Phagenbibliothek wurde die Methode nach Jowett (1986) angewendet und wie folgt modifiziert.

0,5 bis 1 g adulte Fliegen wurden in flüssigem Stickstoff homogenisiert, in 3ml Extraktionspuffer mit ProteinaseK (100µg/ml) überführt und bei 37°C für 30 Minuten bis 1 Stunde inkubiert.

Extraktionspuffer: 0,1M Tris-HCl pH 7,0; 0,3M NaCl; 20mM EDTA;
1% SDS

Das Lysat wurde mit 1 Volumen Phenol unter leichtem Schütteln extrahiert und die Phasen durch Zentrifugation bei 3000x g und 4°C getrennt. Die wäßrige Oberphase wurde abgenommen und nacheinander 2x mit 0,5 Volumen Phenol/0,5 Volumen Chloroform, danach 2x mit 1 Volumen Chloroform extrahiert und zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA aus der wäßrigen Oberphase nach Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaCl mit 2,5 Volumen 96%igem Ethanol bei Raumtemperatur gefällt und 10 Minuten bei 4000x g sedimentiert. Nach Waschen mit 70%igem Ethanol wurde die DNA getrocknet und über Nacht in 0,5-2ml 1x TE bei 4°C gelöst.

1x TE: 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0

Nach dem Lösen erfolgte eine RNaseA-Behandlung für 20 Minuten bei 37°C (Endkonzentration 50µg/ml). Danach wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 10x ProteinaseK-Puffer sowie ProteinaseK mit einer Endkonzentration von 100µg/ml für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

10x ProteinaseK-Puffer: 0,5M Tris-HCl ; 100mM EDTA pH 8,0;
5% SDS

Die DNA wurde erneut mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt, gewaschen und in 50-100µl 1x TE aufgenommen.

Zur DNA-Präparation für Southernblots und PCR wurden 100 Fliegen zu 2ml Extraktionspuffer gegeben, im Dounce-Homogenisator homogenisiert und für 30 Minuten bei 65-70°C inkubiert.

Extraktionspuffer: 0,2M Saccharose; 0,1M Tris-HCl pH 9,2; 0,1M NaCl, 0,05M
EDTA; 0,5% SDS

Es wurden 300µl 8M Natriumacetat pH 10,0 zugegeben und das Homogenat für 30 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 10,000x g wurde die DNA aus dem Überstand durch Zugabe von 1 Volumen 96% Ethanol gefällt. Die DNA wurde für 30 Minuten bei 4000x g und 4°C abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, in ca. 500µl 1xTE aufgenommen und über Nacht gelöst. Danach erfolgte eine RNaseA-Behandlung analog der Präparationsmethode nach Jowett.

2.6.2. Extraktion von Plasmid-DNA

Minipräparation von Plasmid-DNA

Die modifizierte Methode nach Birnboim und Doly (1983) erlaubt eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.

1,5ml einer Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfröhrchen für 2 Minuten bei 6000x g sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 200µl P1-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 200µl P2-Puffer lysiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200µl P3-Puffer zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Rezepturen für die Puffer P1-P3 wurden dem "Qiagen-Plasmid-Kit" (Qiagen) entnommen.

P1-Puffer: 50mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA

P2-Puffer: 200mM NaOH; 1% SDS

P3-Puffer: 3M Kaliumacetat pH 4,8

Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 10,000x g wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit 4,5ml Isopropanol gefällt, mit 70% igem Ethanol gewaschen und in 40µl 1xTE aufgenommen.

Großpräparation von Plasmid-DNA

100ml LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml für pBluescript II KS Plasmide, 50µg/ml für pGEX-2T Plasmide) wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 250rpm auf einem Schüttler kultiviert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte unter Nutzung des "Qiagen-Plasmid-Kits" (Qiagen). Die isolierte DNA-Menge betrug ca. 100µg.

2.6.3. DNA-Präparation aus λ-Phagen

Für die Präparation von Bakteriophagen-DNA wurde die Methode nach Maniatis *et al.* (1989) angewendet und wie folgt modifiziert.

Die Übernachtskultur des *E.coli*-Stammes XL-1Blue MRA wurde sedimentiert, die Zellen in SM-Puffer resuspendiert und die optische Dichte bei 600nm bestimmt (1 OD=8x10⁸ Zellen). Zu 10⁹ *E. coli*-Zellen wurden 5x10⁶ λ-Phagen gegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 8ml Topagar wurde der Ansatz auf Petrischalen (Durchmesser 15cm) mit LB-Agar ausplattiert. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Phagen-DNA aus dem Plattenlysat präpariert. Dazu wurden 10ml SM-Puffer in die Petrischalen gegeben und die Phagen unter Schütteln für 3 Stunden eluiert. Danach erfolgte eine 30-minütige Behandlung des Phageneluates mit DNase und RNase bei einer Endkonzentration von jeweils 1µg/ml. Nachfolgend wurde NaCl zu einer Endkonzentration von 1M zugesetzt, eine Stunde auf Eis inkubiert und die Bakterienzellrückstände durch 10-minütige Zentrifugation bei 5000x g und 4°C sedimentiert. Aus dem Überstand wurden die Phagenpartikel durch Zugabe von PEG 6000 (Endkonzentration 10%) bei 4°C für 1-2 Stunden gefällt. Die Sedimentation der Phagenpartikel erfolgte durch 30-minütige Zentrifugation bei 5000x g und 4°C. Das Sediment wurde in 2ml SM-Puffer resuspendiert und mehrmals mit einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Die Phagenpartikel wurden nach Zugabe von EDTA pH 8,0 (Endkonzentration 20mM), ProteinaseK (Endkonzentration 50µg/ml) und SDS (Endkonzentration 0,5%) für 1 Stunde bei 37°C aufgeschlossen. Die DNA wurde einmal mit dem gleichen Volumen Phenol, zweimal mit einem Volumen Phenol-Chloroformgemisch (1:1) und zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Die Phasen wurden jeweils durch 10 Minuten Zentrifugation bei 5000x g getrennt. Gefällt wurde die DNA nach Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaCl mit 2,5 Volumen 96%igem Ethanol. Nach Sedimentation (30 Minuten, 5000x g, 4°C) wurde die DNA einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen 1x TE aufgenommen.

2.6.4. DNA-Restriktionsanalyse

Die Restriktion erfolgte mit den entsprechenden Enzymen und Puffern nach Angaben des Herstellers (Gibco BRL, MBI Fermentas) bis zur vollständigen Spaltung der DNA.

2.6.5. DNA-Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,4-2%igen Agarosegelen. Den DNA-Proben wurde zuvor 0,2 Volumen Ladepuffer zugesetzt.

Ladepuffer: 50% Glycerol, 1mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau

Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TBE verwendet.

1x TBE: 90mM Tris-Borat, 20mM EDTA

Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 20 bis 100V. Die Gele enthielten Ethidiumbromid (0,1µg/ml).

2.6.6. Phosphatasebehandlung von DNA

Für die Behandlung von DNA mit Alkalischer Phosphatase wurde 30 Minuten vor Beendigung der Restriktion 1U Shrimp Alkalische Phosphatase (Amersham Pharmacia Biotech) zugegeben. Im Falle von hitzeinaktivierbaren Restriktionsenzymen erfolgte eine Inaktivierung des Ansatzes für 15 Minuten bei 65°C.

2.6.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen aufgetrennt und die jeweiligen Banden unter UV-Licht so knapp wie möglich ausgeschnitten.

Die weitere Verarbeitung erfolgte unter Verwendung eines "DNA-Extraktions-Kit" (Qiaex) nach Angaben des Herstellers (Qiagen).

2.6.8. Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde für 2-3 Stunden bei 14-16°C mit T4-DNA-Ligase (nach Sambrooke *et al.* 1989) nach folgendem Ansatz durchgeführt:

xµl Vektor-DNA (ca. 100ng)
yµl Donor-DNA (ca. 300-900ng)
2µl 10x Ligationspuffer (Gibco BRL)
2µl 10mM dATP
1U T4-DNA-Ligase (Gibco BRL)
ad. 20µl mit Aqua bidest.

2.6.9. *E.coli*-Transformation

Die Präparation kompetenter Zellen der Bakterienstämme JM101 und DH5α unter Verwendung von CaCl₂ erfolgte nach dem Protokoll von Sambrooke *et al.* 1989. Es konnten Transformationsraten von 10⁵-10⁶/µg Plasmid-DNA erreicht werden. Die kompetenten Zellen wurden bei -70°C gelagert.

Zu 200µl kompetenten Zellen wurden entweder 10ng Plasmid-DNA oder 10µl Ligationsansatz gegeben und die Transformationsansätze 40 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C und nachfolgenden 2 Minuten Abkühlung im Eisbad wurden 800µl SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien zur Ausprägung der Ampicillinresistenz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Die Ampicillinkonzentration im Medium hing dabei von den verwendeten Vektoren ab.

pBluescript II KS	100µg/ml
pGEX-2T	50µg/ml

Bei der Verwendung von pBluescript II KS wurde der Transformationsansatz zur Selektion rekombinanter Plasmide zusätzlich auf LB-Agarplatten mit X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside)-Platten ausplattiert (50µl einer X-Gal-Stammlösung von 10mg/ml in DMF pro Platte).

2.6.10. PCR

Amplifikation von DNA

Die *in vitro* Amplifikation von DNA erfolgte durch Polymerasekettenreaktion (PCR) nach Saiki *et al.* (1988) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

xµl DNA (100ng genomische DNA bzw. 1ng Plasmid-DNA oder entsprechend
100pfu Phagenpartikel)
2µl Primer forward (10pmol/µl)
2µl Primer back (10pmol/µl)
5µl PCR-Puffer (Gibco BRL)
1,5µl MgCl₂ (50mM)
4µl dNTPs (2,5mM Amersham Pharmacia Biotech)
1U Taq-Polymerase (Gibco BRL) oder Pfu-Polymerase (Stratagene)
auf 50µl mit Aqua bidest.

Denaturierung des Templates	95°C: 5 Minuten
Synthesezyklen (30)	95°C: 30 Sekunden Denaturierung 42-59°C: 1 Minute Primerannealing 72°C (Taq-Polymerase) oder 75°C (Pfu- Polymerase): 1-5 Minuten DNA-Synthese
Nachsynthese	72 bzw. 75°C: 10 Minuten

Die Synthesezeiten wurden aus der Prozessivität der entsprechenden Polymerase abgeleitet (Taq-Polymerase 30 Sekunden/kb, Pfu-Polymerase 2 Minuten/kb).

Für die Einführung von Restriktionsschnittstellen für die PCR-Klonierung der spezifischen 3'-Bereiche der cDNA-Klone 1(8) und 4(4) und der die BTB-Domäne kodierenden Exonen wurden im 5'-Bereich der jeweiligen Primer *Bam*HI- bzw. *Bgl*II-Schnittstellen und 3-4 weitere unspezifische Basen eingeführt.

RT-PCR

Spezifische Transkripte können durch RT-PCR amplifiziert und damit für weitere Analysen, wie deren Sequenzierung, zugänglich gemacht werden.

cDNA-Synthese: 100ng Poly(A⁺)-RNA
4µl 5x Reaktionspuffer (MBI Fermentas)
8µl dNTPs (2,5 mM, Amersham Pharmacia Biotech)
50pmol Oligo-dT-Primer oder 20pmol genspezifischer Primer
25U RNase-Inhibitor (MBI Fermentas)
30U M-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas)
auf 20µl mit Aqua bidest.

Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend für 5 Minuten bei 95°C inaktiviert. Für die Analyse der Mutation *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* erfolgte die Reverse Transkription unter Verwendung des Primers Oligo-dT (2.4.4.) Die nachfolgende PCR wurde mit jeweils 2µl der erhaltenen cDNA unter Verwendung der Primer 2-forward und Oligo-dT durchgeführt.

2.6.11. Herstellung einer rekombinanten genomischen Phagenbibliothek

Von *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴/TM3*-Tieren wurde die DNA nach Jowett (2.6.1.) isoliert. 100µg DNA wurden mit der Restriktionsendonuclease *Sau3A* (Biolabs) durch partiellen Verdau in ca. 15-25kb große Fragmente gespalten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 Volumen Stopplösung zu 5 Volumen Reaktionsansatz und nachfolgender Inkubation für 10 Minuten bei 67°C abgestoppt.

Stopplösung: 0,25M EDTA; 0,5% SDS

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgte im 5-25%igen Saccharosegradienten für 4 Stunden bei 285,000x g (Rotor SW 65, Beckmann).

Saccharosegradient: Lösung 1 (5% Saccharose; 0,1M NaCl; 2mM EDTA; 2mM Tris-HCl pH 8,0)

Lösung 2 (25% Saccharose; 0,1M NaCl; 2mM EDTA; 2mM Tris-HCl pH 8,0)

beide Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 im Zentrifugenröhrchen überschichtet und 2 Stunden zur Ausbildung des Gradienten horizontal gelagert.

DNA-Fragmente in der Größe von 15-25kb wurden mit dem mit *Bam*HI vorverdauten Vektor λ DASH II[®] nach den Angaben des Herstellers (Stratagene) ligiert.

Die Verpackung der Phagen erfolgte mit dem "Gigapack[®] III XL Packaging Extract" (Stratagene) ebenfalls nach den Angaben des Herstellers.

2.6.12. Isolation rekombinanter λ -Phagen

Die rekombinanten Phagen wurden mit einer Dichte von 10,000-30,000 Plaques pro Petrischale (Durchmesser 15 cm) ausplattiert. Als Wirtsstamm für die Vermehrung der Phagen diente der *E.coli*-Stamm XL-1Blue MRA.

Der Transfer der Phagen-DNA auf Nitrocellulosefilter und deren Denaturierung erfolgte nach der von Benton und Davis (1977) beschriebenen Methode. Die DNA wurde durch UV-Crosslinking an die Filter gebunden. Die Filter wurden mit den jeweiligen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert, gewaschen (2.6.15.) und exponiert (2.6.16.). Die erhaltenen Signale wurden den entsprechenden Regionen auf den Originalplatten zugeordnet, die jeweiligen Plaques ausgestochen und in SM-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Phagen durch nochmaliges Ausplattieren vereinzelt (ca. 100 Plaques pro Petrischale mit einem Durchmesser von 10cm). Nach erneuter Herstellung von Filterabzügen und deren weiterer Behandlung wie vorhergehend beschrieben, konnten den Signalen Einzelplaques zugeordnet werden, von denen Bakteriophagen-DNA präpariert wurde.

2.6.13. Southern-Transfer von DNA

Der Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter nach Restriktionsverdau erfolgte nach der von Southern (1975) beschriebenen Methode (siehe auch Sambrooke *et al.* 1989).

Die DNA wurde durch UV-Crosslinking an die Filter fixiert.

2.6.14. Radioaktive Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung erfolgte mit ^{32}P -dATP nach der von Feinberg und Vogelstein (1983) beschriebenen Methode unter Verwendung von Hexanukleotiden als Primer (random priming) nach dem Protokoll des "Multiprime DNA-labelling systems" (Amersham Pharmacia Biotech). Die Abtrennung der markierten DNA von den freien Nukleotiden erfolgte im Anschluß an die Reaktion über eine Sephadex G-50 Säule. Die DNA-Sonden wurden durch 5 minütige Inkubation im kochenden Wasserbad denaturiert.

2.6.15. Hybridisierungs-und Waschbedingungen

Die Nitrocellulosefilter mit der immobilisierten DNA wurden für 3-4 Stunden bei 42°C in Hybridisierungslösung prähybridisiert.

Hybridisierungslösung:	50% Formamid; 5x SSC; 1% SDS;
	5x Denhardt-Puffer; 50mg/l Hefe-RNA
50x Denhardt-Puffer	2% Ficoll, 2% PVP, 2% BSA

Die radioaktiv markierte Sonde wurde zu 50ml Hybridisierungslösung gegeben und die Filter über Nacht bei 42°C in der Lösung inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Filter 2x15 Minuten in Waschlösung 1 und 2x15 Minuten in Waschlösung 2 bei 42°C gewaschen.

Waschlösung 1:	2x SSC; 0,1% SDS
Waschlösung 2:	0,2x SSC; 0,1% SDS
20x SSC	3M NaCl; 0,3M Natriumcitrat

2.6.16. Autoradiographie

Die Filter wurden nach Hybridisierung mit einer ³²P-markierten Sonde zwischen 2 Verstärkerfolien mit Röntgenfilm bei -70°C exponiert.

2.6.17. Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten

Die DNA-Sequenzierung wurde unter Anwendung des "ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing" Kits (Perkin Elmer) am ABI377 (Perkin Elmer) durchgeführt.

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden abhängig von der Plasmidgröße (4-10kb) 0,5-1µg DNA pro Reaktion eingesetzt. 100-250ng DNA wurden für eine Direktsequenzierung von PCR-Fragmenten verwendet.

2.6.18 Computergestützte Auswertung von Sequenzdaten

Die Auswertung von Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Programme "Mac Vector" und "PROSITE". Zur Feststellung von Sequenzhomologien zu anderen Sequenzen wurden die Programme "Blast" unter Nutzung der aktuellen Datenbanken und "BDGP Blast" unter Nutzung der Sequenzen des "Drosophila Genome Projects" (Rubin 1996) verwendet.

2.7. Isolierung und Charakterisierung von Proteinen

2.7.1. Expression der GST-Fusionsproteine in *E.coli*

Unter Verwendung des Expressionsvektors pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech) werden die rekombinanten Proteine als Fusionsproteine mit der GST (Glutathion-S-Transferase) von *Schistosoma japonicum* exprimiert (Smith und Johnson 1988).

Für analytische Ansätze wurden Einzelkolonien der mit den Expressionskonstrukten bzw. pGEX-2T transformierten JM101-Zellen über Nacht in LB-Medium mit 50µg/ml Ampicillin inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:100 mit 3ml frischem LB-Medium (50µg/ml Ampicillin) verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 kultiviert. Es wurde jeweils 1ml Kulturmedium abgenommen, die Zellen durch 2 Minuten Zentrifugation bei 6000x g sedimentiert und bei -20°C aufbewahrt. Die verbleibenden Kulturen wurden durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 0,5mM) induziert und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Je 1 Ansatz der Zellen mit rekombinanten Plasmiden sowie mit dem Vektorplasmid wurden nicht induziert. Die Bakterienzellen wurden nach Induktion sedimentiert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Induktion präparativer Ansätze erfolgte, wie für die analytischen Ansätze beschrieben, mit einem Endvolumen von 0,5-4l Medium.

2.7.2. Herstellung von Proteinextrakten aus *E.coli*

Die Zellen der analytischen Ansätze (2.7.1.) wurden in 100µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C inkubiert, bei 10,000x g abzentrifugiert und 10µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel (8x9cm) geladen.

2x SDS-Probenpuffer: 4% SDS; 120mM Tris-HCl pH 6,8; 20% Glycerol; 200mM DTT;
0,007% Bromphenolblau

Für die Aufarbeitung präparativer Ansätze wurden die Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) wie folgt modifiziert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 4000x g abzentrifugiert, mit eiskaltem 1x PBS gewaschen und bei -20°C aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 50µl PBS pro ml Kulturvolumen resuspendiert.

1x PBS: 137mM NaCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄; 2,7mM KCl

Die Zellen wurden an einem Ultraschallgerät (Bandelin Sonopuls GM 70) für je 4x 30s mit gepulstem Schall (70%) bei 42W aufgeschlossen.

Es wurde Triton-X100 mit einer Endkonzentration von 1% zugegeben und 30 Minuten bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 30 Minuten bei 8000x g abzentrifugiert.

Die Überstände wurden für die Reinigung der löslichen Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie und nachfolgende Thrombinspaltung verwendet, aus den Pellets wurden unlösliche Fusionsproteine über eine Harnstoffextraktion gereinigt.

2.7.3. Affinitätschromatographie von GST-Fusionsproteinen

Der GST-Anteil der exprimierten Fusionsproteine erlaubt unter nativen Bedingungen deren Reinigung über Affinitätschromatographie. Die Reinigung erfolgte über eine Glutathion-Sepharose-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) nach den Angaben des Herstellers. Es wurden für eine Aufreinigung jeweils 1-2ml Glutathion-Sepharose als Matrix eingesetzt.

2.7.4. Thrombinspaltung von GST-Fusionsproteinen

Mit der Protease Thrombin kann der GST- Anteil der Fusionsproteine abgespalten werden. Die Trennung von abgespaltener GST und dem zu exprimierenden Fusionsprotein erfolgt ebenfalls durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose.

Nach der Austestung der optimalen Bedingungen (Zeit, Temperatur, Thrombinkonzentration) für jedes Fusionsprotein wurden die löslichen Proteine des Überstandes (2.7.2.) im Batch-Verfahren nach den Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) an 1-2ml Bettvolumen Glutathion-Sepharose gebunden und mit der entsprechenden Menge Thrombin (5-10U/ ml Bettvolumen, Amersham Pharmacia Biotech) gespalten. Die zu exprimierenden Proteine befanden sich im Überstand und die GST sowie ungespaltenes Fusionsprotein wurden an die Matrix gebunden.

2.7.5. Harnstoffextraktion unlöslicher Fusionsproteine

Aus dem Pellet (2.7.2.) wurden die unlöslichen Fusionsproteine über eine Harnstoffextraktion gereinigt (modifiziert nach Küpper *et al.* 1982).

Lösungen: 0,5M EDTA, pH 8,0
 Lysozymstammlösung (20mg/ml)
 Triton-Lytic-Mix (0,1% Triton-X100; 50mM Tris-HCl pH 8,0;
 62,5mM EDTA)
 5% Triton-X100
 1M Harnstoff
 7M Harnstoff

Das Pellet (aus 500ml Originalkultur) wurde in 4ml 0,5M EDTA und 4ml Lysozymstammlösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mit einem Ultraschallgerät 4x15 Sekunden bei

42W beschallt, 10ml Triton-Lytic-Mix hinzugegeben, erneut beschallt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur und 8000x g abzentrifugiert und der Überstand als Ü1 verwahrt. Das verbliebene Pellet wurde in der Reihenfolge mit je 20 ml 5% Triton-X100, 1M Harnstoff und 7M Harnstoff versetzt, beschallt, inkubiert und zentrifugiert. Die entsprechenden Überstände (Ü2, Ü3, Ü4) wurden bei 4°C verwahrt. Die rekombinanten Proteine konnten in hoher Reinheit in der 7M- Harnstofffraktion nachgewiesen werden.

Durch eine schrittweise Dialyse der 7M-Harnstofffraktion über 4M Harnstoff in PBS, 2M Harnstoff in PBS und PBS wurde eine Renaturierung der Proteine durchgeführt.

2.7.6. Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Die gereinigten rekombinanten Proteine wurden für die Immunisierung von Kaninchen bzw. Mäusen verwendet. Pro Boost wurden für ein Kaninchen 100µg Protein und pro Maus 25µg Protein eingesetzt. Die Tiere wurden bei Eurogentec nach dem Standardprotokoll immunisiert. Bei Prof. Saumweber (Humboldt-Universität Berlin) wurden je 2 Mäuse mit den Proteinen 23gt-gesamt und 38gt-spezifisch immunisiert.

2.7.7 Dechorionisierung von Drosophilaembryonen

Die Embryonen wurden mit einem Pinsel von den Platten abgesammelt und 3 mal in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen in eine 50%ige Natriumhypochloritlösung überführt und dort für ca. 1-3 Minuten inkubiert, um die Chorionschicht zu entfernen. Die Embryonen wurden danach 3 mal in PBS gewaschen.

2.7.8 Herstellung von Proteinextrakten aus *Drosophila melanogaster*

Denaturierte Extrakte

Tiere der entsprechenden Entwicklungsstadien (Embryonen, 3. Larvenstadium, Adulte) wurden in einer entsprechenden Menge 1x SDS-Probenpuffer homogenisiert, 5 Minuten bei 95°C inkubiert und die Überstände bei -20°C verwahrt.

Native Extrakte aus Embryonen (Tamkun, persönliche Mitteilung)

4g dechorionisierte Embryonen wurden in flüssigem Stickstoff im Mörser zerrieben, zu 4ml eiskaltem Embryonenextraktionspuffer im Dounce-Homogenisator gegeben und homogenisiert.

Embryonenextraktionspuffer: 50mM HEPES pH 7,6; 385mM NaCl; 0,1% Tween20;
0,1% EGTA; 1mM MgCl₂; je 1µg/ml Leupeptin, Pepstatin
und Aprotinin; 1mM PMSF

Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Die Extrakte wurden nach 15 Minuten Inkubation auf Eis für 1 Stunde bei 15,000x g abzentrifugiert. Nach erneuter Zentrifugation der Überstände wurde Glycerol mit einer Endkonzentration von 10% zugegeben, die Extrakte in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Präparation von Kernextrakten

Für die Präparation von Kernextrakten aus *Drosophila melanogaster* wurde die Methode von Elgin und Hood (1973) angewendet und wie folgt modifiziert.

Alle Schritte wurde bei 4°C ausgeführt. 2g dechorionisierte Embryonen wurden im Dounce-Homogenisator in 7,5ml PufferII homogenisiert und das Homogenat durch ein Nylonnetzchen mit einer Porengröße von 100µm filtriert.

PufferII: 0,05M Tris-maleat, 0,005M MgCl₂; 0,01M β-Mercaptoethanol; 0,1mM
PMSF pH 7,4

Das Homogenat wurde auf 2,5ml 0,2M Saccharose in PufferII gegeben und für 10 Minuten bei 2000x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in PufferII; PufferII+0,1% Triton-X100 und PufferII gewaschen und jeweils für 10 Minuten bei 2000x g abzentrifugiert. Die Kerne wurden in 17ml 0,2M Saccharose in PufferII resuspendiert und auf 19ml 2,2M Saccharoselösung in PufferIII geschichtet.

PufferIII 0,01M Tris-maleat; 0,005M MgCl₂; 0,01M β-Mercaptoethanol; 0,1mM
PMSF pH 7,4

Die Kerne wurden für 100 Minuten bei 85,000x g (Rotor SW27, Beckmann, 4°C) sedimentiert, 3x in PufferII gewaschen und in 0,5-1ml Saline/EDTA aufgenommen.

Saline/EDTA: 0,075M NaCl; 0,024M EDTA pH 8,0; 0,1mM PMSF

Ein Aliquot der Kernpräparation wurde in DAPI-Lösung (1mg DAPI/l 1x PBS) angefärbt und am Epifluoreszenzmikroskop wie unter 2.8.1. angegeben, beurteilt. Zur Kernsuspension wurde 1 Volumen 2x SDS-Probenpuffer zugegeben und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Extrakte wurden bei -20°C verwahrt.

2.7.9 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation wurden native Proteinextrakte aus Embryonen von *Drosophila melanogaster* (2.7.8) eingesetzt. Protein-A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) wurde in einem geeigneten Volumen Waschpuffer mit 20% Ethanol aufgenommen und bei 4°C verwahrt.

Waschpuffer: 50mM HEPES pH 7,6; 150mM NaCl; 7mM DTT; 10% Glycerol;
0,1% Tween20; 1mM PMSF

Vor Gebrauch wurde die Protein-A-Sepharose 2x mit 10 Volumen Waschpuffer gewaschen und in einem Volumen Waschpuffer resuspendiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Die Extrakte wurden bei 10,000x g 30 Minuten abzentrifugiert. Ca. 15mg Protein wurden für eine Immunopräzipitation eingesetzt. Zunächst wurden die Extrakte in 50mM HEPES pH 7,6; 192,5mM NaCl; 7mM DTT; 10% Glycerol; 0,1% Tween20; 1mM PMSF an 10 µl 50% Protein-A Sepharose für 1 Stunde präadsorbiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 10,000x g wurde zu den Überständen ca. 1µg Antikörper gegeben und für 2 Stunden inkubiert. Danach wurde den Ansätzen zur Bindung der gebildeten Immunkomplexe 50µl 50% Protein-A-Sepharose zugesetzt und für weitere 2 Stunden inkubiert. Die Protein-A-Sepharose wurde 4x 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Die gebundenen Immunkomplexe wurden nach Zugabe von 30µl 2x SDS-Probenpuffer für 10 Minuten bei 95°C eluiert.

2.7.10 Elektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5%, im Trenngel 8-15%. Die Elektrophorese wurde in 1x Laufpuffer bei 20mA für ein Minigel (8x9cm) oder 40mA für ein 14x12cm Gel durchgeführt.

1x Laufpuffer: 192mM Glycin; 25mM Tris; 0,1% SDS

Als Molekulargewichtsstandard wurden entweder ein Gemisch aus "protein test mixture 4" und "protein test mixture 5" (Serva) für die Coomassiefärbung des Gels oder vorgefärbter Proteinstandard (Sigma) für einen nachfolgenden Westernblot des Gels verwendet.

2.7.11 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Proteingele in Coomassielösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln gefärbt.

Coomassielösung: 0,1% Coomassie Brilliant Blue R250 in 25% Isopropanol und
10% Essigsäure

Die Gele wurden in Aqua bidest. für 20 Minuten bei 750W in einer Mikrowelle entfärbt.

2.7.12 Nachweis von Proteinen im Westernblot

Die Proteine wurden im Anschluß an die Elektrophorese auf eine PVDF-Membran (Millipore) durch Elektro-Tank-Transfer bei 600mA und 4°C für 2,5-3 Stunden transferiert.

Blotpuffer: 192mM Glycin; 25mM Tris; 10-20% Methanol

Zur Kontrolle der Effizienz des Transfers wurden auf der Membran die Proteine mit Ponceau-S-Lösung für 10 Minuten angefärbt und mit Wasser entfärbt.

10x Ponceau-S-Lösung: 2% Ponceau S ; 30% Trichloressigsäure;
30% Sulfosalicylsäure

Die Membran wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver (Biorad) in PBS geblockt. Im Anschluß daran wurden die primären Antikörper in 5% Milchpulver oder 3% BSA in PBS verdünnt zugegeben und entweder 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x 10 Minuten Waschen in PBST wurden die entsprechenden sekundären Antikörper 1:5000 in 5% Milchpulver verdünnt zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

PBST: 1x PBS; 0,1% Tween20
sekundäre Antikörper (Dianova): Goat-Anti mouse-Alkalische Phosphatase (1:5000)
Goat-Anti rabbit-Alkalische Phosphatase (1:5000)
Goat-Anti mouse-Peroxidase (1:5000)
Goat-Anti rabbit-Peroxidase (1:5000)

Die Membran wurde 3x 10 Minuten in PBST gewaschen.

Die Detektion Alkalischer Phosphatase-gekoppelter Antikörper erfolgte nach 2x Waschen mit AP-Puffer colorimetrisch mit NBT/BCIP als Substrat.

AP-Puffer: 100mM NaCl; 100mM Tris-HCl; 5mM MgCl₂, pH 9,5
AP-Färbelösung: 66µl NBT-Lösung (50mg/ml NBT in 70% DMF); 33µl BCIP-Lösung(50mg/ml in DMF); 10ml AP-Puffer

Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 20mM EDTA in PBS abgestoppt.

Die Detektion Peroxidase-gekoppelter Antikörper erfolgte nach dem "ECL"-System (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers.

2.7.13 Aufreinigung von Antikörpern über Affinitätschromatographie

Die polyklonalen Antiseren gegen die Proteine E(VAR)3-93D-23gt gesamt und E(VAR)3-93D-23gt spezifisch wurden über Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt, um unspezifisch reagierende Antikörper zu entfernen und Antikörper, die gegen die BTB-Domäne gerichtet sind, anzureichern. Für die Aufreinigung des Antikörpers Anti-23gt-gesamt wurde das BTB-Domänenprotein nach Überexpression in *E.coli*, Aufreinigung des GST-Fusionsproteins und Thrombinspaltung kovalent an NHS (N-hydroxysuccinimide)-Sephrose (Amersham Pharmacia Biotech) gebunden. Es wurde eine Säule mit 1ml Bettvolumen verwendet und 500µg rekombinantes Protein nach den Angaben des Herstellers für 4 Stunden bei 4°C mit 92%iger Kopplungseffizienz gebunden. Analog wurden für die Aufreinigung des Antikörpers Anti-23gt-spezifisch 2mg rekombinantes Protein E(VAR)3-93D-23gt-spezifisch kovalent gebunden.

Die NHS-Proteinsäulen wurden mit 3ml Startpuffer, 6ml Elutionspuffer und nochmals 6ml Startpuffer gewaschen.

Startpuffer: 0,05M Tris-HCl; 0,5M NaCl pH 8,0

Elutionspuffer: 0,05M Glycin; 0,5M NaCl pH 2,7

Je 5ml der entsprechenden Antiseren wurden mit einer Flußrate von ca. 0,5ml pro Minute über die Säule gegeben. Nach 5-maligem Waschen der Säule mit je 2 Bettvolumen Startpuffer wurden die spezifisch gebundenen Antikörper mit 4x 3ml Elutionspuffer eluiert und sofort mit 0,1 Volumen Tris-HCl pH 9,0 neutralisiert. Die Säule wurde mit 5 Volumen Storage-Puffer gewaschen und bei 4°C verwahrt.

Storage-Puffer: 0,05M Natriumphosphat pH 7,0; 0,01% Natriumacid

2.7.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des "Coomassie Plus Protein Assay Reagent" (Pierce) nach Angaben des Herstellers.

2.8. Immunozytologische Methoden

2.8.1. Antikörpermarkierung von Ovarien von *Drosophila melanogaster*

Einbettung der Ovarien

Die Ovarien adulter Weibchen wurden in Fixierlösung präpariert und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Fixierlösung: 3% Paraformaldehyd; 0,1% Triton-X100 in PBS

Nach 2x 15 Minuten Waschen in PBS wurden die Ovarien für mindestens je 30 Minuten in 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 90% und 100% Ethanol dehydriert. Es wurde erneut 100%iger Ethanol zugegeben und alle weiteren Schritte bei 55°C durchgeführt. Danach erfolgte eine Infiltration des Materials mit Polyethylenglycol (PEG), welches sich aus PEG 1500 und PEG 4000 im Verhältnis von 2:1 zusammensetzte. Es wurden dafür folgende PEG/Ethanolgemische verwendet: PEG/Ethanol 1:3 1 Stunde; PEG/Ethanol 1:1 1 Stunde; PEG/Ethanol 3:1 1,5 Stunden; 100% PEG 2 Stunden. Im Anschluß daran wurden die Ovarien mit PEG in eine Einbettform überführt und nach dem Erstarren bis zum Schneiden bei 4°C aufbewahrt.

Beschichtung von Objektträgern mit Poly-L-Lysin

Die Objektträger wurden für mindestens 30 Minuten in 96% Ethanol eingeweicht, geputzt, mit 0,1%iger Poly-L-Lysinlösung überschichtet und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 3x 5 Minuten in Aqua bidest. gewaschen und luftgetrocknet.

Anfertigung von Semidünnschnitten

Am Rotationsmikrotom HM 335 (Microm) wurden 2µm Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit einer Öse aufgenommen, die vorher in eine 40%ige PEG 6000- Lösung in PBS getaucht wurde und auf die mit Poly-L-Lysin behandelten Objektträger gebracht. Die Objektträger wurden anschließend in eine Färbeküvette mit 1x PBS gestellt.

Immunmarkierung der Schnitte

Die Objektträger wurden für je 5 Minuten in 0,1M Ammoniumchloridlösung und 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten in 1% BSA in PBS inkubiert, 5 Minuten mit 0,1% BSA in PBS gewaschen, der primäre Antikörper in 1% BSA verdünnt in PBS zugegeben und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 4x 10 Minuten Waschen in 0,1% BSA in PBS wurde der mit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) markierte sekundäre Antikörper (Dianova) 1:50 verdünnt in 1% BSA in PBS zugegeben und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 4x 10 Minuten in PBS gewaschen und für 15 Minuten mit DAPI-Lösung gefärbt.

DAPI-Lösung 1mg DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylindol) pro Liter in PBS

Nach 2x 10 Minuten Waschen in PBS wurden die Schnitte mit Citifluor (Citifluor Ltd., London) eingeschlossen.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit dem Epifluoreszenzmikroskop "Axioskop" (Carl-Zeiss) für die einzelnen Fluorochrome mit folgenden Filtern:

DAPI BP 365nm / FT 395nm / LP 397nm;

FITC BP 470-490nm / FT 510nm / LP 520nm.

2.8.2. Antikörperfärbung von Polyänchromosomen

Es wurde die Methode nach Silver und Elgin (1978) verwendet und wie folgt modifiziert.

Aus Drosophilalarven (3. Larvenstadium) wurden Speicheldrüsen auf einem silikonisierten Objektträger in 0,7% NaCl-Lösung präpariert, in einen Tropfen Quetschlösung transferiert und darin für 10 Minuten inkubiert.

Quetschlösung: 45% Essigsäure; 1,85% Formaldehyd

Danach wurden die Drüsen in 15µl Quetschlösung auf ein silikonisiertes Deckglas gegeben, mit einem Objektträger aufgenommen und die Chromosomen gespreitet. Die Präparate wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, das Deckglas abgesprengt und in 1x TBS bis zur Antikörpermarkierung bei 4°C verwahrt.

1x TBS: 10mM Tris-HCl pH 7,15; 150mM NaCl

Die Antikörpermarkierung erfolgte nach Silver und Elgin (1978) mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern. Als positive Kontrolle für die Färbungen homozygoter Mutanten wurden die Antikörper Anti-HistonHI (Prof. Grossbach, Georg-August-Universität Göttingen) und Anti-Prod (Proliferation disrupter, Török *et al.* 1997) eingesetzt. Für die Auswertung am Epifluoreszenzmikroskop wurden für die einzelnen Fluorochrome folgende Filter verwendet:

FITC und DAPI siehe 2.8.1.

Texas Red BP 546 / FT 580 / LP 590

Doppelmarkierung FITC und Texas red 485; 578 / FT 500; 600 / 515-540; LP 610

Die Dokumentation erfolgte mit der CCD-Kamera MC-3215 (Carl-Zeiss)

2.8.3. Immunmarkierung von Drosophilaembryonen

Für die Antikörperfärbung ganzer Embryonen wurde die Methode nach Mitchison und Sedat (1983) angewendet und wie folgt modifiziert.

Nach Dechorionisierung wurden die Embryonen in ein Gemisch aus n-Heptan und 3,7% Paraformaldehyd in PBS im Verhältnis 1:1 gegeben und 10 Minuten fixiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, 1 Volumen Methanol zugegeben und kräftig geschüttelt. Die auf den Boden gesunkenen devitellinisierten Embryonen wurden 5x mit Methanol gewaschen und bei -20°C verwahrt. Die Embryonen wurden 3x mit PBST gewaschen und für 2 Stunden in 10% Ziegen Serum in PBST blockiert. Die primären Antikörper wurden in 10% Ziegen Serum in PBST verdünnt zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x 5 Minuten Waschen in PBST wurden die FITC-markierten sekundären Antikörper (Dianova) zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig erfolgte eine RNaseA-Behandlung (40µg/ml). Nach 3x 5 Minuten Waschen in PBST wurden die Embryonen 5 Minuten mit Propidiumiodid (Endkonzentration 5µg/ml in PBS) gefärbt und mit 1x PBS gewaschen. Nach der Zugabe von Citifluor wurden die Embryonen unter einem Deckglas eingeschlossen.

Die Auswertung der Färbungen erfolgte am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 510 (Carl-Zeiss). Dabei wurden der 488/458nm Argon- und der 543nm HeNe1-Laser mit folgendem Strahlengang benutzt:

HFT 488nm; 543nm / NFT 545nm / Kanal 1 LP 560nm; Kanal 2 BP 505-560nm

Es wurden optische Schnitte in x-y Richtung oder Schnittstapel in x-y Richtung entlang der z-Achse angefertigt. Die optischen Schnittdicken für beide Kanäle wurden aufeinander abgestimmt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Molekulare Charakterisierung der Mutante $E(var)3-93D^{71-4}$

3.1.1. Eingrenzung des Mutationsortes

Durch Northernblotanalysen von heterozygoten $E(var)3-93D^{71-4}/TM3$ -Tieren konnte neben den 2,3kb und 2,0 kb-Transkripten ein verkürztes Transkript in der Größe von 1kb nachgewiesen werden (Dorn, persönliche Mitteilung). Aufgrund der Größe des verkürzten Transkriptes wurde der Mutationsort im gemeinsamen Teil der genomischen Region des $E(var)3-93D$ -Locus vermutet. Um größere Umbauten in der genomischen Region wie Deletionen oder Insertionen bzw. Mutationen in der Erkennungssequenz der entsprechenden Restriktionsenzyme zu identifizieren, wurde die genomische DNA von heterozygoten $E(var)3-93D^{71-4}/TM3$ -Tieren mit verschiedenen Restriktionsendonucleasen gespalten und für eine Southernblotanalyse eingesetzt. Als Hybridisierungssonde wurde das 4,2kb *Nsi*I-Fragment (siehe Abb. 4) eingesetzt, welches die ersten 4 Exonen und die dazwischenliegenden Intronen des $E(var)3-93D$ -Gens einschließt. Das Ergebnis der Southernblotanalyse zeigt Abb. 3. Für alle verwendeten Restriktionsenzyme konnten neben den erwarteten Wildtypfragmenten zusätzliche Fragmente nachgewiesen werden, was auf einen größeren Umbau in dieser entsprechenden genomischen Region schließen ließ.

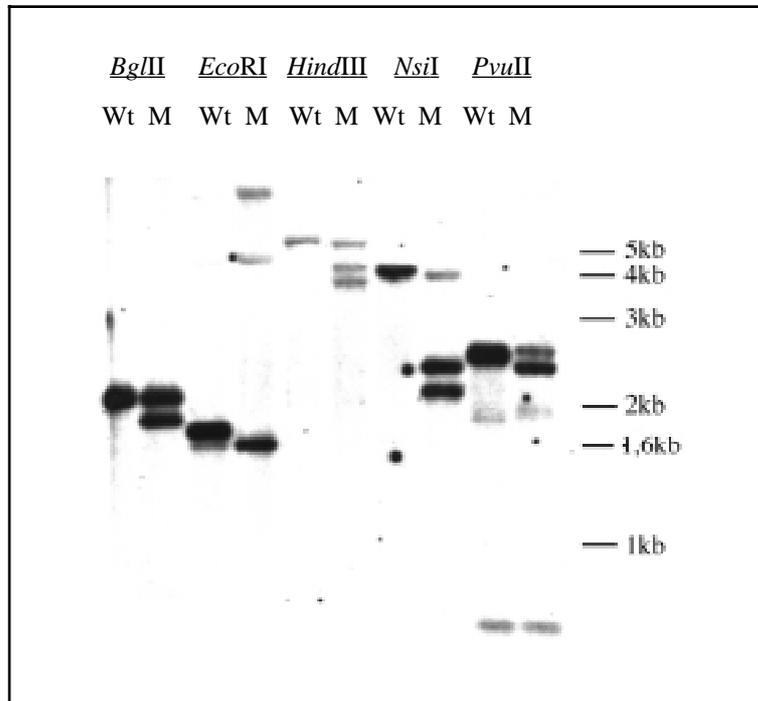


Abb. 3: Southernblotanalyse von heterozygoten $E(var)3-93D^{71-4}/TM3$ -Mutanten: Wt-Wildtyp (*CantonS*), M- $E(var)3-93D^{71-4}/TM3$
Für alle verwendeten Restriktionsenzyme sind bei der heterozygoten Mutante neben den beim Wildtyp (*CantonS*) auftretenden Fragmenten zusätzliche Fragmente nachweisbar.

Um den Mutationsort weiter eingrenzen zu können, wurden PCR-Analysen an homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Tieren (3. Larvenstadium) durchgeführt. Eine physische Karte mit den zu erwartenden PCR-Fragmenten des Wildtyps ist in Abb. 4 zu sehen.

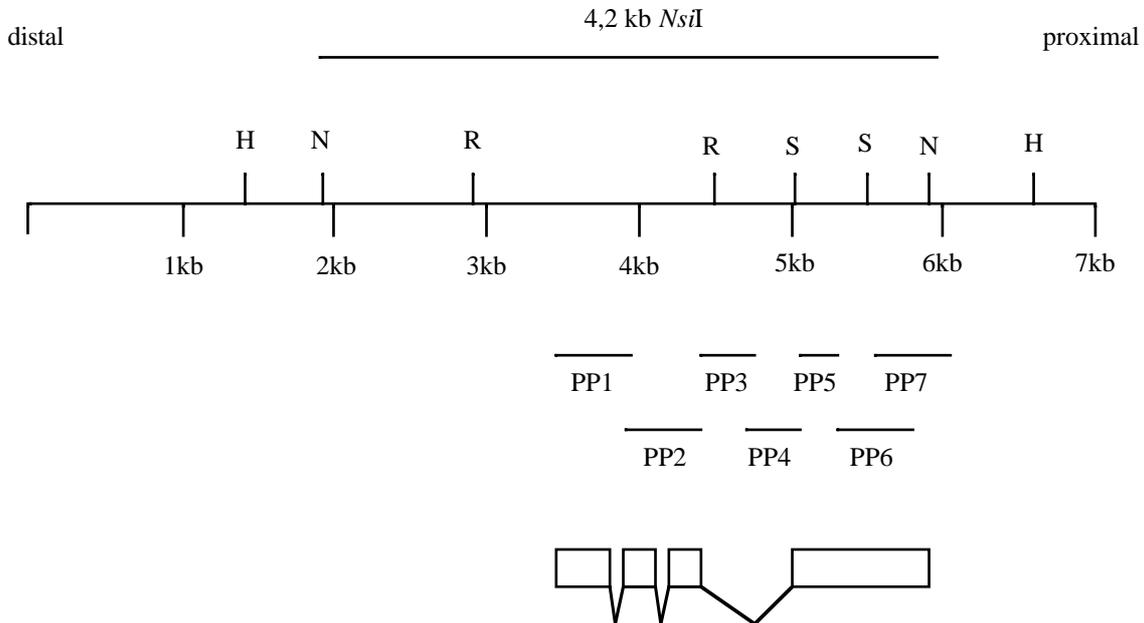


Abb. 4: Restriktionskarte der genomischen Region des *E(var)3-93D*-Locus im Bereich der ersten vier Exonen:
 Dargestellt ist das 4,2kb *NsiI*-Fragment, welches für die Southernblotanalyse verwendet wurde und die PCR-Primer, die zur molekularen Eingrenzung der *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutation eingesetzt wurden.
 H-*HindIII*, N-*NsiI*; R-*EcoRI*, S-*Sall*; PP-Primerpaar. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Material und Methoden (2.4.4.) zu finden.

Bei der Verwendung genomischer DNA aus homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutanten konnte für das Primerpaar 3 kein PCR-Produkt erhalten werden. Auch mit der Primerkombination 1forw-4back (siehe Abb.4) konnte keine DNA amplifiziert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Umbau im Bereich des 3. Exons bzw. des 3. Introns vermutet.

Für die weitere molekulare Charakterisierung der Mutante wurde von heterozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴/TM3*-Tieren eine rekombinante genomische Phagenbank angefertigt.

3.1.2. Isolation und Charakterisierung rekombinanter genomischer Phagen

Zur Sichtung der angefertigten rekombinanten genomischen Phagenbank von heterozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴/TM3*-Tieren wurde das 4,2kb *NsiI*-Fragment eingesetzt, welches auch für die Southernblotanalyse verwendet wurde.

Es konnten 8 rekombinante Phagen isoliert werden. Durchgeführte PCR-Analysen der isolierten rekombinanten Phagen dienten der Trennung von Phagen, die die DNA des Stabilisierungschromosom inseriert hatten, von denen die DNA des *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Chromosoms enthielten.

Durch eine Restriktionsanalyse der rekombinanten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Phagen konnte gezeigt werden, daß es sich um eine Insertionsmutation handelt. Eine erstellte physische Karte der inserierten DNA des rekombinanten Phagen 2 zeigt Abb. 5.

Die in pBluescript II KS subklonierten *Xba*I- und *Nsi*I-Fragmente wurden für eine Sequenzanalyse eingesetzt.

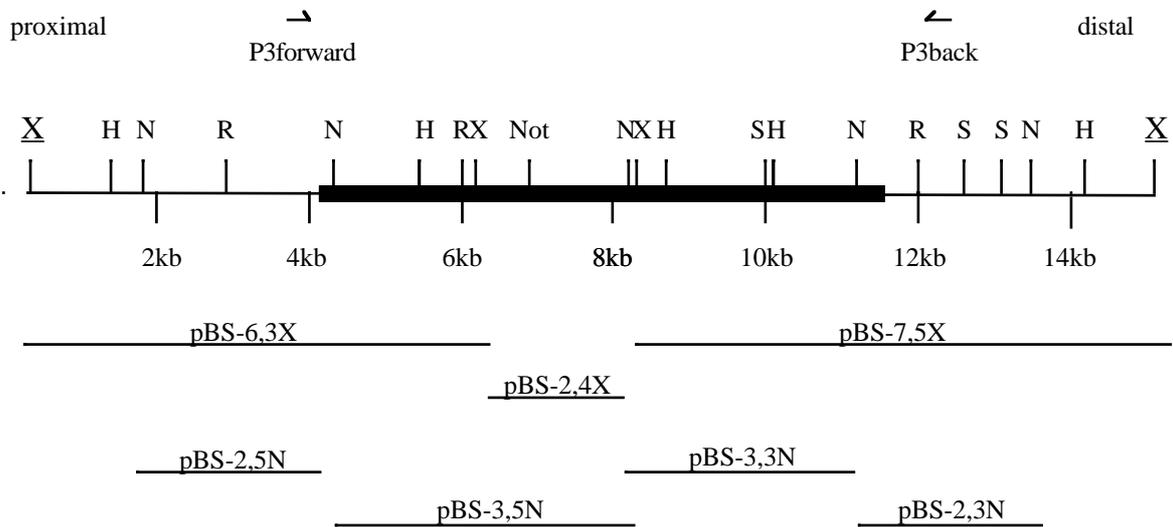


Abb. 5: Restriktionskarte der inserierten DNA des rekombinanten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Phagen 2: Dargestellt wurde das Primerpaar 3, womit der Mutationsort eingegrenzt werden konnte sowie die für eine Sequenzanalyse eingesetzten subklonierten Fragmente H-*Hind*III, N-*Nsi*I, Not-*Not*I, R-*Eco*RI, S-*Sal*I, X-*Xba*I Die bei der Mutation *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* inserierte DNA wurde fett dargestellt. Bei den unterstrichenen *Xba*I-Schnittstellen handelt es sich um Schnittstellen aus dem für die Klonierung verwendeten Phagen λ -DASH[®]II (Stratagene).

3.1.3. Sequenzanalyse

Es wurden ca. 4kb DNA innerhalb der inserierten und der angrenzenden genomischen DNA ausgehend von den Primern 3 forward, 3 back, sowie den Primern KS mod. und M13 mod. aus dem Plasmid pBluescript II KS sequenziert.

Es erfolgte bei der Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* eine Insertion in das 3. Intron, 84 Basen nach dem Ende des 3. Exons. An der Insertionsstelle wurden die 4 Basen TACA verdoppelt.

Ein Datenbankscreen der erhaltenen Sequenzen der inserierten DNA ergab eine 64-71%ige Identität auf DNA-Ebene zu dem mobilen Element *gypsy* von *Drosophila melanogaster* (Smith und Corces 1992). Das *gypsy*-Element ist ein Retrotransposon, dessen Transposition über ein RNA-Intermediat erfolgt (Bingham und Zachar 1989). Eine Darstellung der Homologie zwischen dem bei der Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* identifizierten mobilen Element und dem *gypsy*-Element ist in Abb. 6 zu sehen.

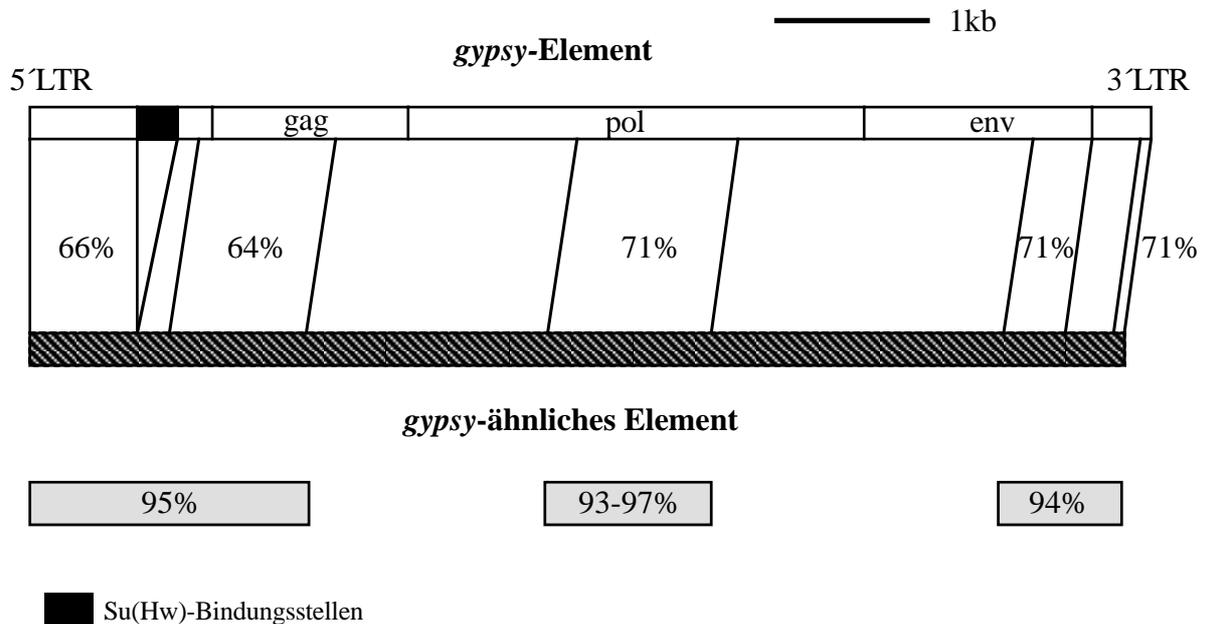


Abb. 6: Darstellung der Homologie des bei der Mutante $E(var)3-93D^{71-4}$ identifizierten *gypsy*-ähnlichen Elementes mit dem *gypsy*-Transposon von *Drosophila melanogaster* (Smith und Corces, 1992). Es wurden die Identitäten auf DNA-Ebene innerhalb der sequenzierten Bereiche gekennzeichnet. Die sequenzierten Bereiche und deren Identität mit dem P1-Klon *DS00956* von *Drosophila melanogaster* wurden unter dem *gypsy*-ähnlichen Element als Boxen dargestellt. Die Identität zwischen beiden mobilen Elementen beträgt innerhalb der LTRs und der sequenzierten Bereiche der Gene *gag*, *pol* und *env* 64-71%. Beim identifizierten *gypsy*-ähnlichen Element fehlen die Su(Hw)-Bindungsstellen. Su(Hw) - Suppressor of hairy wing, LTR-Long terminal repeat, *gag*-group specific antigen, *pol*-polymerase, *env*-envelope, zum Aufbau von Retroviren siehe Varmus und Brown (1989).

Die Identität umfaßt die proteincodierenden Bereiche *gag*, *pol* und *env* sowie die 5' und 3' Long terminal repeats (LTR). Keine oder nur sehr geringe Ähnlichkeit ist in den Bereichen zwischen 5'LTR und Startcodon des *gag*-Gens sowie dem Stopcodon des *env*-Gens und dem 3'LTR zu finden. Die Sequenzanalyse zeigte außerdem, daß beim identifizierten Element die Su(Hw)-Bindungsstellen zwischen 5'LTR und Startcodon des *gag*-Gens fehlen. Durch Deletionsanalysen eines inserierten *gypsy*-Elementes am *yellow*-Locus konnte die essentielle Funktion der Su(Hw)-Bindungsstellen für die Mutagenese durch das *gypsy*-Element gezeigt werden (Smith und Corces 1992). Durch die Interaktion des Su(Hw)-Proteins mit diesen Bindungsstellen wird die Wechselwirkung zwischen gewebespezifischen Enhancern und dem Promotor verhindert (Harrison *et al.* 1989). Für putative offene Leserahmen der sequenzierten DNA-Bereiche konnten 60-81% Identität, sowie 81-93% Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu den *gypsy*-Proteinen GAG, POL und ENV gefunden werden. Die ermittelten Sequenzen innerhalb der inserierten DNA zeigten außerdem im gesamten Bereich eine Identität von ca. 90-98% auf DNA-Ebene zu den Subklonen 1-g3, 3-h2 und 1-g11 des PI-Klones

DS00956, der im Rahmen des "Drosophila Genome Projects" sequenziert wurde (Rubin 1996, Kimmerly *et al.* 1996). Die Sequenzen des PI-Klones besitzen wiederum 65-74% Identität zum *gypsy*-Element.

Beim inserierten Element handelt es sich also um ein *gypsy*-ähnliches Element mit einer Größe von ca. 7,2 kb, welches die LTR und die Gene *gag*, *pol* und *env* besitzt. Es fehlen jedoch die Su(Hw)-Bindungsstellen. Die Insertionsstelle liegt im 3. Intron, 84 Basen nach dem Ende des 3. Exons. An der Insertionsstelle wurden die 4 Basen TACA verdoppelt.

3.1.4. Transkriptanalyse

Da beim inserierten *gypsy*-ähnlichen Element bei der Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* die Su(Hw)-Bindungsstellen fehlen, sollten andere Mechanismen für die Mutagenese verantwortlich sein. So könnten auch Spleißdefekte durch eine Insertion im Intron hervorgerufen werden.

Auch die Insertion des *pUChsneory⁺*-Transposons bei *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutanten erfolgte im 3. Intron (Dorn, 1993b). Für diese Mutante konnte ein abberantes Transkript nachgewiesen werden, welches sich aus den ersten 3 Exonen, Sequenzen aus dem 3. Intron und dem 5'-Bereich des *pUChsneory⁺*-Transposons zusammensetzt. Es wird ein Polyadenylierungssignal innerhalb des *pUChsneory⁺*-Transposons genutzt (Schotta, 1997).

Aufgrund des Auftretens eines zusätzlichen verkürzten Transkriptes bei *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴/TM3*-Tieren im Northern-Blot (Dorn, persönliche Mitteilung) wurde ein ähnliches abberantes Transkript vermutet, da auch im 5'-nichttranslatierten Bereich des inserierten *gypsy*-Elementes ein putatives Polyadenylierungssignal identifiziert werden konnte.

Durch RT-PCR-Analysen konnte bei der *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutante ein abberantes Transkript nachgewiesen werden. Seine Sequenz und das daraus abgeleitete Protein zeigt Abb. 7.

Das Transkript setzt sich zusammen aus den ersten 3 Exonen, 84 Basen des 3. Introns und 304 Basen des 5'-nichttranslatierten Bereiches des *gypsy*-ähnlichen Elementes. Es wird ein Polyadenylierungssignal innerhalb des *gypsy*-ähnlichen Elementes genutzt (siehe Abb. 7). Das daraus abgeleitete Protein besteht aus der BTB-Domäne und weiteren 9 Aminosäuren, die von der Intronsequenz kodiert werden. Dem Protein fehlt die Kernlokalisationssequenz, die innerhalb des 4. Exons kodiert wird (siehe Einleitung). Dieses Protein ist somit identisch mit dem Protein, welches für die *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutation postuliert werden konnte (Schotta, 1997).

TCAAAGAACTCGGACGCGTTCTGCGTGTGCGCCGCGCTAGCAAAAACTCTGGCTTTAGT	60
TAGTTATTTTATTGGAAAAATATTTAGTCAAGAGCCAACAAACGCATAGATACAGAAAAG	120
M A D D E Q F S L C W N N F	
TATTGATTTTCGTCCAAGATGGCGGACGACGAGCAATTCAGCTTGTGCTGGAACAACCTTC	180
N T N L S A G F H E S L C R G D L V D V	
AACACGAATTTGTGCGCCGGCTTCCACGAGTCGCTATGCCGCGGCGACCTGGTGGACGTC	240
S L A A E G Q I V K A H R L V L S V C S	
TCGCTGGCCGCCGAGGGCCAAATAGTGAAGGCCACCGATTGGTGTATCCGTCTGCTCG	300
P F F R K M F T Q M P S N T H A I V F L	
CCCTTCTTCCGCAAGATGTTCACTCAGATGCCGTGCAACACCCACGCTATCGTATTCTCTG	360
N N V S H S A L K D L I Q F M Y C G E V	
AACAACGTCAGCCACTCGGCGCTGAAGGACCTCATCCAATTCATGTACTGCGGCGAGGTC	420
N V K Q D A L P A F I S T A E S L Q I K	
AACGTGAAGCAGGACGCCCTGCCGCGTTTATTAGCACCGCGGAATCGCTGCAAATCAAG	480
G L T D V S I C I H L C A	
GGGCTAACGGATGTGAGTATATGTATACATTTGTGTGCGTGATATACTGGTATATCGAAT	540
CGAGCAACTACAACGCAACCTTTTCGCGCCCAATACAAGTTAACAACTAAGAGCACACAAT	600
ATTAAGAGCACACATATAACAAATTAATTAATATAAACAATGCTGACGCGCCCAAATGA	660
GTTCAGCGCTCTGCGCCACGAACGGTCAGCAACAGCAATCGGACACCCCTTATCCGGGGT	720
ACCGAGCTATGTTGCATAAATGCTGAGTCGGCTTGCCGACCATGGCTTTTATGGCGTGATG	780
CATTGGAGCCACAATAGATTTACATTTTCATATTCTTTTGTGTTTAGTCTTAAGCCAGAG	840
CTTTAATAAAGAGCAGCTATTCCTCCGGCTCGCAGCCGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	900
AAAA	904

Abb. 7: Sequenz des durch RT-PCR identifizierten abberanten Transkriptes und des daraus abgeleiteten Proteins für die Mutation *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*
Die mRNA- und Proteinsequenzen des Introns sind rot markiert, die mRNA-Sequenz, die vom *gypsy*-ähnlichen Element kodiert wird, ist in grün dargestellt. Das genutzte Polyadenylierungssignal wurde unterstrichen.
Für die sich an die Reverse Transkription anschließende PCR wurden die Primer 2-forward (kursiv dargestellt) und Oligo-dT (siehe 2.4.4.) verwendet

3.2. Charakterisierung der E(VAR)3-93D-Proteine

Der *E(var)3-93D*-Locus kodiert für ca. 22 verschiedene Proteine, die durch alternatives Spleißen entstehen (Dorn *et al.* 1993b; Dorn und Roth, persönliche Mitteilung). Um die Funktionen der einzelnen Proteine näher zu charakterisieren, sind Antikörper, die nur gegen Epitope der spezifischen C-Termini gerichtet sind, ein wichtiges Hilfsmittel, weil sie eine Charakterisierung der individuellen Proteine erlauben. Damit soll nachgewiesen werden, ob die E(VAR)3-93D-Proteine unterschiedliche Funktionen besitzen oder ob sie funktionell austauschbar sind.

Während mit Hilfe spezifischer Antikörper die Funktionen der verschiedenen E(VAR)3-93D-Proteine näher charakterisiert werden sollten, wurden ausgewählte Mutanten zur funktionellen Analyse einzelner Proteinabschnitte eingesetzt.

Die rezessive Letalität fast aller *E(var)3-93D*-Mutanten ist ein Hinweis auf essentielle Funktionen dieses Locus. Dadurch wird aber eine detaillierte Analyse der Mutanten erschwert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei der Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* ein modifiziertes *gypsy*-Element in das 3. Intron inseriert wurde (siehe 3.1.3.). Es konnte ein abberantes Transkript identifiziert werden, welches sich aus den ersten 3 Exonen, Sequenz des 3. Introns und 5'-Sequenz des *gypsy*-ähnlichen Elementes zusammensetzt (siehe Abb. 7). Das daraus resultierende Protein besteht aus der BTB-Domäne und weiteren 9 Aminosäuren, die von der Intronsequenz kodiert werden (siehe Abb. 7). Es ist damit identisch mit dem für die *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutation postulierten Protein (Schotta, 1997). Beide Mutanten unterscheiden sich aber in ihrem Verhalten. Während die Mutante *E(var)3-93D^{neo129}* bei 29°C stark semiletal ist, ist auch die Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* bei dieser Temperatur rezessiv letal. Die bei diesen Mutanten inserierten mobilen Elemente sind verschieden, ebenso deren Insertionsort. Es stellt sich daraus die Frage, ob sich für beide Mutanten Unterschiede auf der Proteinebene nachweisen lassen, um deren unterschiedliches Verhalten zu erklären.

3.2.1. Proteinbiochemische Analysen der E(VAR)3-93D-Proteine

3.2.1.1. Überexpression ausgewählter E(VAR)3-93D-Proteine in *E.coli*, Induktion polyklonaler Antikörper und Nachweis der Spezifität der Antikörper

Die E(VAR)3-93D-Proteine 23gt-gesamt und 38gt-spezifisch konnten bereits in *E.coli* überexprimiert werden, um polyklonale Antikörper in Maus und Kaninchen gegen diese Proteine zu induzieren (Büchner 1994). Im Rahmen dieser Arbeit sollten außerdem die E(VAR)3-93D-Proteine 23gt-spezifisch, 1(8)-spezifisch und 4(4)-spezifisch in *E.coli* überexprimiert und gereinigt werden, um auch gegen sie polyklonale Antikörper zu erhalten. In *E.coli* wurden die E(VAR)3-93D-Proteine als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) von *Schistosoma japonicum* exprimiert. Lagen die Fusionsproteine in löslicher Form vor (GST-23gt spezifisch) wurden sie durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose als Matrix aufgereinigt und durch anschließende Spaltung mit der Protease Thrombin von der GST getrennt. Unlösliche Proteine [GST-1(8)-spezifisch und GST-4(4)-spezifisch] wurden als inclusion bodies durch eine Harnstoffextraktion aufgereinigt (siehe Material und Methoden). Das Protein GST-1(8) konnte durch anschließende Dialyse in PBS+ 2M Harnstoff renaturiert und durch Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose als Matrix weiter aufgereinigt werden.

Alle erhaltenen Antikörper gegen die überexprimierten E(VAR)3-93D-Proteine wurden in Westernblotanalysen auf ihre Reaktivität und Spezifität getestet. Dafür wurden bakterielle Extrakte der entsprechenden plasmidtragenden Stämme verwendet. Als negative Kontrolle diente der Wirtsstamm JM101. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 zu sehen. Alle verwendeten Antikörper zeigten eine spezifische Reaktion mit den entsprechenden rekombinanten GST-Fusionsproteinen. Die Antikörper detektierten Proteine mit folgenden Molekulargewichten: Anti-23gt-spezifisch Kaninchen 43kDa, (Abb. 8, Bahn 2, theoretisches Molekulargewicht 42kDa), Anti-23gt-gesamt Kaninchen 100kDa (Abb. 8, Bahn 4, theoretisches Molekulargewicht 85kDa), Anti-38gt-spezifisch Maus 59kDa (Abb. 8, Bahn 6, theoretisches Molekulargewicht 51kDa), Anti-1(8)-spezifisch Kaninchen 39kDa (Abb. 8, Bahn 8, theoretisches Molekulargewicht 42kDa), Anti-4(4)-spezifisch Kaninchen 37kDa (Abb. 8, Bahn 10, theoretisches Molekulargewicht 40kDa). Alle verwendeten Antikörper zeigten keine Reaktion mit den Extrakten des Wirtsstammes JM101 (Abb. 8, Bahnen 1,3,5,7,9). Die ermittelten Molekulargewichte für die exprimierten und detektierten Proteine GST-23gt gesamt und GST-38gt-spezifisch sind größer als die aus den abgeleiteten Proteinsequenzen postulierten theoretischen Molekulargewichte. Es sollte sich aber um die korrekten Fusionsproteine handeln. In Westernblotanalysen wurden unter Verwendung eines Anti-GST Antikörpers (Sigma) dieselben Proteine detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Laufunterschiede lassen sich auch nicht durch ein abnormales Verhalten der GST erklären, da für das Protein GST-23gt spezifisch keine Abweichungen zwischen theoretischem und ermitteltem Molekulargewicht detektiert werden konnte. Außerdem konnte für das reine GST-Protein ein Molekulargewicht von 27kDa ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Ein abnormales Laufverhalten

im SDS-PAA-Gel wurde für Proteine mit hydrophoben, stark sauren oder basischen Bereichen beschrieben (Hames 1990). Ebenso konnte gezeigt werden, daß auch durch einzelne Aminosäureaustausche die Mobilität von Proteinen verändert werden kann (Fasano *et al.* 1984).

Alle verwendeten Präimmunsereen zeigten keine Reaktion gegen die induzierten Fusionsproteine (Daten nicht gezeigt). Es konnte also nachgewiesen werden, daß alle induzierten Antikörper eine spezifische Reaktion mit den entsprechenden bakteriell exprimierten Proteinen zeigen.

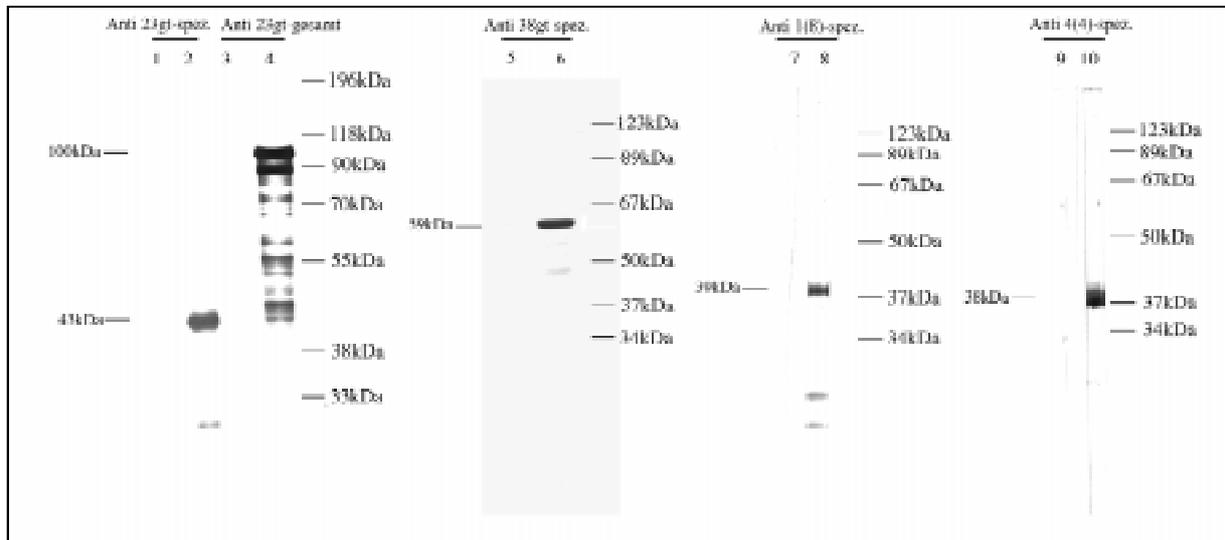


Abb. 8: Testung der Spezifität der induzierten Antikörper gegen die rekombinanten E(VAR)3-93D-Proteine:
 Aufgetragen wurden *E.coli*-Proteinextrakte (Bahn 1,3,5,7,9 JM101; Bahnen 2,4,6,8,10 JM101 mit folgenden Expressionsplasmiden: Bahn 2 23gt-spezifisch in pGEX-2T, Bahn 4 23gt-gesamt in pGEX-2T, Bahn 6 38gt-spezifisch in pGEX-2T, Bahn 8 1(8)-spezifisch in pGEX-2T, Bahn 10 4(4)-spezifisch in pGEX-2T).
 Bahnen 1,2 Anti-23gt-spezifisch (Kaninchen 1:20,000); Bahnen 3,4 Anti-23gt-gesamt (Kaninchen 1:20,000); Bahnen 5,6 Anti-38gt-spezifisch (Maus 1:20,000); Bahnen 7,8 Anti-1(8)-spezifisch (Kaninchen 1:20,000); Bahnen 9,10 Anti-4(4)-spezifisch (Kaninchen 1:20,000)
 Alle induzierten Antikörper zeigen eine spezifische Reaktion mit den exprimierten Fusionsproteinen

3.2.1.2. Nachweis und Reinigung von Antikörpern, die Epitope innerhalb der BTB-Domäne erkennen

Zum Nachweis der für die Mutanten *E(var)3-93D^{neo129}* und *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* postulierten verkürzten Proteine wird ein Antikörper benötigt, der auch die BTB-Domäne detektiert.

Für die Detektion von Epitopen, die vom Antiserum Anti-23gt-gesamt erkannt werden, wurden die BTB-Domäne und der spezifische Teil des 23gt-Proteins als Fusionsproteine mit GST in *E.coli* überexprimiert, gereinigt und mit der Protease Thrombin in GST und die BTB-Domäne bzw. den spezifischen Teil des Proteins 23gt gespalten. Die Ergebnisse des Westernblots mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt sind in Abb. 9 dargestellt. Das Antiserum reagiert mit den entsprechenden Fusionsproteinen GST-BTB und GST-23gt-spezifisch (Abb. 9, Bahn 1 und 3), mit der GST (Bahn 2

und 4), aber auch mit der BTB-Domäne (Bahn 4) und 23gt-spezifisch (Bahn 2). Im Antiserum Anti-23gt-spezifisch sind somit Antikörper nachweisbar, die Epitope innerhalb der BTB-Domäne erkennen. Zur Erhöhung der Spezifität wurde das Antiserum Anti-23gt-gesamt immunoaffinitätsgereinigt. Dazu wurde die in *E.coli* überexprimierte und gereinigte BTB-Domäne nach Abspaltung und Trennung von GST an NHS-Sepharose immobilisiert (siehe Material und Methoden 2.7.4.; 2.7.12.) und die eluierten Antikörper auf ihre Reaktivität getestet. Der eluierte Antikörper detektiert die BTB-Domäne (Abb. 9, Bahn 5) und nicht mehr das Protein 23gt-spezifisch (Abb. 9, Bahn 6), wie das Antiserum vor der Aufreinigung (Abb. 9, Bahn 2). Eine durchgeführte Kontrolle zeigt für den ebenfalls immunoaffinitätsgereinigten Antikörper Anti-23gt-spezifisch eine positive Reaktion mit dem Protein 23gt-spezifisch (Abb. 9, Bahn 7).

Es konnte also nachgewiesen werden, daß sowohl das Antiserum Anti-23gt-gesamt als auch der gegen die BTB-Domäne immunoaffinitätsgereinigte Antikörper (Anti-BTB) Epitope innerhalb der BTB-Domäne erkennen.

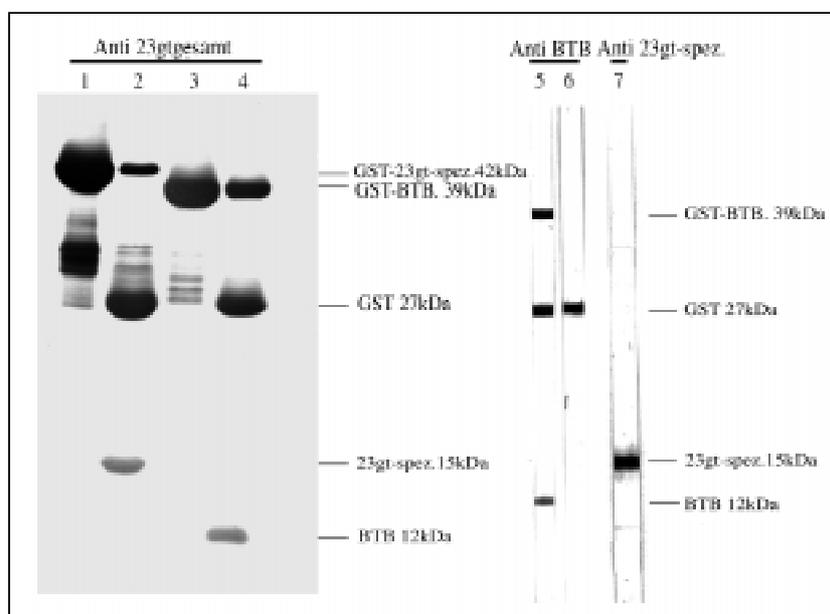


Abb. 9: Nachweis und Reinigung von Antikörpern, die Epitope innerhalb der BTB-Domäne erkennen: Bahn 1: über Affinitätschromatographie (2.7.3.) gereinigtes Protein GST-23gt-spez.; Bahn 2,6,7: Protein GST-23gt-spez., nach Reinigung und Thrombinspaltung (ÜN, 37°C, 2U Thrombin / 100µg Protein); Bahn 3: über Affinitätschromatographie (2.7.3.) gereinigtes Protein GST-BTB; Bahn 4,5: Protein GST-BTB, nach Reinigung und Thrombinspaltung (ÜN, 37°C, 2U Thrombin / 100µg Protein); Bahn 1-4: Anti-23gt-gesamt Kaninchen (1:50,000); Bahn 5,6 aus Anti-23gt-gesamt Kaninchen über die BTB-Domäne immunoaffinitätsgereinigter Antikörper (1:50,000); Bahn 7 immunoaffinitätsgereinigter Antikörper Anti-23gt-spezifisch (1:50,000). Der Antikörper Anti-23gt-gesamt erkennt Epitope innerhalb der BTB-Domäne und dem spezifischen Teil des Proteins 23gt. Es konnten daraus Antikörper aufgereinigt werden, die gegen die BTB-Domäne gerichtet sind und bei gleicher Verdünnung keine Epitope innerhalb des spezifischen Teils des 23gt-Proteins mehr erkennen.

3.2.1.3. Nachweis der E(VAR)3-93D-Proteine bei *Drosophila melanogaster*

Durch Northernblotanalysen konnten für den *E(var)3-93D*-Locus 2 abundante Transkripte mit Größen von 2,3 und 2,0 kb mit gleicher Abundanz nachgewiesen werden (Dorn *et al.* 1993b). Bisher wurden ca. 22 verschiedene cDNA-Klone identifiziert. Anhand dieser identifizierten cDNA-Sequenzen können für die resultierenden E(VAR)3-93D-Proteine theoretische Molekulargewichte von 46kDa bis 67kDa abgeleitet werden (Dorn und Roth, persönliche Mitteilung).

Durch Westernblotanalysen sollten die E(VAR)3-93D-Proteine 38gt, 23gt, 1(8) und 4(4) im Wildtyp nachgewiesen werden. Die Mutanten *E(var)3-93D^{neo129}*-und *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-wurden zum Nachweis des für diese Mutanten postulierten verkürzten Proteins verwendet.

Der Antikörper Anti-23gt-gesamt detektiert in Wildtypembryonen (*CantonS*) 3 Proteine mit Molekulargewichten von 101kDa, 87kDa und 75kDa (Abb. 10, Bahn 1). Im Gegensatz dazu konnte in Wildtyp-Larven (*CantonS*, 3. Larvenstadium) ein Protein mit einem Molekulargewicht von 31kDa detektiert werden (Abb. 10, Bahn 2). Diese Bande ist in homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Tieren nicht mehr nachweisbar, statt dessen wird ein Protein mit einem Molekulargewicht von 33kDa detektiert (Abb. 10, Bahn 4). Sowohl in *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴/TM6B* (Abb. 10, Bahn 3), als auch *E(var)3-93D^{neo129}/TM6B*-Tieren (Abb. 10, Bahn 5) lassen sich das in Wildtyp-Larven detektierte 31kDa-Protein und das in homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Larven detektierte 33kDa-Protein nachweisen. Der verwendete Antikörper detektiert aber im larvalen Extrakt noch eine Vielzahl weiterer Proteine. Zur Erhöhung der Spezifität wurde deshalb der gegen die BTB-Domäne immunoaffinitätsgereinigte Antikörper verwendet.

Auch in Wildtypembryonen (*CantonS*) wurde unter Verwendung des Antikörpers Anti-BTB das 31kDa-Protein detektiert (Abb. 10, Bahn 6). Dieses Protein mit einem Molekulargewicht von 31kDa konnte wieder sowohl in Wildtyp-Larven (*CantonS*, Abb. 10, Bahn 7), als auch in heterozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴/TM6B*-Larven (Abb. 10, Bahn 8) zusammen mit dem 33kDa-Protein nachgewiesen werden. In homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutanten wurde wieder nur das 33kDa-Protein detektiert (Abb. 10, Bahn 9). Im Gegensatz zu den Embryonen (Abb. 10, Bahn 6) konnte mit dem Anti-BTB Antikörper in Larven ein Protein mit einem Molekulargewicht von 36kDa nachgewiesen werden (Abb. 10, Bahnen 7-9). Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine unspezifische Reaktion des verwendeten Antikörpers. Die theoretischen Molekulargewichte der E(VAR)3-93D-Proteine betragen 46-67kDa. Das 31kDa-Protein ließe sich durch proteolytischen Abbau oder ein abnormales Laufverhalten erklären. Ähnlich verhält es sich mit dem bei den Mutanten detektierten 33kDa-Protein. Das Protein, welches für die beiden insertionellen Mutanten postuliert wurde, besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 15kDa. Die zu beobachtenden eindeutigen Unterschiede zwischen Wildtyp, homozygoten und heterozygoten Mutanten sprechen jedoch dafür, daß es sich bei den detektierten 31kDa- und 33kDa-Proteinen um E(VAR)3-93D-Proteine handelt. Während der Anti-BTB Antikörper auch in den embryonalen Extrakten vor allem das Protein mit dem Molekulargewicht von 31kDa (Abb. 10, Bahn 6) detektiert, lassen sich mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt 3 Proteine mit Molekulargewichten von 101, 87 und 75kDa nachweisen (Abb. 10, Bahn 1). Eine mögliche Erklärung

dafür wäre eine höhere Affinität des Anti-BTB Antikörpers zu einem durch proteolytischen Abbau entstandenen verkürzten E(VAR)3-93D-Protein, welches noch die BTB-Domäne enthält. Diese Frage kann durch die Verwendung spezifischer Antikörper, die gegen die C-Termini von E(VAR)3-93D-Proteinen gerichtet sind, geklärt werden.

Mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch kann in embryonalen Extrakten des Wildtyps (*CantonS*) ein Protein mit einem Molekulargewicht von 101kDa detektiert werden (Abb. 10, Bahn 10). Dieses Protein ist auch in Wildtyp-Larven (*CantonS*) nachweisbar (Abb. 10, Bahn 11), außerdem wird noch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 45kDa detektiert. Hierbei könnte es sich um ein Abbauprodukt handeln. Das 101kDa-Protein ist in heterozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Larven reduziert (Abb. 10, Bahn 12) und kann in homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Larven nicht nachgewiesen werden (Abb. 10, Bahn 13). Für die Antikörperreaktionen in den Bahnen 6-9 und 10-13 wurden identische Mengen derselben Proteinextrakte aufgetragen und die Auftrennung erfolgte im selben Gel. Damit kann ausgeschlossen werden, daß bei den homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutanten durch zu geringe Proteinmengen mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch kein Protein detektiert werden konnte. Das E(VAR)3-93D-Protein 38gt besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 67kDa. Bei dem detektierten 101kDa-Protein könnte es sich trotzdem um das 38gt-Protein handeln, denn auch die in *E.coli* überexprimierten Proteine GST-23gt-gesamt und GST-38gt-spezifisch zeigen Unterschiede zwischen theoretischem und ermitteltem Molekulargewicht von 15kDa (GST-23gt-gesamt) und 8kDa (GST-38gt-spezifisch). Das Protein mit einem Molekulargewicht von 101kDa konnte von 2 Antikörpern detektiert werden, die gegen verschiedene Epitope gerichtet sind, die aber im E(VAR)3-93D-Protein 38gt enthalten sind. Während der Antikörper Anti-23gt-gesamt Epitope im gemeinsamen Bereich der E(VAR)3-93D-Proteine und im spezifischen Teil des E(VAR)3-93D-Proteins 23gt erkennt, detektiert der Antikörper Anti-38gt-spezifisch nur Epitope im spezifischen Teil des Proteins 38gt. Außerdem wurde das 101kDa-Protein nicht in homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutanten nachgewiesen.

Mit den Antikörpern Anti-23gt-spezifisch, Anti-1(8) und Anti-4(4) konnten im Westernblot unter Verwendung embryonaler und larvaler Extrakte keine Proteine nachgewiesen werden. Dies könnte an der geringeren Abundanz der Proteine, aber auch an der niedrigeren Affinität der Antikörper liegen.

Die sowohl mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt, als auch mit dem Antikörper Anti-BTB nachgewiesenen 31kDa und 33kDa-Proteine (Abb. 10, Bahnen 2-9) wurden nicht mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch detektiert. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um verkürzte Proteine, die noch die BTB-Domäne, nicht aber die spezifischen C-terminalen Bereiche besitzen.

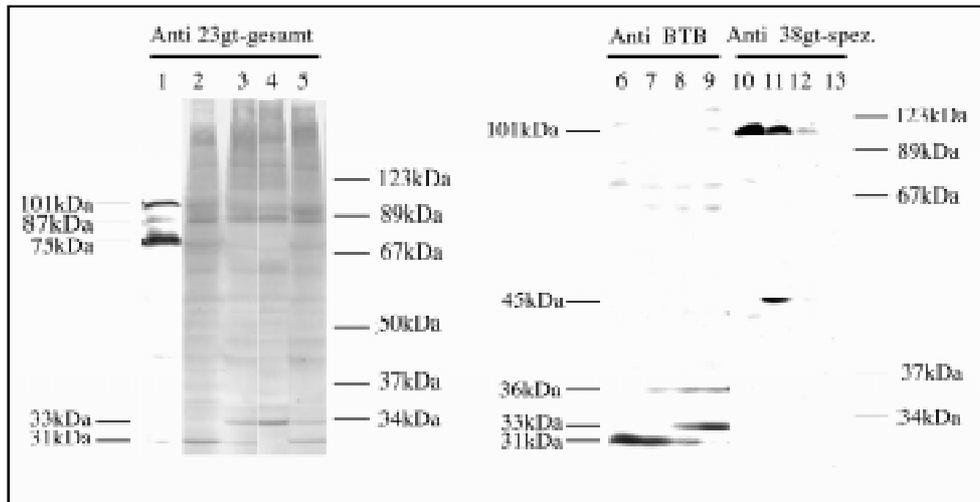


Abb. 10: Nachweis der E(VAR)3-93D-Proteine in Gesamtextrakten von *Drosophila melanogaster*: Bahnen 1,6,10 embryonale Proteinextrakte; Bahnen 2-5, 7-9; 11-13 larvale Proteinextrakte; Bahnen 1,2,6,7,10 Wildtyp (*CantonS*); Bahnen 3,8,12 *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴/TM6B*-Larven; Bahn 5 *E(var)3-93D^{neo129}/TM6B*-Larven; Bahnen 4,9,13 homozygote *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Larven; Bahnen 1-5 Anti-23gt-gesamt (Kaninchen, 1:4000); Bahnen 6-9 über die BTB-Domäne immunoaffinitätsgereinigter Antikörper (1:50); Bahnen 10-13 Anti-38gt-spezifisch (Maus, 1.500)
Der Antikörper Anti-23gt-gesamt detektiert in embryonalen Extrakten des Wildtyps (*CantonS*) 3 Proteine mit Molekulargewichten von 101, 87 und 75kDa. Ein Protein mit einem Molekulargewicht von 101kDa wurde im Wildtyp und in heterozygoten Tieren auch mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch nachgewiesen. Es konnte aber nicht in homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Larven detektiert werden. Im Gegensatz zum Wildtyp kann in homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Larven unter Verwendung der Antikörper Anti-23gt-gesamt und Anti-BTB nicht ein 31kDa, sondern ein 33kDa-Protein nachgewiesen werden. In heterozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*- und *E(var)3-93D^{neo129}*-Larven werden beide Proteine detektiert.

Die E(VAR)3-93D-Proteine besitzen im gemeinsamen Teil eine Kernlokalisationssequenz (siehe Einleitung). Auch konnte schon eine Chromatinbindung an Polytänchromosomen nachgewiesen werden (Dorn *et al.* 1993b). Zur Erhöhung der Sensitivität wurden deshalb Kernextrakte aus Wildtypembryonen (*CantonS*) für die Westernblotanalysen eingesetzt.

Mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt konnten Proteine mit Molekulargewichten zwischen 71kDa und 99 kDa detektiert werden (Abb. 11, Bahn 1). Die abundantesten detektierten Proteine besitzen Molekulargewichte von 99kDa, 93kDa, 83kDa, 75kDa und 71kDa. Ein nahezu identisches Bandenmuster wurde mit dem über Immunoaffinitätschromatographie gereinigten Antikörper Anti-BTB erhalten (Abb. 11, Bahn 3). Es sollte sich bei den detektierten Proteinen um verschiedene E(VAR)3-93D-Proteine handeln. Deshalb wurden auch die verfügbaren Antikörper gegen die verschiedenen spezifischen C-Termini der E(VAR)3-93D-Proteine eingesetzt.

Der Antikörper Anti-38gt-spezifisch detektiert auch die Proteine mit Molekulargewichten von 99kDa und 93kDa (Abb. 11, Bahn 2), die auch mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt (Abb. 11, Bahn 1) und Anti-BTB (Abb. 11, Bahn 3) nachgewiesen werden konnten. Bei den im Kernextrakt nachgewiesenen 99kDa- und 93kDa-Proteinen sollte es sich um das 38gt-Protein handeln, den sie konnten wieder von 2 Antikörpern detektiert werden, die gegen verschiedene Epitope gerichtet sind, die aber im

E(VAR)3-93D-Protein 38gt enthalten sind. Es wurden 2 Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten nachgewiesen. Möglicherweise handelt es sich um unterschiedlich modifizierte Proteine. So konnten anhand der Proteinsequenz im gemeinsamen Teil der E(VAR)3-93D-Proteine mit Hilfe des Programmes "PROSITE" 16 potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Während das 101kDa-Protein mit dem Antikörper Anti-38gt spezifisch auch in embryonalen und larvalen Gesamtextrakten nachgewiesen werden konnte, wurde es mit dem gegen die BTB-Domäne immunoaffinitätsgereinigten Antikörper nicht detektiert. Ein möglicher Grund dafür könnte die geringere Affinität des Anti-BTB Antikörpers sein. Ein möglicher Hinweis dafür ist auch seine schwächere Reaktion im Kernextrakt (Abb. 11, Bahn 3) im Vergleich zum Antikörper Anti-23gt-gesamt (Abb. 11, Bahn 1).

Die Antikörper Anti-23gt-spezifisch, Anti-1(8)-spezifisch und Anti-4(4)-spezifisch zeigten auch mit den Kernextrakten keine spezifische Reaktion (Daten nicht gezeigt). Entweder ist die Abundanz der Proteine deutlich geringer als die des 38gt-Proteins oder die verwendeten Antikörper zeigen eine niedrigere Affinität.

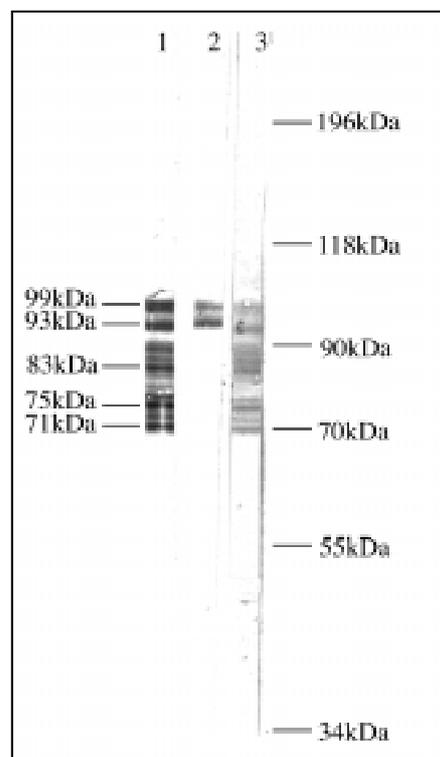


Abb. 11: Nachweis der E(VAR)3-93D-Proteine in embryonalen Kernextrakten des Wildtyps (*CantonS*): Bahn 1: Anti-23gt-gesamt (Kaninchen, 1:4000); Bahn 2: Anti-38gt-spezifisch (Maus, 1:500); Bahn 3: über die BTB-Domäne immunoaffinitätsgereinigter Antikörper (1:50). Mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch wurden 2 Proteine mit Molekulargewichten von 99kDa und 93kDa detektiert, die auch mit den Antikörpern Anti-23gt-gesamt und Anti-BTB nachgewiesen werden konnten. Die Antikörper Anti-23gt-gesamt und Anti-BTB detektieren außerdem noch Proteine mit Molekulargewichten von 83kDa, 75kDa und 71kDa.

Für eine mögliche Identifizierung der in den Kernextrakten mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt nachgewiesenen Proteinen mit den Molekulargewichten von 83kDa, 75kDa und 71kDa (Abb. 11, Bahn 1) wurden Immunopräzipitationen durchgeführt. Auch sollte das mit den Antikörpern Anti-23gt-gesamt und Anti-BTB detektierte Protein mit einem Molekulargewicht von 31kDa näher charakterisiert werden.

Immunopräzipitationen mit dem Antikörper Anti-23gt-spezifisch dienten einem sensitiveren Nachweis des E(VAR)-93D-Proteins 23gt.

3.2.1.4. Nachweis von E(VAR)3-93D-Proteinen durch Immunopräzipitation

Bei der Immunopräzipitation werden Proteine nach Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen und deren Bindung an eine Matrix (z.B. Protein-A-Sepharose) selektiv angereichert. Die gebundenen Proteine können im Anschluß durch Westernblotanalysen nachgewiesen werden.

In der Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Immunopräzipitation mit dem Antikörper Anti-23gt-spezifisch zu sehen. In den erhaltenen Immunkomplexen wurden die E(VAR)3-93D-Proteine durch die Verwendung der entsprechenden Antikörper nachgewiesen. Der Antikörper Anti-23gt-spezifisch detektiert im erhaltenen Immunkomplex ein Protein mit einem Molekulargewicht von 75kDa (Abb. 12, Bahn 4). Ein Protein mit dem gleichen Molekulargewicht wurde auch im gebildeten Immunkomplex mit dem Anti-BTB Antikörper detektiert (Abb. 12, Bahn 2). Es handelt sich um jeweils 2 Proteinbanden, die durch Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung bedingt sein können. Außerdem wird unter Verwendung beider Antikörper ein Protein mit einem Molekulargewicht von 55kDa detektiert. Hierbei handelt es sich um den für die Immunopräzipitation eingesetzten Antikörper, der dann im Westernblot mit dem sekundären Antikörper reagiert. Die Bahnen 1 und 3 zeigen die Reaktion des Antikörpers Anti-23gt-spezifisch mit dem sekundären Antikörper. Außerdem detektieren die Antikörper Anti-23gt-spezifisch und Anti-BTB auch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 38kDa, der Antikörper Anti-BTB detektiert zusätzlich noch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35kDa. Bei diesen Proteinen handelt es sich möglicherweise um Abbauprodukte. Um störende Reaktionen des für die Immunopräzipitation eingesetzten Antikörpers mit dem sekundären Antikörper zu vermeiden, wurde der Antikörper Anti-23gt-gesamt (Maus) für die Detektion eingesetzt. Auch hier konnte wieder im erhaltenen Immunkomplex ein Protein mit einem Molekulargewicht von 75kDa detektiert werden (Abb. 12, Bahn 5). Bei dem außerdem nachgewiesenen Protein mit einem Molekulargewicht von 47kDa handelt es sich möglicherweise um ein Abbauprodukt.

Es sollte sich bei dem nachgewiesenen Protein mit einem Molekulargewicht von 75kDa um das E(VAR)3-93D-Protein 23gt handeln. Es wurde mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt immunopräzipitiert und kann mit Antikörpern, die Epitope im gemeinsamen Teil der E(VAR)3-93D-Proteine (Anti-23gt-gesamt Maus und Anti-BTB) oder im spezifischen Teil des E(VAR)3-93D-Proteins 23gt (Anti-23gt-spezifisch) besitzen, detektiert werden. Dagegen wurden im gebildeten Immunkomplex mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch keine Proteine detektiert (Abb. 12, Bahn 6).

Ein Protein mit einem Molekulargewicht von 75kDa wurde auch unter Verwendung der Antikörper Anti-23gt-gesamt und Anti-BTB im Kernextrakt nachgewiesen (Abb. 11, Bahnen 1 und 3), nicht aber unter Verwendung des Antikörpers Anti-23gt-spezifisch. Ein Grund dafür kann die geringere Affinität des Antikörpers Anti-23gt-spezifisch sein. Es ist aber auch möglich, daß die Abundanz des 23gt-Proteins sehr gering ist und unter Verwendung der Antikörper Anti-23gt-gesamt und Anti-BTB in der gereinigten Kernfraktion weitere E(VAR)3-93D-Proteine mit einem Molekulargewicht von 75kDa detektiert werden. Der Unterschied zwischen theoretischem Molekulargewicht für das 23gt-Protein und dem Molekulargewicht des ermittelten Proteins beträgt 17kDa. Eine ähnliche Differenz zwischen theoretischem und ermitteltem Molekulargewicht konnte auch für das Fusionsprotein GST-23gt nachgewiesen werden (siehe 3.2.1.1.).

Durch Immunopräzipitationen unter Verwendung des Anti-BTB Antikörpers konnten im Immunkomplex durch Westernblotanalysen keine Proteine detektiert werden. Eine mögliche Erklärung wäre eine Protein-Proteinwechselwirkung der E(VAR)3-93D-Proteine mit anderen Proteinen, die über die BTB-Domäne vermittelt wird. Für den verwendeten Antikörper ist dann die BTB-Domäne nicht mehr zugänglich.

Das in larvalen Extrakten des Wildtyps (Abb. 10, Bahnen 2,7) und der heterozygoten Mutanten (Abb. 10, Bahnen 3,5,8) nachgewiesenen Protein mit einem Molekulargewicht von 31kDa ist wahrscheinlich ein durch proteolytischen Abbau entstandenes Produkt, was noch die BTB-Domäne enthält. Dieses Protein wurde auch in embryonalen Extrakten mit dem Anti-BTB Antikörper detektiert (Abb. 10, Bahn 6). Im Gegensatz dazu wurden mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt in embryonalen Extrakten 3 Proteine mit Molekulargewichten von 101kDa, 87kDa und 75kDa nachgewiesen (Abb. 10, Bahn 1). Durch weitere Experimente konnte gezeigt werden, daß die Proteine mit den ermittelten Molekulargewichten von 101kDa und 75kDa nicht durch eine unspezifische Reaktion des Antikörpers Anti-23gt-gesamt erklärt werden können. Das Protein mit dem Molekulargewicht von 101kDa konnte auch mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch beim Wildtyp (Abb. 19, Bahnen 10,11) und heterozygoten Mutanten (Abb. 10, Bahn 12) detektiert werden, jedoch nicht in homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutanten (Abb. 10, Bahn 13). In einer gereinigten Kernfraktion wurden Proteine mit Molekulargewichten von 99kDa und 93kDa sowohl mit den Antikörpern Anti-23gt-gesamt (Abb. 11, Bahn 1) und Anti-BTB (Abb. 11, Bahn 3), als auch mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch detektiert (Abb. 10, Bahn 2). Das Protein mit dem Molekulargewicht von 75kDa wurde auch von den Antikörpern Anti-23gt-gesamt (Abb. 11, Bahn 1) und Anti-BTB (Abb. 11, Bahn 3) im Kernextrakt nachgewiesen. Außerdem konnte es mit dem Antikörper Anti-23gt-spezifisch immunopräzipitiert werden. Im erhaltenen Immunkomplex konnte es nur mit Antikörpern detektiert werden, die Epitope im gemeinsamen (Anti-23gt-gesamt: Abb. 12 Bahn 5; Anti-BTB: Abb. 12 Bahn 2) oder spezifischen Teil (Anti-23gt-spezifisch: Abb. 12 Bahn 4) des E(VAR)3-93D-Proteins 23gt besitzen. Es konnte im erhaltenen Immunkomplex nicht mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch detektiert werden (Abb. 12, Bahn 6). Wahrscheinlich besitzt der durch Immunoaffinitätschromatographie gereinigte Antikörper

Anti-BTB eine höhere Affinität zu verkürzten, noch die BTB-Domäne besitzenden E(VAR)3-93D-Proteinen als zu den Gesamtproteinen.

In den beiden insertionellen Mutanten *E(var)3-93D^{neo129}* und *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* konnte ein Protein mit einem Molekulargewicht von 33kDa nachgewiesen werden. Hierbei sollte es sich um ein verkürztes E(VAR)3-93D-Protein handeln, welches noch die BTB-Domäne besitzt.

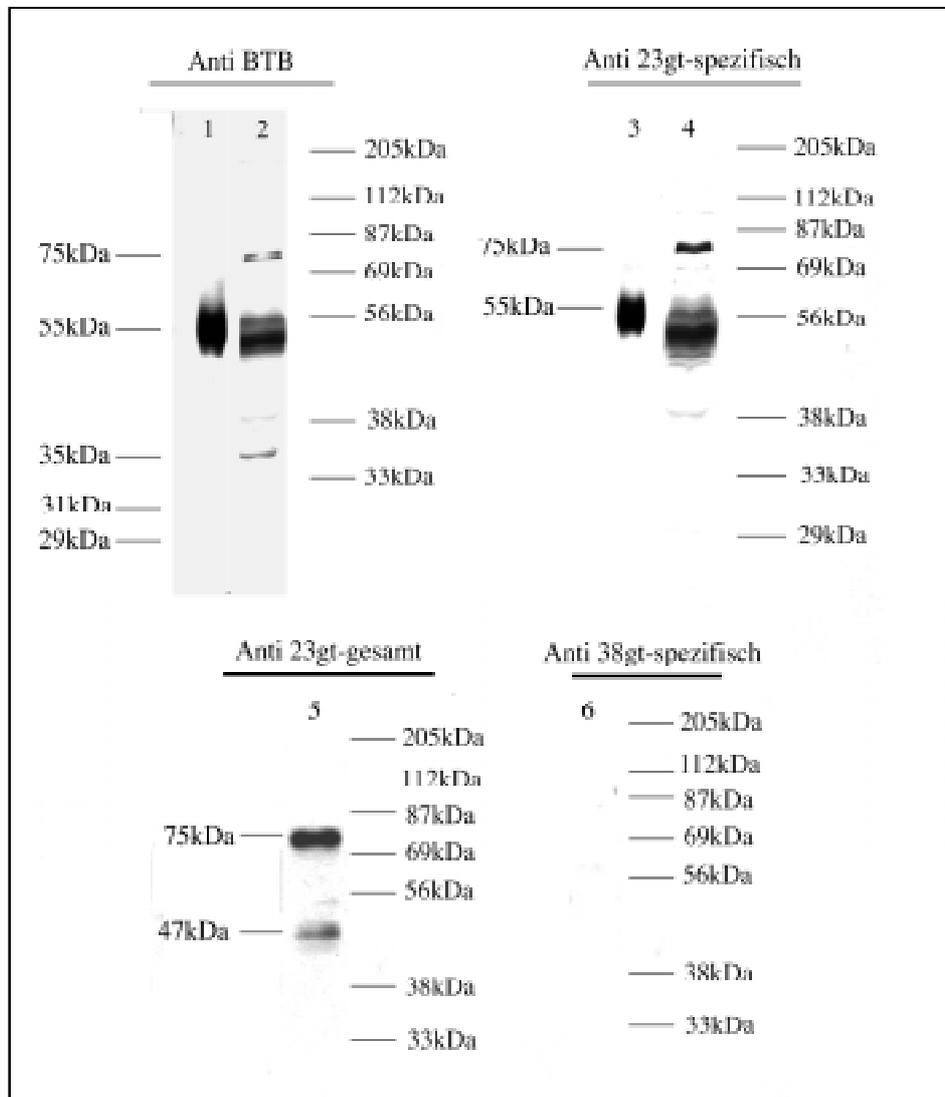


Abb. 12: Immunopräzipitation unter Verwendung des Antikörpers Anti-23gt-spezifisch: Bahnen 1,3 für die Immunopräzipitation eingesetzter Antikörper Anti-23gt-spezifisch; Bahnen 2,4,5,6 gebildete Immunkomplexe
Bahnen 1,2 Anti-BTB (1:50); Bahnen 3,4 Anti-23gt-spezifisch (Kaninchen, 1.500); Bahn 5 Anti-23gt-gesamt (Maus 1:2000); Bahn 6 Anti-38gt-spezifisch (Maus, 1:500)
Im gebildeten Immunkomplex kann mit den Antikörpern Anti-BTB, Anti-23gt-spezifisch und Anti-23gt-gesamt ein Protein mit einem Molekulargewicht von 75kDa detektiert werden.

3.2.2. Immunozytologische Charakterisierung der E(VAR)3-93D-Proteine

Durch proteinbiochemische Analysen wurden mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch zwei Proteine mit Molekulargewichten von 99kDa und 93kDa, mit dem Antikörper Anti-23gt-spezifisch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 75kDa detektiert. Auch beim 75kDa-Protein konnten 2 Formen mit einem geringen Laufunterschied nachgewiesen werden, was durch Modifikationen des Proteins begründet werden kann. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß es sich bei den detektierten Proteinen um Kernproteine handelt.

Immunozytologische Techniken erlauben eine Analyse der zeitlichen und räumlichen Lokalisation von Proteinen. Mit Hilfe dieser Techniken sollte untersucht werden, ob es sich bei den E(VAR)3-93D-Proteinen um Chromatinproteine handelt und in welchen Entwicklungsstadien sie nachweisbar sind. Besonders wichtig in diesem Zusammenhang ist das Verhalten der einzelnen E(VAR)3-93D-Proteine. Werden sie zu verschiedenen Zeiten exprimiert und unterschiedlich lokalisiert oder zeigen sie ein ähnliches Verhalten?

Analysen homozygoter Mutanten dienen der funktionellen Analyse der E(VAR)3-93D-Proteine. In den homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*- und *E(var)3-93D^{neo129}*-Larven konnte ein Protein mit einem Molekulargewicht von 33kDa detektiert werden. Ist dieses Protein noch kernlokalisiert und welche Funktion kann es ausüben? Weiterhin wurden homozygote *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutanten und homozygote *E(var)3-93D^{neo129}*-Tiere, die noch das zusätzliche 7,5kb *Bam*HI-Fragment besitzen, analysiert. Wie kann die partielle Rettung der homozygoten *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutanten durch das 7,5kb *Bam*HI-Fragment erklärt werden, welches nur für den gemeinsamen Bereich der E(VAR)3-93D-Proteine kodiert?

Die Analyse der Mutanten ist außerdem essentiell, um die Spezifität der eingesetzten Antikörper zu beweisen.

Bei allen angewandten Techniken wurden auch die entsprechenden Präimmunsereen ausgetestet, sie zeigten keine Reaktion. Das Antiserum Anti-23gt-gesamt aus Kaninchen und der aus diesem Serum gegen die BTB-Domäne immunoaffinitätsgereinigte Antikörper zeigten gleiche Resultate in den entsprechenden Versuchen.

Die Antikörper, die gegen die E(VAR)3-93D-Proteine 1(8) und 4(4) gerichtet waren, zeigten für die angewandten Methoden keine Reaktion, was mit einer geringeren Abundanz der Proteine oder einer niedrigeren Affinität der Antikörper begründet werden kann.

3.2.2.1. Charakterisierung der Expression der E(VAR)3-93D-Proteine in Ovarien adulter Weibchen

Aufgrund von "whole mount" *in situ* Hybridisierungen von Ovarien und genetischen Analysen konnte für den *E(var)3-93D*-Locus eine starke maternale Komponente nachgewiesen werden (Dorn, persönliche Mitteilung). Die maternale Komponente kann aus RNA und/oder Protein bestehen.

Deshalb wurden zum Nachweis einer maternalen Proteinkomponente Ovarien des Wildtyps (*CantonS*) mit dem Antikörper gegen das gesamte 23gt-Protein immunmarkiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 a-f zu sehen.

Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei den E(VAR)3-93D-Proteinen um Kernproteine handelt. Sie wurden in Zellkernen somatischen Ursprunges (Follikelzellen), aber auch in den Keimbahnzellkernen (Eizelle und Nährzellen) nachgewiesen (Abb. 13 a-d). In den Nährzellen erfolgt eine Endoreplikation der Chromosomen. In diesen Kernen konnte eine gute Korrelation zwischen DNA- und Proteinfärbung gezeigt werden (Abb. 13a,b), was auf eine Chromatinbindung der E(VAR)3-93D-Proteine hinweist. Die Chromosomen der Eizelle werden in der meiotischen Metaphase 1 arretiert (Cummings und King 1969). Eine Bindung der E(VAR)3-93D-Proteine an diese Chromosomen wurde nicht gezeigt, sie können aber im Karyoplasma nachgewiesen werden (Abb. 13c-d). Ab Stadium 11 der Oogenese erfolgt eine Degradation der Nährzellen. Die in ihnen synthetisierten RNAs und Proteine werden in die Eizelle transportiert und stellen den maternalen Vorrat für den sich entwickelnden Embryo dar. Auch die E(VAR)3-93D-Proteine werden nach Degradation der Nährzellen in die reifende Eizelle transportiert und können dort in Form von "protein bodies" nachgewiesen werden (Abb. 13e). Damit konnten sowohl RNA als auch Protein des *E(var)3-93D*-Locus als maternale Komponente nachgewiesen werden.

Die Mutation *E(var)3-93D^{neo129}* zeichnet sich durch rezessive Letalität bei 18°C und 25°C aus. Die Tiere sind stark semiletal bei 29°C. Die homozygoten Weibchen sind steril. Sie legen zwar Eier ab, diese arretieren aber in ihrer Entwicklung unmittelbar nach der Befruchtung. Ovarien dieser homozygoten Weibchen wurden ebenfalls mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt immunmarkiert. Es konnten in den Eikammern keine Proteine im Kern nachgewiesen werden (Abb. 13 g-h). Aufgrund der Insertion des *pUChsneory⁺*-Transposons wurde für diese Mutante ein Protein postuliert, was sich aus der BTB-Domäne und weiteren 9 Aminosäuren zusammensetzt (Schotta, 1997). Durch Westernblotanalysen konnte nachgewiesen werden, daß der Antikörper Anti-23gt-gesamt auch die BTB-Domäne erkennt. Deshalb sollte bei der Mutante in den Ovarien auch keine Kernlokalisierung des verkürzten Proteins erfolgen. Dieses Ergebnis ist zudem ein wichtiger Hinweis für die Spezifität des verwendeten Antikörpers.

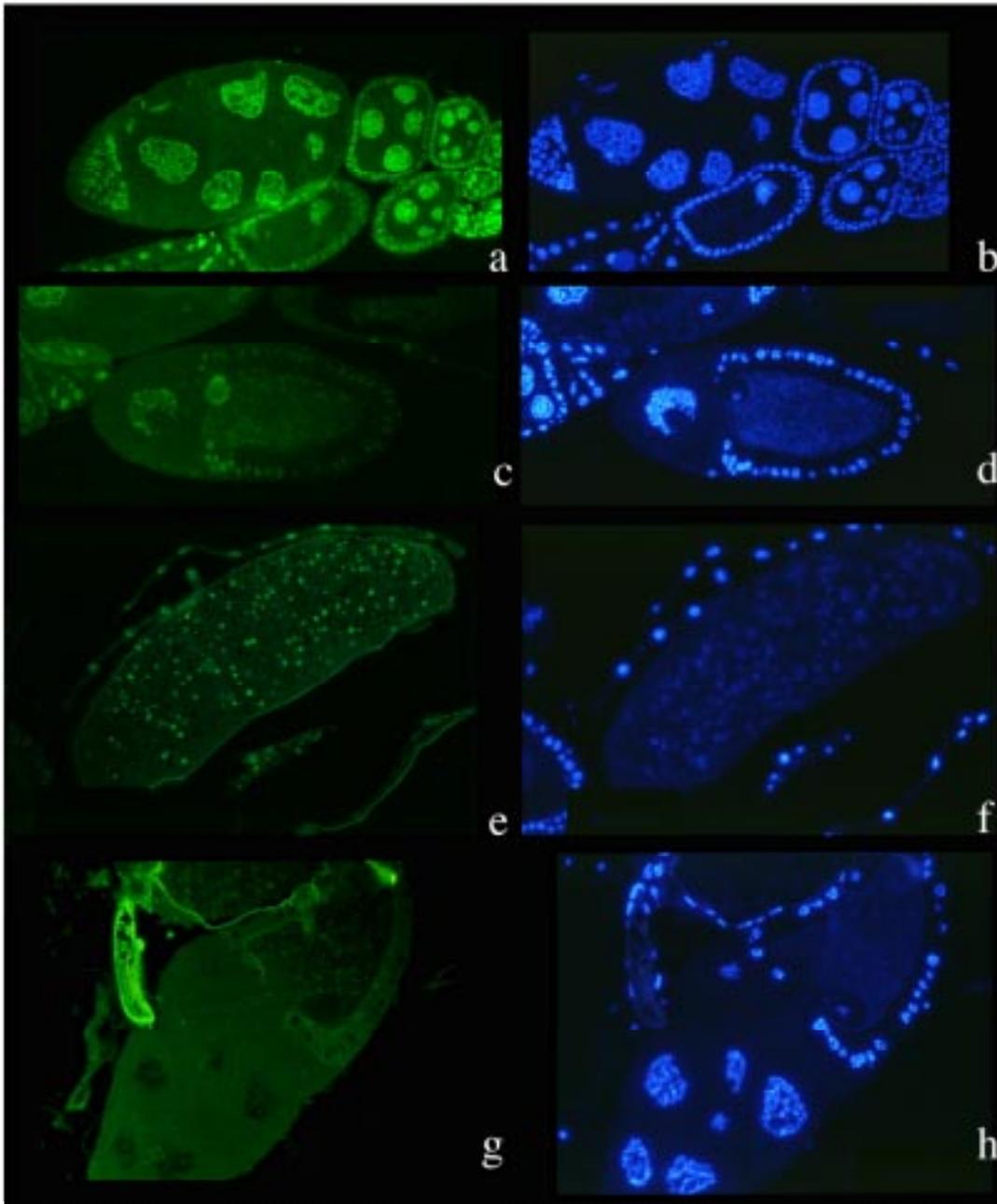


Abb. 13: Immunmarkierung von Ovarien mit dem Antikörper gegen das gesamte 23gt-Protein (1:1000): a-f Wildtyp (*CantonS*); g-h homozygote *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutante; a,c,e,g Antikörperfärbung; b,d,f,h DNA-Färbung; a,b Eikammern bis Stadium 8; c,d,g,h Eikammer Stadium 10; e,f Eikammern Stadium 14
Die in der *CantonS*-Linie detektierten E(VAR)3-93D-Proteine sind kernlokalisiert und werden als maternale Komponente in die Eizelle gegeben. In den Ovarien der Mutante sind die Proteine im Kern nicht nachweisbar.

3.2.2.2. Analyse der E(VAR)3-93D-Proteinexpression während der Embryonalentwicklung

Aufgrund der maternalen Komponente sollten die E(VAR)3-93D-Proteine auch Funktionen während der Embryonalentwicklung besitzen. Dabei stellt sich die Frage, ob die einzelnen E(VAR)3-93D-Proteine verschiedene Funktionen ausüben bzw. zu unterschiedlichen Zeiten exprimiert werden.

Deshalb wurden Embryonen mit den Antikörpern Anti-23gt-gesamt, Anti-38gt-spezifisch und Anti-23gt-spezifisch immunmarkiert und dadurch das Verhalten der Proteine während der Embryonalentwicklung untersucht.

Nach der Beendigung der meiotischen Teilung befinden sich in der Eizelle 4 haploide weibliche Vorkerne. Nach der Befruchtung, die noch während der Meiose stattfindet, bewegt sich ein weiblicher Vorkern zum haploiden männlichen Vorkern in das Innere des Eies und beide treten in den ersten Mitosezyklus ein. Die restlichen drei weiblichen Vorkerne verbleiben an der Oberfläche und bilden das Polarkörperchen. Auch sie beginnen mit der Mitose, bleiben aber in der Metaphase arretiert. Die ersten Kernteilungen (präblastodermale Teilungen), finden im Inneren des Embryos statt, später (im Kernteilungsstadium 9) erfolgt die Wanderung der Kerne an die Oberfläche und das Blastodermstadium wird erreicht. Einige Kerne verbleiben in Inneren des Embryos und bilden die Dotterkerne, welche während der folgenden Mitosen polyploidisieren. Die ersten Teilungen verlaufen im Syncytium, das heißt, es werden keine Plasmamembranen gebildet. Erst nach der 14. Kernteilung im Blastodermstadium erfolgt die Bildung von Plasmamembranen. Bis zum 14. Kernteilungszyklus verlaufen die Kernteilungen im Embryo synchron (Foe *et al.* 1993).

In präblastodermalen Embryonen konnte ein starker maternaler Vorrat der E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 14b). Es konnte gezeigt werden, daß die E(VAR)3-93D-Proteine im Präblastodermstadium nicht im Kern lokalisiert sind. In Abb. 14a-c ist ein präblastodermaler Embryo während der Interphase des Kernteilungszyklus 6 zu sehen, Abb. 15 d-f zeigt die vergrößerten Kerne für das entsprechende Stadium.

Ein Polarkörperchen ist in Abb. 15a-c zu sehen. Eine Bindung der E(VAR)3-93D-Proteine an die in der Metaphase arretierten Chromosomen konnte nicht gezeigt werden (Abb. 15b).

Eine Kernlokalisierung der E(VAR)3-93D-Proteine konnte zuerst in der Interphase des Kernteilungszyklus 9 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). In der Interphase 10, nach Beendigung der Wanderung der Kerne an die Peripherie, ist eine deutliche Kernlokalisierung der E(VAR)3-93D-Proteine zu erkennen (Abb. 15g-i). In der Abb. 14 d-f sind optische Schnitte durch einen Embryo während der Interphase des Kernteilungszyklus 13 zu sehen. Die Abb. 14d-e zeigen einen optischen Schnitt an der Oberfläche, die Abb. 14g-i einen optischen Schnitt durch die Mitte des Embryos. Während die Kerne an der Peripherie deutlich markiert sind (Abb. 14d-f), konnten in den polyploiden Dotterkernen keine E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 14g-i). Eine Vergrößerung der Kerne an der Peripherie ist in Abb. 15k-m zu sehen. Auch in den Polzellen, die die späteren Keimbahnzellen bilden, konnte eine Kernlokalisierung der E(VAR)3-93D-Proteine gezeigt werden (Abb. 14 g-i).

In späteren Stadien konnte keine Organspezifität der E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen werden, sie sind ubiquitär verteilt (Daten nicht gezeigt).

Die beschriebenen Immunmarkierungen wurden mit dem Antikörper 23gt-gesamt durchgeführt, der alle E(VAR)3-93D-Proteine detektiert. Die gleichen Resultate wurden mit den Antikörpern gegen die spezifischen Proteine 23gt und 38gt erhalten (Daten nicht gezeigt).

Die Expression und Lokalisation der E(VAR)3-93D-Proteine sprechen für deren Funktion während der Embryonalentwicklung.

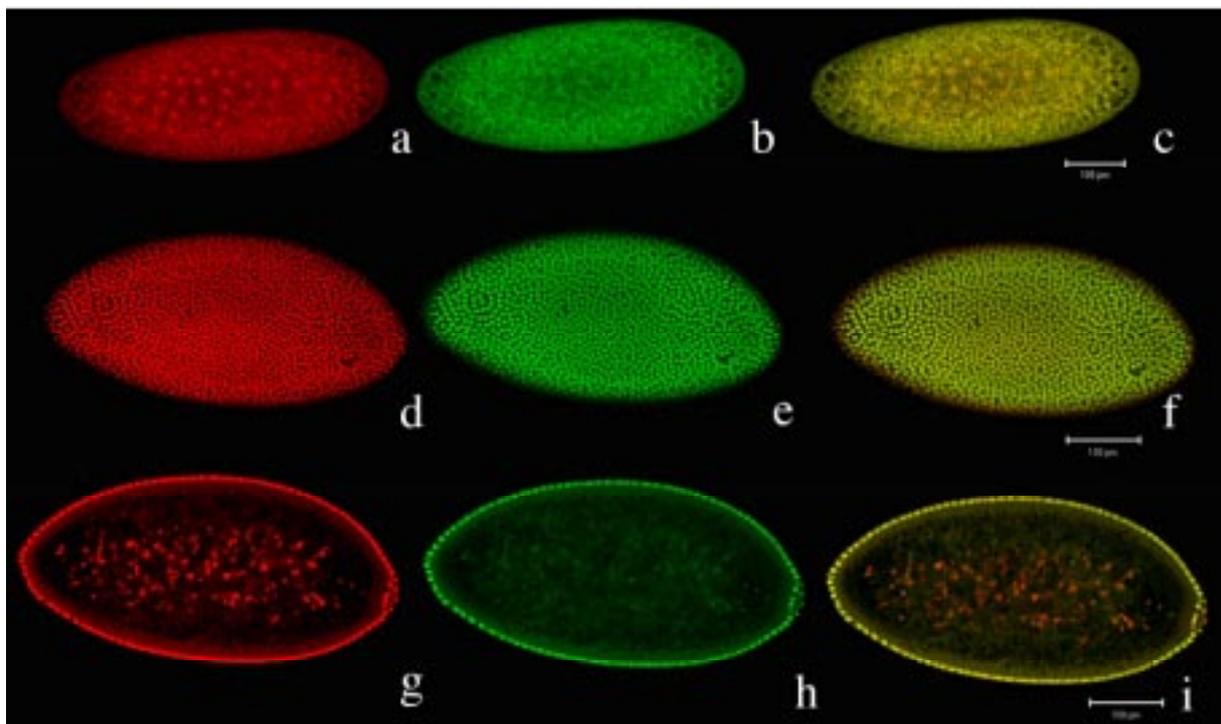


Abb. 14: Immunmarkierung von Wildtypembryonen (*CantonS*) mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt (1:1000): a-c präblastodermaler Embryo Kernteilungszyklus 6 Interphase; d-i Embryo während des syncytialen Blastoderms Kernteilungszyklus 13 Interphase; d-f optischer Schnitt an der Oberfläche des Embryos; g-i optischer Schnitt durch die Mitte des Embryos a,d,g DNA-Färbung; b,e,h Anti-23gt-gesamt, c,f,i Überlagerung von DNA-und Antikörperfärbung

Es wurde eine Lokalisation der E(VAR)3-93D-Proteine in den somatischen Kernen an der Peripherie und den Polzellkernen während des syncytialen Blastoderms nachgewiesen.

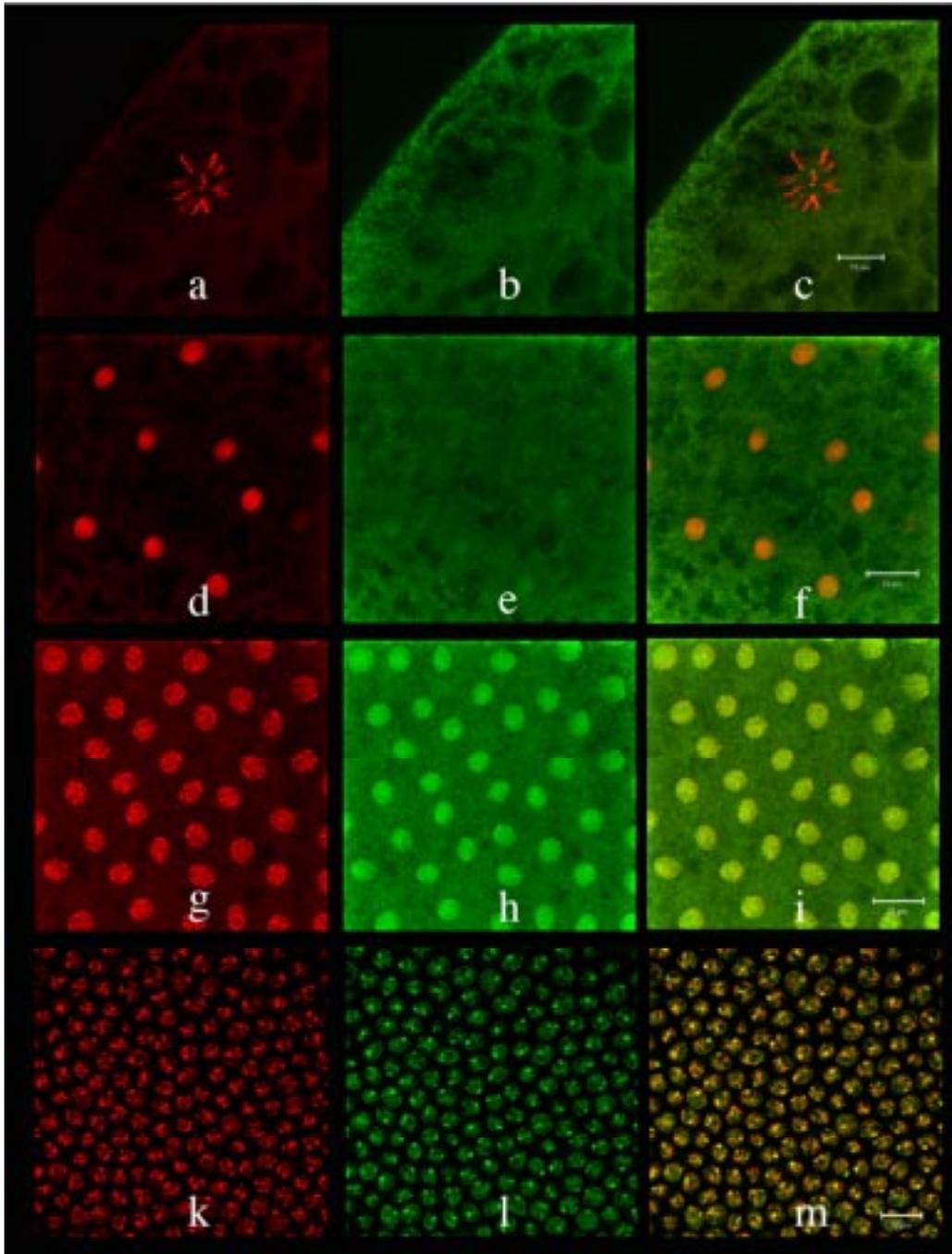


Abb. 15: Vergrößerte Darstellung embryonaler Kerne des Wildtyps (*CantonS*), Immunmarkierung mit dem Antikörper gegen das gesamte 23gt-Protein (1:1000): a-c Polarkörperchen; Interphasekerne während der 6. (d-f); 10. (g-i) und 13. Kernteilung (k-m) a,d,g,k DNA-Färbung; b,e,h,l Anti-23gt-gesamt; c,f,i,m Überlagerung von DNA- und Antikörperfärbung
Eine Kernlokalisierung der E(VAR)3-93D-Proteine konnte erst im syncytialen Blastoderm nachgewiesen werden.

3.2.2.3. Die Lokalisation der E(VAR)3-93D-Proteine während des Zellzyklus

Die Teilungen der somatischen Kerne während des syncytialen Blastoderms verlaufen synchron (Foe and Alberts 1983). Während der Mitose erfolgt eine Umorganisation des Chromatins, wobei eine selektive Dissoziation von Nichthistonproteinen zu beobachten ist (Martinez-Balbas *et al.*, 1995).

Wie in Abb. 15k-m gezeigt wurde, sind die detektierten E(VAR)3-93D-Proteine in der Interphase während des syncytialen Blastoderms kernlokalisiert. Die Verteilung der E(VAR)3-93D-Proteine während der Mitose im syncytialen Blastoderm ist in den Abbildungen 16 und 17a-f zu sehen.

Während der Prophase, wenn die Kondensation der Chromosomen beginnt, sind die nachgewiesenen Proteine noch chromatinassoziiert (Abb. 16d-f). Danach kann eine Dissoziation der Proteine von den Chromosomen detektiert werden. Sie sind während der Meta-(Abb. 16g-i) und Anaphase (Abb. 17 a-c) im Zytoplasma lokalisiert. Noch während der Telophase läßt sich eine Reassoziierung der Proteine mit dem Chromatin (Abb. 17d-f) nachweisen. Danach erfolgt eine Dekondensation des Chromatins und der nächste Zellzyklus beginnt.

Nach dem Blastodermstadium verlaufen die Zellteilungen asynchron. Auch hier ist das gleiche Verhalten der E(VAR)3-93D während des Zellzyklus zu beobachten (Abb. 17g-i).

Die in den Abbildungen 16 und 17 dargestellten Ergebnisse wurden unter Verwendung des Antikörper Anti-23gt-gesamt erhalten. Immunmarkierungen mit den Antikörpern Anti-23gt-spezifisch und Anti-38gt-spezifisch zeigten ein ähnliches Verhalten für diese Proteine. Die Abb. 18 zeigt die Überlagerungen von DNA- und Antikörperfärbung unter Verwendung der Antikörper Anti-23gt-gesamt (18a,d,g,k), Anti-38gt-spezifisch (18 b,e,h,l) und Anti-23gt-spezifisch (Abb. 18c,f,i,m) während der Inter- (Abb. 18a-c), Pro- (Abb. 18 d-f) , Meta- (Abb. 18g-i) und Anaphase (Abb. 18 k-m).

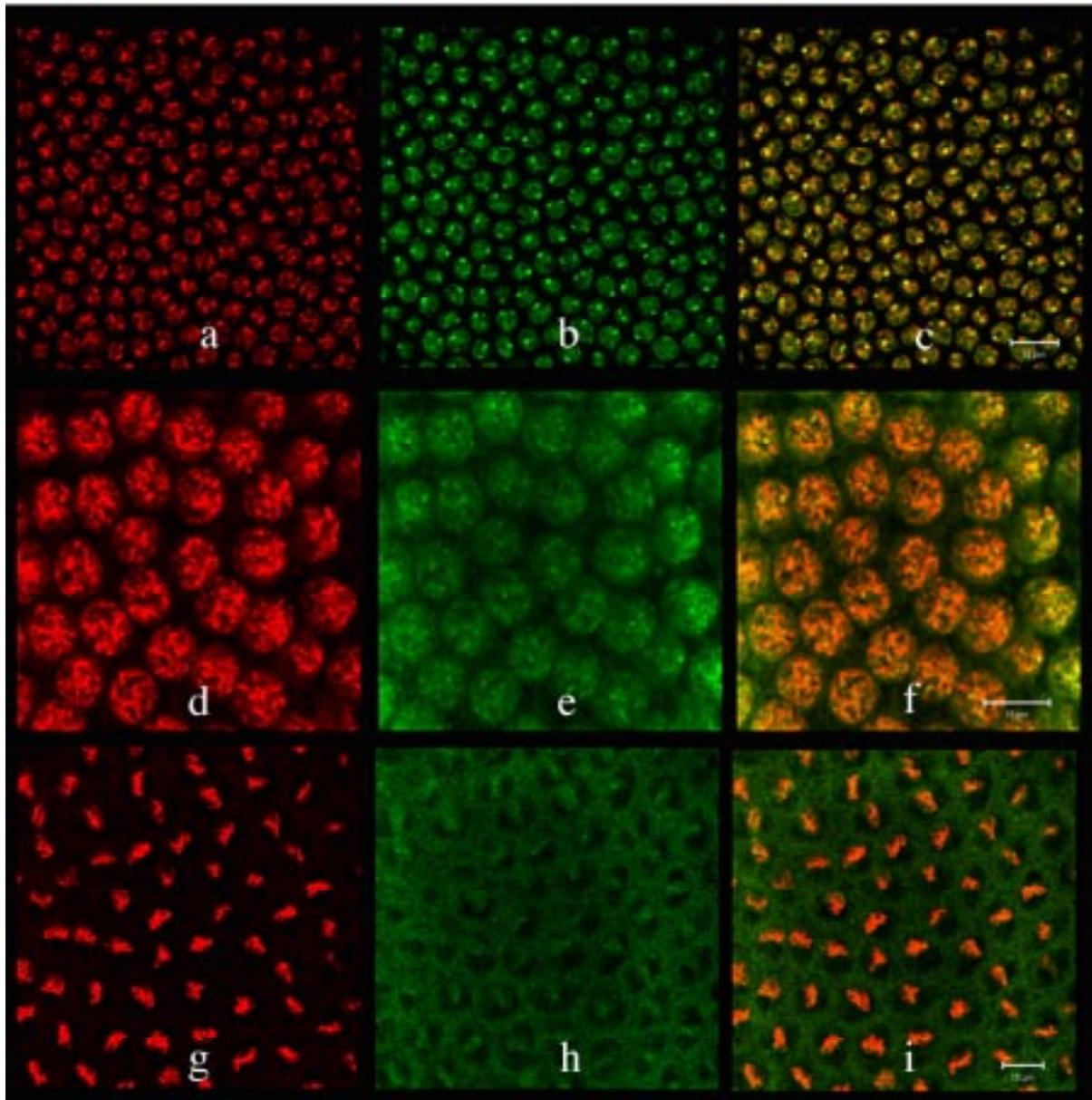


Abb. 16: Immunmarkierung von Wildtypembryonen (*CantonS*) mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt (1:1000), Verhalten der E(var)3-93D-Proteine während des Zellzyklus
a-c Interphase Kernteilung 13; d-f Prophase Kernteilung 10; g-i Metaphase Kernteilung 12;
a,d,g, DNA-Färbung; b,e,h Anti-23gt-gesamt; ,f,i Überlagerung von DNA-und Antikörperfärbung

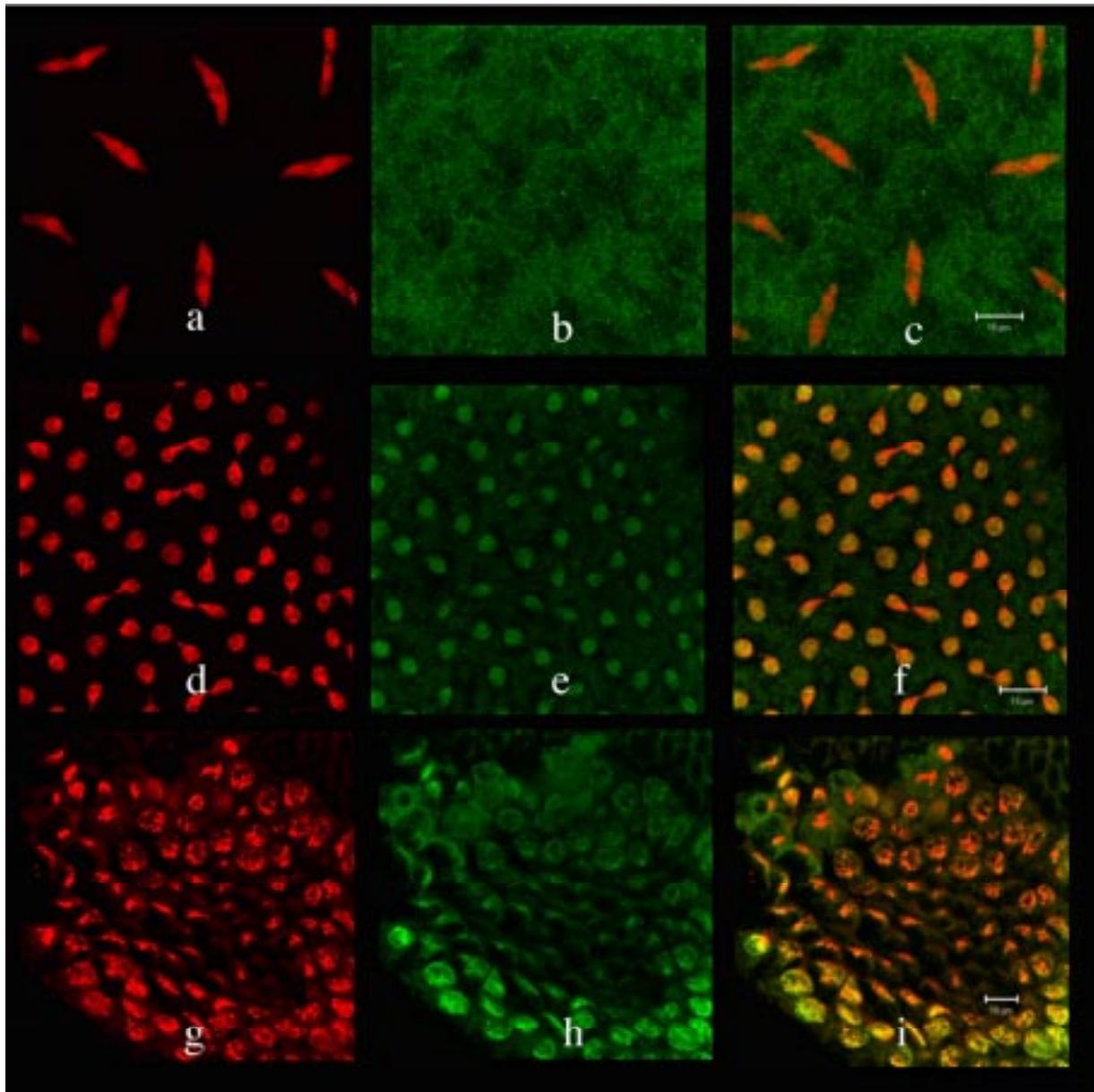


Abb. 17: Immunmarkierung von Wildtypembryonen (*CantonS*) mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt (1:1000), Verhalten der E(VAR)3-93D-Proteine während des Zellzyklus
a-c Anaphase Kernteilung 10; d-f Telophase Kernteilung 12; g-i Mitosefeld während der Gastrulation;
a,d,g, DNA-Färbung; b,e,h Anti-23gt-gesamt; ,f,i Überlagerung von DNA-und Antikörperfärbung
Anhand der Abb. 16 und 17 konnte eine Dissoziation der E(VAR)3-93D-Proteine vom Chromatin nach der Prophase und deren Reassoziatiion mit dem Chromatin in der Telophase detektiert werden.

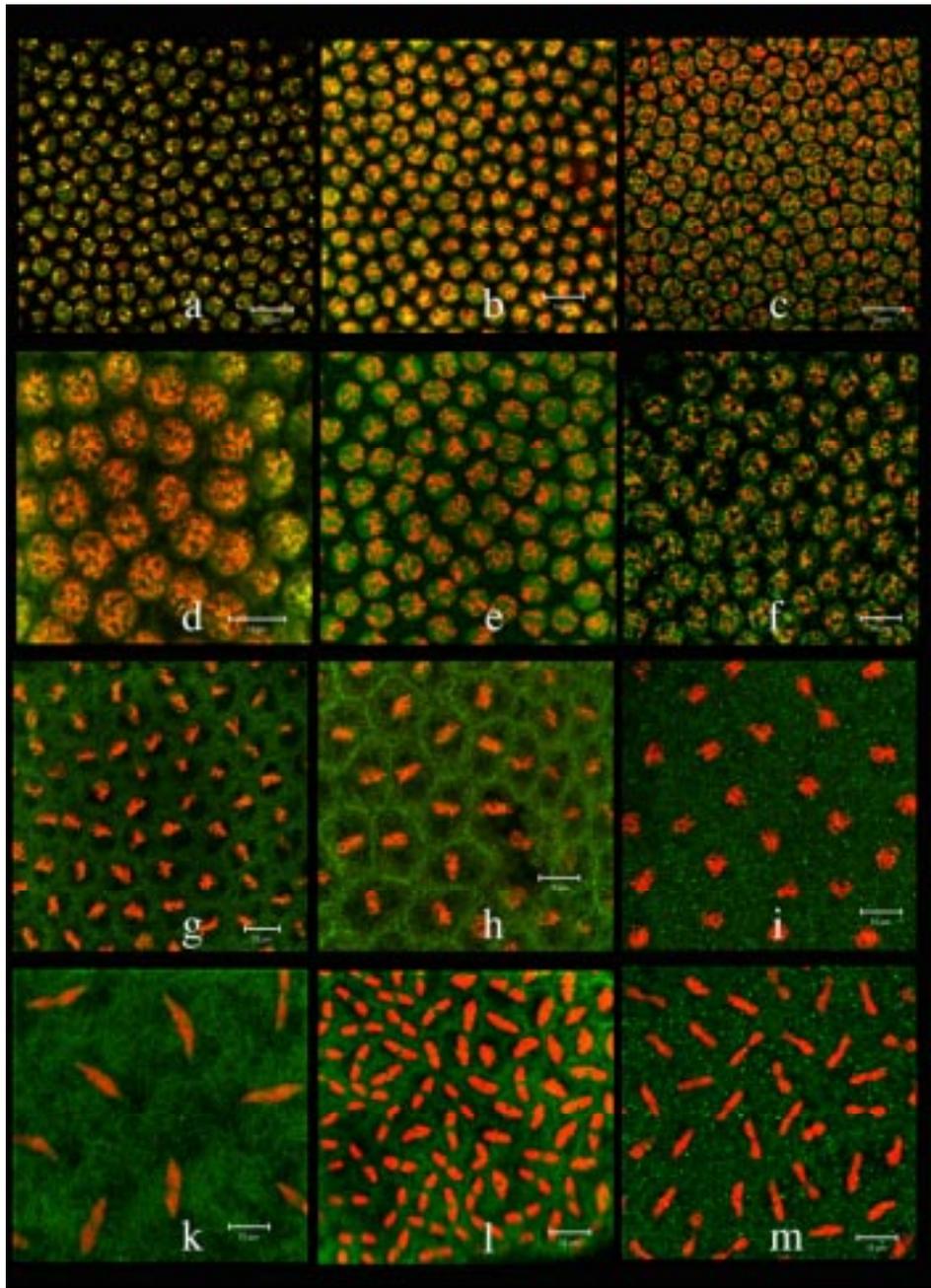


Abb. 18: Immunmarkierung von Wildtypembryonen (*CantonS*) mit den Antikörpern Anti-23gt-gesamt (1:1000), Anti-38gt-spezifisch (1:500) und Anti-23gt-spezifisch (affinitätsgereinigt 1:100), Verhalten der E(var)3-93D-Proteine während des Zellzyklus: Die Abbildung zeigt die Überlagerungen von DNA- und Proteinfärbung.
a,d,g,k Anti-23gt-gesamt, b,e,h,l Anti-38gt-spezifisch; e,f,i,m Anti-23gt-spezifisch;
a-c Interphase; d-f Prophase; g-i Metaphase; k-m Anaphase; d,k Kernteilung 10; i,m h
Kernteilung 11; e,f,g,l Kernteilung 12; a,b,c Kernteilung 13
Es konnte ein prinzipiell gleiches Verhalten der E(VAR)3-93D-Proteine 23gt und 38gt während des Zellzyklus gezeigt werden.

3.2.2.4. Nachweis der räumlichen Verteilung der E(VAR)3-93D-Proteine im Interphasekern

Für alle untersuchten E(VAR)3-93D-Proteine konnte das gleiche Verhalten in der Embryonalentwicklung und während des Zellzyklus gezeigt werden.

Doch die Analyse der räumlichen Verteilung der E(VAR)3-93D-Proteine mit Hilfe der Antikörper Anti-23gt-spezifisch, Anti-38gt-spezifisch und Anti-23gt-gesamt im Interphasekern deutet auf unterschiedliche Funktionen einzelner E(VAR)3-93D-Proteine hin. Dafür wurden Schnittserien horizontaler optischer Schnitte angefertigt und damit die Verteilung der Proteine innerhalb des Interphasekerns ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 zu sehen. Horizontale Schnitte entlang der Oberfläche zeigen die Abb. 19a-i, horizontale Schnitte entlang der Mittellinie die Abb. 19k-s.

An der apikalen Oberfläche konnten mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt distinkte Spots nachgewiesen werden (Abb. 19b), die auch mit einer intensiven DNA-Färbung korrelieren (Abb. 19c, in gelb). Für die Markierung mit den Antikörpern Anti-23gt-spezifisch (Abb. 19h) und 38gt-spezifisch (Abb. 19e) konnte entlang der apikalen Oberfläche nur eine schwache Färbung und auch keine Markierung distinkter Spots wie in 19b,c nachgewiesen werden. Optische Schnitte entlang der Mittellinie (Abb. 19, k-s) lassen ein prinzipiell ähnliches Färbemuster für alle verwendeten Antikörper erkennen.

Außerdem wurden vertikale optische Schnitte entlang der Mittellinie der Kerne angefertigt (Abb. 20). An der apikalen Oberfläche der Kerne sind bei der DNA-Färbung intensiv angefärbte Bereiche zu erkennen (Abb. 20 a,d,g). Dabei handelt es sich um zentromerisches Heterochromatin (Foe and Alberts 1993). Unter Verwendung des Antikörpers Anti-23gt-gesamt konnten in diesem Bereich distinkte Spots nachgewiesen werden (Abb. 20 b), die mit der intensiven DNA-Färbung korrelieren (Abb. 20c). Diese Färbung erstreckt sich aber nicht über den gesamten heterochromatischen Bereich (Abb. 20 a-c). Für die Antikörper Anti-23gt-spezifisch (Abb. 20h) und Anti-38gt-spezifisch (Abb. 20e) konnte eine gleichmäßige Verteilung der Proteine innerhalb des Kerns, aber keine Färbung im Bereich des zentromerischen Heterochromatins nachgewiesen werden.

Vom *E(var)3-93D*-Locus sollten also Proteine mit überwiegend euchromatischer Lokalisation (23gt und 38gt), aber auch Proteine mit Lokalisation im Heterochromatin kodiert werden. Dabei sollte es sich um andere Proteine als 23gt oder 38gt handeln.

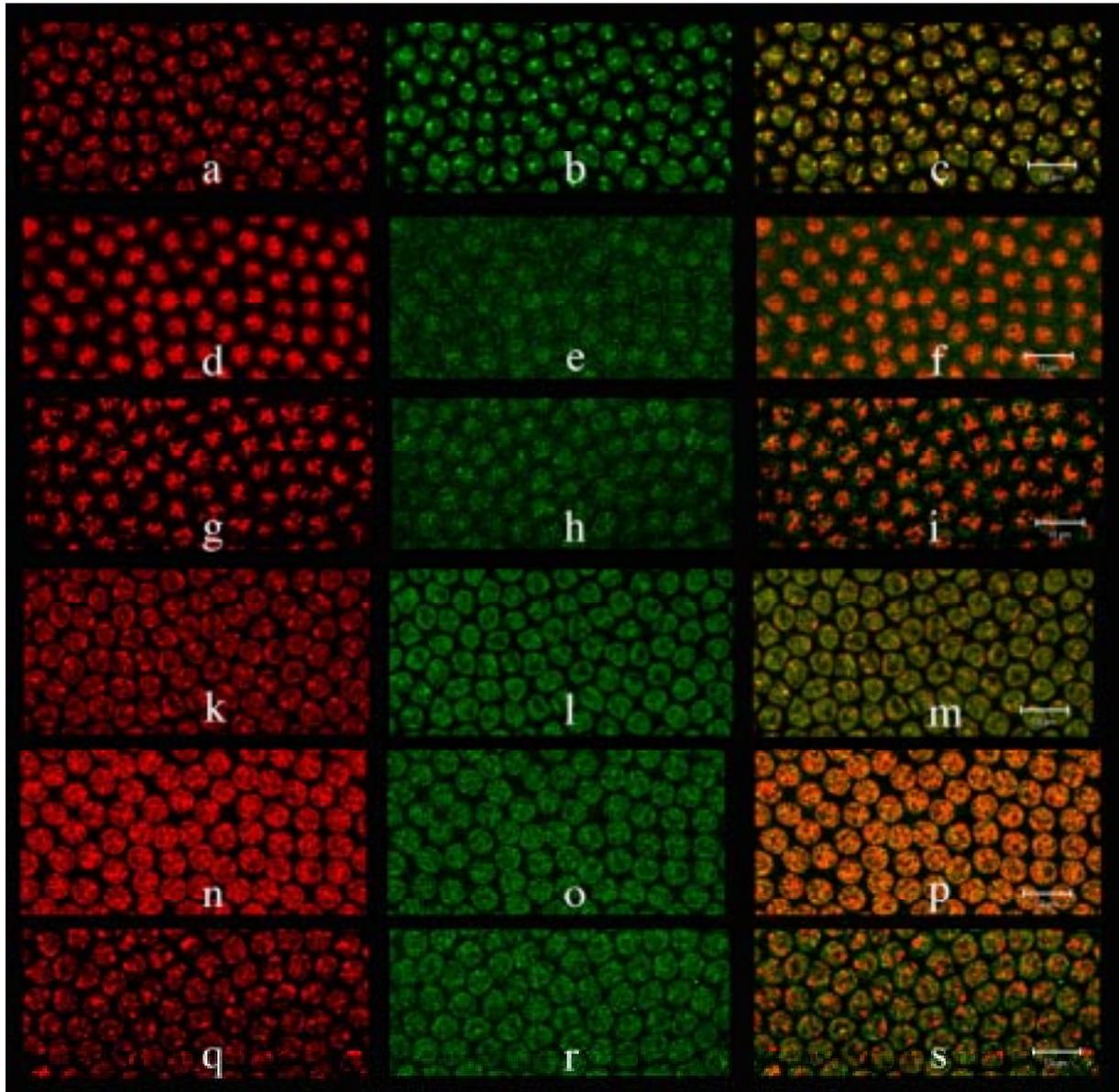


Abb. 19: Horizontale optische Schnitte durch Interphasekerne des Wildtyps (*CantonS*) während des syncytialen Blastoderms (Kernteilung 13):
a-i optische Schnitte entlang der apikalen Oberfläche; k-s optische Schnitte entlang der Mittelebene;
a,b,c,k,l,m, Anti-23gt-gesamt (1:1000); d,e,f,n,o,p Anti-38gt-spezifisch (1:500); g,h,i,q,r,s Anti-23gt-spezifisch (affinitätsgereinigt, 1:100)
a,d,g,k,n,q DNA-Färbung; b,e,h,l,o,r, Antikörperfärbung; c,f,i,m,p,s Überlagerung von DNA- und Antikörperfärbung;
Es konnten E(VAR)3-93D-Proteine an der apikalen Oberfläche der Interphasekerne nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich nicht um die Proteine 23gt und 38gt.

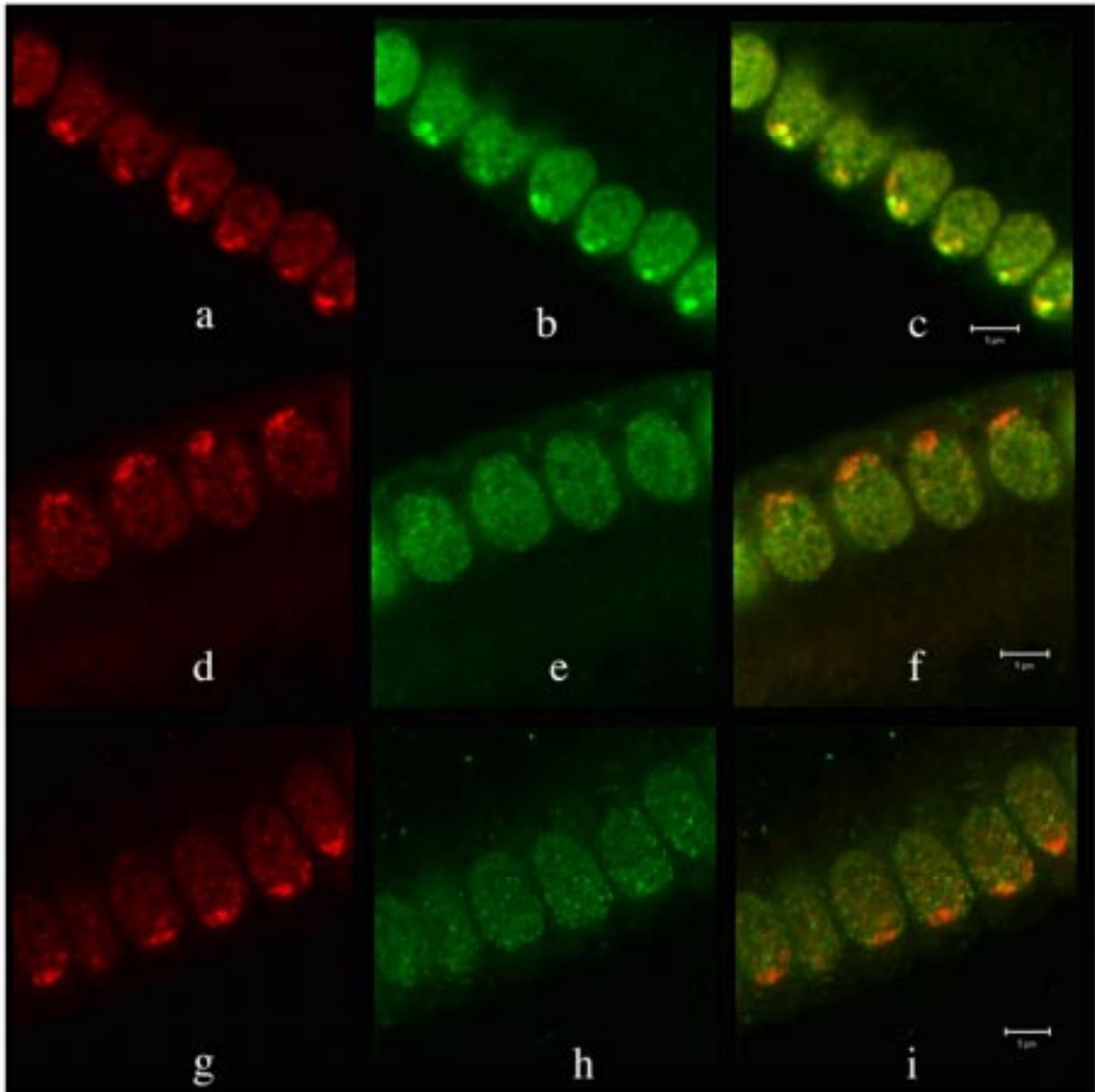


Abb. 20: Vertikale optische Schnitte durch Interphasekerne des Wildtyps (*CantonS*) während des syncytialen Blastoderms:
a-c Anti-23gt-gesamt (1:1000); d-f Anti-38gt-spezifisch (1:500); g-i Anti-23gt-gesamt (affinitätsgereinigt 1:100)
a,d,g DNA-Färbung; b,e,h Antikörperfärbung; c,f,i Überlagerung von DNA- und Antikörperfärbung;
Die detektierbare Bindung der E(VAR)3-93D-Proteine an das zentromere Heterochromatin wird nicht durch die Proteine 23gt und 38gt realisiert.

3.2.2.5. Analyse von homozygoten $E(var)3-93D^{neo129}$ -Tieren mit zusätzlichem genomischem 7,5kb $BamHI$ -Fragment

Die E(VAR)3-93D-Proteine werden als maternale Komponente in die Eizelle gegeben. Aufgrund ihrer nachgewiesenen Lokalisation können für sie Funktionen während der Embryonalentwicklung postuliert werden.

In den Ovarien homozygoter $E(var)3-93D^{neo129}$ -Mutanten, die bei 29°C selektiert wurden, konnten keine E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen werden (siehe Abb. 13g-h), was mit der Sterilität der Tiere korreliert. Die rezessive Letalität der $E(var)3-93D^{neo129}$ -Mutanten bei 18°C und 25°C konnte durch P-Element vermittelte Transformation der 7,5kb $BamHI$ -Fragmentes partiell gerettet werden, nicht aber deren weibliche Sterilität (Dorn, persönliche Mitteilung). Doch während die Nachkommen homozygoter $E(var)3-93D^{neo129}$ -Weibchen in ihrer Entwicklung nach der Befruchtung arretieren, führt das zusätzliche genomische 7,5kb $BamHI$ -Fragment zum Überleben der Tiere bis über das Blastodermstadium hinaus. Das 7,5kb $BamHI$ -Fragment enthält nur die ersten vier Exonen des $E(var)3-93D$ -Locus und sollte für diesen Effekt verantwortlich sein. Die ersten vier Exonen kodieren neben der BTB-Domäne auch für einen Teil der E(VAR)3-93D-Proteine mit einer potentielle Kernlokalisationssequenz (siehe Einleitung, Abb. 1). Deshalb wurden die Nachkommen homozygoter $E(var)3-93D^{neo129}$, $w^+(7,5kb BamHI)$ -Weibchen mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt immunmarkiert.

Ein repräsentativer Embryo ist in Abb. 14 zu sehen. Es sind deutliche Entwicklungsdefekte zu erkennen. In Wildtypembryonen befinden sich im Blastodermstadium alle Kerne, mit Ausnahme der Dotterkerne, an der Oberfläche. In homozygoten $E(var)3-93D^{neo129}$, $w^+(7,5 BamHI)$ -Embryonen wurden auch Kerne gefunden, die von der Oberfläche wieder ins Innere gefallen sind (Abb. 14a-b). Das nachgewiesene Protein ist kernlokalisiert, es konnte aber auch ein relativ hoher Anteil von zytoplasmatisch lokalisiertem Protein detektiert werden (Abb. 21a-b, f-g). Eine Vergrößerung der Kerne aus der Schnittebene 21a-b ist in 21c-e zu sehen. Die Kerne weisen Defekte wie Chromatinüber- und Unterkondensation, sowie Chromatinfragmentierung auf. Einen Schnitt durch die Mittelebene des Embryos zeigt Abb. 21f-g, die entsprechenden vergrößerten Kerne sind in 21h-n zu sehen. In Wildtypembryonen befinden sich im Inneren des Embryos Dotterkerne (siehe Abb.14g-i). Statt dessen sind in homozygoten $E(var)3-93D^{neo129}$, $w^+(7,5kb BamHI)$ -Embryonen atypisch strukturierte Kerne zu finden, an die das detektierte Protein teilweise nur sehr schwach bindet (Abb. 21f-n). Auch die Polzellen sind abnormal strukturiert (Abb. 21f-g).

In homozygoten $E(var)3-93D^{neo129}$, $w^+(7,5kb BamHI)$ -Embryonen können E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen werden, die auch kernlokalisiert sind. Es treten aber Entwicklungsdefekte und atypisch strukturierte Kerne auf.

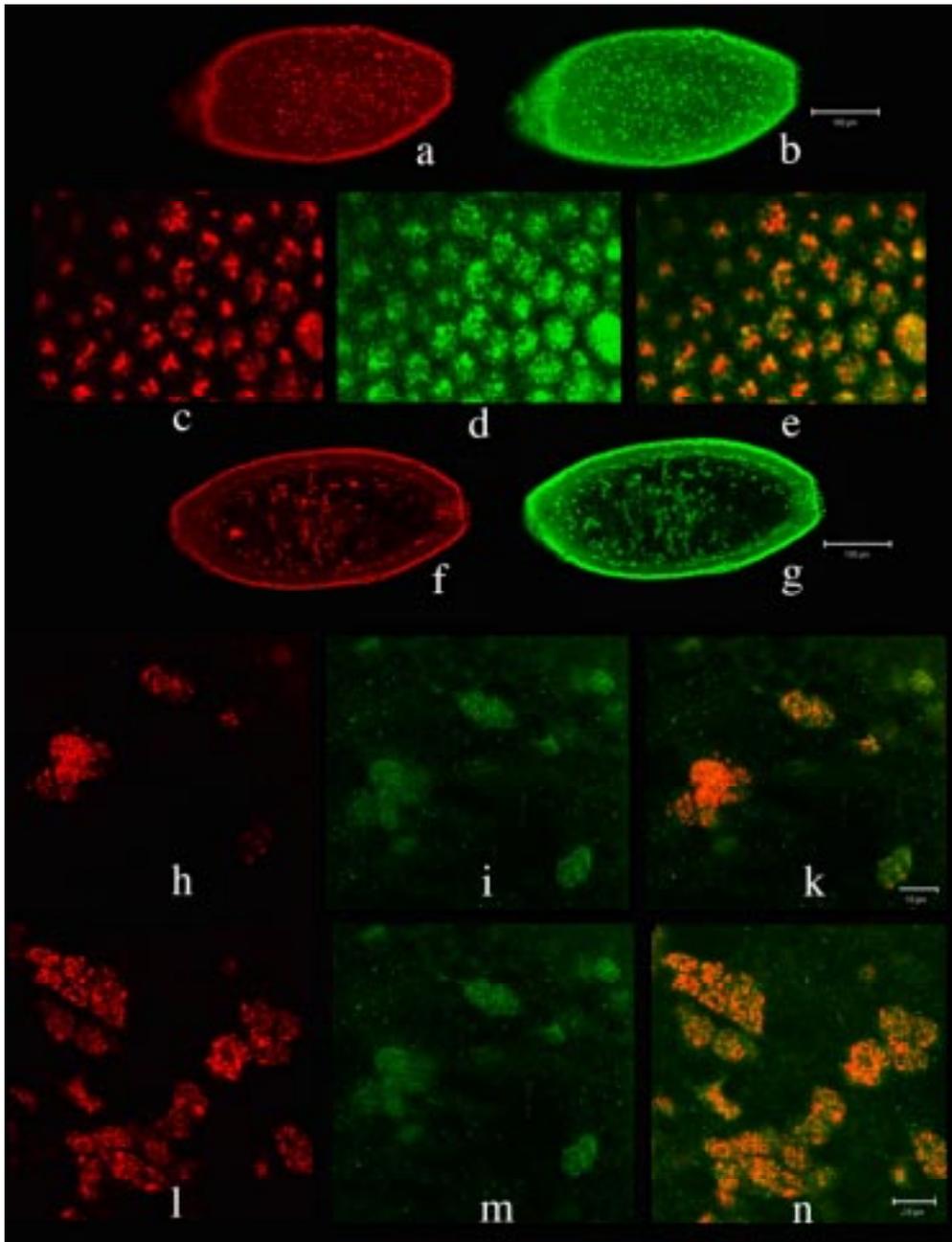


Abb. 21: Antikörperfärbung Anti-23gt-gesamt (1:1000) von *E(var)3-93D^{neo129}/E(var)3-93D^{neo129},w⁺(7,5kb BamH1)*-Embryonen: a-g optische Schnitte kurz unter der Oberfläche eines Embryos, c-e Kerne vergrößert; f-n Schnitte durch die Mittelebene des Embryos, h-n Kerne vergrößert; a,cf,h,l DNA-Färbung; b,d,g,i,m Antikörperfärbung; d,k,n Überlagerung von DNA-und Antikörperfärbung Die untersuchten Mutanten weisen zahlreiche Defekte auf. Das bei ihnen detektierte Protein ist kernlokalisiert.

3.2.2.6. Analyse des Bindungsverhaltens der E(VAR)3-93D-Proteine an Polytäanchrosomen

Die Verteilung der E(VAR)3-93D-Proteine im embryonalen Interphasekern läßt auf deren unterschiedliche Lokalisation und damit auch auf verschiedene Funktionen der einzelnen Proteine schließen. Doch im Gegensatz zu den embryonalen Interphasekernen erlauben die Polytäanchrosomen eine genaue Lokalisation chromosomaler Proteine an definierbaren Sites entlang der Chromosomenarme und im Chromozentrum.

Die gleichzeitige Anwendung zweier primärer Antikörper aus Maus und Kaninchen und deren Detektion durch sekundäre Antikörper, die mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert sind, erlauben den Nachweis der chromosomalen Bindungsstellen zweier Proteine an einem Chromosom. Eine Kolokalisation von Proteinen ist ein Hinweis darauf, daß von den detektierten Proteinen die gleichen Genloci reguliert werden.

Wie in Westernanalysen gezeigt werden konnte, detektiert der Antikörper Anti-23gt-gesamt die BTB-Domäne und somit alle E(VAR)3-93D-Proteine. An Polytäanchrosomen werden durch diesen Antikörper eine Vielzahl von Banden auf allen Chromosomenarmen markiert (Abb. 22a). Die nachweisbare Bindung der E(VAR)3-93D-Proteine an zahlreiche euchromatische Stellen korreliert mit deren Funktion als allgemeine Transkriptionsregulatoren, die aufgrund genetischer und molekularer Daten postuliert wurde (Dorn *et al.* 1993b, Dorn und Reuter, persönliche Mitteilung). Eine schwache Färbung ist im Chromozentrum zu erkennen (Abb. 22a), eine starke Markierung konnte an den Telomeren nachgewiesen werden (Abb. 22a). Es ergibt sich daraus die Frage, ob alle E(VAR)3-93D-Proteine das gleiche Verhalten zeigen oder ob sich spezifische Bindungsmuster für die einzelnen E(VAR)3-93D-Proteine nachweisen lassen.

Abb. 22 zeigt eine Doppelmarkierung von Polytäanchrosomen für die Antikörper Anti-23gt-gesamt und Anti-38gt-spezifisch. Das E(VAR)3-93D-Protein 38gt ist ebenfalls an einer Vielzahl euchromatischer Stellen auf allen Chromosomenarmen nachweisbar (Abb. 22b). Alle diese Banden korrelieren mit denen, die mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt detektiert werden konnten (Abb. 22c, in gelb). Auch im Chromozentrum konnte ein identisches Bindungsmuster für die Antikörper Anti-23gt-gesamt und Anti-38gt-spezifisch gezeigt werden. Doch die Überlappung der beiden Antikörpermarkierungen an den Polytäanchrosomen ist nicht vollständig. Sehr auffällig ist, daß das E(VAR)3-93D-Protein 38gt nicht an den Telomeren lokalisiert ist, aber auch an einigen der euchromatischen Bindungsstellen der E(VAR)3-93D-Proteine, die mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt nachgewiesen werden können, konnte das E(VAR)3-93D-Protein 38gt nicht detektiert werden (Abb. 22c, in grün).

Es konnte also gezeigt werden, daß das E(VAR)3-93D-Protein 38gt an den meisten, aber nicht allen, euchromatischen Bindungsstellen der E(VAR)3-93D-Protein detektiert werden kann. Auch das nachweisbare Bindungsverhalten im Chromozentrum ist identisch. An die Telomere und die euchromatischen Bindungsstellen, die nicht vom Antikörper 38gt-spezifisch detektiert werden, sollten andere E(VAR)3-93D-Proteine binden.

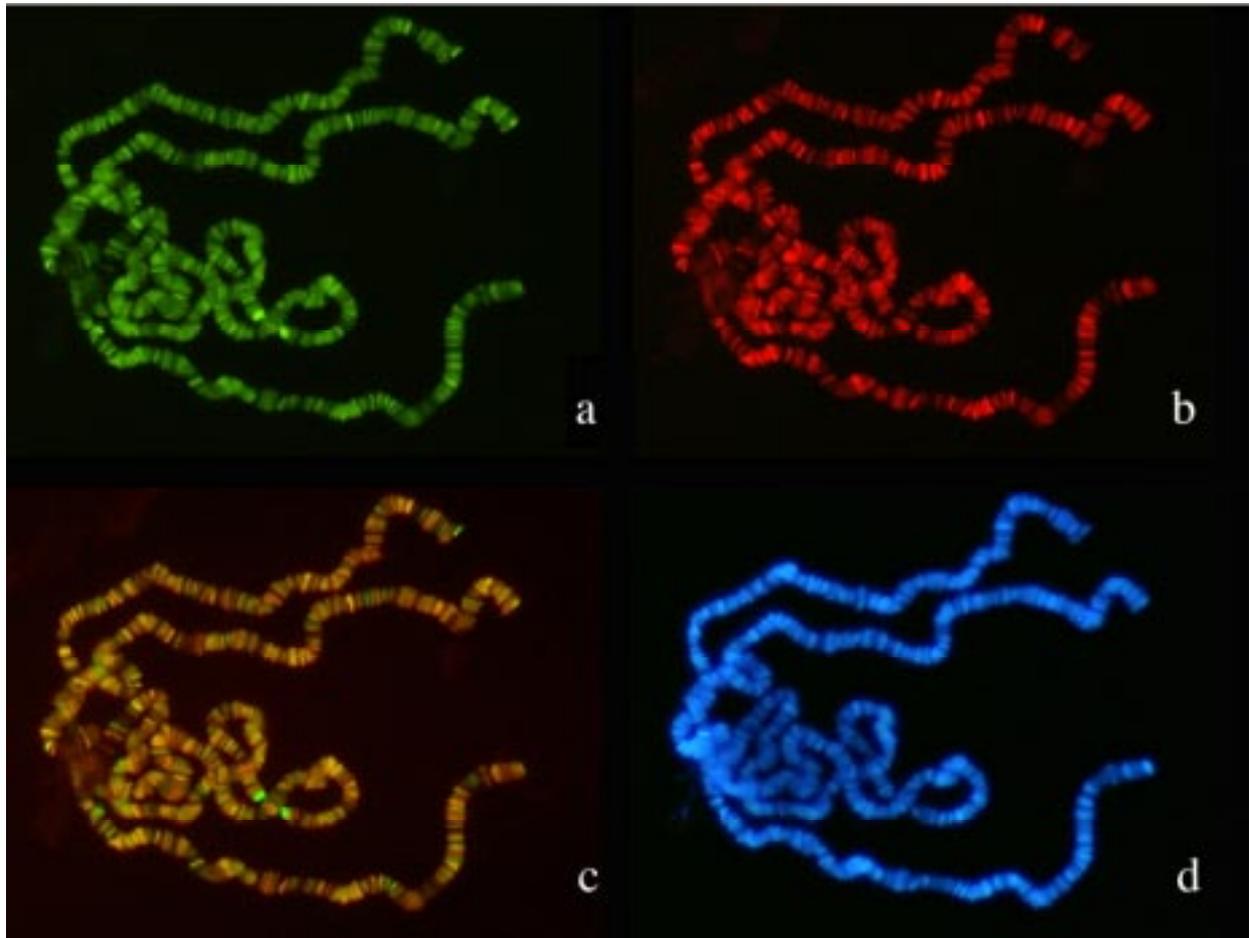


Abb. 22 Antikörperfärbung von Polytäanchrosomen einer Wildtypllinie (*CantonS*)
 a Anti-23gt-gesamt (1:1000); b Anti-38gt-spezifisch (1:500); c Überlappung Anti-23gt-gesamt und Anti-38gt-spezifisch; d DNA-Färbung
 Die Überlappung beider Antikörperfärbungen zeigt, daß das E(VAR)3-93D-Protein 38gt an den meisten der euchromatischen Bindungsstellen aller E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen werden kann (20c, in gelb). An den Telomeren und einigen euchromatischen Bindungsstellen aller E(VAR)3-93D-Proteine wird das E(VAR)3-93D-Protein 38gt nicht detektiert (20c, in grün).

Eine Doppelmarkierung mit den Antikörpern 23gt-gesamt und 23gt-spezifisch ist in Abbildung 23 zu sehen. Da auch der Antikörper 23gt-spezifisch durch Immunisierung eines Kaninchens erhalten wurde, konnten die Doppelmarkierungen nicht mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt aus Kaninchen bzw. dem durch Affinitätschromatographie über die BTB-Domäne aufgereinigten Antikörper durchgeführt werden. Zum Einsatz kam deshalb der Antikörper Anti-23gt-gesamt (Prof. Saumweber, Humboldt-Universität Berlin), der durch Immunisierung einer Maus erhalten wurde. Eine durchgeführte Doppelmarkierung mit den Antikörpern Anti-23gt-gesamt aus Maus und Kaninchen zeigte ein völlig identisches Bindungsmuster (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zum E(VAR)3-93D-Protein 38gt kann das Protein 23gt an nur ca. 40 Stellen auf den Chromosomenarmen (Abb. 23a) lokalisiert werden. Dies sind Stellen, die auch vom Antikörper Anti-23gt-gesamt detektiert werden (Abb. 23c, in gelb). Weder im Chromozentrum, noch an den Telomeren konnte das 23gt-Protein nachgewiesen werden (Abb. 23a).

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit die Bindungsstellen des 23gt-Proteins mit denen des 38gt-Proteins überlappen. Eine Doppelmarkierung von Polytänschromosomen mit den beiden Antikörpern ist in Abb. 24 zu sehen. Es gibt Bindungsstellen, an denen beide Proteine nachgewiesen werden können (Abb. 24c, in gelb). Es sind aber auch Bindungsstellen, an denen nur das 23gt-Protein und nicht das 38gt-Protein detektiert werden kann (Abb. 24c, in grün), zu erkennen.

Kann nun an allen Bindungsstellen der E(VAR)3-93D-Proteine entlang der Chromosomenarme, die nicht vom 38gt-Protein resultieren, das 23gt-Protein nachgewiesen werden? In der Abb. 25 sind exemplarisch die X-Chromosomen zu sehen. Es ist zu erkennen, daß das 38gt-Protein deutlich an 3 Stellen nicht nachgewiesen werden kann (Abb. 23b), die aber Bindungsstellen der E(var)3-93D-Proteine repräsentieren, da sie mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt detektiert werden können (Abb. 25a). Auch das E(VAR)3-93D-Protein 23gt kann nicht an diesen Stellen detektiert werden (Abb. 25d). Aus den Antikörperfärbungen kann geschlußfolgert werden, daß das E(VAR)3-93D-Protein 23gt, im Gegensatz zum Protein 38gt, nur sehr wenige nachweisbare Bindungsstellen entlang der Chromosomenarme besitzt. Diese überlappen teilweise mit denen des 38gt-Proteins, es wurden aber auch spezifische Bindungsstellen für das 23gt-Protein nachgewiesen. Identifiziert wurden weiterhin Bindungsstellen entlang der Chromosomenarme, wo die Proteine 23gt und 38gt nicht binden, die also Targets für weitere E(VAR)3-93D-Proteine darstellen sollten. Auch die Telomerbindung sollte von anderen E(VAR)3-93D-Proteinen als 23gt und 38gt realisiert werden.

Die nachweisbar schwächere Bindung des Proteins 23gt im Vergleich zum Protein 38gt kann durch seine geringere Abundanz, aber auch durch eine geringere Affinität des verwendeten Antikörpers bedingt sein.

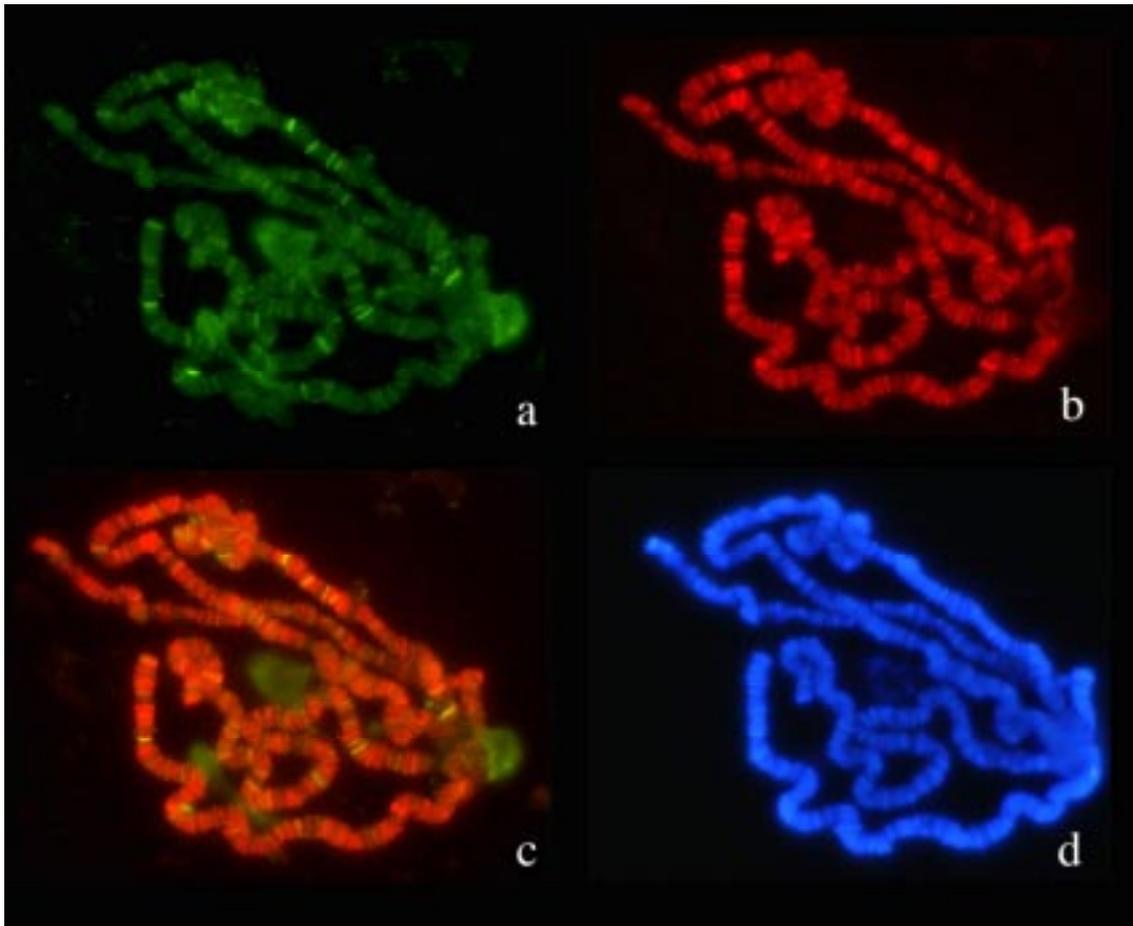


Abb. 23: Antikörperfärbung von Polytäanchromosomen einer Wildtyplinie (*CantonS*)
 a Anti-23gt-spezifisch (affinitätsgereinigt 1:250); b Anti-23gt-gesamt (Maus, 1:1000);
 c Überlappung Anti-23gt-gesamt und Anti-23gt-spezifisch; d DNA-Färbung
 Die Überlappung beider Antikörperfärbungen zeigt, daß das E(VAR)3-93D-Protein 23gt nur an
 wenigen der euchromatischen Bindungsstellen aller E(VAR)3-93D-Proteine detektiert werden
 kann (20c, in gelb). Alle nachgewiesenen Bindungsstellen für das Protein 23gt-spezifisch
 werden auch vom Antikörper Anti-23gt-gesamt markiert.

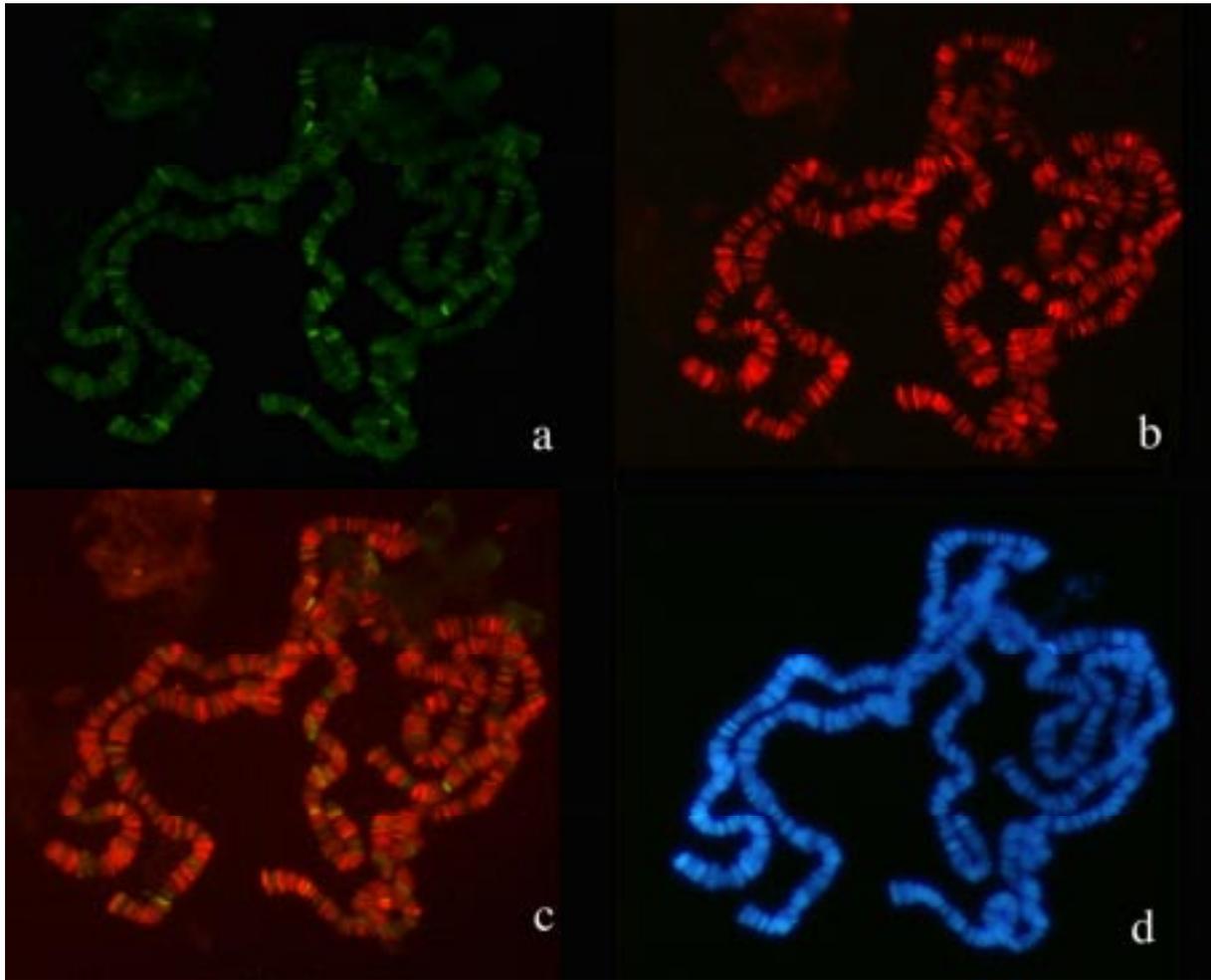


Abb. 24: Antikörperfärbung von Polytäanchrosomen einer Wildtyplinie (*CantonS*):
 a Anti-23gt-spezifisch (affinitätsgereinigt 1:250); b Anti-38gt-spezifisch (1:500);
 c Überlappung Anti-38gt-spezifisch und Anti-23gt-spezifisch; d DNA-Färbung
 Die Überlappung beider Antikörperfärbungen zeigt, daß das E(VAR)3-93D-Protein 23gt
 teilweise mit 38gt-spezifisch kolokalisiert, aber auch spezifische Bindungsstellen
 besitzt.

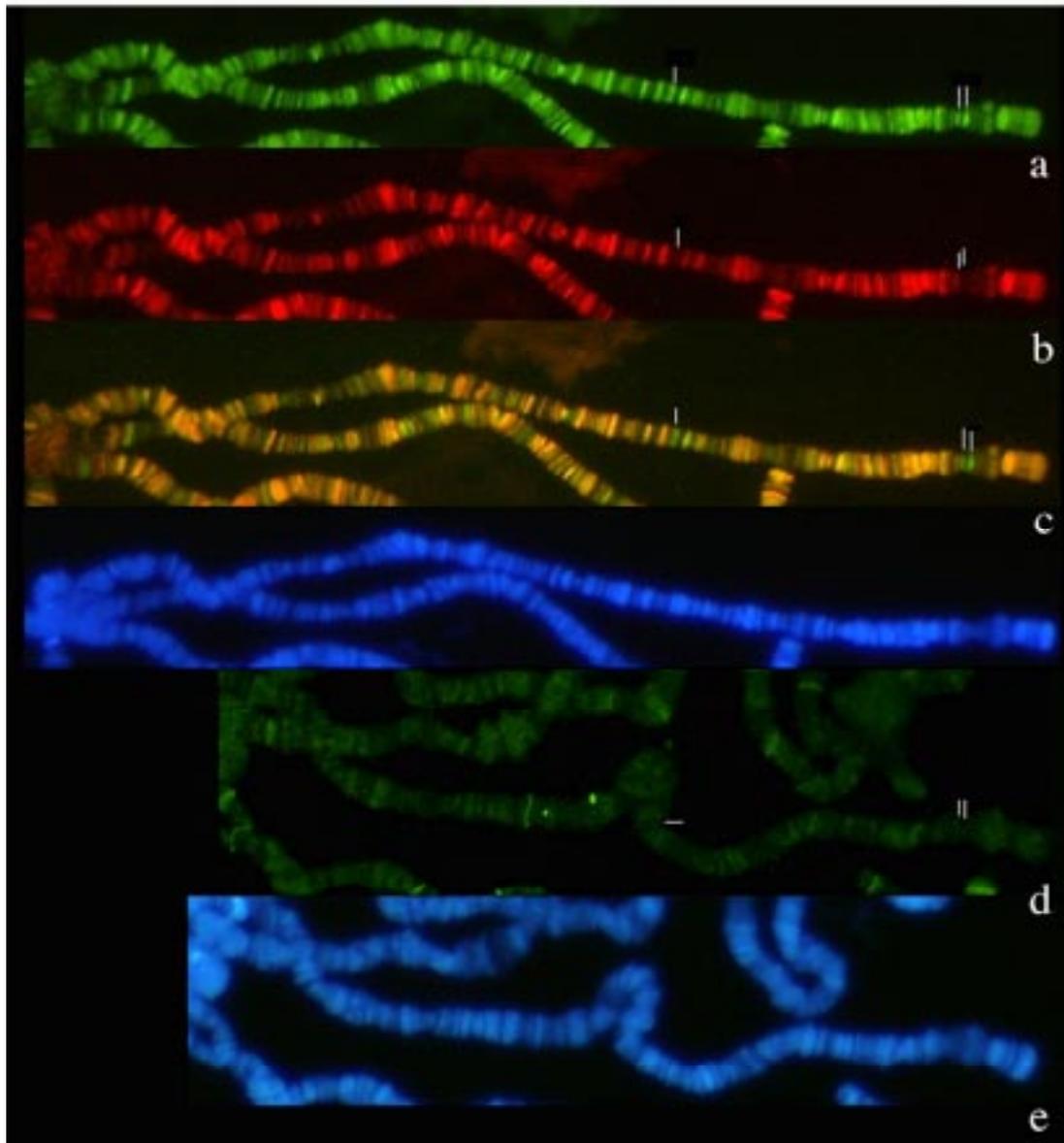


Abb. 25: Antikörperfärbung von Polytäanchrosomen einer Wildtyplinie (*CantonS*):
 Darstellung der X-Chromosomen:
 a Anti-23gt-gesamt (1:1000); b Anti-38gt-spezifisch (1:500), c Überlappung Anti-38gt-spezifisch und Anti-23gt-gesamt; d Anti-23gt-spezifisch (affinitätsgereinigt 1:250);
 d,e DNA-Färbung
 Die Balken zeigen nachgewiesene Bindungsstellen der E(var)3-93D-Proteine, an denen weder das 38gt- noch das 23gt-Protein lokalisiert werden kann.

3.2.2.7. Nachweis der E(VAR)3-93D-Proteine an Polytäanchrosomen homozygoter insertioneller Mutanten

Durch Immunmarkierungen von Polytäanchrosomen des Wildtyps (*CantonS*) konnten die E(VAR)3-93D-Proteine an zahlreichen euchromatischen Bindungsstellen, aber auch im Heterochromatin nachgewiesen werden.

Bis auf eine Ausnahme sind alle bekannten E(var)3-93D-Mutationen rezessiv letal. Viele der homozygoten Mutanten sind im 1. oder 2. Larvenstadium letal. Eine Ausnahme bilden die beiden insertionellen Mutanten *E(var)3-93D^{neo129}* und *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*. Bei diesen Mutanten überleben einige homozygote Tiere bis zum 3. Larvenstadium und sind im frühen Puppenstadium letal. In homozygoten *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Larven wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von 33kDa detektiert, welches im Wildtyp nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 10, Bahnen 2,4). Es stellt sich die Frage, ob dieses Protein auch an den Polytäanchrosomen nachweisbar ist.

Von diesen homozygoten Mutanten wurden Polytäanchrosomen mit den Antikörpern gegen die E(VAR)3-93D-Proteine immunmarkiert.

An Polytäanchrosomen homozygoter *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutanten zeigten alle verwendeten Antikörper, die gegen die E(VAR)3-93D-Proteine gerichtet sind, keine Markierung (Abb. 26a,b,d,f). Dies ist auch ein wichtiger Hinweis für die Spezifität der verwendeten Antikörper. Als positive Kontrolle für die Immunmarkierung der Chromosomen wurde eine Doppelfärbung mit den Antikörpern Anti-23gt-gesamt und Anti-HistonHI (Prof. Grossbach, Georg-August Universität Göttingen) durchgeführt. Während für dasselbe Chromosom (Abb. 26f-h) eine Immunmarkierung mit dem Antikörper Anti-HistonHI (Abb. 26f,g) erfolgte, konnten unter Verwendung des Antikörpers Anti-23gt-gesamt keine E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 26f).

Im Gegensatz zur Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* sind bei homozygoten *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutanten noch E(VAR)3-93D-Proteine an den Polytäanchrosomen nachweisbar. Die nachgewiesenen Markierungen sind aber im Vergleich zum Wildtyp (*CantonS*) signifikant reduziert (Abb. 27). In der Abb. 25a und b sind Immunmarkierungen unter Verwendung des Antikörpers Anti-23gt-gesamt zu sehen, in 25c und f Antikörperfärbungen mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch. Im Gegensatz zu den Chromosomen des Wildtyps (*CantonS*, Abb. 27a,c) zeigen die Chromosomen der Mutante (Abb. 27b,f) eine deutlich reduzierte Markierung unter Verwendung beider Antikörper. Als positive Kontrolle wurde eine Doppelfärbung mit den Antikörpern Anti-38gt-spezifisch und Anti-Prod (Török *et al.* 1997) durchgeführt (Abb. 25 c-h). Während bei der homozygoten *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutante die erhaltenen Signale für das E(VAR)3-93D-Protein 38gt (Abb. 25f) im Gegensatz zum Wildtyp (*CantonS*, Abb. 27c) signifikant reduziert sind, können mit dem Antikörper Anti-Prod für dieselben Chromosomen (Abb. 27d Wildtyp-*CantonS* Abb. 27g *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutante) ähnliche Signalstärken erhalten werden. In Abb. 27e sind die Überlagerungen beider Immunmarkierungen im Wildtyp (*CantonS*) zu sehen, in Abb. 27h für die Mutante *E(var)3-93D^{neo129}*.

Außerdem sind bei den beiden analysierten homozygoten insertionellen Mutanten die Chromosomenarme im Gegensatz zum Wildtyp signifikant verbreitert.

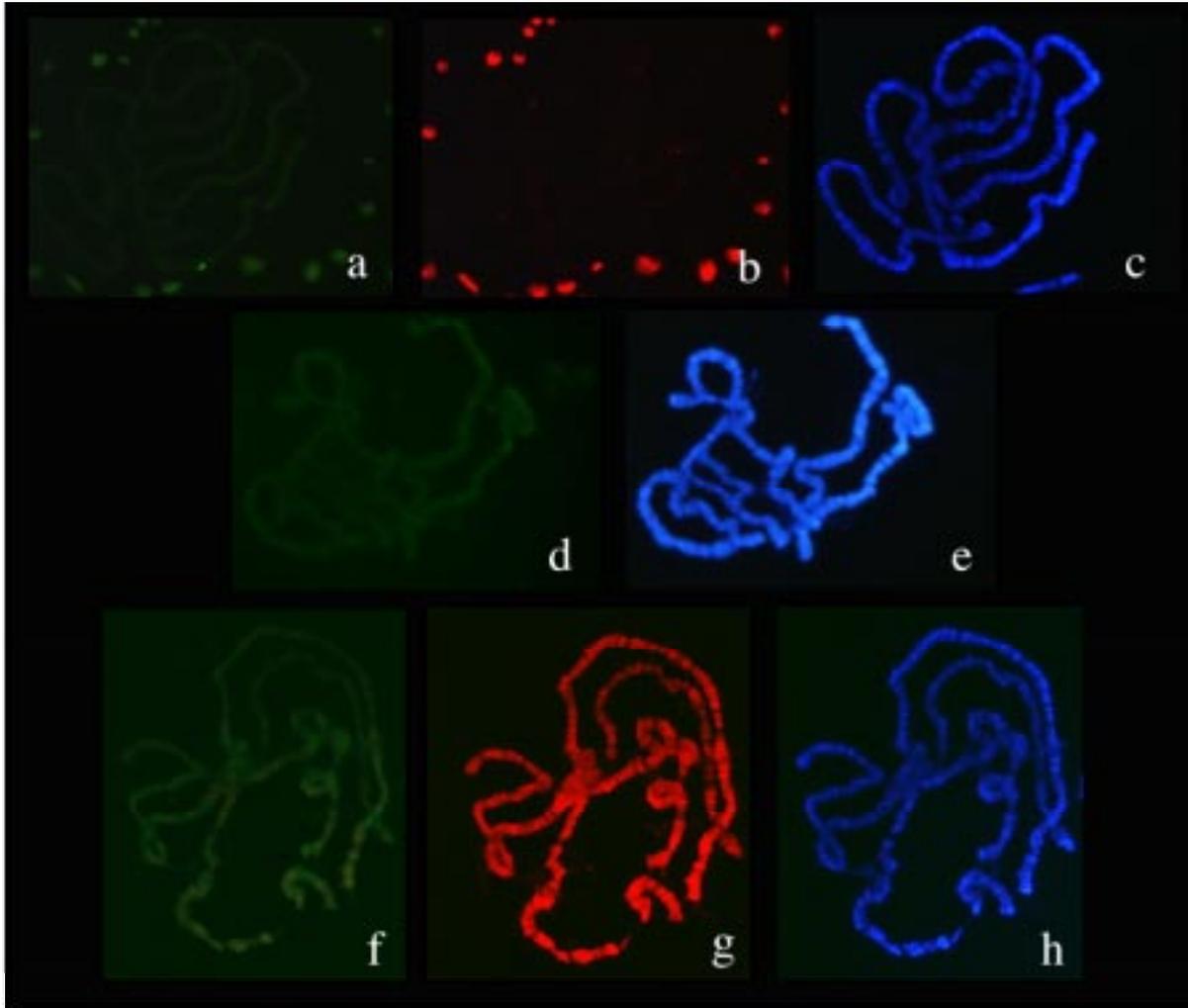


Abb. 26: Antikörperfärbung von Polytäanchrosomen homozygoter *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Tiere:
a,f Anti-23gt-gesamt(1:1000); b Anti-38gt-spezifisch (1:500); d Anti-23gt-spezifisch (affinitätsgereinigt 1:250); g Anti-HistonH1 (1:250); c,e,h DNA-Färbung
Die verwendeten Antikörper gegen die E(VAR)3-93D-Proteine binden bei der Mutante eindeutig nicht, wogegen der Anti-HistonH1 Antikörper eine normale Markierung zeigt

Beide Mutanten entstanden durch die Insertion eines mobilen Elementes in das 3. Intron. Während bei der *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutante das *gypsy*-ähnliche Element (7,2kb) 84 Basen nach dem Exonende inseriert wurde, erfolgte die Insertion des *pUChsneory⁺*-Elementes (11,8 kb) bei der Mutante *E(var)3-93D^{neo129}* 121 Basen nach dem Ende des 3. Exons (Dorn, 1993b). Die nachweisbaren E(VAR)3-93D-Proteine bei der Mutante *E(var)3-93D^{neo129}* sollten nicht das für beide insertionellen Mutanten postulierte, verkürzte Protein darstellen, da auch mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch das vollständige Protein nachgewiesen werden konnte (Abb. 27f).

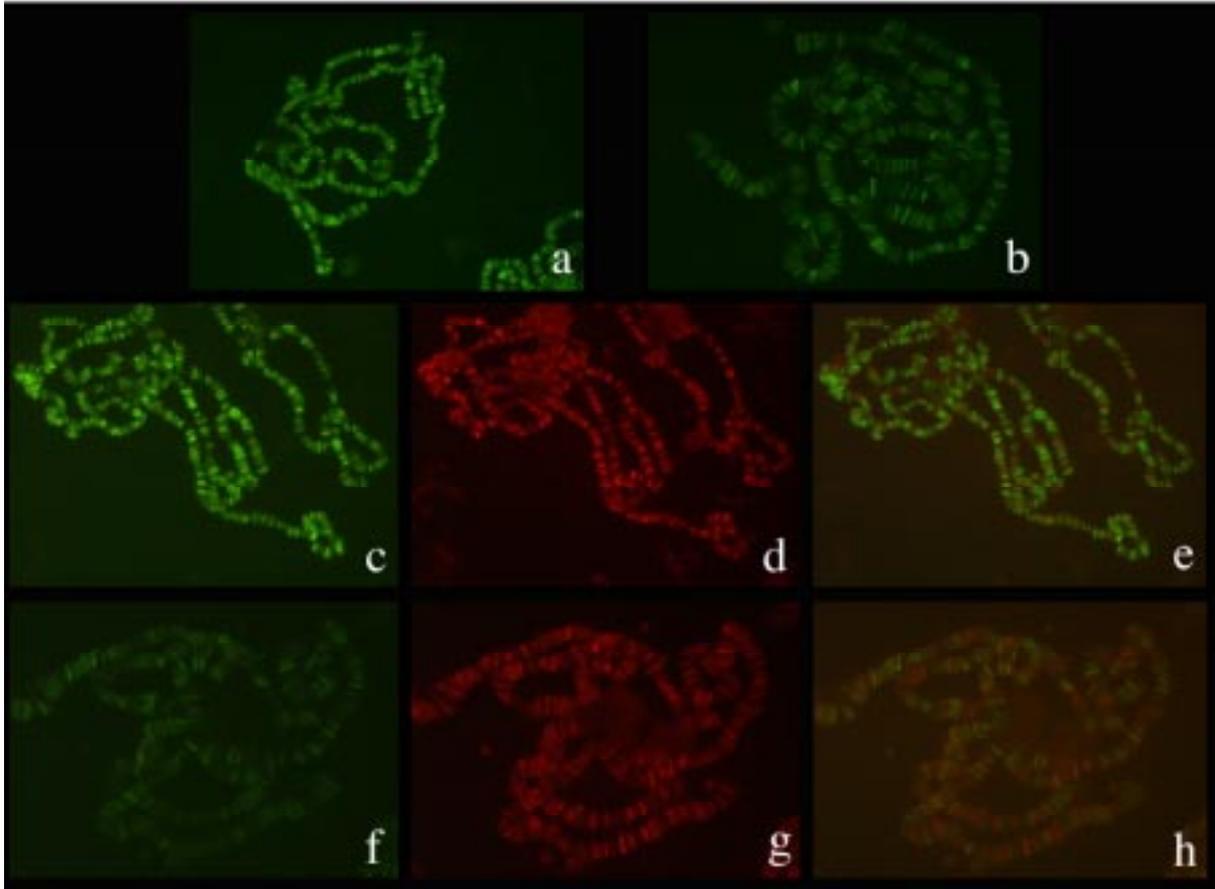


Abb. 27: Antikörperfärbung von Polytäanchrosomen:
a,c,d,e Polytäanchrosomen einer Wildtyplinie (*CantonS*); b,f,g,h Polytäanchrosomen von homozygoten *E(var)3-93D^{neo129}*-Tieren
a,b Anti-23gt-gesamt (1:1000); c,f Anti-38gt-spezifisch (1:500); d,g Anti-Prod (1:100);
e,h Überlagerung Anti-Prod und Anti-38gt-spezifisch
Die verwendeten Antikörper gegen die E(VAR)3-93D-Proteine binden bei den Mutanten eindeutig schwächer, wogegen der Anti-Prod Antikörper eine ähnlich starke Markierung zeigt

4. DISKUSSION

Das Modellsystem der PEV ist hervorragend für die Identifizierung struktureller und regulatorischer Chromatinbestandteile geeignet (Reuter und Spierer 1992).

Durch die genetische und molekulare Analyse von Suppressormutationen konnten Gene identifiziert werden, deren Produkte Funktionen im Heterochromatin besitzen (James *et al.* 1989, Eissenberg *et al.* 1990, Reuter *et al.* 1990, Tschiersch *et al.* 1994, Baksa *et al.* 1993). Im Gegensatz dazu sollten die Enhancerprodukte an der Dekondensation des Chromatins beteiligt sein. Sie stellen damit eine wichtige Voraussetzung für jede Genaktivierung dar.

Einige Enhancermutationen zeigen außerdem homöotische Effekte, was auf eine Wechselwirkung mit dem Bithoraxkomplex hinweist. Dazu gehören der GAGA-Faktor (*Trl*) und das Enhancerprodukt *E(var)3-93D*. Für den GAGA-Faktor konnte gezeigt werden, daß er ein Transkriptionsaktivator ist, der auch Chromatinstrukturen modifizieren kann (Biggin und Tijan 1988, Soeller *et al.* 1993, Brien *et al.* 1995, Tsukiyama *et al.* 1995, Okada und Hirose 1998).

Es wurden bisher für den *E(VAR)3-93D*-Locus 22 Transkripte identifiziert, die für Proteine mit verschiedenen C-Termini kodieren (Dorn und Roth, persönliche Mitteilung). Daraus ergibt sich die Frage, ob alle *E(VAR)3-93D*-Proteine verschiedene Funktionen ausüben oder ob sie funktionell austauschbar sind.

Die rezessive Letalität fast aller bekannten Mutanten dieses Locus ist ein Hinweis auf essentielle Funktionen der Genprodukte.

Durch eine Charakterisierung der *E(VAR)3-93D*-Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper im Wildtyp und bei ausgewählten Mutanten konnte ein wesentlicher Beitrag zur funktionellen Analyse der Genprodukte des *E(var)3-93D*-Locus erbracht werden.

4.1. Der *E(var)3-93D*-Locus kodiert für Kernproteine

In embryonalen Kernextrakten konnten mit den Antikörpern Anti-23gt-gesamt und Anti-BTB mehrere Proteine mit Molekulargewichten zwischen 71kDa und 99kDa detektiert werden (Abb. 11, Bahnen 1,3). Es wurden bisher 22 verschiedene Transkripte identifiziert (Dorn und Roth, persönliche Mitteilung). Daher sollten mit Antikörpern, die Epitope im gemeinsamen Teil der *E(VAR)3-93D*-Proteine besitzen, auch mehrere Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten detektiert werden. Da für einige *E(VAR)3-93D*-Proteine aufgrund ihrer Aminosäuresequenz ähnliche theoretische Molekulargewichte abgeleitet werden konnten (Roth, persönliche Mitteilung), kann eine positive Reaktion im Westernblot durch mehrere Proteine mit gleichem Molekulargewicht hervorgerufen werden. 2 Proteine mit Molekulargewichten von 99kDa und 93kDa wurden auch mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch nachgewiesen (Abb. 11, Bahn 2). Im Gegensatz dazu konnten mit dem Antikörper Anti-23gt-spezifisch im Kernextrakt keine Proteine detektiert werden. Es konnte

aber mit diesem Antikörper nach Immunopräzipitation und nachfolgenden Westernblotanalysen ein Protein mit einem Molekulargewicht von 75kDa nachgewiesen werden.

Im gemeinsamen Teil der E(VAR)3-93D-Proteine konnte hinter der BTB-Domäne eine Kernlokalisationssequenz identifiziert werden (Asp 223-**K R**saqrssltpassagv**KRsK**-Asp.244, Dingwall und Laskey 1991). Dies ist ein Hinweis dafür, daß alle E(VAR)3-93D-Proteine in den Kern transportiert werden und dort ihre Funktion ausüben.

Daß mit dem Antikörper Anti-23gt-spezifisch im Kernextrakt das 75kDa-Protein nicht nachgewiesen werden konnte, sondern nur nach Immunopräzipitation, kann 2 Ursachen haben.

Der Antikörper Anti-23gt-spezifisch wurde gegen den 131 Aminosäuren umfassenden spezifischen Teil des Proteins 23gt induziert. Dieses Protein wurde im nativen Zustand gereinigt und durch Thrombinspaltung vom GST-Anteil getrennt. Es ist deshalb möglich, daß vor allem Antikörper induziert wurden, die Epitope im nativen, gefalteten Zustand des Proteins erkennen, die aber in der Primärstruktur voneinander entfernt liegen. Diese Epitope sind bei einer Immunopräzipitation gut zugänglich, könnten aber durch die denaturierenden Bedingungen bei der SDS-PAA-Gelelektrophorese zerstört werden. Durch Immunopräzipitation wurde das Protein angereichert, so daß dann auch die Bindung von Antikörpern mit niedrigerer Affinität zu einer nachweisbaren Reaktion im Westernblot führt.

Ebenso ist es möglich, daß das E(VAR)3-93D-Protein 23gt weitaus weniger abundant ist als das Protein 38gt. Im Kernextrakt wird mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt auch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 75kDa detektiert. Möglicherweise handelt es sich dabei nicht nur um das Protein 23gt, denn es wurden weitere 6 E(VAR)3-93D-Proteine postuliert (Roth, persönliche Mitteilung), die ein ähnliches theoretisches Molekulargewicht besitzen. Im Gegensatz dazu konnte noch kein E(VAR)3-93D-Protein mit einem gleichen theoretischen Molekulargewicht wie für das 38gt-Protein identifiziert werden (Roth, persönliche Mitteilung). In Northernblotanalysen wurden 2 abundante Transkripte mit Größen von 2,3 und 2,0 kb nachgewiesen (Dorn, persönliche Mitteilung). Während das 2,3kb-Transkript das 38gt-Transkript repräsentiert, existieren mehrere alternativ gespleißte *E(var)3-93D*-Transkripte mit einer Größe von 2,0kb (Roth, persönliche Mitteilung). Northernblotanalysen unter Verwendung der spezifischen 3'-Bereiche der alternativ gespleißten Transkripte haben außerdem gezeigt, daß das 38gt-Transkript weitaus abundanter ist als das 23gt- und alle weiteren untersuchten Transkripte (Roth, persönliche Mitteilung).

Die Molekulargewichte der mit den Antikörpern detektierten Proteine (38gt 99kDa und 93kDa, theoretisches Molekulargewicht 67kDa, 23gt 75kDa, theoretisches Molekulargewicht 58kDa) weichen von den theoretischen Molekulargewichten ab. Ein ähnliches Verhalten wurde auch für die in *E.coli* überexprimierten Proteine GST-23gt-gesamt und GST-38gt-spezifisch beobachtet. Ein abnormales Laufverhalten im SDS-PAA-Gel wurde für Proteine mit hydrophoben, stark sauren oder basischen Bereichen beschrieben (Hames 1990). Im Bereich der BTB-Domäne der E(VAR)3-93D-Proteine sind gehäuft hydrophobe Aminosäuren zu finden, im spezifischen Teil des Proteins 38gt treten Bereiche

mit einem hohen Anteil saurer bzw. basischer Aminosäuren auf (Dorn *et al.* 1993b). Ebenso konnte gezeigt werden, daß auch durch einzelne Aminosäureaustausche die Mobilität von Proteinen beeinflusst werden kann (Fasano *et al.* 1984). Modifikationen von Proteinen, wie z.B. Glycosylierung und Phosphorylierung, können zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität führen (Hames 1990). Solche Modifikationen können auch für die E(VAR)3-93D-Proteine in Betracht gezogen werden, da unter Verwendung des Programmes "PROSITE". 5 potentielle Glycosylierungsstellen und 16 potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert werden konnten.

Es wurden für die cDNAs 23gt, 38gt und 1(8) Fusionskonstrukte mit dem GFP (green fluorescent protein) unter Kontrolle des Hitzeschockpromotors hergestellt und transgene Linien erhalten (Roth, persönliche Mitteilung). Im Westernblot konnten spezifisch nach Hitzeschock mit dem Anti-GFP Antikörper E(VAR)3-93D-GFP Fusionsproteine mit ähnlichen Differenzen zwischen theoretischem und ermitteltem Molekulargewicht detektiert werden (Roth, persönliche Mitteilung).

4.2. Die E(VAR)3-93D-Proteine werden maternal exprimiert und sind während der Embryogenese ab dem 9. Kernteilungszyklus mit dem Interphasechromatin assoziiert.

Die ersten embryonalen Kernteilungszyklen bei *Drosophila melanogaster* werden durch maternale Produkte ermöglicht. Die zygotische Transkription beginnt während der Kernteilungszyklen 11-13 (Foe *et al.* 1993).

In Northernanalysen und "whole mount" *in situ* Hybridisierungen konnten für den *E(var)3-93D*-Locus maternale Transkripte nachgewiesen werden (Dorn, persönliche Mitteilung).

Anhand der Färbungen von adulten Ovarien konnte auch eine maternale Proteinkomponente für den *E(var)3-93D*-Locus detektiert werden. Die Proteine sind kernlokalisiert, können aber nach Degradation der Nährzellen auch im Zytoplasma der Oocyte detektiert werden. Die im Zytoplasma reifer Oocyten nachgewiesenen E(VAR)3-93D-Proteine stellen den maternalen Vorrat dar. Im Gegensatz zu der nachgewiesenen Lokalisation der E(VAR)3-93D-Proteine in den Ovarien beim Wildtyp konnten die E(VAR)3-93D-Proteine nicht in den Kernen der Eikammern homozygoter *E(var)3-93D^{neo129}*-Weibchen detektiert werden. Dieser Befund korreliert mit der Sterilität dieser Weibchen.

Die E(VAR)3-93D-Proteine sind in präblastodermalen Embryonen uniform im Zytoplasma verteilt. Erst ab dem 9. Kernteilungszyklus können sie in den Kernen lokalisiert werden. Auch HistonH1, ein essentieller Chromatinbestandteil, kann erst ab dem Kernteilungszyklus 8 in den Kernen detektiert werden. Davor übt das HMG-D-Protein möglicherweise die Funktion von HistonH1 aus. Das Verhältnis HMG-D/H1 und die damit verbundene Chromatinstrukturierung sind wichtige Voraussetzungen für den Start der Transkription (Ner und Travers 1994). Möglicherweise sind die E(VAR)3-93D-Proteine in der Lage, dann an das durch HistonH1 strukturierte Chromatin zu binden und selbst als Transkriptionsaktivator zu agieren. Es ist aber auch denkbar, daß die E(VAR)3-93D-

Proteine selbst am Prozeß der Chromatinstrukturierung beteiligt sind. Im Gegensatz zu den E(VAR)3-93D-Proteinen wird Histone H1 nicht als maternales Protein, sondern als RNA in die Eizelle transportiert (Ner und Travers 1994).

Im Blastodermstadium sind die E(VAR)3-93D-Proteine während der Interphase kernlokalisiert. Sie dissoziieren nach der Prophase von den Chromosomen und reassoziieren mit ihnen in der Telophase. Eine zellzyklusabhängige Chromatinassoziation wurde auch für sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren beschrieben (Martinez-Balbas *et al.* 1995). Die Dissoziation vom mitotischen Chromatin ist dabei nicht immer Konsequenz einer Inhibierung der DNA-Bindungsaktivität. Die Reduktion negativer Ladungen durch Histondeacetylierung und Polyaminbindung, die während der Kondensation des Chromatins zu beobachten ist, kann ebenso Ursache für die Verdrängung der Transkriptionsfaktoren vom mitotischen Chromatin sein, wie Veränderungen in DNA-Topologie und -Struktur (Martinez-Balbas *et al.* 1995). Eine Dissoziation vom Chromatin während der Mitose wurde nicht nur für Transkriptionsfaktoren beobachtet. Ein ähnliches Verhalten zeigt das Suppressorgenprodukt SU(VAR)3-7 (Cleard *et al.* 1997). Auch die drei Polycombgruppenproteine Polycomb, Posterior Sex Combs und Enhancer of Zeste sind nicht mit den Chromosomen während der Metaphase assoziiert (Buchenau *et al.* 1998). Wie bei PEV wird der aktive oder reprimierte Zustand der homöotischen Gene stabil von einer Generation auf die nächste weitergegeben. Geringe Mengen an Polycombgruppenproteinen, die noch mit dem mitotischen Chromatin assoziiert sind, könnten diese Funktion ausüben (Buchenau *et al.* 1998). Aber auch andere Mechanismen, wie eine durch Proteine hervorgerufene Markierung aktiver Gene durch Konformationsänderung der DNA während der Mitose (Michelotti *et al.* 1997) oder eine Modifikation des Chromatins durch Acetylierung (Pirota, 1998) können für die Weitergabe aktiver oder reprimierter Zustände von einer Zellgeneration an die nächste verantwortlich sein. Der GAGA-Faktor kann auch während der Mitose an den Chromosomen nachgewiesen werden, diese Bindung ist aber auf repetitive heterochromatische Sequenzen beschränkt (Raff *et al.* 1994).

4.3. Die E(VAR)3-93D-Proteine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation im Interphasekern.

Für die untersuchten E(VAR)3-93D-Proteine konnte das gleiche Verhalten in der Embryonalentwicklung und während des Zellzyklus gezeigt werden.

Jedoch deutet die Analyse der räumlichen Verteilung der E(VAR)3-93D-Proteine mit Hilfe der Antikörper Anti-23gt-gesamt, Anti-38gt-spezifisch und Anti-23gt-spezifisch in embryonalen Interphasekernen und an Polytänchromosomen auf unterschiedliche Funktionen der einzelnen E(VAR)3-93D-Proteine hin.

Der Antikörper Anti-23gt-gesamt, der alle E(VAR)3-93D-Proteine detektiert, zeigt in embryonalen Interphasekernen neben einer Markierung euchromatischer Bereiche auch eine Bindung an das

zentromerische Heterochromatin. Da mit den Antikörpern Anti-23gt-spezifisch und Anti-38gt-spezifisch keine Proteine im zentromerischen Heterochromatin nachgewiesen werden können, sollten dort andere E(VAR)3-93D-Proteine binden. Vom *E(var)3-93D*-Locus werden also Proteine mit überwiegend euchromatischer Lokalisation, wie 23gt und 38gt, kodiert, aber auch Proteine mit Lokalisation im zentromerischen Heterochromatin. Auch der GAGA-Faktor, der ein Transkriptionsaktivator ist und Chromatinstrukturen modifizieren kann (Biggin und Tijan 1988, Soeller *et al.* 1993, Brien *et al.* 1995, Tsukiyama *et al.* 1995, Okada und Hirose 1998), bindet an das zentromerische Heterochromatin (Raff *et al.* 1994, Bhat *et al.* 1996).

Die Hauptkomponenten des funktionellen Dp1187-Zentromeres sind Satellitensequenzen (AATAT- und AAGAG-Repeats) und transponible Elemente (Sun *et al.* 1997). Die Bindung des GAGA-Faktors an repetitive Sequenzen im Heterochromatin sollte von funktioneller Bedeutung sein (Raff *et al.* 1994). Diskutiert werden eine Dekondensation der Chromatinstruktur im Bereich essentieller heterochromatischer Gene, eine Funktion als Boundary-Element, welches ein Spreading von Heterochromatin ins Euchromatin verhindert, oder eine Modifikation der Chromatinstruktur, um eine DNA-Bindung heterochromatischer Faktoren zu ermöglichen (Raff *et al.* 1994). Die E(VAR)3-93D-Proteine besitzen keine bekannten DNA-bindenden Motive. Sie könnten aber über Protein-Proteinwechselwirkungen, die über die BTB-Domäne vermittelt werden, an die heterochromatischen Sequenzen binden und ähnliche Funktionen wie der GAGA-Faktor ausüben.

Der Antikörper Anti-23gt-gesamt markiert an Polytäanchrosomen eine Vielzahl euchromatischer Loci. Dies korreliert mit der Funktion der E(VAR)3-93D-Proteine als allgemeine Transkriptionsregulatoren, die aufgrund genetischer und molekularer Daten postuliert wurde (Dorn *et al.* 1993b; Dorn und Reuter, persönliche Mitteilung). Auch der GAGA-Faktor konnte an einer Vielzahl euchromatischer Loci detektiert werden (Benyajati *et al.* 1997). Es konnte mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt nur eine sehr schwache Markierung im Bereich des Chromozentrums nachgewiesen werden. In embryonalen Interphasekernen konnte jedoch eine Bindung von E(VAR)3-93D-Proteinen an das zentromerische Heterochromatin detektiert werden. Sowohl für den GAGA-Faktor (Benyajati *et al.* 1997, Bhat *et al.* 1996, Raff *et al.* 1994) als auch für den Proliferation disrupter (Prod, Török *et al.* 1997) wurden ähnliche Ergebnisse erhalten. Für Prod wird deshalb eine Assoziation mit dem α -Heterochromatin diskutiert, welches in Polytäanchrosomen stark unterrepräsentiert ist (Török *et al.* 1997).

Die E(VAR)3-93D-Proteine konnten auch an den Telomeren detektiert werden. Im Gegensatz zu den meisten eukaryontischen Chromosomen besitzt *Drosophila melanogaster* an den Telomeren keine einfachen Repeats, die von der Telomerase synthetisiert werden, um Verluste durch unvollständige Replikation an den Chromosomenenden auszugleichen (Mason und Biessmann 1995). Die Verluste an den Chromosomenenden werden bei *Drosophila melanogaster* durch die Transposition der telomerspezifischen Retroposons *TART* (Sheen und Levis 1994) und *HeT-A* (Danilevskaja *et al.* 1994) ausgeglichen. Die Retroposons lagern sich als RNA mit ihren Poly-A-Enden an die Chromosomenenden und durch Reverse Transkription entsteht dann ein neues Chromosomenende

(Mason und Biessmann 1995). Im Gegensatz zu den Retroposons sind die Funktionen der im Telomer weiter proximal liegenden Tandem repeats weniger gut verstanden. Sie könnten eine Wechselwirkung mit anderen Telomeren vermitteln oder durch Kontakte mit der Kernmembran an der dreidimensionalen Organisation des Zellkerns beteiligt sein (Mason und Biessmann 1995). Möglicherweise sind die E(VAR)3-93D-Proteine durch ihre nachgewiesene Lokalisation an den Telomeren auch in diese Funktionen involviert.

Welche der mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt detektierten Bindungsstellen im Eu- und Heterochromatin sind den einzelnen E(VAR)3-93D-Proteinen zuzuschreiben?

Das E(VAR)3-93D-Protein 38gt wird an den meisten, aber nicht allen, euchromatischen Bindungsstellen der E(VAR)3-93D-Proteine, die mit dem Antikörper Anti-23gt-gesamt nachgewiesen werden, detektiert. An weitaus weniger Bindungsstellen im Euchromatin kann das E(VAR)3-93D-Protein 23gt nachgewiesen werden. Ähnliche Abundanzunterschiede zwischen den Proteinen 23gt und 38gt konnten auch in den Westernblotanalysen beobachtet werden. Sie könnten aber auch durch unterschiedliche Affinitäten der verwendeten Antikörper erklärt werden. Einige Daten sprechen aber für die unterschiedliche Abundanz und die verschiedenen Funktionen der einzelnen E(VAR)3-93D-Proteine. Das 38gt-Transkript ist das abundanteste aller bisher untersuchten Transkripte (Roth, persönliche Mitteilung). Für die cDNA-Klone 23gt, 38gt und 1(8) wurden Fusionskonstrukte mit dem GFP (green fluorescent protein) unter Kontrolle des Hitzeschockpromotors hergestellt und transgene Linien erhalten. An den Polytäanchrosomen wurden mit einem Anti-GFP Antikörper die GFP-Fusionsproteine nachgewiesen (Roth, persönliche Mitteilung). Auch hier konnte gezeigt werden, daß das 38gt-Protein das abundanteste Protein ist und an einer Vielzahl euchromatischer Loci detektiert werden kann. Für das Protein 1(8) konnten nur wenige Bindungsstellen nachgewiesen werden. Ebenso wie für das endogene 23gt-Protein ist das GFP-23gt-Fusionsprotein auch nach Hitzeschock nur an ca. 40 Stellen auf den Chromosomenarmen detektierbar.

Die Bindungsstellen des E(VAR)3-93D-Proteins 23gt überlappen teilweise mit denen des Proteins 38gt, es konnten aber auch spezifische Bindungsstellen für das E(VAR)3-93D-Protein 23gt detektiert werden. Es konnten außerdem noch euchromatische Bindungsstellen für E(VAR)3-93D-Proteine detektiert werden, an denen die beiden Proteine 38gt und 23gt nicht binden. Sie sollten Targets für weitere E(VAR)3-93D-Proteine darstellen.

Weder das E(VAR)3-93D-Protein 23gt, noch das E(VAR)3-93D-Protein 38gt konnten an den Telomeren detektiert werden, hier sollten andere E(VAR)3-93D-Proteine binden. Dieser Befund wird auch dadurch bestätigt, daß auch keines der untersuchten Fusionsproteine an den Telomeren nachgewiesen werden konnte (Roth, persönliche Mitteilung).

Die nachgewiesene Lokalisation der GFP-E(VAR)3-93D-Fusionsproteine in den transgenen Linien bestätigt die mit Hilfe der Antikörper erhaltenen Ergebnisse. Die zu beobachtende unterschiedliche Abundanz und Lokalisation der beiden E(VAR)3-93D-Proteine 38gt und 23gt ist daher nicht durch unterschiedliche Affinitäten der verwendeten Antikörper bedingt. Außerdem sind die Daten ein Beweis für die Spezifität der verwendeten Antikörper.

Interessant ist außerdem, daß auch nach einem Hitzeschock und der damit verbundenen Überexpression die GFP-E(VAR)3-93D-Fusionsproteine nur an ihren endogenen Bindungsstellen detektiert werden können (Roth, persönliche Mitteilung). Demzufolge führt eine Überexpression der E(VAR)3-93D-Proteine nicht zu deren Bindung an ektopische Bindungsstellen an den Polytäanchromosomen. Die Bindung des E(VAR)3-93D-Proteins 23gt an weitaus weniger euchromatische Bindungsstellen als das E(VAR)3-93D-Protein 38gt läßt sich daher nicht nur durch die geringere Abundanz des Proteins 23gt erklären. Aufgrund der im gemeinsamen Teil der Proteine gelegenen Kernlokalisationssequenz sollten alle E(VAR)3-93D-Proteine in den Kern transportiert werden. Über die BTB-Domäne könnten Protein-Proteinwechselwirkungen mit weiteren Proteinen stattfinden. Die Spezifität der Wechselwirkungen und die damit verbundene Lokalisation der einzelnen Proteine sollte jedoch über die spezifischen Teile vermittelt werden. Ein Hinweis dafür ist auch das E(VAR)3-93D-Protein 4(4), welches als Doom im Zusammenhang mit Apoptose identifiziert wurde (Harvey *et al.* 1997). Doom ist kernlokalisiert und kann durch eine Wechselwirkung mit dem Inhibitor of Apoptosis in Zellkultur Apoptose auslösen. Die Wechselwirkung beider Proteine wird durch den spezifischen C-Terminus ermöglicht (Harvey *et al.* 1997). Andere E(VAR)3-93D-Proteine sind möglicherweise für den Einfluß dieses Locus auf PEV und die Regulation des Bithoraxkomplex verantwortlich. Das E(VAR)3-93D-Protein 38gt [Mod(mdg4)2,2] wurde als Interaktor mit dem Su(Hw)-Protein identifiziert, welches die Wechselwirkung zwischen gewebespezifischen Enhancern und dem Promotor am *yellow*-Locus verhindert (Gerasimova *et al.* 1995).

Alternatives Spleißen bei Chromatinproteinen wurde bisher wenig untersucht. Beim GAGA-Faktor konnte gezeigt werden, daß von den zwei untersuchten Isoformen nur eine während der ersten 6 Stunden der Embryogenese detektiert werden kann. Im Gegensatz zu den E(VAR)3-93D-Proteinen konnte jedoch für die untersuchten Isoformen des GAGA-Faktors eine Kolo-kalisation an Polytäanchromosomen beschrieben werden. Für beide Isoformen konnten gleiche Funktionen *in vitro* nachgewiesen werden (Benyajati *et al.* 1997).

4.4. Die Mutation *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* wurde durch die Insertion eines *gypsy*-ähnlichen Retrotransposons in das 3. Intron verursacht

Die Mutation *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* wurde durch die Insertion eines *gypsy*-ähnliches Elementes in das 3. Intron, 84 Basen nach dem Ende des 3. Exons, verursacht.

Eine Insertionsmutation kann verschiedene Konsequenzen haben. Es können proteinkodierende Regionen zerstört werden, die Prozessierung der RNA und die Wechselwirkungen zwischen regulatorischen Elementen für die Transkriptionsinitiation können behindert werden.

Am *yellow*-Locus wurde die Insertion eines *gypsy*-Elementes 700bp upstream vom Transkriptionsstart identifiziert, was zu einer gewebespezifischen Repression des *yellow*-Gens führt. Diese kann durch Mutationen im Su(Hw)-Gen revertiert werden (Harrison *et al.* 1989). Im Bereich zwischen der 5'LTR und dem Startkodon des *gag*-Gens konnte eine Su(Hw)-Bindungsregion identifiziert werden. Sie

besteht aus 12 Kopien der Konsensussequenz 5'-PyPuTTGCATACC-Py3', die durch AT-reiche Sequenzen unterbrochen werden. An die Konsensussequenzen bindet das Su(Hw)-Protein, ein DNA-bindendes Protein mit 12 Zinkfingerstrukturen (Harrison *et al.* 1989). Durch Deletionsexperimente konnte bewiesen werden, daß die Su(Hw)-Bindungsregion für die *gypsy*-Mutagenese am *yellow*-Locus notwendig ist (Smith und Corces 1992). Die Bindung des Su(Hw)-Proteins verhindert am *yellow*-Locus Wechselwirkungen von Enhancern, die distal der Insertionsstelle liegen, mit dem Promotor (Gerasimova *et al.* 1995, Gdula *et al.* 1996). Mutationen im *mod(mdg4)*-Gen verhindern zusätzlich die Wechselwirkung von proximal gelegenen Enhancern mit dem Promotor (Gerasimova *et al.* 1995, Gdula *et al.* 1996). Das durch die Insertion des mobilen Elementes *Stalker* identifizierte Transkript *mod(mdg4)2,2* ist identisch mit dem *E(var)3-93D*-Transkript 38gt (Gerasimova *et al.* 1995).

Beim inserierten *gypsy*-ähnlichen Element der *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutation sind die Su(Hw)-Bindungsstellen deletiert. Daher sollte ein anderer Mechanismus zur Mutagenese durch das inserierte *gypsy*-ähnliche Retrotransposon führen. Es konnte in *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutanten ein abberantes Transkript nachgewiesen werden, welches aus den ersten drei Exonen, 84 Basen des 3. Introns und 304 Basen des 5'-nichttranslatierten Bereiches des *gypsy*-ähnlichen Elementes zusammensetzt. Es wird ein Polyadenylierungssignal innerhalb der 5'-LTR des Retrotransposons genutzt. Auch infolge einer *gypsy*-Insertion in das 2. Intron des Gen *forked* wurde ein abberantes Transkript identifiziert, welches sich aus Exonbereichen von *forked*, Intronbereich und 5'-LTR-Sequenz von *gypsy* zusammensetzt (Ishimaru und Saigo 1993). Das gleiche Polyadenylierungssignal innerhalb des *gypsy*-ähnlichen Elementes wird bei der Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* genutzt.

Die Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* wurde nach Insertionsmutagenese durch ein modifiziertes P-Element, das *Icarus-neo*-Element (Steller und Pirotta 1986), erhalten. Das *Icarus-neo*-Element an der zytologischen Position 27A sollte unter P-hybridysgenen Bedingungen mobilisiert werden, aber in keiner der selektierten Mutanten konnte seine Transposition nachgewiesen werden (Dorn *et al.* 1993a). Deshalb wurden die selektierten Mutationen als spontan klassifiziert. Die Mutationsrate liegt für die induzierten Enhancermutationen bei $4,6 \times 10^{-4}$ und ist damit vergleichbar mit induzierten Mutationen durch das modifizierte P-Element *P[lArB]* (1×10^{-4}) und Röntgenstrahlmutagenese bei weiblichen Tieren ($2,2 \times 10^{-4}$) (Dorn *et al.* 1993a).

Transponible Elemente sind normale Bestandteile eukaryontischer Genome, ca. 10% des *Drosophilagenoms* und bis zu 35% des menschlichen Genoms bestehen aus mobilen Elementen (Labrador und Corces 1997). Transpositionen mobiler Elemente sind infolge von Element-Wirtsinteraktionen normalerweise gut kontrolliert (Labrador und Corces 1997, Lozovskaya *et al.* 1995). Die Transposition von P-Elementen ist in sog. P-Stämmen, die viele P-Elemente im Genom enthalten, sehr gering. Werden diese P-Männchen mit M-Weibchen, die keine P-Elemente im Genom besitzen, gekreuzt, kommt es zu einer hohen Transpositionsrate von P-Elementen, jedoch nicht in der reziproken Kreuzung (Engels 1989). Auch die Transpositionsrate für das *gypsy*-Element ist normalerweise sehr gering (Dominguez und Albornoz 1996, Kim *et al.* 1994). Sehr hohe Transpositionsraten des *gypsy*-Retrotransposons, die mit der Produktion des retroviralen Envelope-like

Proteins korrelieren, wurden dagegen im Hintergrund von Mutationen des *flamenco*-Gens beobachtet (Prud'homme *et al.* 1995, Pelisson *et al.* 1995). Das *flamenco*-Genprodukt sollte daher an der Repression der Transposition des *gypsy*-Elementes beteiligt sein.

Eine Komobilisation anderer mobiler Elemente als das P-Element selbst durch P-Hybriddysgenese ist umstritten (Engels 1989). Multiple Transpositionseignisse, unter anderem auch von *gypsy*-Elementen, wurden nach P-Hybriddysgenese beschrieben (Gerasimova *et al.* 1984). Auch bei *Drosophila virilis* wurden nach hybriddysgener Kreuzung mindestens vier unabhängige transponible Elemente mobilisiert (Petrov *et al.* 1995). Möglicherweise induzieren Doppelstrangbrüche in der DNA, die durch die Transposase verursacht werden, in der Zelle eine Reaktion, die zur Derepression der Transposition weiterer mobiler Elemente führt (Petrov *et al.* 1995).

Es ist also nicht auszuschließen, daß unter P-hybriddysgenen Bedingungen das *gypsy*-ähnliche Element mobilisiert wurde. Möglicherweise erfolgte auch bei weiteren Mutanten, die aus dieser Kreuzung erhalten wurden, eine Insertion dieses Elementes. Durch Southernblotanalysen und *in situ*-Hybridisierungen von Polytänchromosomen mit einer Sonde aus dem *gypsy*-ähnlichen Element kann dies überprüft werden. Damit wäre die molekulare Analyse weiterer funktionell interessanter Enhancer- und Suppressormutationen möglich.

4.5. Die Expression der E(VAR)3-93D-Proteine in ausgewählten Mutanten

Bis auf eine Ausnahme sind alle bekannten *E(var)3-93D*-Mutationen rezessiv letal, was ein Hinweis für essentielle Funktionen dieses Locus ist.

Die Mutation *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* konnte molekular charakterisiert werden. Durch die Insertion des *gypsy*-ähnlichen Elementes in das 3. Intron wird ein abberantes Transkript mit einer ähnlichen Struktur wie bei der Mutante *E(var)3-93D^{neo129}* gebildet. Die von den Transkripten kodierten Proteine setzen sich aus der BTB-Domäne und weiteren 9 Aminosäuren, die von der Intronsequenz kodiert werden, zusammen. Beide Mutanten unterscheiden sich in ihrem Verhalten. Während die *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutation bei 29°C sehr stark semiletal ist, ist die Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* auch bei dieser Temperatur rezessiv letal. In beiden Mutanten konnte im dritten Larvenstadium ein Protein mit einem Molekulargewicht von 33kDa detektiert werden, welches noch die BTB-Domäne enthält.

An Polytänchromosomen homozygoter *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴*-Mutanten sind mit allen verwendeten Antikörpern keine E(VAR)3-93D-Proteine mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu können bei homozygoten *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutanten an Polytänchromosomen noch sehr geringe Mengen an E(VAR)3-93D-Proteinen detektiert werden. Dabei sollte es sich nicht um das verkürzte, für die Mutante postulierte Protein handeln. Da die Proteine auch mit dem Antikörper Anti-38gt-spezifisch detektiert werden konnten, handelt es sich dabei um vollständige Proteine mit spezifischem C-Terminus. Gegen das Vorhandensein von maternalem Protein spricht das Fehlen der Proteine bei der Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* und die Letalität fast aller anderen bekannten Mutationen dieses Locus im

1. oder 2. Larvenstadium. Bei der Mutation *E(var)3-93D^{neo129}* sollten durch Spleißvorgänge in geringer Menge neben dem abberanten Transkript noch Wildtyptranskripte gebildet werden. Die Insertionsstellen der mobilen Elemente *pUChsneory⁺* und dem *gypsy*-ähnlichen Retrotransposon liegen 37 Basenpaare voneinander entfernt. Spleißunterschiede für beide Mutanten könnten durch den Insertionsort oder die Stärke der Polyadenylierungssignale der beiden mobilen Elemente begründet sein. Bei der GAGA-Mutation *Trl^{13C}* erfolgte die Insertion eines P-Elementes in das erste Intron des *Trl*-Genes (Farkas *et al.* 1994). Die Mutation ist semilethal und die homozygoten Weibchen sind steril. Es konnte in den homozygoten adulten Weibchen neben dem verkürzten Transkript von 1kb noch das Wildtyptranskript mit einer Größe von 2,4kb nachgewiesen werden (Bhat *et al.* 1996). Es sollten durch Spleißvorgänge das verkürzte Transkript infolge der Insertion im Intron aber auch noch in geringen Mengen das Wildtyptranskript gebildet werden.

Bei 29°C ist die Mutante *E(var)3-93D^{neo129}* sehr stark semilethal und weiblich steril. In den Eikammern konnten keine kernlokalisierten E(var)3-93D-Proteine mehr detektiert werden, was mit der weiblichen Sterilität korreliert.

Die rezessive Letalität bei 18°C und 25°C konnte durch P-elementvermittelte Transformation des 7,5kb *BamH1*-Fragmentes, welches die ersten vier gemeinsamen Exonen des *E(var)3-93D-Locus* enthält, partiell gerettet werden, nicht aber die weibliche Sterilität der Tiere (Dorn, persönliche Mitteilung). Doch während die Nachkommen von homozygoten *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutanten in ihrer Entwicklung unmittelbar nach der Befruchtung arretieren, führt das zusätzliche 7,5kb *BamH1*-Fragment zum Überleben einiger Tiere bis über das Blastodermstadium hinaus. Durch immunozytologische Analysen konnten in diesen Embryonen E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen werden, die auch zum Teil kernlokalisiert sind. Das 7,5kb *BamH1*-Fragment kodiert neben der BTB-Domäne, im Gegensatz zur Mutante *E(var)3-93D^{neo129}*, auch für einen Proteinabschnitt, der die Kernlokalisationssequenz enthält (siehe Einleitung Abb. 1). Phänotypisch zeigen die Embryonen zahlreiche Defekte. Es wurden im Blastodermstadium abnormal strukturierte Kerne gefunden, die von der Oberfläche wieder ins Innere der Embryonen gefallen sind. Die Kerne weisen Defekte, wie Chromatinüber- und -unterkondensation sowie Chromatinfragmentierung auf. Auch die Polzellen sind abnormal strukturiert. Ein Zurückfallen abnormal strukturierter Kerne in das Innere des Embryos konnte auch für andere Mutanten mit Kerndefekten beobachtet werden, z.B. für HP1-Mutanten (Kellum und Alberts 1995). HP1 ist Bestandteil des Heterochromatins (James *et al.* 1989, Eissenberg *et al.* 1990) und wird für die korrekte Chromosomensegregation in *Drosophila*-Embryonen benötigt (Kellum und Alberts 1995). Auch in Nachkommen homozygoter *Trl^{13C}*-Mutanten konnten Chromatinkondensationsdefekte und Chromatinfragmentierung gefunden werden (Bhat *et al.* 1996). Der GAGA-Faktor sollte deshalb für die Dekondensation des Chromatins nach der Mitose und die Herstellung eines replikations- und transkriptionskompetenten Chromatins benötigt werden. Ebenso sollte er Funktionen bei der Kondensation und der Trennung homologer Chromosomen nach der Replikation besitzen (Bhat *et al.* 1996).

Es wurden E(VAR)3-93D-Proteine nachgewiesen, die auch wie der GAGA-Faktor im zentromerischen Heterochromatin lokalisiert sind. Ebenso wurden Proteine mit euchromatischer Lokalisation identifiziert (23gt, 38gt). Die zu beobachtenden Mutanteneffekte deuten ebenso auf einen funktionellen Dualismus der E(VAR)3-93D-Proteine im Eu- und Heterochromatin hin, der auch für den GAGA-Faktor beschrieben wurde (Raff *et al.* 1994, Bhat *et al.* 1996).

Ein Überleben homozygoter *E(var)3-93D^{neo129}*-Nachkommen von *E(var)3-93D^{neo129}/TM3*-Tieren mit genomischem 7,5kb *BamH1*-Fragment ist möglicherweise durch die maternale Komponente bedingt, die die Funktionen der E(VAR)3-93D-Proteine während der frühen Entwicklungsstadien ausüben kann. Von den adulten homozygoten *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutanten mit zusätzlichem 7,5kb *BamH1*-Fragment wird dann möglicherweise ein verkürztes Protein in die Eizelle transportiert, was aber noch die Kernlokalisationssequenz besitzt. Da aber die spezifischen C-terminalen Bereiche wahrscheinlich wichtig für die Lokalisation und Funktion der E(VAR)3-93D-Proteine im Chromatin sind, ist das Protein nicht in der Lage, diese Funktionen auszuüben. Eine ausgeprägte maternale Komponente wurde auch für den GAGA-Faktor nachgewiesen (Bhat *et al.* 1996). Homozygote Nachkommen heterozygoter *Trl^{13C}*-Mutanten sind semilethal. Aber auch hier sind die Weibchen steril und deren Nachkommen zeigen die schon beschriebenen Defekte. Die maternale Komponente ist aber beim GAGA-Faktor aber kein Protein, sondern RNA (Bhat *et al.* 1996).

Durch immunologische Analysen konnten E(VAR)3-93D-Proteine mit unterschiedlicher Abundanz und Lokalisation nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten durch Untersuchungen transgener Linien, die verschiedene E(VAR)3-93D-GFP-Fusionsproteine exprimieren, bestätigt werden (Roth, persönliche Mitteilung). Die E(VAR)3-93D-Proteine sind in verschiedene Prozesse involviert. Sie üben einen Einfluß auf PEV und die Regulation des Bithoraxkomplexes aus (Dorn *et al.* 1993b). Doom interagiert mit IAP von Baculovirus und ist in der Lage, Apoptose auszulösen (Harvey *et al.* 1997). Mod(mdg4) wechselwirkt mit Su(Hw) und ist dadurch an der Regulation insulierender Sequenzen beteiligt (Gerasimova *et al.* 1995). Die unterschiedliche Lokalisation der einzelnen E(VAR)3-93D-Proteine weist auf deren spezifische Beteiligung an den verschiedenen Prozessen hin. Untersuchungen weiterer transgener Linien einzelner E(VAR)3-93D-GFP-Fusionsproteine können Aufschluß über Lokalisation und Funktion weiterer E(VAR)3-93D-Proteine geben. Vor allem sollen damit die im Heterochromatin lokalisierten Proteine identifiziert werden.

Koimmunopräzipitationen und der Einsatz des Hefe-Dihybridsystems ermöglichen den Nachweis individueller E(VAR)3-93D-Proteine in verschiedenen multimeren Proteinkomplexen mit unterschiedlichen Funktionen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Vom *E(var)3-93D*-Locus werden durch alternatives Spleißen verschiedene Transkripte gebildet. Die resultierenden Proteine besitzen einen gemeinsamen N-Terminus, der auch die BTB-Domäne enthält, und verschiedene C-Termini (Dorn *et al.* 1993b, Dorn und Roth, persönliche Mitteilung). Die vorliegende Arbeit beschreibt die funktionelle Analyse des *E(var)3-93D*-Locus mit Hilfe spezifischer Antikörper und ausgewählter Mutanten.

Die Mutante *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* wurde durch die Insertion eines *gypsy*-ähnlichen Retrotransposons verursacht. Es wird in dieser Mutante ein Transkript gebildet, welches sich aus den ersten drei Exonen, 84 Basen Intronsequenz und 304 Basen des 5'-nichttranslatierten Bereiches des inserierten *gypsy*-ähnlichen Retrotransposons zusammensetzt. Aufgrund dieses Transkriptes kann ein Protein abgeleitet werden, welches sich aus der BTB-Domäne und weiteren 9 Aminosäuren, die von der Intronsequenz kodiert werden, zusammensetzt. Dabei handelt es sich um dasselbe Protein, welches auch für die *E(var)3-93D^{neo129}*-Mutation identifiziert werden konnte (Schotta, 1997).

Die E(VAR)3-93D-Proteine werden als maternale Komponente in die Eizelle gegeben. In den Embryonen sind sie zunächst uniform verteilt. Erst ab dem 9. Kernteilungszyklus kann ihre Kernlokalisierung nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt ersetzt auch HistonH1 das Protein HMG-D des zuvor transkriptionell inaktiven Chromatins (Ner und Travers, 1994).

Während der Mitose erfolgt eine Dissoziation der E(VAR)3-93D-Proteine vom Chromatin. Sie sind während der Meta- und Anaphase nicht mit den Chromosomen assoziiert.

Es konnte für einzelne E(VAR)3-93D-Proteine eine unterschiedliche Lokalisation im Interphasechromatin nachgewiesen werden. Das E(VAR)3-93D-Protein 38gt ist ein allgemeiner und abundanter Bestandteil des Euchromatins. Im Gegensatz dazu ist das E(VAR)3-93D-Protein 23gt nur an ca. 40 euchromatischen Bindungsstellen nachweisbar. Diese überlappen teilweise mit denen des E(VAR)3-93D-Proteins 38gt, es konnten aber auch Bindungsstellen nachgewiesen werden, an denen das E(VAR)3-93D-Protein 23gt, nicht aber das E(VAR)3-93D-Protein 38gt bindet.

Weder im zentromerischen Heterochromatin, noch an den Telomeren, konnten die E(VAR)3-93D-Proteine 38gt und 23gt nachgewiesen werden. Für die Assoziation mit heterochromatischen Sequenzen sollten daher andere E(VAR)3-93D-Proteine verantwortlich sein.

Das in den insertionellen Mutanten *E(var)3-93D^{neo129}* und *E(var)3-93D⁷¹⁻⁴* exprimierte verkürzte Protein ist nicht kernlokalisiert. In homozygoten *E(var)3-93D^{neo129}*-Weibchen, die bei einer Entwicklungstemperatur von 29°C selektiert wurden, konnten in den Kernen der Eikammern keine E(VAR)3-93D-Proteine detektiert werden, was mit der weiblichen Sterilität der Tiere korreliert.

Die unterschiedliche Lokalisation der E(VAR)3-93D-Proteine weist auf verschiedene Funktionen einzelner E(VAR)3-93D-Proteine hin. Dabei sollten die verschiedenen C-terminalen Bereiche eine wichtige Rolle spielen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Baksa,K., Morawietz,H., Dombradi,V., Axton,M., Taubert,H., Szabo,G., Török,I., Udvardy,A., Gyurkovics,H., Szöör,B., Glover,D., Reuter,G., Gausz,J. (1993). Mutations in the protein phosphatase 1 gene at 87B can differentially affect suppression of position-effect variegation and mitosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 135, 117-125.

Bardwell,V.J. and Treisman,R. (1994) The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* 8: 1664-1677.

Benton,W., Davis,R. (1977). Screening λ -gt recombinant clones by hybridisation to single plaques in situ. *Science* 196: 180-182.

Benyajati,C., Mueller,L., Xu,N., Pappano,M., Gao,J., Mosammaparast,M., Conklin,D., Granok,H., Craig,C., Elgin,S. (1997). Multiple isoforms of GAGA factor, a critical component of chromatin structure. *Nucleic Acids Res.* 26: 3345-3353.

Bhat,K.M., Farkas,G., Karch,F., Gyorkovics,H., Gausz,J., Schedl,P. (1996). The GAGA factor is required in the early *Drosophila* embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division. *Development* 112: 1113-1124.

Biggin,M.D. and Tjian,R. (1988). Transcription factors that activate the *Ultrabithorax* promoter in developmentally staged extracts. *Cell* 53: 699-711.

Bingham,P.M. and Zachar,S. (1989). Retrotransposons and the FB transposons from *Drosophila melanogaster*. in Berg,D.E., Howe,M.W. (1989). *Mobile DNA*. Washington,DC: Am. Soc. Microbiol. pp. 485-502.

Birnboim,H.C. and Doly, J. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100: 243-255.

Brown,J., Wu,C. (1993). Repression of *Drosophila* pair-rule segmentation genes by ectopic expression of *tramtrack*. *Development* 117, 45-58.

Buchenau,P., Hodgson,J., Strutt,H., Arndt-Jovin,D.J. (1998). The distribution of polycomb-group proteins during cell division and development in *Drosophila* embryos: Impact on models for silencing. *J. Cell. Biol.* 141: 569-481.

Büchner,K. (1994). Molekulargenetische Analyse von zwei Enhancermutationen für Positioneffekt-Variation bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Cairns,R. (1998). Chromatin remodelling machines: similar motors, ulterior motives. Trends Biochem. Sci. 23: 20-25.

Chan,C.S., Rastelli,L., Pirotta,V. (1994). A polycomb response element in the *Ubx* gene that determines an epigenetically inherited state of repression. EMBO J. 13: 2553-2564.

Chen,W., Zollman,S., Couderc,J.L., Laski,F.A. (1995). The BTB domain of *bric a brac* mediates dimerization *in vitro*. Mol. Cell. Biol. 6: 3424-3429.

Chinwalla,V., Jane,E.P., Harte,P.J. (1995). The *Drosophila* Trithorax protein binds to specific chromosomal sites and is co-localized with Polycomb at many sites. EMBO J. 14: 2056-2065.

Cleard,F., Delattre,M., Spierer,P. (1997). SU(VAR)3-7, a *Drosophila* heterochromatin-associated protein and companion of HP1 in the genomic silencing of position-effect variegation. EMBO J. 16: 5280-5288.

Csink,A.K. and Henikoff,S. (1998). Something for nothing: the evolution and utility of satellite repeats. Trends Genet. 14: 200-204.

Cummings,M.R. and King,R.C. (1969). The cytology of the vitellogenic stages of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. General staging characteristics. J. Morphol. 128: 427-435.

Danilevskaya,O.N., Slot,F., Traverse,K.L., Hogan,N.C., Pardue,M.L. (1994). *Drosophila* telomere transposon *HeT-A* produces a transcript with tightly bound protein. Proc. Natl Acad. Sci. USA 91: 6679-6682.

Dhordain,P., Albagli,O., Lin,R.J., Ansieau,S., Quief,S., Leutz,A., Kerckaert,J.P., Evans,R.E., Leprince,D. (1997). Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. Proc. Natl Acad. Sci. USA 94: 10762-10767.

DiBello,P., Withers,D., Bayer,C., Fristrom,J., Guild,G. (1991). The *Drosophila Broad-Complex* encodes a family of related proteins containing zinc fingers. Genetics 129, 385-397.

Dingwall,A.K., Beek,S.J., McCallum,C., Tamkun,J.W., Kalpana,G.V., Goff,S.P., Scott,M.P. (1995). The *Drosophila* *snr1* and *brm* proteins are related to yeast SWI/SNF proteins and are components of a large protein complex. Mol. Biol. Cell 6: 777-791.

Dingwall,C. and Laskey,R.A. (1991). Nuclear targeting sequences- a consensus? Trends Biochem. Sci. 16: 478-481

Dominguez,A. and Albornoz,J. (1996). Rates of movement of transposable elements in *Drosophila melanogaster*. Mol. Gen. Genet. 251: 130-138.

Dong,S., Zhu,J., Reid,A., Strutt,P., Guidez,F., Zhong,H.J., Wang,Z.Y., Licht,J., Waxman,S., Chomienne,C., Chen,Z., Zelent,A., Chen,S.J. (1996). Amino-terminal protein-protein interaction motif (POZ-domain) is responsible for activities of the promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor- α fusion protein. Proc. Natl Acad. Sci. USA 93: 3624-3629.

Dorn,R., Heymann,S., Lindigkeit,R., Reuter,G. (1986). Suppressor mutation of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affecting chromatin properties. Chromosoma 93, 398-403.

Dorn,R., Krauss,V., Reuter,G., Saumweber,H. (1993). The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, *E(var)3-93D*, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators. Proc. Natl Acad. Sci. USA 90: 11376-11380.

Dorn,R., Szidonya,J., Korge,G., Sehnert,M., Taubert,H., Archoukieh,E., Tschiersch,B., Morawietz,H., Wustmann,G., Hoffmann,G., Reuter,G. (1993). P-Transposon-induced dominant enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. Genetics 133: 279-290.

Eissenberg,J., James, T., Foster-Hartnett,D., Hartnett,T., Ngan,V., Elgin,S. (1990). Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 87, 9923-9927.

Elfring,L.K., Daniel,C., Papoulas,O., Deuring,R., Sarte,M., Moseley,S., Beek,S.J., Waldrip,W.R., Daubresse,G., DePace,A., Kennison,J.A., Tamkun,J. (1998). Genetic analysis of brahma: The *Drosophila* homolog of the yeast chromatin remodeling factor SWI2/SNF2. Genetics 148: 251-265.

Elgin,C.R., Hood, L.E. (1973) Chromosomal Proteins of *Drosophila* Embryos. Biochemistry 24: 4984-4991

Elgin,S.C.R. (1996).Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. Curr. Opin. Genet. Dev. 6: 193-202.

Engels,W.R. (1989). P elements in *Drosophila melanogaster*. in Berg,D.E., Howe,M.W. (1989). Mobile DNA. Washington,DC: Am. Soc. Microbiol. pp.437-484.

Farkas,G., Gausz,J., Galloni,M., Reuter,G., Gyurkovics,H., Karch,F. (1994). The *Trithorax-like* gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* 371: 806-808.

Fasano,O., Aldrich,T., Tamanoi,F., Taparowsky,E., Furth,M., Wigler,M. (1984). Analysis of the transforming potential of the human *H-ras* gene by random mutagenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81: 4008-4012.

Feinberg,A., Vogelstein,B. (1983). A technique for radiolabeling DNA construction fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137: 266-267.

Fischer,A. (1997). Molekulargenetische Untersuchung Heterochromatin-assoziiierter Proteine mit Hilfe des Hefe-Dihybridensystems und des Telomer-Positionseffektes in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Foe,V.E. and Alberts,B.M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell Sci.* 61: 31-70.

Foe,V.E., Odell,G.M., Edgar,B.A. (1993). Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: Point and counterpoint. *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Franke,A., DeCamillis,M., Zink,G., Cheng,N., Brock,H., Paro,R. (1992). Polycomb and Polyhomeotic are constituents of a multimeric complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 11, 2941-2950.

Gdula,D.A., Gerasimova,T.I., Corces,V.G. (1996). Genetic and molecular analysis of the *gypsy* chromatin insulator of *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 9378-9383.

Georgiev,P. and Kozycina,M. (1996). Interaction between mutations in the *suppressor of Hairy wing* and *modifier of mdg4* genes of *Drosophila melanogaster* affecting the phenotype of *gypsy*-induced mutations. *Genetics* 142: 425-436.

Gerasimova,T.I. and Corces,V.G. (1998). Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell* 92: 511-521.

Gerasimova,T.I., Gdula,D.A., Gerasimov,D.V., Simonova,O., Corces,V.G. (1995). A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect variegation. *Cell* 82: 587-597.

Gerasimova,T.I., Matyunina,L.V., Ilyin,Y.I., Georgiev,G.P. (1984). Simultaneous transposition of different mobile elements: Relation to multiple mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. Mol. Gen. Genet. 194: 517-522.

Grigliatti,T. (1991). Position-effect variegation-an assay for nonhistone chromosomal proteins and chromatin assembly and modifying factors. Methods in Cell Biology 35, 587-627.

Hames,B.D. (1990). One-dimensional polyacrylamid gel elektrophoresis. In: Hames,B.D. and Rickwood,D., eds. Gel elektrophoresis of proteins: a practical approach. Oxford: Oxford University press.

Harrison,D.A., Geyer,P.K., Spana,C., Corces,V.G. (1989). The *gypsy* retrotransposon of *Drosophila melanogaster*: Mechanisms of mutagenesis and interaction with the *suppressor of Hairy-wing* locus. Dev. Genet. 10: 239-248.

Harrison,S., Travers,A. (1990). The *tramtrack* gene encodes a *Drosophila* finger protein that interacts with the *ftz* transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern. EMBO J. 9, 207-216.

Harvey,A.J., Bidwal,A.P., Miller,L.K. (1997). Doom, a product of the *Drosophila mod(mdg4)* gene, induces apoptosis and binds to Baculovirus Inhibitor-of-Apoptosis Protein. Mol. Cell. Biol. 5: 2835-2843.

Heitz,E. (1928). Das Heterochromatin der Moose. Jahrb. Wiss. Botanik 69: 762-818.

Henikoff,S., (1996). Dosage-dependent modification of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. BioEssays 18: 401-409.

Ishimaru,S. and Saigo,K. (1993). The *Drosophila forked* gene encodes two major RNAs, which, in *gypsy* or *springer* insertion mutants, are partially or completely truncated within the 5'-LTR of the inserted retrotransposon. Mol. Gen. Genet. 241: 647-656.

Ito,T., Bulger,M., Pazin,M.J., Kobayashi,R., Kadonaga,J.T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. Cell 90: 145-155.

James,T.C., Eissenberg,J.C., Craig,C., Dietrich,V., Hobson,A., Elgin,S.C.R. (1989). Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated nonhistone chromosomal protein of *Drosophila*. Eur. J. Cell. Biol. 50: 170-180.

- Jerpseth,B. Greener,A., Short,J.M., Viola,J., Kretz, P.L. (1993). *Stratagies* 6: 24.
- Jones,R.S. and Gelbart,W.M. (1993). The *Drosophila* Polycomb-group gene *Enhancer of zeste* contains a region with sequence similarity to *trithorax*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6357-6366.
- Jowett,T. (1986). Extraction of high molecular weight DNA. In: *Drosophila-A practical approach* (D.B. Roberts, ed.). IRL Press, Oxford: 276.
- Judd,B.H. (1995). Mutations of *zeste* that mediate transvection are recessive enhancers of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 141: 245-253.
- Kadonaga,J.T. (1998). Eukaryotic transcription: An interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92: 307-313.
- Karpen,G.H. (1994). Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 281-291.
- Karpen,G.H., Allshire,R.C. (1997). The case of epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet.* 13: 489-496.
- Kellum,R. and Alberts,B.M. (1995) Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.* 108: 1419-1431.
- Kellum,R., Raff,J.W., Alberts,B.M. (1995) Heterochromatin protein 1 distribution during development and during the cell cycle in *Drosophila* embryos. *J. Cell Sci.* 108: 1407-1418.
- Kennison,J.A. (1995). The polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: Trans-regulators of homeotic gene function. *Annu. Rev. Genetics* 29: 289-303.
- Kennison,J.A. and Tamkun,J.W. (1988). Dosage-dependent modifiers of Polycomb and Antennapedia mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85: 8136-8140.
- Kennison,J.A., (1993). Transcriptional activation of *Drosophila* homeotic genes from distant regulatory elements. *Trends Genet.* 9:75-79.
- Kim,A.I., Lyubomirskaya,N.v., Belyaeva,E.S., Shostack,N.G., Ilyin,Y.V. (1994). The introduction of a transpositionally active copy of retrotransposon *gypsy* into the stable strain of *Drosophila melanogaster* causes genetic instability. *Mol. Gen. Genet.* 242: 472-477.

Kimmerly,W., Stultz,K., Lewis,S., Lewis,K., Lustre,V., Romero,R., Benke,J., Sun,D., Shirley,G., Martin,C., Palozzo,M. (1996). A P1-based physical map of the *Drosophila* euchromatic genome. *Genome Research* 6. 414-430.

Kingston,R.E., Bunker,C.A., Imbalzano,A.N. (1996). Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev.* 10: 905-920.

Küpper,H., Delamarter,J., Otto,B., Schaller,H. (1982). Expression of major foot and mouth disease antigen in *E.coli*. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Genetics on Industrial Microorganisms*: 222-226

Labrador,M. and Corces,V.G. (1997). Transposable element-host interactions: Regulation of insertion and excision. *Annu. Rev. Genet.* 31: 381-404.

Laemmli,U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Laney,J.D., Biggin, M.D. (1992). *Zeste*, a nonessential gene, potently activates *Ultrabithorax* transcription in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 6: 1531-1541.

Li,X., Lopez-Guisa,J.M., Ninan,N., Weiner,E.J., Rauscher,F.J., Marmorstein,R. (1997). Overexpression, purification, characterization and crystallization of the BTB/POZ domain from the PLZF oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 272: 27324-27329.

Lindsley,D., Zimm,G. (1992). *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press.,San Diego, New York.

Locke,J., Kotarski,M., Tartof,K. (1988). Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* 120, 181-198.

Lozovskaya,E.R., Hartl,D.L., Petrov,D.A. (1995). Genomic regulation of transposable elements in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 768-773.

Lu,B.Y., Bishop,P., Eissenberg,J.C. (1996). Developmental timing and tissue specificity of heterochromatin-mediated silencing. *EMBO J.* 15: 1323-1332.

Lu,B.Y. and Eissenberg,J.C. (1998). Time out: developmental regulation of heterochromatin silencing in *Drosophila*. *CMLS* 54: 50-59.

- Lyon, M.F. (1972). X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol. Rev.* 47:1-35.
- Martinez-Balbas, M.A., Dey, A., Rabindran, K., Ozato, K., Wu, C. (1995). Displacement of sequence-specific transcription factors from mitotic chromatin. *Cell* 83: 29-38
- Mason, J.M. and Biessmann, H. (1995). The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends Genet.* 11: 58-62.
- Mazo, A., Huang, D., Mozer, B., Dawid, I. (1990). The *trithorax* gene, a trans-acting regulator of the *bithorax* complex in *Drosophila*, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 2112-2116.
- Michelotti, E.F., Sanford, S., Levens, D. (1997). Marking of active genes on mitotic chromosomes. *Nature* 388: 895-899.
- Mitchison, T.J. and Sedat, J.W. (1983). Localization of antigenic determinants in whole *Drosophila* embryos. *Dev. Biol.* 99: 261-264.
- Muller, H. (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Genetics* 22, 299-334.
- Ner, S.S. and Travers, A.A. (1994). HMG-D, the *Drosophila melanogaster* homologue of HMG 1 protein, is associated with early embryonic chromatin in the absence of histone H1. *EMBO J.* 13: 1817-1822.
- Okada, M. and Hirose, S. (1998). Chromatin remodeling mediated by *Drosophila* GAGA-Faktor and ISWI activates *fushi tarazu* gene transkription in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2455-2461.
- Orlando, V., Jane, E.P., Chinwalla, V., Harte, P.J., Paro, R. (1998). Binding of Trithorax and polycomb proteins to the bithorax complex: dynamic changes during early *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.* 17: 5141-5150.
- O'Brien, T., Wilkins, R.C., Giardina, C., Lis, J.T. (1995). Distribution of GAGA protein on *Drosophila* genes in vivo. *Genes Dev.* 9: 1098-1110.
- Paro, R. (1990). Imprinting a determined state into the chromatin of *Drosophila*. *Trends Genet.* 6: 416-421.

Paro,R., Hogness,D. (1991). The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 88, 263-267.

Pazin,M.J. and Kadonaga,J.T. (1997). SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? Cell 88: 737-740.

Pelisson,A., Song,S.U., Prud'homme,N., Smith,P.A., Bucheton,A., Corces,V.G. (1994). *Gypsy* transposition correlates with the production of a retroviral envelope-like protein under the tissue-specific control of the *Drosophila flamenco* gene. EMBO J. 13: 4401-4411.

Petrov,D.A., Schutzmann,J.L., Hartl,D.L., Lozovskaya,E.R. (1995). Diverse transposable elements are mobilized in hybrid dysgenesis in *Drosophila virilis*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 92: 8050-8054.

Pirotta,V. (1998). Polycomb-ing the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. Cell 93: 333-336.

Platero,J.S., Csink,A.K., Quintanilla,A., Henikoff,S. (1998). Changes in chromosomal localization of heterochromatin-binding proteins during cell cycle in *Drosophila*. J. Cell Biol. 140: 1297-1306.

Prud'homme,N., Gans,M., Masson,M., Terzian,C., Bucheton,A. (1995). *Flamenco*, a gene controlling the *gypsy* retrovirus of *Drosophila melanogaster*. Genetics 139: 697-711.

Raff,J.W., Kellum,R., Alberts,B.M. (1994) The *Drosophila* GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle. EMBO J. 13: 5977-5983.

Read,D., Manley,J. (1992) Alternately spliced transcripts of the *Drosophila tramtrack* gene encode zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities. EMBO J. 11, 11035-1044.

Reuter,G. and Wolff,I. (1981). Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. Mol. Gen. Genet. 182: 516-519.

Reuter,G., Guiarre,M., Farah,J., Gausz,J., Spierer,A., Spierer,P. (1990). Dependence of position-effect variegation in *Drosophila* on dose of a gene encoding an unusual zinc-finger protein. Nature 344, 219-223.

Reuter,G., Spierer,P. (1992). Position effect variegation and chromatin proteins. BioEssays 14, 605-612.

Reuter,G., Werner,W., Hoffmann,H.J. (1982). Mutants affecting position-effect Heterochromatinization in *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 85: 539-551.

Reuter,S., Bartelamn,M., Vogt,M., Geisen,C., Napierski,I., Kahn,T., Delius,H., Lichter,P., Weitz,S., Korn,B., Schwarz,E. (1998). *APM-1*, a novel human gene, identified by aberrant co-transcription with papillomavirus oncogenes in a cervical carcinoma cell line, encoded a BTB/POZ-zinc finger protein with growth inhibitory activity. *EMBO J.* 17: 215-222.

Rubin,G.M. (1996). Around the genomes. The *Drosophila* genome project. *Genome Research* 6: 71-79.

Saiki,R.K., Gelfrand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis,K., Erlich, H.A. (1988). Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-489.

Sambrooke,J., Fritsch,E., Maniatis,T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Schotta,G. (1997).Charakterisierung einer antimorphen Mutation für den Transkriptionsregulator *E(var)3-93D*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Schulz,J. (1936). Variegation in *Drosophila* and the insert genome region. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 22, 27-33.

Sheen,F.M. and Levis,R.W. (1994). Transposition of the LINE-like retrotransposon *TART* to *Drosophila* chromosome termini. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 12510-12514.

Silver,L.M., Elgin,S.C.R. (1978). Immunological analysis of protein distribution in *Drosophila* polytene chromosomes. *The cell nucleus*, Vol.5: 215-262. Academic Press, New York.

Sinclair,D.A.R., Mottus,R.C., Grigliatti,T.A. (1983). Genes which suppress position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* are clustered. *Mol. Gen. Genet.* 191: 326-333.

Smith,D.B. and Johnson K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31-40.

Smith,P.A. and Corces,V.G. (1992). The suppressor of Hairy-wing binding region is required for *gypsy* mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* 233: 65-70.

Soeller,W., Euk Oh,C., Kornberg,T. (1993). Isolation of cDNAs encoding the *Drosophila* GAGA transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7961-7970.

Southern,E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Steller,M. Pirotta,V. (1985). A transposable P vector that confers selectable G 418 resistance to *Drosophila* larvae. EMBO J. 4, 167-171

Strutt,H., Cavalli,G., Paro,R. (1997). Co-localization of polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. EMBO J. 16: 3621-3632.

Sun,X., Wahlstrom,J., Karpen,G. (1997). Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. Cell 91: 1007-1019.

Tamkun,J., Deuring,R., Scott,M., Kissinger,M., Pattatucci,A., Kaufman,T., Kennison,J. (1992). Brahma: a regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related of the Yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. Cell 68, 561-572.

Török,T., Harvie,P.D., Buratovich,M. Bryant,P.J. (1997). The product of *proliferation disrupter* is concentrated at centromeres and required for mitotic chromosome condensation and cell proliferation in *Drosophila*. Genes Dev. 11: 213-225.

Tschiersch,B., Hofmann,A., Krauss,V., Dorn,R., Korge,G., Reuter,G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. EMBO J. 13: 3822-831.

Tsukiyama,T. and Wu,C. (1995). Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. Cell 83: 1011-1020.

Tsukiyama,T., Daniel,C., Tamkun,J., Wu,C. (1995). ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. Cell 83: 1021-1026.

Varmus,H. and Brown,P. (1989). Retroviruses. in Berg,D.E., Howe,M.W. (1989). Mobile DNA. Washington,DC: Am. Soc. Microbiol. pp. 53-108.

Wakimoto,B.T. and Hearn,M.G. (1990). The effects of chromosome rearrangements on the expression of heterochromatic genes in chromosome 2L of *Drosophila melanogaster*. Genetics 5: 141-154.

Wallrath,L.L., Elgin,S.C.R. (1995). Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev.* 9: 1263-1277.

Wang,W., Cote,J., Xue,Y., Zhou,S., Khavari,P.A., Biggar,S.R., Murchardt,C., Kalpana,G.V., Goff,S.P., Yaniv,M., Workman,J.L., Crabtree,G.R. (1996). Purification and biochemical heterogeneity of the mammalian SWI-SNF complex. *EMBO J.* 15: 5370-5382.

Wustmann,G., Szidonya,J., Taubert,H., Reuter,G. (1989). The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 217, 520-527

Yanisch-Perron,C. Vieira,J.,Messing,J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC vectors. *Gene* 33: 103.

Zink,D. and Paro,R. (1995). *Drosophila* Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA. *EMBO J.* 14: 5660-5671.

Zollman,S., Godt,D., Prive,G.G., Couderc,J.L. Laski,F.A. (1994). The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91: 10717-10721.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACF	ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Aminosäureposition
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4chloro-3-indolyl-phosphat
BP	Bandpaß
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy-DNA, doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
CHRAC	Chromatin accessibility complex
DAPI	4,6-Diaminino-2-phenylindol
dATP	2`-Desoxy-ATP
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Df	Defizienz
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DTT	1,4-Dithiothreitol
E(var)	Enhancer für Positionseffekt-Variegation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis[β -aminoethylether]-NNN`N`-tetraessigsäure
EMS	Ethylmethylsulfonat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FT	Farbteiler
g	Erdbeschleunigung
GFP	Green fluorescent protein aus <i>Aequorea victoria</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N`-2-ethansulfonsäure
HFT	Hauptfarbteiler
HMG	High mobility group
HP1	Heterochromatisches Protein 1
hsp	Hitzeschockpromotor
IAP	Inhibitor of apoptosis
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAZ3/BCL6	Lymphoma-associated zinc finger 3 / B cell lymphoma 6
LB	Luria Bertani

LP	Langpaß
mod	Modifier
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NFT	Nebenfarbteiler
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NURF	Nucleosome remodelling factor
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEV	Positioneffekt-Variegation
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POZ	Poxvirus and zinc finger
PRE	Polycomb group response elements
PVDF	Polyvinylidenefluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RAR	retinoic acid receptor
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Su(var)	Suppressor für Positioneffekt-Variegation
Su(Hw)	Suppressor of hairy wing
TBS	Tris gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trl	Trithorax-like
U	Unit
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Kerstin Büchner geboren am 24. 12. 1966, an Eides Statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), Januar 1999

Lebenslauf

Name: Kerstin Büchner

Geburtsdatum: 24.12.1966

Geburtsort: Halle/Saale

Familienstand: ledig

Sept. 1973- Juli 1975 Polytechnische Oberschule "Friedrich Schiller" in Halle

Sept. 1975- Juli 1983 Polytechnische Oberschule " Dr. Kurt Fischer" mit
erweitertem Russischunterricht in Halle

Sept. 1983- Aug. 1986 Medizinische Fachschule der Martin-Luther-Universität in
Halle, Fachschulabschluß als Medizinisch-technische
Laborassistentin

Sept. 1986- Aug. 1989 Medizinisch-technische Assistentin im Serologischen
Zentrallabor der Martin-Luther-Universität in Halle

Sept. 1987- Aug. 1989 Stadtvolkshochschule Halle, Abschluß: Abitur

Sept. 1989- Aug. 1994 Martin-Luther-Universität Halle, Studiengang Biochemie
Abschluß: Diplom-Biochemiker

Nov.1993- Juli 1994 Institut für Genetik an der Martin-Luther-Universität in Halle,
Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema:
"Molekulargenetische Analyse von zwei Enhancermutationen
für Positioneffekt-Variation bei Drosophila melanogaster"

seit Sept. 1994 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Genetik an der
Martin-Luther-Universität in Halle, Abteilung
Entwicklungsgenetik, Prof, Dr. G. Reuter
Anfertigung der Promotionsarbeit

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Reuter für die Überlassung des Themas sowie seine Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. R. Dorn möchte ich mich für seine fortwährende Hilfe und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. H. Saumweber danke ich für die Hinweise bei der Durchführung der proteinbiochemischen Arbeiten.

Bei Herrn Prof. Dr. S. Pimpinelli und Dr. L. Fanti möchte ich mich für die Arbeitsmöglichkeiten in ihrem Labor und die Hilfe bei der Durchführung zytologischer Techniken bedanken.

Herrn Dr. G. Hause danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung der Semidünnschnitte.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe "Drosophila-Genetik" für das sehr gute Arbeitsklima bedanken.