

**Molekulare Grundlagen der Schwesterchromatidentrennung:
Charakterisierung der PIM Funktion und Identifizierung
genetisch interagierender chromosomaler Loci in
*Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

-Dr.rer.nat.-

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Oliver Leismann

aus Asslar

Bayreuth 2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 13.06.2001

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2001

1. Gutachter: Prof. Dr. C. F. Lehner

2. Gutachter: Prof. Dr. F. X. Schmid

Berichte aus der Biologie

Oliver Leismann

**Molekulare Grundlagen der
Schwesterchromatidentrennung:
Charakterisierung der PIM Funktion und
Identifizierung genetisch interagierender
chromosomaler Loci in *Drosophila melanogaster***

Shaker Verlag
Aachen 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Leismann, Oliver:

Molekulare Grundlagen der Schwesterchromatidentrennung: Charakterisierung der PIM Funktion und Identifizierung genetisch interagierender chromosomaler Loci in *Drosophila melanogaster*/ Oliver Leismann.

Aachen : Shaker, 2002

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Bayreuth, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8265-9741-9

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-9741-9

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

*Meinen Eltern
und
Alexandra*

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian F. Lehner am Lehrstuhl für Genetik an der Universität Bayreuth angefertigt.

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Professor Christian Lehner für die Bereitstellung des spannenden und hochaktuellen Themas der Schwesterchromatidentrennung, für seine hervorragenden Anleitungen zum wissenschaftlichen Arbeiten, für seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und für seine Bereitschaft auch den „kleinen“ technischen und theoretischen Problemen Gehör zu schenken.

Herrn Prof. Dr. F. X. Schmid danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern des „Guten Labors“ und ganz besonders bei Dr. Stefan Heidmann und Alf Herzig. Dr. Stefan Heidmann war stets bereit bei der Versuchsplanung und –interpretation kompetente und freundliche Hilfe zu leisten. Alf Herzig danke ich für die unzähligen Tips hinsichtlich der *Drosophila*-Halteung und der Proteinbiochemie sowie für seine Diskussionsbereitschaft und seine Geduld.

Weiterhin danke ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern (natürlich auch denen des „Bösen Labors“) des Lehrstuhls für Genetik für die schöne Arbeitsatmosphäre, für die Diskussionen und die Ratschläge zu einzelnen Experimenten. Den technischen Assistentinnen, den Damen der Spülküche und den Sekretärinnen danke ich für die vielen „Kleinigkeiten“, die viel zu wenig gewürdigt werden. Herr Sebastian Heeger hat bei der Eingrenzung des *l(3)85Aa* Locus mitgeholfen. Joachim Reischl danke ich für die Mithilfe bei der Halteung des „Defizienzen-Kits“.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde als Originalarbeit bereits veröffentlicht.

Leismann, O., Herzig, A., Heidmann, S. und Lehner, C. F. (2000).
Degradation of *Drosophila* PIM regulates sister chromatid separation during mitosis.
Genes and Development 14, 2192-2205.

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY	3
3. EINLEITUNG	5
3.1 DIE TRENNUNG DER SCHWESTERCHROMATIDEN	5
3.2 EVOLUTION UND FUNKTION DER SCHWESTERCHROMATIDENKOHÄSION UND DER SCHWESTERCHROMATIDENTRENNUNG.....	6
3.3 MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER KOHÄSION.....	8
3.4 MECHANISMUS DER SCHWESTERCHROMATIDENTRENNUNG.....	9
3.5 DIE REGULATION DER SEPARASEAKTIVITÄT.....	10
3.6 DIE MITOTISCHE DEGRADATION DER SECURINE	11
3.7 DER SPINDELAPPARAT IN DER MITOSE UND DER SPINDEL-CHECKPOINT	14
3.8 DIE SCHWESTERCHROMATIDENTRENNUNG IN DROSOPHILA MELANOGASTER	15
3.9 DIE EMBRYONALEN ZELLYKLEN IN DROSOPHILA MELANOGASTER.....	16
3.10 DAS UAS/GAL4-SYSTEM.....	18
3.11 DAS DROSOPHILA AUGEN ALS MODELLSYSTEM	19
4. ERGEBNISSE	21
4.1 CHARAKTERISIERUNG DER PIMPLES (PIM) FUNKTION:	21
4.1.1 DIE BEDEUTUNG VON FIZZY FÜR DEN ABBAU VON PIM.....	21
4.1.2 PIM BESITZT EINE UNGEWÖHNLICHE DESTRUCTION BOX	21
4.1.3 DIE BEDEUTUNG DER PIM D-BOX FÜR DIE STABILITÄT DES PIM PROTEINS	23
4.1.4 DIE BEDEUTUNG VON FIZZY-RELATED FÜR DEN ABBAU VON PIM	27
4.1.5 DIE PHÄNOTYPISCHEN AUSWIRKUNGEN EINER MITOTISCHEN STABILISIERUNG VON PIM	31
4.1.6 HOHE KONZENTRATIONEN AN PIM ^{DBA} -MYC HEMMEN DIE SCHWESTERCHROMATIDENSEPARATION	33
4.1.7 DIE KOMPLEXBILDUNG ZWISCHEN PIM ^{DBA} -MYC UND THR	35
4.1.8 DIE AUSWIRKUNG EINER PIM ÜBEREXPRESSION AUF DIE SCHWESTERCHROMATIDENSEPARATION	36
4.1.9 SCHWESTERCHROMATIDENTRENNUNG IN ANWESENHEIT GERINGER MENGEN AN NICHTDEGRADIERBAREM PIM.....	39
4.1.10 DAS VERHALTEN VON PIM IM SPINDEL-CHECKPOINT ARREST	46
4.1.11 FUSION EINES N-DEGRONS AN DEN N-TERMINUS VON PIM	47
4.1.12 PTTG KANN PIM NICHT ERSETZEN.....	50
4.2 IDENTIFIZIERUNG CHROMOSOMALER LOCI, DIE GENETISCH MIT PIM UND THR INTERAGIEREN:	53
4.2.1 ÜBEREXPRESSION VON PIM UND THRAC IM DROSOPHILA KOMPLEXAUGE.....	53
4.2.2 DIE KONSEQUENZ DER PIM ÜBEREXPRESSION IN NICHTPROLIFERIERENDEN GEWEBEN	54
4.2.3 DIE SUCHE NACH DEFIZIENZEN, DIE GENETISCH MIT PIM UND THRAC INTERAGIEREN	56
4.2.4 DIE LETALMUTATION L(3)85AA IST EIN VERSTÄRKER DER PIM- UND THRAC- ÜBEREXPRESSIONSPHÄNOTYPEN	62
4.2.5 DIE MUTATION L(3)85AA IST EMBRYONAL LETAL.....	65
4.2.6 PHÄNOTYPISCHE AUSWIRKUNGEN DER LETALMUTATION L(3)85AA IN EMBRYONEN	66
4.2.7 DER SPINDELAUFBAU IN HOMOZYGOT MUTANTEN L(3)85AA EMBRYONEN IST NORMAL	68
4.2.8 DIE REPLIKATION IST IN L(3)85AA MUTANTEN EMBRYONEN NICHT BEEINTRÄCHTIGT	69

4.2.8 DIE REPLIKATION IST IN L(3)85AA MUTANTEN EMBRYONEN NICHT BEEINTRÄCHTIGT	69
4.2.9 HOMOZYGOT MUTANTE L(3)85AA EMBRYONEN ZEIGEN DEFEKTE IN DER AUFLÖSUNG DER CENTROMERNAHEN KOHÄSION.....	73
4.2.10 DIE PCR-VERMITTELTE BESTIMMUNG DER PROXIMALEN BRUCHPUNKTE DER DEFIZIENZEN Df(3R)p25, Df(3R)p-XT103 UND Df(3R)G1	74

5. DISKUSSION **79**

5.1 DIE DEGRADATION VON PIM.....	79
5.2 PIM IST EIN SECURIN VON DROSOPHILA MELANOGASTER.....	82
5.3 FUNKTIONELLE SPEZIALISIERUNG VON SECURINEN	84
5.4 DIE RELEVANZ DES PIM ABBAUS FÜR DIE SCHWESTERCHROMATIDENTRENNUNG	85
5.5 DIE STÖRUNG DER AUGENENTWICKLUNG DURCH PIM- UND THRAC-ÜBEREXPRESSION	89
5.6 GENETISCHE INTERAKTION DES L(3)85AA LOKUS MIT PIM UND THR	91
5.7 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON L(3)85AA	93
5.8 PERSPEKTIVEN IM HINBLICK AUF DIE WEITERE CHARAKTERISIERUNG VON L(3)85AA	95
5.9 PERSPEKTIVEN IM HINBLICK AUF DIE IDENTIFIKATION DES L(3)85AA ⁺ GENS	96

6. MATERIALIEN UND METHODEN **101**

6.1 DROSOPHILA MELANOGASTER STÄMME.....	101
6.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	103
6.3 KONSTRUKTE ZUR GENERIERUNG TRANSGENER FLIEGEN	104
6.4 HERSTELLUNG TRANSGENER FLIEGENSTÄMME	108
6.5 METHODEN IM UMGANG MIT DROSOPHILA MELANOGASTER	109
6.6 PRIMÄRE ANTIKÖRPER	110
6.7 IMMUNPRÄZIPITATION	111
6.8 IMMUNOBLOT-EXPERIMENTE	112
6.9 IMMUNFLUORESCENZ-ANALYSEN	114
6.10 BRDÜ-PULSMARKIERUNG VON DROSOPHILA EMBRYONEN.....	119
6.11 SUCHE NACH MUTATIONEN, WELCHE DIE PIM- UND THRAC-ÜBEREXPRESSIONSPHÄNOTYPEN IM DROSOPHILA MELANOGASTER AUGE MODIFIZIEREN	119
6.12 MOLEKULARE ENDPUNKTBESTIMMUNG DER DEFIZIENZEN Df(3R)p25, Df(3R)p-XT103 UND Df(3R)G1	120

7. LITERATURVERZEICHNIS **123**
