

Molekulare und funktionelle Analyse von Windei (CG12340) als  
Bindungspartner der Histonmethyltransferase Eggless während der  
Oogenese von *Drosophila*

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Carmen Maike Koch

aus Mönchengladbach

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. Andreas Wodarz

Korreferent: Prof. Dr. Ernst Wimmer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2009

<b>I Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Stammzellen.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1 Epigenetik.....</b>	<b>3</b>
Genomische Prägung ( <i>engl. imprinting</i> ).....	4
X-chromosomale Prägung.....	5
<b>1.1.2 Keimbahnchromatin.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Oogenese von <i>Drosophila</i>.....</b>	<b>9</b>
Die Teilung der Keimbahnstammzellen.....	9
Polarisierung der Zysten und die Determinierung der Oozyte.....	11
Die Teilung der somatischen Stammzellen und die Verpackung der Eikammern.....	12
<b>1.3 Die Chromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.1 Das vierte Chromosom von <i>Drosophila melanogaster</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.2 Polytänychromosomen.....</b>	<b>17</b>
Polytänychromosomen der Speicheldrüsen.....	17
Polytänychromosomen der Nährzellen.....	18
<b>1.3.3 Das Karyosom des Oozytenkerns.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Die Repression der Genexpression durch H3K9-Methylierung.....</b>	<b>21</b>
PEV.....	23
<b>1.4.1 HP1.....</b>	<b>24</b>
<b>1.4.2 H3K9 spezifische Methyltransferasen.....</b>	<b>24</b>
Su(var)3-9.....	25
G9a.....	25
SETDB1/ ESET/ Eggless.....	26
<b>1.5 Die Rolle der SUMOylierung in der transkriptionellen     Repression.....</b>	<b>28</b>
<b>1.6 Themenstellung.....</b>	<b>30</b>
 <b>II Material und Methoden.....</b>	 <b>32</b>
<b>2.1 Chemikalien und andere Materialien.....</b>	<b>32</b>
2.1.1. Photoarbeiten und Bildbearbeitung.....	33
<b>2.2 Genetische Methoden.....</b>	<b>33</b>

---

2.2.1	Fliegenzucht und Fliegenstämme.....	33
2.2.2	P-Element-Insertionslinien.....	35
2.2.3	Kreuzungen zur Überexpression mittels UAS-Gal4-System.....	37
2.2.3.1	Kreuzung zur Überexpression von <i>CG12340</i> mittels UAS-Sequenz des P-Elementes EP2024 und <i>engrailed</i> Gal4.....	38
2.2.3.2	Kreuzung zur Überexpression von <i>CG12340</i> - und <i>eggless</i> -Transgenen mittels UAS-Gal4-System.....	38
2.2.4	Kreuzungen zur Erzeugung eines Transdeletions-Allels von <i>CG12340</i> .....	39
2.2.5	Kreuzungen zur Rettung der Letalität des Transdeletions-Allels mittels UAS- Gal4-System.....	43
2.2.6	Erzeugung von Keimbahnklonen mittels FRT-Flp-System.....	43
2.2.6.1	Herstellung von FRT-Rekombinanten der <i>CG12340</i> mutanten Allel.....	44
2.2.6.2	Herstellung von Keimbahnklonen.....	46
<b>2.3</b>	<b>Histologische Methoden.....</b>	<b>47</b>
2.3.1	Antikörperfärbungen an Embryonen.....	47
2.3.2	Antikörperfärbungen an Ovarien.....	48
2.3.3	Antikörperfärbungen an Polytänchromosomen.....	49
2.3.4	Verwendete Antikörper.....	51
2.3.5	DNA-Fluoreszenzmarkierung mit DAPI.....	52
2.3.6	GFP-Färbung.....	52
2.3.7	RFP-Färbung.....	53
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>53</b>
2.4.1	Isolierung genomischer DNA.....	53
2.4.1.1	Isolierung von genomischer DNA aus 30 Fliegen.....	54
2.4.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus einer Fliege.....	54
2.4.1.3	Isolierung von DNA aus Larven und Embryonen mittels Chelex.....	54
2.4.2	Isolierung von polyA <sup>+</sup> -mRNA.....	55
2.4.3	Herstellung von cDNA aus polyA <sup>+</sup> -mRNA.....	55
2.4.4	Gelelektrophorese.....	55
2.4.5	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion).....	56
2.4.5.1	PCR mit Taq- und Pfu-Polymerasen.....	57
2.4.5.2	Long Template PCR.....	58
2.4.5.3	Verwendete Oligonukleotide.....	59
2.4.6	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	62

2.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	63
2.4.8 Sequenzierreaktion.....	63
2.4.9 Bakterienstämme.....	64
2.4.10 Manipulation von DNA-Molekülen.....	65
2.4.10.1 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktions-Verdau).....	65
2.4.10.2 Gateway pEntr/D-Topo-Klonierung und Rekombination mit Ziel-Vektoren.....	66
2.4.10.2.1 Topo-Klonierung in den Gateway-Ausgangsvektor.....	67
2.4.10.2.2 LR-Rekombination in den Gateway-Zielvektoren.....	68
2.4.11 Plasmide.....	69
2.4.12 Transformation von Bakterien.....	73
2.4.12.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	73
2.4.13 Präparation von Plasmid-DNA.....	73
2.4.13.1 Schnell-Präparation der Plasmid-DNA („Mini-Präparation“).....	73
2.4.13.2 Präparation einer größeren Plasmid-DNA-Menge („Midi- Präparation“).....	74
2.4.13.3 Präparation von EST-Klonen.....	74
2.4.14 Zellkultur.....	75
2.4.14.1 Transiente Transfektion von SII-Zellen.....	75
<b>2.5 Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>75</b>
2.5.1 Herstellung von Proteinextrakten.....	75
2.5.1.1. Herstellung von Proteinextrakten aus Embryonen.....	75
2.5.1.2 Herstellung von Proteinlysaten aus SII-Zellen.....	76
2.5.2 Western Blot.....	76
2.5.3 Coimmunpräzipitation.....	78
 <b>III Ergebnisse.....</b>	 <b>79</b>
<b>3.1 Untersuchung der verschiedenen Allele von <i>CG12340</i>.....</b>	<b>79</b>
3.1.1 Untersuchung zur Insertionsposition der P-Elementlinien.....	80
3.1.2 Komplementationstest mit den Insertionslinien und einer Defizienz.....	82
3.1.3 Analyse der mutanten Allele mittels Western Blot.....	82
<b>3.2 Herstellung eines Nullallels von <i>CG12340</i>.....</b>	<b>85</b>

3.2.1 Herstellung eines Nullallels von <i>CG12340</i> durch Entfernung der gesamten Genkassette mittels Transdeletion.....	85
3.2.2 Analyse des Transdeletions-Allels mittels Western Blot.....	88
<b>3.3 Rettungsexperimente.....</b>	<b>89</b>
3.3.1 Rettung von <i>CG12340</i> homozygot mutanten Tieren mittels UAS- <i>GFP-CG12340</i> -Konstrukt und <i>daughterless</i> Gal4 Treiber.....	89
3.3.2 Rettung von <i>CG12340</i> homozygot mutanten Tieren mittels UAS- <i>CG12340-GFP</i> Konstrukt und <i>tubulin</i> -Gal4-Treiber.....	91
<b>3.4 Antikörperfärbungen.....</b>	<b>92</b>
3.4.1 Spezifitätstest des Antikörpers.....	92
3.4.2 Antikörperfärbungen an Embryonen.....	93
3.4.2.1 Antikörperfärbung an Wildtyp-Embryonen.....	93
3.4.2.2 Antikörperfärbung an Embryonen der Transdeletions-Mutante.....	95
3.4.2.3 Antikörperfärbung an transgenen Embryonen.....	97
3.4.3 Antikörperfärbung an Ovarien.....	99
3.4.3.1 Antikörperfärbung an Wildtyp-Ovarien.....	99
3.4.3.2 Antikörperfärbung an Ovarien von transgenen Fliegen.....	103
3.4.3.3 Antikörperfärbungen an wildtypischen Ovarien zur Detektion der POF-Lokalisierung.....	113
3.4.4 Antikörperfärbungen an Keimbahnklon-Ovarien.....	116
3.4.4.1 Antikörperfärbungen an <i>CG12340</i> -mutanten Keimbahnklonen.....	119
3.4.4.2 Antikörperfärbungen an <i>eggless</i> -mutanten und <i>CG12340/eggless</i> mutanten Keimbahnklonen.....	123
3.4.4.3 Färbungen an rudimentären Ovarien von <i>CG12340</i> - und <i>eggless</i> - Mutanten.....	126
3.4.4.4 Färbungen an rudimentären Ovarien geretteter Fliegen.....	129
3.4.5 Antikörperfärbungen an larvalen Speicheldrüsen Polytänchromosomen.....	132
3.4.5.1 Antikörperfärbungen an wildtypischen larvalen Speicheldrüsen Polytänchromosomen.....	132
3.4.5.2 Antikörperfärbungen an transgenen larvalen Speicheldrüsen.....	135
<b>3.7 Untersuchung der Bindung von Windei an Eggless.....</b>	<b>137</b>
3.7.1 Coimmunpräzipitation mit Wde und Eggless.....	137
3.7.2 Untersuchung der Bindedomänen von Windei und Eggless mittels Deletionskonstrukten.....	138

**3.8 Untersuchung der Bindung von Windei an POF.....147**  
 3.8.1 Coimmunpräzipitation mit Windei und POF.....147

**IV Diskussion.....149**

4.1 CG12340 (Windei) ist das *Drosophila*-Homolog von mAM/MCAF1 und lokalisiert in allen untersuchten Geweben ubiquitär und nukleär..... 149  
 4.2 Wde zeigt in den Ovarien von *Drosophila* eine subzelluläre, punktförmige Lokalisierung in den Nährzellen und der Oozyte, welche vermutlich die Assoziation mit dem Chromatin darstellen.....151  
 4.3 Windei und Eggless kolokalisieren in Ovarien und assoziieren in einem Proteinkomplex, wobei die Bindung über die coiled-coil-Domäne von Wde und eine kurze Region von Egg vermittelt wird, welche keine bekannten Proteinmotive besitzt.....152  
 4.4 Windei bindet an POF und könnte zusammen mit Egg die Transkription von Genen des vierten Chromosoms regulieren.....153  
 4.5 Wde ist essenziell für die *in vivo* Funktion von Egg während der Oogenese.....155  
 4.6 Spielt SUMOylierung eine Rolle bei der Funktion des Wde/Egg-Komplexes?...159  
 4.7 Der Wde/Egg-Komplex könnte eine generelle Rolle in Stammzellen spielen....161

**V Zusammenfassung.....163**

**VI Literatur.....165**

**VII Anhang.....CD**

Abkürzungsverzeichnis

Lebenslauf

Danksagung

## I Einleitung

Die Zellen eines Organismus verfügen über die gleichen genetischen Informationen in ihren Kernen. Damit aber eine Spezialisierung von Stammzellen in differenzierte Zellen stattfinden kann, welche dann entwicklungs- oder gewebespezifische Funktionen ausüben, muss eine präzise Kontrolle der Expression aller vorhandenen Gene erfolgen. Dabei kann die Reprimierung von Genen je nach Zelltyp und Entwicklungsstadium reversibel oder nahezu irreversibel sein. Von entscheidender Bedeutung ist in diesen Prozessen die Zugänglichkeit oder Unzugänglichkeit des Chromatins für die Transkriptionsmaschinerie. Die Kondensierung des Chromatins wird in Eukaryoten über hoch konservierte Proteine und Proteinkomplexe reguliert, von denen eine Vielzahl an der Modifizierung von Histon-Proteinen beteiligt ist. Ein Prozess, für den bereits gezeigt werden konnte, dass er die Repression von Chromatin bzw. von Genen vermittelt, ist die Methylierung des Lysinrestes 9 im Histon 3. Die Kopplung der Methylgruppen erfolgt mit Hilfe spezifischer Methyltransferasen, wie dem *Drosophila*-Enzym Eggless. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Funktion dieses Enzyms essentiell für die Trimethylierung von H3K9 in der *Drosophila* Oogenese ist. Der Verlust des Proteins betrifft sowohl die Keimbahnstammzellen wie auch somatische Follikelstammzellen derart, dass ein Arrest der Oogenese und somit eine Sterilität der Weibchen verursacht wird (Clough et al, 2007).

In Säugetieren bindet das Eggless Homolog SETDB1 an den Cofaktor mAM/MCAF, welcher für die Konversion von H3K9me2 zu H3K9me3 durch SETDB1 essenziell ist. Das *Drosophila* Homolog dieses Cofaktors, das vorhergesagte Gen *CG12340*, sollte daher im Rahmen dieser Arbeit näher auf seine Funktion hin untersucht werden.

Der erste Abschnitt der folgenden Einleitung soll einen kurzen Einblick in die Bedeutung von Stammzellen im Allgemeinen sowie der Modifizierung ihres Chromatins geben. Dies vor allem in Bezug auf die Nutzung von Stammzellen in der regenerativen Medizin sowie auf die epigenetischen Mechanismen in Modellorganismen für die Erforschung der zu Grunde liegenden, konservierten Prozesse.

Weitere Abschnitte befassen sich mit den Keimbahnstammzellen und primordialen Keimzellen sowie dem Chromatin von *Drosophila*. Im Hinblick auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Aspekte wird die Histonmethylierung und SUMOylierung im Zusammenhang mit transkriptioneller Repression erläutert.



## 1.1 Stammzellen

Das charakteristische Merkmal einer Stammzelle ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung bei gleichzeitiger Generierung von Tochterzellen, welche der Differenzierung unterliegen. Dabei unterscheiden sich Stammzellen deutlich in ihrem Potential. Adulte Stammzellen dienen als Quelle derjenigen Zelltypen, die für das jeweilige Gewebe notwendig sind, während embryonale Stammzellen zur Differenzierung in alle Zelltypen des Körpers fähig sind.

Totipotente Stammzellen, zu denen die Keimbahnstammzellen und frühe embryonale Zellen zählen, können alle Zelltypen des sich entwickelnden Organismus hervorbringen. Streng genommen sind jedoch nur Zygoten und in einzelnen Organismen ihre direkten Nachkommen totipotent (Seydoux und Braun, 2006). Dagegen können sich pluripotente Stammzellen bereits nicht mehr zu allen, jedoch noch sehr vielen Zelltypen entwickeln, inklusive von Derivaten der drei Keimblätter. Zu den multipotenten Stammzellen mit deutlich eingeschränkterem Potenzial zählen beispielsweise hematopoietische und neuronale Stammzellen, die eine kleinere Anzahl gewebetypischer Zellen hervorbringen können (Corley and Lavine, 2006).

Stammzellen können sich symmetrisch oder asymmetrisch teilen, wobei letztere Variante zur Erhaltung einer Stammzelle und der simultanen Entstehung einer differenzierten Zelle führt. Symmetrische Teilungen können der Generierung einer weiteren Stammzelle zur Besiedelung eines Nischenplatzes dienen (siehe Abschnitt 1.2).

Die Fähigkeit von Stammzellen zur asymmetrischen Zellteilung kann entweder extrinsischer Natur sein, z.B. durch Signale aus der Stammzellnische (siehe Abschnitt 1.2), oder intrinsisch vermittelt werden. Letzteres kann über die asymmetrische Verteilung und Segregation von Proteinen erfolgen.

Die Bedeutung von Stammzellen und deren Gewinnung steigt stetig an, da in ihnen eine Fülle von Möglichkeiten in der regenerativen Medizin gesehen wird. Bislang fanden in der Forschung vorwiegend embryonale Stammzellen (ES-Zellen) Verwendung, welche aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen und kultiviert werden. Die Pluripotenz dieser Zellen beruht dabei unter anderem auf ihrer Fähigkeit zur Differenzierung in somatische Zellen aller drei Keimblätter. Dennoch bleibt gerade bei der Verwendung derartiger Zellen in der regenerativen Medizin der ethische Konflikt bei der Entnahme humaner embryonaler Stammzellen aus Embryonen. Zusätzlich können bei Transplantation von Geweben, die aus diesen Zellen gewonnen wurden, Abstoßungsreaktionen auftreten, da sie von einem „Spender“ stammen.

Eine neuere Methode zur Gewinnung von pluripotenten Zellen stellt die Strategie der induzierten Pluripotenz dar. Es ist inzwischen möglich, aus bereits relativ weit differenzierten Zellen, wie neuronalen Stammzellen oder Keimbahnstammzellen aus Hoden adulter Mäuse induzierte pluripotente Stammzellen zu generieren (Kim et al, 2008; Guan et al, 2006). Dies ist mittlerweile mit verschiedenen murinen und humanen somatischen Zellen durchführbar (Takahashi und Yamanaka, 2006; Yu et al, 2007; Takahashi et al, 2007; Okita et al, 2007; Maherali et al, 2007; Wernig et al, 2007). Den Experimenten liegt in der Regel zu Grunde, dass der Transfer der Gene *oct4*, *sox2*, *c-myc* und *klf4* in somatische Zellen adulter Mäuse diese in ES-Zell-ähnliche Stammzellen verwandelt. Die Genprodukte dieser Gene gelten daher als Pluripotenzfaktoren. Im Falle der neuronalen Stammzellen ist exogenes Oct4 zusammen mit entweder Klf4 oder c-Myc ausreichend für die Reprogrammierung, da diese Zellen bereits größere Mengen von Sox2 und c-Myc exprimieren. Durch Verwendung solcher somatischer Zellen, die bereits endogen Pluripotenzfaktoren exprimieren, kann die Zahl der erforderlichen Faktoren daher reduziert werden (Kim et al, 2008). Allerdings birgt der Transfer über virale Vektoren noch schwer einschätzbare Risiken, ebenso wie die Langzeitkultur, durch die genetische und epigenetische Veränderungen auftreten können (Wobus und Löser, 2008).

### **1.1.1 Epigenetik**

Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Reprogrammierung von Zellen kann die Entschlüsselung der epigenetischen Grundlagen leisten, die somatische Zellen, Keimbahnzellen und diverse Stammzellen voneinander unterscheiden. Dabei bezeichnet die Epigenetik vererbare Veränderungen in der Genexpression ohne Veränderungen der kodierenden Sequenz. Diese Veränderungen beinhalten die Methylierung von genomischer DNA ebenso wie die posttranslationale Methylierung oder SUMOylierung von Chromatin-assoziierten Proteinen, wie zum Beispiel Histonen (Zheng et al, 2008).

Kürzlich wurde gezeigt, dass Oct4 die Demethylasen Jmjd1a und 2c, welche die reprimierenden Di- und Trimethyl-Markierungen an Histon 3 Lysin 9 (H3K9, siehe auch Abschnitt 1.4) demethylieren (Yamane et al, 2006; Whetstine et al, 2006), positiv reguliert. Der Verlust der beiden Demethylasen führt zur Differenzierung der ES-Zellen. Dies beruht auf der Methylierung von H3K9 an Promotoren von Pluripotenz-assoziierten Genen sowie des Schlüssel-Transkriptionsfaktors *nanog* für die ES-Zell Selbsterneuerung (Loh et al, 2007). Die Demethylierung von H3K9me3 am *nanog* Promoter verhindert wiederum konsequent die Bindung transkriptioneller Repressoren wie HP1 (Heterochromatin 1, siehe auch Abschnitt

1.4.1). Es wird daher angenommen, dass die dynamische Repression von Entwicklungssignalwegen ebenso wie die Beibehaltung eines transkriptionell permissiven Chromatins mit wenig H3K9-Methylierung für die Erhaltung der ES-Zell Pluripotenz notwendig ist (Loh et al, 2007). Auch die Reprogrammierung von Fibroblasten zu induzierten pluripotenten Stammzellen wird begleitet von einer erhöhten Expression von *Jmjd1a* und *Jmjd2c* (Takahashi und Yamanaka, 2006, Loh et al; 2007). Daher ist die Expression der beiden H3K9-Demethylasen positiv korreliert mit der Pluripotenz von ES und iPS-Zellen.

#### Genomische Prägung (*engl. imprinting*)

Eine spezielle Form der epigenetischen Vererbung ist die genomische Prägung, die durch differentielle Expression eines Gens in Abhängigkeit von seinem parentalen Ursprung charakterisiert wird (Joanis und Lloyd, 2002). Für die meisten Gene ist der parentale Ursprung nicht weiter bedeutsam, lediglich für die Funktion einer kleinen Anzahl von Genen ist der Ursprung maßgeblich. Ein klassisches Merkmal von genomischer Prägung ist die mitotische Stabilität, wenn Prägung einmal vorgenommen wurde, welche allerdings durch die Passage durch die Meiose reversibel ist (Lloyd et al, 1999).

Praktische Bedeutung erlangt die Epigenetik in der Technik des Klonens von Organismen. Unter der Annahme, dass das Potenzial der Totipotenz in der Oozyte liegt, welche auch weiterhin die Pluripotenzfaktoren Oct4 und Sox2 exprimiert, wird ein diploider Kern einer somatischen Zelle in die Oozyte transferiert (Seydoux und Braun, 2006). Organismen, die durch diese Kern-Transplantation entstanden sind, leiden an einer hohen Rate von begleitenden Defekten und viele davon scheinen auf fehlerhafter genomischer Prägung zu beruhen (Haigh und Lloyd, 2007). Haigh et al klonen erstmals *Drosophila* (Haigh et al, 2005) und zeigten, dass dabei die epigenetische Ruhigstellung eines geprägten Gens verloren geht (Haigh und Lloyd, 2006), was auch auf viele andere geklonte Tiere zutrifft. Da sogar kleinste Einwirkungen auf die Kerne vor der Transplantation die genomische Prägung aufheben können und da diese Kerne nach der Transplantation nicht mehr die Keimbahn durchlaufen, werden die Prägungen nicht wieder hergestellt. Diese epigenetischen Fehler sind selbst relevant, wenn die geklonten Embryonen nur als Stammzellquelle dienen sollen (Haigh und Lloyd, 2006; Humpherys et al, 2001).

Ein Beispiel für eine Erkrankung des Menschen, die auf fehlerhafter Prägung beruht, ist das Beckwith-Wiedemann Syndrom. Dieses beruht auf dem Verlust von DNA- und H3K9-Methylierung einer unterschiedlich methylierten Region von zwei maternal vererbten Wachstumsfaktoren (Higashimoto et al, 2003).

### X-chromosomale Prägung

Eine weitere Form der epigenetischen Prägung ist die Modifikation von X-Chromosomen, die von Nematoden über Fruchtfliegen bis hin zu Säugern auf verschiedene Weise zum Einsatz kommt.

In *Caenorhabditis elegans* erfolgt eine parentale Prägung des X-Chromosoms in der männlichen Spermatogenese (XO). Dort akkumuliert das männliche X-Chromosom methyliertes H3K9 während der Meiose (Schaner und Kelly, 2006) und behält diese Modifikation bei. Diese Anreicherung am X-Chromosom findet allerdings nicht in der Spermatogenese der Hermaphroditen (XX) statt (Bean et al, 2004; Kelly et al, 2002). Eine mögliche Erklärung dafür, dass nur in der männlichen Meiose das einzelne X-Chromosom der Repression durch methyliertes H3K9 zugeführt wird, könnte sein unpaariger Status sein. In Hermaphroditen, welche eine Mutation tragen, die die X-Chromosomen-Paarung verhindert, werden beide X-Chromosomen mit dieser Markierung versehen. Auch Transgene und andere unpaarige DNA sind während der Meiose Ziele dieser Modifikation in beiden Geschlechtern (Bean et al, 2004). Dies deutet darauf hin, dass H3K9-Methylierung in der männlichen Meiose eine generelle Markierung von DNA ohne Paarungspartner ist (Bean et al, 2004).

In Säugetieren erfolgt in den Zellen des Weibchens (XX) die Inaktivierung eines X-Chromosoms. Das inaktive X-Chromosom zeichnet sich ähnlich wie konstitutives Heterochromatin durch späte Replikation aus (Morishima et al, 1962) und kann auf Grund seiner kondensierten Erscheinung in Interphasezellen als Barr-Körperchen wahrgenommen werden (Barr und Carr, 1962). Dabei ist ein essenzieller Auslöser für die X-Inaktivierung die Bedeckung des gesamten inaktiven X mit *Xist* RNA. Diese RNA wird nur von dem X-Chromosom aus transkribiert, welches inaktiviert wird und bedeckt dieses in cis (Brockdorff et al, 1991; Brown et al, 1992).

Auch in Säugern konnten Studien belegen, dass der Zustand des inaktiven X-Chromosoms mit veränderten Histonmodifikationen einhergeht. So ist dieses Chromosom weitgehend frei von aktivierender H3K4-Methylierung, weist aber eine globale Anreicherung von H3K9me3 auf, welches auch während der Mitose am X-Chromosom verbleibt (Boggs et al, 2002; Peters et al, 2002). In Zelllinien mit 5 X-Chromosomen können 4 inaktive X-Chromosomen nachgewiesen werden (Gartler und Riggs, 1983), welche verstärkt mit H3K9me3 markiert sind und reduzierte Färbungen gegen H3K4me3 zeigen (Boggs et al, 2002). Ähnliches wurde in Zelllinien mit 4 X-Chromosomen beobachtet (Peters et al, 2002).

Die H3K9-Methylierung des inaktiven X beginnt sofort nach der Bedeckung mit *Xist*-RNA und vor der transkriptionellen Inaktivierung X-gekoppelter Gene. Außerdem wurde ein Bereich mit H3K9me-Anreicherung stromaufwärts des *Xist*-Gens gefunden. Dieser könnte als Nukleations-Zentrum für *Xist*-RNA-abhängige Ausbreitung der Inaktivierung entlang des X-Chromosoms über H3K9-Methylierung initial verantwortlich ist (Heard et al, 2001).

Da die Ausschaltung der H3K9-spezifischen Methyltransferasen Suv39h1 und 2 (siehe Abschnitt 1.4.2) zwar die H3K9-Methylierung an konstitutivem Heterochromatin entzieht, nicht aber die des inaktiven X und zudem keine Akkumulierung von HP1-Proteinen an diesem X festgestellt werden konnte, muss hier ein Suv39h- und HP1- unabhängiger Mechanismus in der Regulierung der H3K9-Methylierung des fakultativen Heterochromatins vorliegen (Peters et al, 2002). Enzyme, die dafür in Frage kommen, sind eindeutig G9a (Tachibana et al, 2001) und ESET (Dodge 2004; Wang 2003), beide methylieren spezifisch H3K9, wobei ESET bekanntermaßen auch zur Trimethylierung von H3K9 fähig ist (siehe Abschnitt 1.4.2).

Im Gegensatz zum Säuger erfolgt die Dosiskompensierung in *Drosophila* nicht über die Inaktivierung eines X-Chromosoms im Weibchen (XX), sondern über die Hyperaktivierung des einen X-Chromosoms im Männchen (XY). Eine Gemeinsamkeit ist allerdings die Bedeckung dieses Chromosoms mit RNA. Die beiden redundanten, nichtkodierenden RNAs, *roX1* (RNA on X 1) und *roX2* (RNA on X 2) (Meller und Rattner, 2002), sind essentielle Komponenten des Dosis-Kompensations-Systems (Franke und Baker, 1999). Zusammen mit den fünf Male specific lethal (Msl)-Proteinen markieren sie das Dosis-kompensierte männliche X-Chromosom in *Drosophila* (Stuckenholz et al, 1999). Das hyperaktive männliche X in *Drosophila* akkumuliert aktivierende H4K16 Acetylierung, vermittelt durch den Msl-Komplex (Smith et al, 2000). Diese Histonmodifikation ist sicherlich einer der Gründe für die Hyperaktivierung.

### **1.1.2 Keimbahnchromatin**

Das Keimbahnchromatin unterliegt besonders komplexer Regulation und soll im Folgenden am Beispiel der primordialen Keimzellen (PGC) von Maus, Fruchtfliege und Wurm erläutert werden. Die totipotenten primordialen Keimzellen werden früh in der Embryogenese spezifiziert. Dies kann entweder durch Signale von Nachbarzellen (Induktion) oder aber durch maternale Faktoren, wie Nukleinsäuren und Proteine, die während der Zellularisierung bereits im Zytoplasma vorhanden sind (Präformation), geschehen (Wylie, 1999; Extavour und Akam,

2003). Ein Merkmal von Keimzellen in verschiedenen Organismen ist, dass sie oftmals die ersten Zellen des Embryos sind, die zellularisieren. Das Besondere an der transkriptionellen Regulation in embryonalen Keimzellen gegenüber anderen Zellen ist die globale Repression von Genen, die in somatischer Differenzierung eine Rolle spielen, bei gleichzeitiger Aktivität von Genen, welche für das Überleben der Keimbahn notwendig sind (Schaner und Kelly, 2006).

In frühen *C.elegans* Embryonen wird die Keimbahn, dort auch als P-Linie bezeichnet, transkriptionell durch die maternale Keimplasma-Komponente PIE-1 reprimiert. Während der frühen Zellteilungen segregiert das Protein ausschließlich in die posterioren Blastomeren der P-Linie (Mello et al, 1992; Seydoux et al, 1996). Dabei führt der Verlust der PIE-1 Aktivität in den P-Blastomeren und deren Tochterzellen zu einer Transformation in somatische Zellen und damit zum Verlust der Keimbahn (Mello et al, 1992; Seydoux et al, 1996). Nach der symmetrischen Teilung der P-Blastomere P4 in die primordialen Keimzellen Z2 und Z3 sinkt der PIE-1-Gehalt (Mello et al, 1996). Bis zu diesem Stadium befindet sich das Chromatin in einem transkriptionell kompetenten Zustand in Bezug auf Histonmodifikationen (Schaner et al, 2003). Allerdings reprimiert PIE-1 die Transkription durch Verhinderung der transkriptionellen Elongation (Seydoux and Dunn, 1997). Zeitgleich mit dem Verlust des PIE-1-Proteins ist eine deutliche Trennung zwischen Keimbahn und Soma vollzogen, welche begleitet wird von Veränderungen des Keimbahnchromatins (Schaner und Kelly, 2006).

In *Drosophila* gibt es zwar auf genomischer Ebene kein PIE-1-Homolog, aber funktionelle Homologe in Form der Keimplasma-Komponenten Gcl (Germ cell less) und Pgc (Polar granule component), welche ebenfalls die RNA-Polymerase II vermittelte Transkription in PGC bis zur Gastrulation verhindern (Blackwell, 2004; Seydoux und Braun, 2006). Auch in *Drosophila* führen Mutationen in den Genen dieser Komponenten zur Anhäufung zygotischer Transkripte (Blackwell, 2004) und dem Verlust der Keimbahn.

Beiden Organismen gemeinsam ist die Abwesenheit der Trimethylmarkierung von Histon 3 am Lysin 4 (H3K4), welche ein Marker für transkriptionelle Aktivität ist. Die Abwesenheit aktivierender H3K4-Methylierungen wird in *C. elegans* von den Nanos Orthologen Nos-1 und Nos-2 vermittelt sowie in *D. melanogaster* durch das Nanos Protein. Der Verlust der *nos* Gene im Wurm und von *nanos* in der Fliege führt gleichermaßen zu einer verfrühten H3K4-Methylierung und dem Verlust der primordialen Keimzellen (Schaner et al, 2003).

Nachdem die PGC bei gleichzeitiger Repression der RNA Polymerase II-vermittelten Transkription gebildet worden sind, erfolgt in einer zweiten Phase die Modifizierung des Keimbahnchromatins. In *C. elegans* ist diese vor allem geprägt durch die reprimierende H3K27-Methylierung (Schaner und Kelly, 2006).

Die inaktiven *Drosophila* Polzellen zeigen dagegen eine Anreicherung der reprimierenden H3K9-Methylierung. In Embryonen ist eine erhöhte Menge H3K9me in den Polzellen bereits kurz nach ihrer Bildung und vor der Migration nachweisbar. Dieses ist höher als in den somatischen Zellen, wo sich die Färbung auf konstitutiv heterochromatische Bereiche beschränkt (Schaner et al, 2003). Zudem werden *Drosophila* Polzellen nach 0-2 synchronen Teilungen in der G2-Phase mitotisch ruhiggestellt (Su et al, 1998) und beginnen zu wandern. Ein Verlust der *nanos*-Aktivität führt nicht nur zu einem Anstieg der H3K4me-Markierung, sondern auch zu einer deutlichen Reduktion der H3K9-Methylierung, so dass der Chromatinstatus der Polzellen von der *nanos*-Aktivität abhängig ist (Schaner et al, 2003).

Im Gegensatz zu den vorgenannten Modellorganismen entstehen die PGC in der Maus während der Gastrulation durch Induktion im Epiblasten. Auch hier ist ein transkriptioneller Repressor bekannt, Blimp1, der für die Spezifizierung der Maus-Keimbahn notwendig ist und die Inhibition somatischer Transkriptions-Programme vermittelt (Ohinata et al, 2006). Blimp1 positive Zellen exprimieren im Gegensatz zu somatischen Zellen weiterhin Pluripotenzfaktoren wie Oct4, Nanog und Sox2 (Yabuta et al, 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass PGC in Mäusen genomweit ihre DNA-Methylierung und H3K9-Dimethylierung löschen und stattdessen während ihrer Wanderung große Mengen des reprimierenden H3K27me annehmen. Dies könnte entscheidend für die Wiedergewinnung des totipotenten Potenzials in der Keimbahn sein (Seki et al, 2007). Vor oder während der H3K9-Demethylierung sind die PGC in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert, was so lange anhält, bis sie das hohe Ausmaß an H3K27-Methylierung erreicht haben. Die PGC zeigen eine Repression der RNA Pol II-abhängigen Transkription, welche nach der Reduktion von H3K9me2 in der G2-Phase beginnt und erst nach dem Erreichen der großen Mengen H3K27me nachlässt (Seki et al, 2007).

Im Gegensatz zu *D. melanogaster* und *C. elegans* sind PGC-Vorläufer in der Maus transkriptionell aktiv und haben einige Keimbahn-spezifische Gene aktiviert (Yabuta et al, 2006). Erst in wandernden Zellen wird die Transkription reprimiert (Seki et al, 2007).

Ähnlich wie in Wurm und Fliege, sind auch zwei der drei *nanos*-Homologe in der Maus notwendig für die Fertilität (Tsuda et al, 2003). Das Fehlen von *nanos-3*-Genprodukt

beispielsweise verhindert zwar nicht die Spezifizierung der PGC, führt aber zum Verlust dieser Spezifizierung während der Wanderung. Dieser Phänotyp zeigt auffallende Ähnlichkeit zu denen, die in *nanos* mutanten Würmern und Fliegen beobachtet werden können (Schaner et al, 2003).

Wenn die PGC die Genitalkämme besiedeln, erfolgt außerdem die Reaktivierung des inaktiven X-Chromosoms in weiblichen PGC und die Löschung der parentalen Prägung (Li, 2002; McLaren, 2003; Surani, 2001).

Insgesamt zeigen sich auffallende Ähnlichkeiten in der Rekonstitution des Keimbahnchromatins und der X-Chromosom-Inaktivierung oder -Hyperaktivierung verschiedener Modellorganismen. Jedoch sind epigenetische Ereignisse sehr komplex und bedienen sich verschiedenster Chromatinmodifikationen.

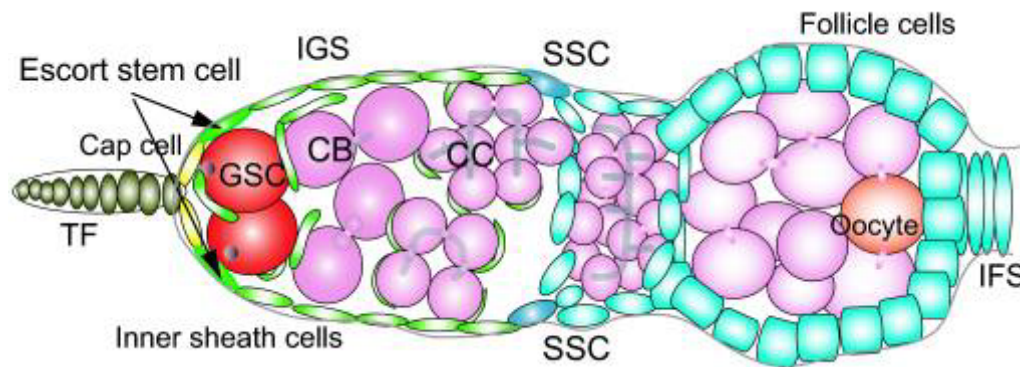
## **1.2 Oogenese von *Drosophila***

Die Oogenese von *Drosophila* findet in den paarig angelegten Ovarien statt, die aus Bündeln von Ovariolen bestehen. Anterior in den Germarien der Ovariolen befinden sich die Keimbahnstammzellen, welche nach posterior die Zystoblasten und damit die späteren Zellzysten abgeben. Nach deren Verpackung in Eikammern werden diese perlschnurartig in den Ovariolen aufgereiht und während sie wachsen in Richtung der Ovidukte transportiert. Nach der Befruchtung aus den *Receptaculi seminis* folgt dann die Eiablage und die Embryonalentwicklung.

### Die Teilung der Keimbahnstammzellen

Die Germarien der Ovariolen besitzen anterior 2-3 Keimbahnstammzellen, in deren unmittelbarer Umgebung sich drei Arten somatischer, mitotisch inaktiver Zellen befinden. Dabei handelt es sich um die Zellen des Terminalfilamentes und die *Cap*-Zellen, welche die Keimbahnstammzellen direkt kontaktieren und die weiter posterior gelegenen *Inner Sheat Cells* (Xie und Spradling 1998). Diese Zellen bilden zusammen die Stammzellnische (Xie und Spradling 2000). Eine weitere Sorte somatischer Zellen sind die Eskortzellen, welche die späteren Zysten bis Region 2a begleiten (Decotto und Spradling, 2005) und in Region 2b apoptotisch werden, wenn die Zysten die Follikelstammzellen erreichen (Nystul und Spradling, 2007).





**Abbildung 1.2.1: Übersicht über ein Germarium aus dem Ovar von *Drosophila melanogaster*.** Die Abbildung wurde aus Niki et al., 2006 entnommen. Anterior ist links, posterior rechts. Dargestellt ist ein Germarium mit einer posterior abknospenden Eikammer Stadium 1. Die Oozyte ist Orange markiert. Die Keimzellen des Germariums werden anterior von den Zellen des Terminalfilamentes und den *Cap*-Zellen umgeben, sowie lateral von den Zellen des *Inner Germarial Sheath*. Die in Rot abgebildeten Keimbahnstammzellen der Region 1 teilen sich asymmetrisch und bringen dabei einen Zystoblasten und eine neue Stammzelle hervor. Der Zystoblast entfernt sich umgeben von Eskortzellen nach posterior (2a). Dort erfolgen vier weitere Teilungen, wobei die 16 entstehenden Zellen über Zytoplasmabrücken verbunden bleiben (2b). In Region 3 des Germariums erfolgt die Einhüllung der Zysten in ein Follikel epithel (Türkis). Diese Zellen sind aus ebenfalls asymmetrischer Teilung der somatischen Stammzellen hervorgegangen (Blau). Abkürzungen: CB Zystoblast, CC Zystozyte, GSC Keimbahnstammzelle, IGS *Inner Germarial Sheath*, IFS *Inter Follicular Stalk*, SSC Somatische Stammzelle, TF Terminalfilament

Die Keimbahnstammzellen teilen sich asymmetrisch, um eine in der Stammzellnische verbleibende Zelle und einen weiter posterior gelegenen Zystoblasten hervorzubringen. Dabei ist die Expression von Decapentaplegic (Dpp), einem Homolog von BMP2 und 4, unerlässlich, um die Keimbahnstammzellen in der Nische zu erhalten und ihre Teilung zu vermitteln (Xie und Spradling 1998). Vermutlich stammt das Dpp-Signal aus den umliegenden somatischen Zellen, wobei die Überexpression von Dpp die Differenzierung der Stammzellen blockiert, während das Fehlen des Signals oder seines Rezeptors den Verlust der Stammzellen beschleunigt und ihre Teilung verlangsamt. Unter normalen Bedingungen beträgt die Verweildauer der Keimbahnstammzellen in der Nische etwa 4-5 Wochen. Keimbahnstammzellen, welche entweder auf natürliche Weise oder durch Induktion differenziert sind, werden effizient ersetzt, indem eine weitere Stammzelle der Nische ihre Tochterzelle nicht posterior abgibt, sondern durch symmetrische Teilung in die freigewordene Nischenposition (Xie und Spradling 2000).

In den Zystoblasten zeigt die Expression des *bag of marbles (bam)*-Gens bereits die beginnende Differenzierung an, da das Bam-Protein ausschließlich in den sich entfernenden Zellen exprimiert wird (McKearin und Spradling, 1990). Ein Verlust dieses Gens in den Zystoblasten führt zur Tumorbildung, weil die Differenzierung der Zellen unterbunden wird.

Es konnte inzwischen gezeigt werden, dass Dpp für die Repression der *bam*-Expression in den Keimbahnstammzellen verantwortlich ist (Chen und Mc Kearin, 2003).

Die differenzierenden Zystoblasten teilen sich weitere vier Mal, so dass am Ende 16 Zellen aus ihnen hervorgehen. Da die Zytokinese unvollständig ist, bleiben diese Zellen in Form einer Zyste über Zytoplasmabrücken bzw. Ringkanäle miteinander verbunden (Abbildung 1.2.1). In den Keimbahnstammzellen wird erstmals das Fusom, ein spektrinreiches, membranhaltiges Organell, sichtbar. Dieses ist zunächst rund und verbleibt nahe der Keimbahnstammzell/*Cap*-Zell-Grenze. In der Teilung elongiert das Fusom und wird teilweise in die sich entfernende Tochterzelle abgegeben. Dort ist es zu Beginn ebenfalls rund, später aber innerhalb der Zyste in alle Zellen verzweigt (Xie und Spradling 2000).

### Polarisierung der Zysten und die Determinierung der Oozyte

Die Polarisierung der Zysten beginnt in der Mitose, wenn das Fusom während der Teilung in nur eine Tochterzelle segregiert. In den Stammzellen ist die Bildung von Zytoplasma-Brücken, den sogenannten Ringkanälen, nur transient, so dass sich diese nach dem Durchlass eines Teils des Fusoms wieder schließen (de Cuevas und Spradling 1998). Der Zystoblast durchläuft vier weitere Teilungen und die 16 entstehenden Zellen sind über Ringkanäle verbunden, welche hier allerdings bestehen bleiben. Das Fusom ist dabei asymmetrisch innerhalb der Zyste verteilt, wobei die Ausläufer durch die interzellulären Brücken in jede Zelle der Zyste reichen. Der größte Anteil verbleibt in einer der beiden Zellen, die über 4 Ringkanäle mit den übrigen Zellen verbunden sind, und somit die Pro-Oozyten darstellen. Dadurch ergibt sich die Vermutung, dass die Oozyte durch asymmetrische Verankerung des Fusoms bereits von der ersten Zystenteilung an spezifiziert ist (de Cuevas und Spradling 1998). Schon kurz nach der Bildung der 16-Zellzyste wird ein MTOC (Mikrotubuli organisierendes Zentrum) innerhalb des Zysten-Zytoplasmas etabliert. Wenn die Oozyte determiniert wird, verbindet ein Mikrotubuli (MT)-Zytoskelett die Oozyte mit den verbliebenen 15 Zellen der Zyste. Dieses MT-Zytoskelett vermittelt nun die folgende asymmetrische Akkumulierung von mRNAs und anderem Material innerhalb des Synzyziums (Theurkauf et al., 1993). Dabei assoziieren die MT mit dem Fusom. Zunächst kann die Assoziation der MT an das Fusom nur periodisch in der Interphase von Zystenteilungen beobachtet werden, später in den 16-Zellzysten, welche die meiotische Prophase erreicht haben, bleibt sie durchgehend bestehen. Dabei fokussieren sich die Minus-Enden der MT im Zentrum des Fusoms. Zur selben Zeit findet die Wanderung von  $\gamma$ -Tubulin-reichen Strukturen entlang des Fusoms in die differenzierende Oozyte statt. Diese Strukturen stellen

höchstwahrscheinlich die Zentrosomen dar (Grieder et al, 2000). Das Fusom spielt demnach eine entscheidende Rolle in der anterior-posterioren Polarisierung der 16-Zellzysten.

Dabei erreicht die Oozyte das posteriore Ende der Zyste in einem zweistufigen Prozess. Zunächst flacht sich die Zyste in der ersten Stufe ab, sobald sie die Region 2b des Germariums erreicht. Die beiden Pro-Oozyten gelangen so in die Mitte der Zyste und bekommen Kontakt zu den posterior angrenzenden Follikelzellen. In der zweiten Stufe wird eine der beiden Pro-Oozyten als Oozyte sichtbar und die Zyste nimmt eine kugelförmigere Gestalt an (Gonzalez-Reyez und St. Johnston, Dev 1998). Für die Platzierung der Oozyte ist zudem die Akkumulierung der Komponenten des Cadherin-Adhäsionskomplexes (Cadherin, Armadillo und  $\alpha$ -Catenin) an der Grenze zwischen der Oozyte und den posterioren Follikelzellen notwendig. Es wird daher vermutet, dass die Oozyte deshalb die posteriore Region der Keimbahnzyste erreicht, weil sie während des Keimzell-Rearrangements die stärkste Adhäsion an die posterioren Follikelzellen aufweist (Gonzalez-Reyez und D. St. Johnston, 1998, Godt und Tepass, 1998).

#### Die Teilung der somatischen Stammzellen und die Verpackung der Eikammern

Die beiden somatischen Stammzellen, welche die Follikelzellen produzieren, befinden sich an gegenüberliegenden Positionen in Region 2b des Germariums (Margolis und Spradling, 1995). Auch sie teilen sich asymmetrisch, um eine Stammzelle und eine sich differenzierende Follikelzelle hervorzubringen, welche sich von der azellulären Stammzellnische entfernt. Dabei bleibt die Follikelstammzelle (FSC) über Zytoplasmabrücken mit den angrenzenden Tochterzellen verbunden, wobei dies möglicherweise dazu dient, den Kontakt zum Follikelepithel zu behalten oder aber die alternierende posteriore und laterale Abgabe der Tochterzellen zu steuern (Nystul und Spradling, 2007).

Die beiden somatischen Stammzellen teilen sich je ein Mal, wobei die sich posterior entfernenden Tochterzellen drei weitere Teilungsrunden durchlaufen und so jeweils 16 Zellen hervorbringen. Die Zellen wandern daraufhin ein, um die Keimbahnzysten einzukapseln (Margolis und Spradling, 1995). Auf diese Weise können pro Tag zwei Eikammern aus dem Germarium abgegeben werden.

Alternierend geben die Follikelstammzellen auch lateral wandernde Tochterzellen ab, welche in etwa 12-24 Stunden durch das Ovariol in Richtung der gegenüberliegenden Nische migrieren, bevor sie proliferieren und zum Follikelepithel beitragen. Diese Tochterzellen konkurrieren mit der residierenden FSC um die Besetzung der Nische und sind die Quelle für das Ersetzen von FSC (Nystul und Spradling, 2007). Dabei ist noch unklar, ob sie während

der Wanderung die Differenzierung „verschieben“ oder ob sie die Fähigkeit zur Dedifferenzierung besitzen, wenn sie den Nischenplatz erobert haben. Allerdings gelingt die Vertreibung der FSC nur selten, so dass sich die gescheiterten Follikelzellen normalerweise unterhalb der Stammzelle in das entstehende Epithel einreihen. Für den Organismus könnte der Vorteil in dieser Konkurrenz darin bestehen, dass Stammzellen, die Mutationen erhalten haben und womöglich geschwächt sind, durch fittere Genotypen ersetzt werden. Somit kann das Gewebe länger aufrecht erhalten werden (Nystul und Spradling, 2007).

Für die anschließende Verpackung der Eikammern in ein Follikelepithel ist unter anderem das Cut-Protein notwendig, ebenso wie für die Gewährleistung der Integrität der Zysten. Das Protein wird zu keiner Zeit der Oogenese in der Keimbahn exprimiert, jedoch in den somatischen Follikelzellen und Follikelstammzellen der Region 2b (Jackson und Blochlinger 1997). Cut scheint dabei eine Funktion in der Erhaltung der Follikelzellpopulation zu haben, weil *cut* mutante Follikelzellklone im Verlauf der Oogenese verschwinden. Da Cut neben den charakteristischen Cut-Wiederholungen auch über eine Homeodomäne verfügt, wäre es denkbar, dass das Protein an DNA bindet und in die transkriptionelle Regulation involviert ist (Jackson und Blochlinger 1997).

Die Abknospung der Eikammern in den Ovariolschlauch erfolgt etwa 4-5 Tage nachdem der Zystoblast abgegeben wurde. Dabei verbleibt die Oozyte auch während der weiteren Oogenese posterior in den Eikammern.

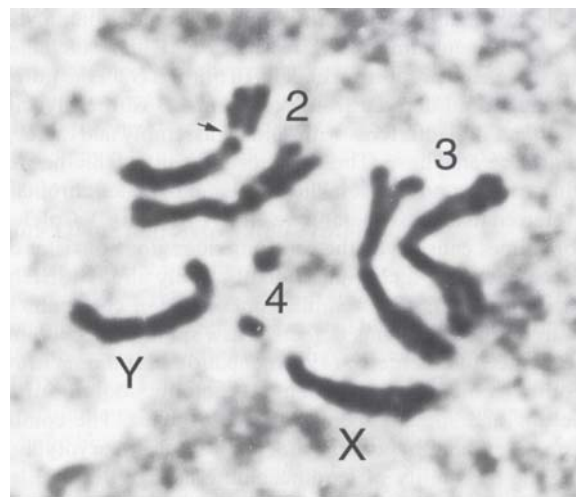
### **1.3 Die Chromosomen von *Drosophila melanogaster***

Das diploide Genom von *Drosophila melanogaster* umfasst drei Autosomenpaare sowie ein Gonosomenpaar, welches im weiblichen Individuum aus zwei X-Chromosomen und im männlichen aus einem X- und einem Y-Chromosom besteht (Abbildung 1.3.1).

Die Gonosomen stellen das 1. Chromosomenpaar der Fruchtfliege dar, während die Autosomenpaare als Chromosomen 2, 3 und 4 bezeichnet werden. Auf zytologischer Ebene lassen sich die verschiedenen Chromosomen an Hand von Unterschieden in der Morphologie differenzieren. So sind die Chromosomen 2 und 3 jeweils metazentrisch, wobei das 3. Chromosom etwas größer erscheint als das 2. Zusätzlich weist das 2. Chromosom eine charakteristische Einschnürung des linken Armes auf (Henderson, 2004).

Das vierte Chromosom ist deutlich kleiner als die übrigen Autosomen und besitzt eine annähernd kugelförmige Gestalt. Da es eine Sonderstellung innerhalb der Autosomen einnimmt, wird es im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Das nahezu akrozentrische X-Chromosom von *Drosophila* besitzt proximal eine Nucleolus organisierende Region (NOR), welche repetitive Sequenzen von ribosomaler DNA enthält. Das Y-Chromosom verfügt ebenfalls über eine NOR. Diese befindet sich auf dem kürzeren seiner beiden Arme (Henderson, 2004). Zwischen den rDNA-Wiederholungseinheiten von X- und Y- Chromosom befinden sich *Spacer*-Regionen, welche die Paarung dieser beiden Chromosomen im männlichen Organismus vermitteln. Auf diese Weise wird eine normale Paarung und Segregation dieser ansonsten wenig homologen Chromosomen in der Meiose gewährleistet (Henderson, 2004).



**Abbildung 1.3.1: Mitotische Chromosomen aus dem Zentralnervensystem von Larven im dritten Larvenstadium (aus: Henderson, 2004).** Abgebildet ist der diploide Chromosomensatz von *Drosophila melanogaster* in Form von mitotischen Chromosomen aus einem männlichen larvalen Gehirn. Die Gonosomen sind mit X und Y markiert, während 2,3 und 4 die homologen Autosomen bezeichnen. Der Pfeil deutet auf eine sekundäre Einschnürung im zweiten Chromosom hin.

Generell werden innerhalb der verschiedenen Chromosomen zwei Arten von Chromatin unterschieden, das genreichere, transkriptionell aktive Euchromatin und das stärker kondensierte Heterochromatin. Dieses repliziert spät in der S-Phase des Zellzyklus, deutlich nach der Replikation des Euchromatins (Henderson, 2004).

Heterochromatin enthält im Gegensatz zum Euchromatin nur eine geringe Menge Proteinkodierender Gene, stattdessen aber eine große Menge von Satelliten-DNAs und transposablen Elementen (Henderson, 2004).

Eine Anhäufung von Heterochromatin findet sich in den perizentrischen Bereichen der Autosomen 2 und 3, sowie in den proximalen Regionen des X-Chromosoms, an allen Telomeren, sowie in großen Bereichen des gesamten 4. Chromosoms (Henderson, 2004).

Das Y-Chromosom ist fast gänzlich heterochromatisch und kodiert lediglich für einige männliche Fertilitätsfaktoren. Es tritt ausschließlich im männlichen Geschlecht auf.

Insgesamt umfasst das vollständig sequenzierte Genom von *Drosophila melanogaster* etwa 13600 Gene.

### 1.3.1 Das vierte Chromosom von *Drosophila melanogaster*

Eine Ausnahme unter den Autosomen von *Drosophila melanogaster* bildet das 4. Chromosom. Dieses kurze, nur etwa 5 Megabasen umfassende Chromosom besteht zu  $\frac{3}{4}$  aus Heterochromatin, besitzt eine stark kondensierte Zentromer-Region und einen gebänderten Bereich (Larsson et al, 2001; Ashburner 1989), welcher 92 Gene enthält. In diesem euchromatischen Bereich findet sich eine Anreicherung zahlreicher repetitiver Elemente, deren Lokalisierung normalerweise auf Heterochromatin beschränkt ist (Henderson, 2004). Zudem finden zwischen den homologen vierten Chromosomen im Gegensatz zu den anderen Autosomen keine *crossing over* und somit keine meiotische Rekombination in der weiblichen Keimbahn statt (Hochmann, 1976; Sandler und Szauter, 1978; Ashburner et al, 2005). Ähnlich wie Heterochromatin repliziert es erst spät (Barigozzi, 1966).

Ein ähnliches Mikrochromosom findet sich in den meisten Spezies von *Drosophila*, wobei es dort als F-Element bezeichnet wird (Ashburner, 1989; Muller, H. J. 1940).

In *Drosophila bucksii*, welches kein derartiges Chromosom besitzt, gibt es Hinweise darauf, dass das F-Element einen proximalen Teil des X-Chromosoms darstellt (Krivshenko, 1955, 1959) und dass dieser Bereich im Laufe der Evolution zu einem unabhängigen Mikrochromosom geworden ist.

Das vierte Chromosom von *Drosophila melanogaster* teilt zudem eine Gemeinsamkeit mit dem X-Chromosom, das Vorhandensein eines Chromosomen-spezifisch bindenden Proteins. Im Falle des Dosis-kompensierten X-Chromosoms handelt es sich um die Proteine eines Komplexes, der unter anderem die Male Specific Lethal (MSL)-Proteine enthält (siehe Abschnitt 1.1.1). Diese Proteine binden an das gesamte männliche X-Chromosom und sind maßgeblich an der Hyperaktivierung desselben zur Dosiskompensation beteiligt (Stuckenholz et al, 1999; Smith et al 2000)

Jan Larsson et al. haben 2001 erstmals ein Protein beschrieben, Painting of fourth (POF), welches spezifisch an ein Autosom von *Drosophila*, Chromosom 4, sowohl in weiblichen wie

in männlichen Individuen bindet. Dabei beginnt die Bindung von POF, analog zu den MSL-Proteinen am X-Chromosom, an einer Initiierungsstelle der proximalen Region des 4. Chromosoms und verbreitet sich von dort aus über das gesamte Chromosom, wobei es bevorzugt an Interbanden lokalisiert und von der heterochromatischen Basis des Chromosoms ausgeschlossen ist (Larsson et al, 2001). Die Bindung von POF ist abhängig von Sequenzen oder Signalen dieses Autosoms, da eine Bindung an translozierte Bereiche von anderen Chromosomen auf das 4. Chromosom nicht erfolgt. Dagegen ist eine Verbreitung von POF in *trans* auf das homologe 4. Chromosom, wenn es keine eigene Initiierungsstelle mehr besitzt, möglich. Die genannte Studie konnte auch zeigen, dass das POF Protein in *Drosophila bucksii* an das gesamte männliche X-Chromosom bindet, woraus sich eine mögliche Verwandtschaft zwischen dem 4. Chromosom und dem X-Chromosom in *Drosophila* sowie zwischen POF-Komplexen und dem Mechanismus der Dosis-Kompensierung herleiten lässt (Larsson et al, 2001). In 3 von 9 untersuchten *Drosophila*-Spezies bindet POF an das männliche X-Chromosom und colokalisiert dort mit dem Msl-3 Protein, was weiterhin einen Zusammenhang mit Dosiskompensierung vermuten lässt. In *Drosophila ananassae* und *malerkotliana* sind das F-Element und das X-Chromosom sogar getrennt, dennoch bindet POF dort das F-Element und das männliche X (Larsson et al, 2001).

Falls das 4. Chromosom tatsächlich vom X-Chromosom stammt, könnte die Heterochromatisierung als ein Weg zur Repression der Hypertranskription entstanden sein. Die Existenz von POF könnte für diesen reprimierenden Einfluss notwendig sein (Larsson et al, 2004).

Bemerkenswerterweise führt das Fehlen eines 4. Chromosoms oder das Vorhandensein eines dritten Homologen nicht zur Letalität oder völligen Infertilität betroffener Individuen (Hochman 1976), ebensowenig wie das Fehlen des *POF*-Gens (Johansson 2007). Dagegen erfolgt eine Haplo-Insuffizienz in Tieren mit nur einem 4. Chromosom, wenn gleichzeitig das POF Protein fehlt. Jedoch kann die Haplo-4-Letalität durch eine Kopie eines POF-Transgens gerettet werden (Johansson et al; 2007). Ein weiteres Indiz für die Verwandtschaft dieses Autosoms mit dem X-Chromosom ist die Tatsache, dass das Vorhandensein von drei vierten Chromosomen zu einer erhöhten Anzahl von Fehlsegregationen führt, was vermutlich auf die Tendenz des 4. Chromosoms zurückzuführen ist, mit dem X-Chromosom in der Meiose zu paaren (Sandler, 1956).

Interessanterweise binden POF und HP1 in gegenseitiger Abhängigkeit voneinander an das vierte Chromosom, dessen Gene in Abwesenheit von POF runterreguliert und in Abwesenheit von HP1 hochreguliert werden (Johansson et al; 2007). Auch resultiert das Ausschalten von

HP1 in einer deutlich erhöhten Letalität von Männchen gegenüber Weibchen (Liu et al, 2005). Zusammengenommen könnte die Funktion von POF in der Stimulation der Genexpression in einem stark heterochromatischen Umfeld liegen (Larsson et al, 2001).

### 1.3.2 Polytänychromosomen

Polytänychromosomen treten in Interphase-Nuklei von differenzierten Zellen verschiedener larvaler und adulter Gewebe von *Drosophila melanogaster* auf. Sie sind das Produkt vieler Endoreplikationen ohne anschließende Zytokinese. Ihre Funktion ist stark mit vermehrter transkriptioneller Aktivität und der rasanten Produktion von Genprodukten gekoppelt. So finden sich polyploide Zellen mit Polytänychromosomen unter anderem im larvalen Verdauungstrakt inklusive der Speicheldrüsen, wo der Grad der Polytänyisierung besonders ausgeprägt ist. Für das schnelle Wachstum der Larven mit anschließender Puppenphase sind enorme Genaktivitäten erforderlich. Ebenso enorm ist die Transkriptionsleistung, die von den polyploiden Nährzellen während der Oogenese vollbracht wird, um in möglichst kurzer Zeit das Heranreifen der Oozyte zu gewährleisten. Eine Gemeinsamkeit aller Polytänychromosomen ist zudem das Auftreten von Banden und Interbanden, die durch Phasenkontrast-Mikroskopie oder Färbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI, welches vorwiegend die Banden markiert, beobachtet werden können (Henderson, 2004). Die Polytänychromosomen von Speicheldrüsen und Nährzellen zeigen das gleiche Bänderungsmuster, wobei die Interbanden allgemein hin als dekondensierte Bereiche mit höherer transkriptioneller Aktivität gelten. Trotz vieler Ähnlichkeiten in den Prozessen der Polytänyisierung innerhalb der Speicheldrüsen und der Nährzellen, gibt es auch erwähnenswerte Unterschiede.

#### Polytänychromosomen der Speicheldrüsen

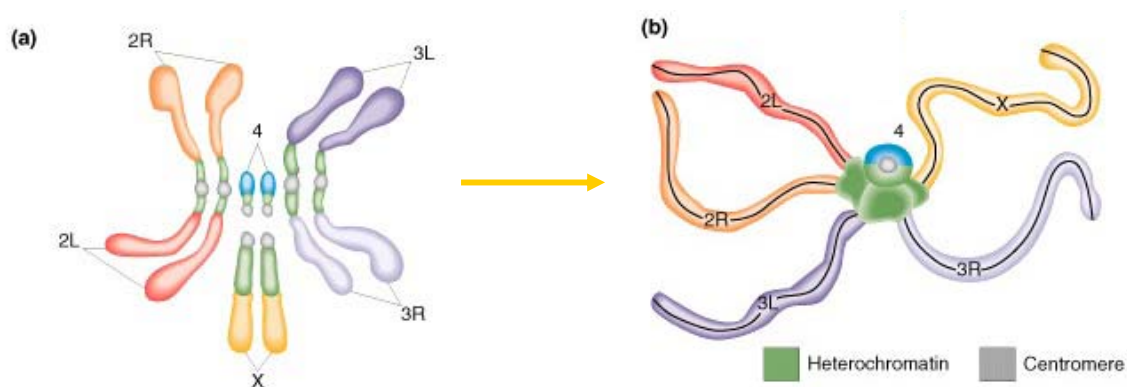
Die Polytänychromosomen der Speicheldrüsen durchlaufen einige Runden von Endoreplikationen, so dass sie am Ende bis zu 2048 Chromatiden besitzen. Dabei zeigt Heterochromatin-assoziierte DNA in der Regel eine reduzierte Polytänie verglichen mit euchromatischen Sequenzen. Die Polytänychromosomen lagern sich an ihren perizentrischen, heterochromatischen Bereichen zu einem Chromozentrum zusammen, wobei dieses stets mit der Kernhülle verbunden ist. Die Telomere des X-Chromosoms und der Autosomen liegen weiter vom Chromozentrum entfernt und die Arme der Chromosomen interagieren nicht miteinander. Das Y-Chromosom geht gänzlich im Chromozentrum auf (Henderson, 2004)



(Abbildung 1.3.2). Es gibt Hinweise darauf, dass die Chromosomen in Bündeln von 29-43 Bündeln mit je 20-40 Chromatiden vorliegen (Urata et al, 1995).

Das Protein SuUR (Suppressor of Under-Replikation) bindet an das Chromozentrum sowie etwa 100 weitere, euchromatische Bereiche und vermittelt die „Unterreplikation“ von DNA des perizentrischen und interkalierenden Heterochromatins, wodurch die polytänsierten Bereiche zusammengehalten werden. Mutationen im SuUR-Lokus beeinflussen zwar weder die Viabilität, noch die Fertilität, verhindern aber die Unterreplikation der vorgenannten Bereiche (Belyaeva et al, 1998).

Die Anordnung in einem Chromozentrum könnte darauf beruhen, dass unterminierte Replikationsgabeln brechen und in homologe Sequenzen anderer Chromosomen eindringen (Dej und Spradling, 1999).

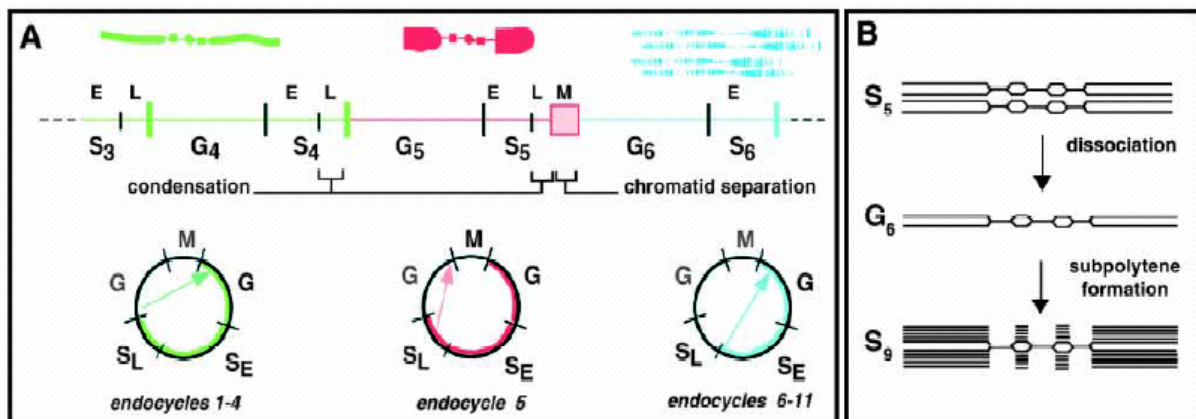


**Abbildung 1.3.2: Schematische Darstellung der Chromosomenanordnung von *Drosophila melanogaster* in der Mitose und als Polytänschromosomen der Speicheldrüsen.** Das Bild stammt von der Internetseite: [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2250/Week\\_Two/Droschro.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2250/Week_Two/Droschro.jpg). Im Gegensatz zu den mitotischen Chromosomen sind die Polytänschromosomen der Speicheldrüsen mit ihren perizentrischen Bereichen zu einem Chromozentrum zusammengelagert. Dabei verteilen sich die Chromosomenarme vom Chromozentrum weg. Die vierten Chromosomen lokalisieren am Chromozentrum, während das Y-Chromosom nicht sichtbar ist.

### Polytänschromosomen der Nährzellen

Während der Oogenese durchlaufen die Nährzellen 10-12 Zyklen von Endoreplikation innerhalb der Eikammerstadien 1-10. Dabei werden drei verschiedene Phasen von Endozyklen unterschieden. In den ersten vier Zyklen findet eine vollständige DNA-Replikation statt, so dass kaum eine Bänderung der Chromosomen zu sehen ist. Ab Stadium 4-5 sind die Polytänschromosomen kaum noch sichtbar. Die zweite Phase findet sich im fünften Endozyklus, in welchem nur eine unvollständige späte S-Phase durchlaufen wird.

Daran schließt sich ein Mitose-ähnliches Stadium an, währenddessen die 64C-Chromosomen in 32 Chromatid-Paare dissoziieren. Diese werden von unterreplizierten Regionen zusammengehalten (Dej und Spradling 1999). Während der folgenden Endozyklen, welche keine späte S-Phase aufweisen, wächst ein neues Polytänchromosom aus jedem 2C-Chromatidpaar, wodurch 32-ploide Polytänkerne entstehen (Abbildung 1.3.3).



**Abbildung 1.3.3: Schematische Darstellung der verschiedenen Phasen der Endozyklen in der Polytänsierung der Nährzellen.** Dargestellt sind in A zunächst die ersten vier Endozyklen sowie der fünfte Endozyklus. Anschließend folgen die Endozyklen 6 bis 11. In B wird hervorgehoben, dass im fünften Endozyklus eine Dissoziation der Chromatiden erfolgt, wodurch sich im Verlauf der folgenden Zyklen die Formierung von Sub-Polytänchromosomen anschließt. Die Abbildung wurde entnommen aus: Dej und Spradling 1999.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass das Euchromatin spät in der S-Phase kondensiert und dass die Struktur der Nährzellpolytänchromosomen darüber reguliert wird, ob bestimmte Stadien der späten S-Phase und der M-Phase in den verschiedenen Endozyklen stattfinden oder übersprungen werden (Dej und Spradling, 1999).

Im Gegensatz zu den Endozyklen der Speicheldrüsen-Polytänchromosomen zeigen die Polytänchromosomen der Nährzellen keine Anordnung in einem Chromozentrum. Vielmehr sind die Chromosomen der Stadien 2-4 als vier separate, polytäne Elemente zu sehen, entsprechend der vier Chromosomen. Zudem besitzen die Chromosomen der Nährzellen deutlich mehr zentromeres Heterochromatin, ähnlich wie mitotische Chromosomen (Dej und Spradling, 1999).

Die Zyklen der Nährzellen sind außerdem asynchron, so dass posteriorer, näher an der Oozyte gelegene Kerne mehr Endozyklen durchlaufen, als weiter anterior gelegene. Am Ende entstehen so in den Kernen 1024-2048 Kopien eines Chromatids.

Einige Mutationen im *ovarian tumor (otu)*-Lokus verursachen eine defekte Dissoziation/Ausbreitung der Chromosomen, so dass die Nährzellen weiter wachsen und riesige Polytänchromosomen entstehen. (King et al, 1981; Mal'ceva und Zhimulev, 1993).

Das Fehlen eines Chromozentrums sowohl im Wildtyp wie auch in Mutanten könnte darauf beruhen, dass die DNA-Replikation während der ersten Endozyklen noch vollständig ist (Dej und Spradling, 1999). Ein möglicher Grund für die Dissoziation/Ausbreitung könnte sein, dass dadurch auch eine räumliche Dissoziation/Ausbreitung der NOR eintritt, wodurch die Produktionsrate von Ribosomen erhöht wird.

### 1.3.3 Das Karyosom des Oozytenkerns

Während der Meiose in der Keimbahn von *Drosophila melanogaster* Weibchen findet die Rekombination zwischen homologen Chromosomen statt. Dabei werden zunächst Doppelstrangbrüche initiiert. Über synaptonemale Komplexe, welche unter anderem aus Proteingerüsten bestehen, erfolgt die Stabilisierung der gepaarten Chromosomen (Page und Hawley, 2004).

Wie bereits in diesem Abschnitt erwähnt, erfolgt keine Rekombination zwischen den vierten Chromosomen von *Drosophila*. Nach erfolgter Rekombination mit anschließender Reparatur der Doppelstrangbrüche lagern sich die meiotischen Chromosomen zusammen und bilden das kompakte, rundliche Karyosom (King 1970). Dabei erfolgt die Anlagerung über das perizentrische Heterochromatin (Dernburg et al., 1996). Die Bildung des Karyosoms ist nur möglich, wenn zuvor die bestehenden Verbindungen zwischen Chromatin und Kernhülle aufgebrochen werden. Diese Verbindung wird durch BAF (Barrier of Autointegration Factor) vermittelt und durch dessen Phosphorylierung mittels NHK-1 (Nucleosomal Histone Kinase-1) aufgehoben (Ivanovska, 2005) (Abbildung 1.3.4).

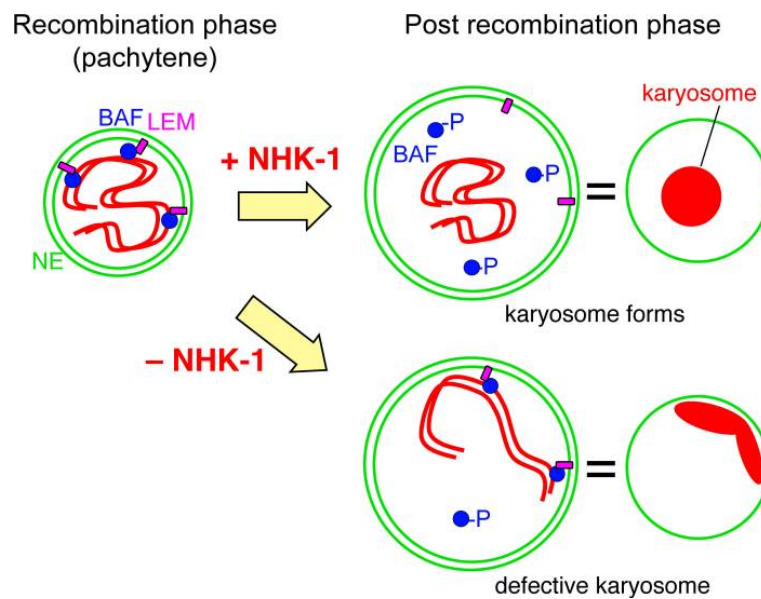


Abbildung 1.3.4: Schematische Darstellung des Chromatins im Oozytenkern, welches sich NHK-1-abhängig von der Kernmembran löst, um das Karyosom zu bilden, das in der Abwesenheit von NHK-1 nicht entsteht. Die Abbildung zeigt schematisch die Bildung des Karyosoms im Oozytenkern. Zunächst ist das Chromatin an einigen Stellen über BAF mit der Kernmembran assoziiert (im Pachytän). In der Anwesenheit von NHK-1 wird BAF phosphoryliert und das Chromatin löst sich von der Kernmembran, so dass das Karyosom inmitten des Kerns entsteht. In der Abwesenheit von NHK-1 bleibt die Verbindung zur Kernmembran bestehen und die Bildung eines normalen Karyosoms wird unterbunden. Die Abbildung wurde aus Lancaster et al., 2007 entnommen.

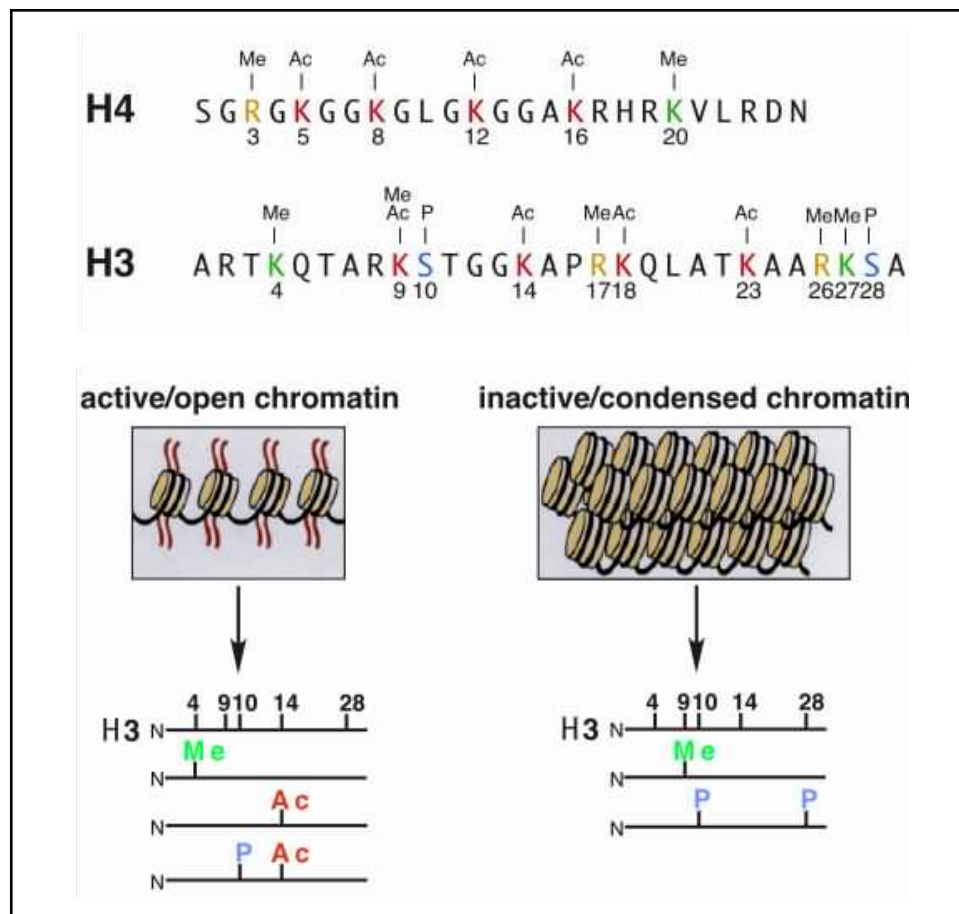
Ein Begleiteffekt der Repression des Genoms ist die Auflösung des Nucleolus in frühen Stadien. Die Bildung des Karyosoms beginnt bereits in Eikammerstadium 1 (Liu et al., 2006). Der Oozytenkern ruht weitestgehend und die Vollendung der Meiose beginnt erst mit der Befruchtung.

#### 1.4 Die Repression der Genexpression durch H3K9-Methylierung

Die Reprimierung der Genexpression spielt eine wichtige Rolle in vielen Stadien der Entwicklung und wird häufig über Modifizierungen an den Histonen vermittelt. Die hoch konservierten Histon-Proteine (H3, H4, H2A, H2B und H1) sind für die Verpackung von eukaryotischer DNA in sich wiederholende, nucleosomale Einheiten verantwortlich, welche zu Chromatinfasern höherer Ordnung gefaltet werden.

Die auswärts gerichteten N-Termini können das Ziel posttranslationaler Modifikationen werden, wie der Acetylierung, der Ubiquitinierung, Phosphorylierung, SUMOylierung oder Methylierung. Es wird angenommen, dass diese Histon-Modifikationen aufeinanderfolgend

oder in Kombination agieren, um die Aktivität des Chromatins zu verändern (Strahl and Allis, 2000; Luger and Richmond 1998; Kornberg and Lorch, 1999).



**Abbildung 1.4.1: Histonmodifikationen am Beispiel von H3 und H4 und Kondensationsgrad des Chromatins durch Methylierung von H3K4 und H3K9.** Die N-Termini der Histone 3 und 4 können an verschiedenen Aminosäure-Resten das Ziel von Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung werden. Dabei können diese Markierungen zu offenerem oder kondensierterem Chromatin führen. Eine bessere Zugänglichkeit für die Transkription erzielt unter anderem die Methylierung von H3K4, wohingegen die Methylierung von H3K9 zur Kompaktion des Chromatins führt. Die Abbildung wurde entnommen aus: <http://www.imt.uni-marburg.de/bauer/research.html>.

Dabei kann die Methylierung von Histon 3 entweder zu besser zugänglichem oder, wie im Falle des Lysinrestes 9 (H3K9), zu transkriptionell inertem Chromatin führen (Krauss 2007; Schotta et al. 2002; Mellone et al. 2003; Peters et al. 2003; Naumann et al. 2005).

Allerdings kann das reprimierte Chromatin nicht generell als Heterochromatin im klassischen Sinne bezeichnet werden. Dieses ist mit verschiedenen Charakteristika verbunden, wie der Kondensation während der Interphase, einem hohen Anteil an repetitiven Sequenzen, Replikation spät in der S-Phase, Suppression von Rekombination, PEV (Position Effect

Variation, siehe auch folgender Absatz) und Hypermethylierung von DNA und von H3K9 (Krauss 2007; Huisinga et al. 2006). Dennoch treten einzelne dieser Kriterien auch in reprimiertem Euchromatin auf, unter anderem die Mono-, Di- und Trimethylierung von H3K9 bzw. die Rekrutierung von HP1 zur Bildung von stärker kondensiertem Chromatin. Dabei kann diese Repression der Genexpression mit bestimmten Entwicklungsstadien oder Zelltypen korrelieren.

### PEV

HJ Müller entdeckte 1930 erstmals das Phänomen der Positions-Effekt-Variation, PEV, dabei untersuchte er Mutationen im *white*-Gen von *Drosophila melanogaster*, wobei dessen Wildtyp-Allel an der roten Augenfarbe beteiligt ist. Die verschiedenen Mutationen resultierten in Variationen der Augenfarbe von einer Zelle zur nächsten und damit in unterschiedlicher Genexpression. So grenzten größere Bereiche roter Facetten an solche mit weißen (Müller, 1930). Ursache waren Rearrangements der chromosomalen Bruchpunkte, wodurch der *white*-Lokus von seiner normalerweise euchromatischen Umgebung in die Nähe von Heterochromatin gelangte. Einer der Gründe, warum nicht alle Facetten eines Auges die gleiche Farbe ausprägten, ist die cis-Ausbreitung eines kondensierten, heterochromatischen Chromatins über die Bruchpunkte hinaus in die ursprünglich euchromatischen Regionen. Dabei wird das Chromatin kompakter und unzugänglich für die Transkriptionsmaschinerie. Diese Ausbreitung des Heterochromatins kann unterschiedlich weitreichend sein und hat im vorliegenden Fall in manchen Zellen bis zum *white*-Lokus gereicht, in anderen aber nicht. (Wakimoto et al, 1998). PEV beschreibt somit die Inaktivierung eines Gens oder Transgens in einigen Zellen, verursacht durch die abnorme Nähe dieses Gens bzw. Transgens zu Heterochromatin.

Das *Drosophila* Genom kodiert einige Proteine, welche eine Rolle in PEV spielen. Viele davon wurden in genetischen Screens entdeckt und auf Grund ihres mutanten Phänotyps als Suppressoren (Su(var)) oder Verstärker (E(var)) der Variagation bezeichnet, darunter Su(var)3-9, Su(var)2-5 (HP1) und Su(var)2-10 (PIAS-Homolog) (Tschiersch et al. 1994; James und Elgin 1986; Eissenberg et al. 1990; Reuter und Wolff, 1981; Wustmann et al, 1989).

### **1.4.1 HP1**

Obwohl die Trimethylierung von H3K9 in Promoter-Regionen zu wesentlich stärkerer transkriptioneller Repression führt als die H3K9-Dimethylierung (Wang et al. 2003), sind beide Methyl-Markierungen in der Lage, HP1 zu rekrutieren, wobei dieses eine höhere Affinität zu H3K9me<sub>3</sub> besitzt (Fischle et al. 2003). HP1 ist ein Protein, welches von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist und erstmals in *Drosophila* unter dem Synonym Su(var)2-5 als Suppressor der Variegation entdeckt wurde (Kato et al. 2007; James und Elgin 1986; Eissenberg et al. 1990). Es kommt in drei Isoformen vor, die im Säuger HP1  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  genannt werden, in *Drosophila* a, b und c. Alle Isoformen enthalten eine *Chromo*-Domäne, eine flexible *hinge*-Region und eine *Chromoshadow*-Domäne. Beide Domänen zusammen sind notwendig für die Funktion des Proteins, wobei die *Chromo*-Domäne die H3K9-Markierungen erkennt, während die *Chromoshadow*-Domäne die HP1-Dimerisierung vermittelt (Eskeland et al. 2007). Die Isoformen a/ $\alpha$  und b/ $\beta$  finden sich hauptsächlich innerhalb von perizentrischem Heterochromatin, während c/ $\gamma$  in euchromatischen Bereichen angereichert ist. (Eskeland et al. 2007; Smothers and Henikoff 2001; Kato et al. 2007; Minc et al. 2000; Greil et al. 2003).

Die ektopische Expression von humanem HP1  $\alpha$  und  $\gamma$  in *Drosophila* führt zu einer verstärkten Repression und Heterochromatin-Bildung. Außerdem ist die humane Isoform  $\alpha$  dazu in der Lage, die durch Mutation in *HP1* verursachte Letalität zu retten (Kato et al, 2007), was auf den hohen Grad der Konservierung innerhalb dieser Proteine und ihrer Funktionen hindeutet und zusätzlich die Wichtigkeit von HP1 in der Bildung von Heterochromatin bestätigt.

Die Bindung des HP1-Dimers an die DNA und Nukleosomen lässt den Schluss zu, dass HP1 eine Rolle als Bindeglied zwischen Nukleosomen und Nicht-Histon-Proteinen spielt, um die Organisation von Chromatin höherer Ordnung und damit die Repression von euchromatischen Genen bzw. die Expression von heterochromatischen Genen zu vermitteln (Zhao et al. 2000).

### **1.4.2 H3K9 spezifische Methyltransferasen**

Da eine der wichtigsten, HP1 rekrutierenden Markierungen die H3K9-Methylierung ist, wurden inzwischen einige H3K9 spezifische Histon-Methyl-Transferasen (HMT) mit preSET-, SET- und post-SET-Domänen untersucht. Dabei stammt der Name SET von den ersten drei Proteinen, bei denen dieses Motiv gefunden wurde: Suppressor of Variegation, Enhancer of Zeste und Trithorax (Tschiersch et al, 1994).

### Su(var)3-9

Die erste identifizierte *Drosophila* HMT war Su(var)3-9 (Tschiersch et al. 1994). Säugerorthologe sind die Proteine Suv39H1 (Rea et al. 2000; Aagaard et al. 1999) und Suv39H2 (O'Carroll et al. 2000). Su(var)3-9 und seine Orthologe generieren H3K9-Methyl-Markierungen an perizentrischem Heterochromatin aller höheren Eukaryoten (Eskeland et al 2007; Peters et al., 2001) und Su(var)3-9 kann mono-, di- und trimethyl-H3K9 in vitro generieren (Seum et al, 2007). Dies wird durch die SET-Domäne katalysiert (Rea et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Su(var)3-9 und HP1 zusammen an transponierbare Elemente und vorwiegend im perizentrischen Heterochromatin liegende Gene binden, dass jedoch die HP1-Bindung am vierten Chromosom größtenteils unabhängig von der Su(var)3-9-Lokalisierung ist (Greil et al., 2003). Zudem ist die HP1 Lokalisierung an Polytänchromosomen von Gehirnen in Su(var)3-9 mutanten Larven insgesamt stark reduziert, dennoch unverändert am vierten Chromosom (Schotta, et al., 2002), wodurch sich die Annahme ergibt, dass die dortigen Methyl-Markierungen und die HP1-Bindung durch eine andere Methyltransferase vermittelt werden.

Da Su(var)3-9 Methyl-Markierungen an konstitutivem Heterochromatin etabliert (Verschure et al, 2005) und sein Ortholog für die Mausentwicklung benötigt wird (Peter et al., 2001; Mis et al, 2006), ist es erstaunlich, dass Fliegen, welche homozygot mutant im *su(var)3-9*-Lokus sind, eine normale Entwicklung durchlaufen und Adulte vital und fertil sind. Daher ist der *su(var)3-9*-Lokus kein essentielles Gen in *Drosophila* (Mis et al., 2006).

### G9a

Eine weitere Gruppe H3K9-spezifischer Methyl-Transferasen mit pre-SET-, SET und post-SET-Domäne, sowie zusätzlich mit Ankyrin-Wiederholungen, enthält die Proteine G9a (Tachibana et al., 2001) und G9a-like proteins (GLP). G9a hat eine *in vivo* Methylase-Aktivität, welche die Mono- und Dimethylierung von H3K9 in Euchromatin von Säugerzellen katalysiert, und es konnte gezeigt werden, dass G9a/GLP in die Regulierung euchromatischer Gene involviert ist (Krauss, 2007; Tachibana et al., 2007; Stabell et al., 2006). Dagegen lokalisiert G9a nicht im perizentrischen Chromatin (Tachibana et al., 2001). Im Säuger ist G9a eine für die Mausentwicklung essentielle H3K9 Mono- und Di-Methylase (Mis et al., 2006; Tachibana et al., 2002), deren Fehlen zu früher Letalität führt (Dodge et al., 2004; Mis et al., 2006).

Interessanterweise konnte vor kurzem gezeigt werden, dass G9a und einige andere Proteine, darunter auch das CG12340-Homolog mAM (murine ATFa associated Factor), eine kurze



Sequenz mit der Aminosäure-Komposition ARKT aufweisen, welche eine deutliche Ähnlichkeit zum Histon 3 N-Terminus um Lysin 9 (ARKS) aufweist und daher eine „Histon-Nachahmung“ darstellen könnte. G9a ist zur autokatalytischen Selbst-Methylierung dieses Motivs in der Lage, aber auch zur Methylierung dieses Motivs in mAM, einem CG12340-Homolog, und anderen Proteinen. Zudem kann die Methylierung dieser Sequenz in vivo zu einer Interaktion mit HP1 führen, welche reversibel ist durch die Phosphorylierung des benachbarten Threonins durch Aurora B (Sampath et al., 2007; Fischle et al., 2005). Dennoch scheint die enzymatische Aktivität von G9a mehr als die Methylierung der „Histon-Nachahmung“ von Bedeutung für die Kontrolle der Genexpression zu sein (Sampath et al., 2007). Es ist bisher nicht bekannt, ob die Methylierung dieses Motivs in mAM eine Auswirkung auf dessen Funktion hat.

Neuere Daten zeigen, dass das *Drosophila* G9a Protein, im Gegensatz zu seinem Säuger-Homolog, keine essenzielle Methyltransferase darstellt (Seum et al., 2007 b). Die Deletion der gesamten genomischen Sequenz von *G9a* stört nicht die Vitalität der Fliegen.

#### SETDB1/ ESET/ Eggless

Eine ebenfalls recht ausführlich untersuchte H3K9 spezifische HMT ist SETDB1 (Mensch), welche hochkonserviert ist und unter anderem Orthologe in der Maus (ESET) sowie in *Drosophila* hat (Eggless). Ebenso wie die bereits erwähnten Enzyme besitzt auch Eggless eine zweigeteilte SET-Domäne, sowie zwei TUDOR-Motive und eine Methyl-Binde-Domäne (Clough et al., 2007). Das humane SETDB1-Protein wurde erstmals von Harte et al., 1999 und von Schultz et al., 2002 beschrieben und lokalisiert hauptsächlich in euchromatischen Regionen von Säugerzellen, wo es an der Reprimierung von Genen beteiligt ist. SETDB1 kann von MBD1 (Methyl-CpG Binding Domain 1) über die Interaktion mit humanem MCAF1 (MBD1-containing Chromatin Associated Factor 1/ mAM) rekrutiert werden, um durch HP1 kondensiertes Heterochromatin zu generieren (Ichimura et al., 2005). In der Maus führt der Verlust von mAM (MCAF1) zu einem Anstieg der H3K9-Dimethyl-Form, bedingt durch die Unfähigkeit von ESET (SETDB1) in dessen Abwesenheit die Konversion in Trimethyl-H3K9 zu katalysieren (Wang et al., 2003).

Die Deletion der gesamten preSET/SET-Domäne des SETDB1 Orthologs ESET in der Maus führt zu Periimplantations-Letalität zwischen 3,5 und 5,5 Tagen nach der Befruchtung. Vermutlich würde die Letalität sogar früher einsetzen, wenn die maternale Komponente des Proteins ausgeschaltet würde. Zudem schlägt eine Kultivierung von ES-Zellen fehl, wenn diese mutant für das *ESET*-Gen sind, so dass daraus geschlossen wird, dass ESET für das

Überleben der ES-Zellen essenziell ist (Dodge et al., 2004). Analog zu seinem humanen Homolog ist die ESET-Enzymaktivität stark eingeschränkt in der Abwesenheit von mAM (MCAF1), da auch hier dieser Cofaktor die Fähigkeit des Enzyms verstärkt, die Trimethylierung von H3K9 und damit die Repression der Transkription zu vermitteln (Wang et al., 2003). Für das *Drosophila*-Ortholog dSETDB1 bzw. Eggless konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass diese H3K9 spezifische HMT unverzichtbar für eine normale Entwicklung und die Vitalität der Fliegen ist (Stabell et al., 2006; Seum et al., 2007; Tzeng et al., 2007; Clough et al., 2007). Dabei führt das Fehlen beider Kopien des Gens zur Letalität im Puppenstadium (Seum et al., 2007), während die Deletion der SET-Domäne auch homozygot mutante, adulte Weibchen hervorbringt, diese jedoch steril sind (Clough et al., 2007). DSETDB1/ Eggless lokalisiert in euchromatischen Regionen, im Chromozentrum und am Chromosom 4 in Präparationen von Polytämchromosomen (Stabell et al., 2006; Seum et al., 2007; Tzeng et al., 2007). Zudem coimmunpräzipitiert dSETDB1/Eggless mit POF (Tzeng et al., 2007), welches für die transkriptionelle Hochregulierung von Genen des vierten Chromosoms verantwortlich ist (Larsson et al., 2001; Johansson et al., 2007a). DSETDB1/ Eggless-Mutanten verlieren den größten Teil ihrer H3K9 Methyl-Markierungen, sowie die HP1-Bindung an Chromosom 4 (Tzeng et al., 2007), welches unter Wildtyp-Bedingungen durch dSETDb1/ Eggless reprimiert wird (Seum et al., 2007; Tzeng et al., 2007). Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass dSETDB1/ Eggless notwendig für die H3K9-Trimethylierung in somatischen und Keimbahn-Zellen während der Oogenese ist. Mutante Ovarien zeigen einen frühen Arrest der Oogenese, in Korrelation mit dem Verlust der Trimethylierung des H3K9 in den frühen Stadien der Oogenese im Germarium (Clough et al., 2007; Yoon et al., 2008), sowie durch eine reduzierte Proliferation der somatischen Zellen und damit verbunden die unvollständige Einkapselung der Eikammern. Außerdem tritt Apoptose in den betroffenen somatischen und Keimbahn-Zellen auf (Clough et al., 2007).

## 1.5 Die Rolle der SUMOylierung in der transkriptionellen Repression

In den letzten Jahren ist eine Reihe von Polypeptid-Modifizierern entdeckt worden, unter ihnen der bekannteste Vertreter Ubiquitin. Die Ubiquitinierung dient neben anderen Funktionen hauptsächlich dazu, die Zielproteine der proteolytischen Degradation zuzuführen (Gill, 2004).

Einen Verwandten des Ubiquitins stellt mit 18% identischen Aminosäuren und ähnlicher dreidimensionaler Struktur das SUMO (small ubiquitin-related modifier)-Molekül dar (Melchior, 2000). Als reversibler Protein-Modifizierer kann SUMO die Lokalisierung modifizierter Zielproteine durch veränderte Protein-Protein-Interaktionen (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007) und somit eine Fülle von Prozessen beeinflussen, darunter auch die transkriptionelle Repression. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren zur Etablierung von kompaktem, reprimiertem Chromatin führen kann, welches Charakteristika von Heterochromatin aufweist (Stielow et al., 2008). Zudem wurde dabei herausgefunden, dass eine SUMO-abhängige Rekrutierung verschiedener Faktoren wie SETDB1 und HP1 erfolgt, woraus eine Kompaktierung des Chromatins folgt.

Neben der verwandten Struktur weisen auch der generelle Mechanismus der SUMO-Konjugation sowie die beteiligten Enzyme Parallelen zur Ubiquitinierung auf. Dabei wird zunächst das SUMO-Protein durch Bildung einer Thioester-Bindung mit einem E1 (SUMO-aktivierenden) Enzym aktiviert. Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Heterodimer aus Aos1 und Uba2. In einem zweiten Schritt erfolgt der Transfer des SUMO-Moleküls an das SUMO-konjugierende (E2) Enzym Ubc9 (Melchior, 2000). Anschließend folgt der Transfer von SUMO über Ubc9 an das Substrat durch Bildung einer Isopeptid-Bindung zwischen einem Glycin in SUMO und einem Lysin des Zielproteins. Dabei wird dieser Prozess in der Regel durch eine SUMO E3 Ligase vereinfacht, zu der unter anderem die Proteine der PIAS-Familie zählen (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007). Zudem sind SUMO-spezifische Proteasen wie Ulp1 sowohl an der Prozessierung von unreifem SUMO wie auch an der Entfernung von SUMO Konjugaten vom Substrat beteiligt (Gill, 2004).

Die SUMOylierung ist ein weit verbreiteter und konservierter Mechanismus, so dass Homologe des SUMO-Proteins und entsprechender Enzyme von der Hefe über *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* bis zu den Säugern gefunden worden sind (Meluh und Koshland, 1995; Mannen et al, 1996; Chen et al, 1998; Lapenta et al, 1997; Bhaskar, 2000; Huang et al, 1998 ; Hanania et al, 1999; Vierstra und Callis, 1999).

Das menschliche Genom beispielweise kodiert vier verschiedene SUMO Proteine, SUMO-1 bis SUMO-4 (Melchior et al, 2000; Guo et al, 2004), wohingegen *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *D. melanogaster* nur einen Vertreter dieser vorwiegend ubiquitär exprimierten Proteine besitzen (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007).

Im Modellorganismus *Drosophila* konnten inzwischen Homologe sämtlicher Komponenten, die für die SUMOylierung notwendig sind, nachgewiesen werden (Talamillo et al, 2008). Zu den E3-Ligasen zählt dabei auch ein Vertreter der PIAS-Proteinfamilie, Su(var)2-10, welches als Su(var)-Protein ein Kandidat für eine Beteiligung in der Funktion von Heterochromatin ist (Reuter und Wolff, 1981). Dies wird gestützt durch die Entdeckung, dass Su(var)2-10 eine Rolle in der chromosomalen Struktur und der chromosomalen Vererbung spielt (Le et al, 2004; Hari et al, 2001). Daher kann analog zu den Studien im Säuger auch in *Drosophila* eine Involvierung der SUMOylierung in der transkriptionellen Repression angenommen werden.

Zudem zeigt das *Drosophila* SUMO Protein und weitere Komponenten der SUMOylierung eine Anreicherung in verschiedenen Geweben, in denen eine Funktion in der transkriptionellen Repression vermutet werden kann und teilweise bereits bestätigt wurde:

Zunächst wird das SUMO Protein dem Embryo in großer Menge maternal zur Verfügung gestellt. Dabei erfolgt eine Anreicherung in der Keimbahn während der Spermatogenese und der Oogenese, hier insbesondere in den Keimbahnstammzellen und Keimbahnzysten und später in den Kernen von Nährzellen und der Oozyte (Hashiyama et al, 2008). Es folgt eine ubiquitäre Verteilung in frühen Embryonen mit einer neuerlichen Akkumulierung der Proteine auch in späteren Stadien im Nervensystem und in den Gonaden (Lehembre et al, 2000; Shigenobu et al, 2006; Hashiyama et al, 2008), welche die primordialen Keimzellen beherbergen. In *Drosophila* entstehen die primordialen Keimzellen, hier auch Polzellen genannt, am posterioren Ende des Embryos im Blastodermstadium. Während der Gastrulation passieren die Polzellen das Mitteldarmepithel und wandern dann in die Gonaden ein, wo sie in funktionelle Gameten differenzieren (Williamson und Lehmann, 1996). Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erläutert, durchlaufen die Polzellen eine Reihe von Veränderungen in ihrer transkriptionellen Aktivität und ihrem Chromatinzustand, so dass die Akkumulierung von SUMO in den Polzellen auf eine mögliche Funktion in diesen epigenetischen Prozessen schließen lässt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die SUMOylierung von Transkriptionsfaktoren unter anderem im zentralen Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* eine wichtige Rolle in der Entwicklung spielt. Diese ist gestört und resultiert in embryonaler Letalität, wenn die durch SUMOylierung vermittelte transkriptionelle Repression des Transkriptionsfaktors SoxNeuro ausbleibt (Savare et al, 2005). Zusätzlich wurde die

SUMOylierung von Tramtrack gezeigt (Lehembre et al, 2000), welches die Expression von Genen reprimiert, die spezifisch für neuronale Stammzellen sind (Badenhorst et al, 2002), und die Repression von neuronalen Schicksalsdeterminanten im peripheren Nervensystem (PNS) vermittelt (Guo et al, 1996). Diese Entdeckungen korrelieren mit der deutlichen Expression von SUMO im ZNS und PNS während der Embryonalentwicklung.

In Verbindung mit SUMO-Molekülen wird unter anderem zwischen SUMO-Interaktionsmotiven (SIM) und SUMOylierungsmotiven unterschieden, wobei nur letztere das Ziel der kovalenten Bindung mit SUMO sind. Für das Säugerprotein MCAF1 konnte gezeigt werden, dass dieses über ein SIM-Motiv verfügt, welches seinen Bindungspartner MBD1 der SUMOylierung zuführt und damit die Bindung zwischen MCAF1 und dem DNA-bindenden Protein MBD1 deutlich verstärkt (Uchimura et al, 2006). Ein SIM-Motiv besteht häufig aus der Aminosäurefolge hxxh, wobei h für die Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin steht und x für jede beliebige Aminosäure. Das Motiv ist dabei in der Regel von sauren Aminosäuren flankiert, seltener auch von Serin (Melchior, 2000, Minty et al, 2000).

Das SUMOylierungsmotiv, über das eine kovalente Bindung der SUMO-Moleküle an das Protein stattfindet, besteht aus der Aminosäurefolge  $\psi$ KxE, wobei  $\psi$  für eine große, aliphatische Aminosäure steht, K für Lysin, x für jede beliebige Aminosäure und E für Glutaminsäure (Rodriguez et al, 2001).

Es gibt inzwischen Daten darüber, dass auch SETDB1 nicht nur wie bereits erwähnt durch SUMOylierung rekrutiert wird, sondern vielmehr selbst ein Ziel der SUMOylierung ist und durch diese Modifikation, wie zahlreiche andere Proteine ebenfalls, eine Bandenverschiebung um etwa 40 kDa in Proteingelen erfährt (Rosendorff et al., 2006). Dennoch konnte bisher die direkte Funktion der SUMOylierung von SETDB1 noch nicht geklärt werden.

## 1.6 Themenstellung:

Die räumliche und zeitliche Repression der Genaktivität spielt eine tragende Rolle in vielen Entwicklungsprozessen. Von großer Bedeutung ist dabei die Methylierung von H3K9 mit anschließender Rekrutierung des Heterochromatin Proteins 1. Durch die Kondensierung des Chromatins wird die Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie herabgesetzt. Wie bereits gezeigt werden konnte, sind verschiedene H3K9-Methyltransferasen in diversen Organismen essenziell, so auch die HMT dSETDB1/Eggless unter anderem in der *Drosophila* Oogenese. Bisher liegen aber keinerlei Daten darüber vor, ob das *Drosophila*-Homolog von mAM/MCAF1, das vorhergesagte Gen *CG12340*, analog zu den Beobachtungen im Säuger

ein essenzieller Bindungspartner von dSETDB1/Eggless in der Konversion von H3K9me2 zu H3K9me3 ist. Weiterhin ist nicht bekannt, ob CG12340 ein essenzielles Protein der Fruchtfliege ist und ob es in den Geweben, in denen dSETDB1/Eggless seine Funktion ausübt, exprimiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Expression des CG12340-Proteins untersucht werden, vor allem im Hinblick auf diejenigen Gewebe, in denen bereits eine Funktion von dSETDB1/Eggless beschrieben wurde. Für die Klärung der Frage, ob *CG12340* ein essenzieller Lokus von *Drosophila melanogaster* ist, sollte ein Nullallel hergestellt und zusammen mit diversen erhältlichen P-Element-Insertionslinien auf mutante Phänotypen hin untersucht werden. Dabei lag das Hauptaugenmerk darauf, ob möglicherweise auftretende Phänotypen mit bereits für dSETDB1/Eggless beschriebenen Defekten korrelieren. Ebenfalls sollte geklärt werden, ob die beiden Proteine in *Drosophila*-Gewebe colokalisieren, wofür die Herstellung von transgenen Fliegen, welche entsprechende Fusionsproteine von dSETDB1/Eggless und CG12340 exprimieren, vorgesehen war. Über diese Fusionsproteine sollte zudem geklärt werden, ob eine Komplexbildung mittels Coimmunpräzipitation nachgewiesen werden kann. Durch die Generierung von Deletionskonstrukten könnten dabei die Bereiche der Proteine herausgestellt werden, welche für eine Bindung essenziell sind. In diesem Zusammenhang war auch von Interesse, inwieweit der dSETDB1/Eggless-Bindungspartner POF simultan in diesem Komplex vorliegt und ob CG12340 möglicherweise in allen bisher beschriebenen Bereichen, in denen dSETDB1/Eggless seine Funktionen ausübt, beteiligt ist.

## II Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und andere Materialien

Alle Chemikalien wurden in der Qualität *pro analysis* von folgenden Firmen bezogen: *Acros*, Geel, Belgien; *Baker*, Deventer, Niederlande; *Biomol*, Hamburg; *Bio-Rad*, München; *Roche Diagnostics*, Mannheim; *Difco*, Detroit, USA; *Fluka*, Buchs, Schweiz; *Gibco/BRL Life Technologies*, Karlsruhe; *Grüssing*, Filsum; *Merck*, Darmstadt; *Pharmacia/LKB*, Freiburg; *Riedel-de Haen*, Seelze; *Roth*, Karlsruhe; *Serva*, Heidelberg; *Sigma-Aldrich*, Steinheim.

Die Restriktionsenzyme, Polymerasen und Ligasen, sowie ihre entsprechenden Puffer wurden von *Roche Diagnostics*, Mannheim; *MBI Fermentas*, St. Leon Rot; *New England Biolabs*, Schwalbach/Taunus; *Promega*, Madison, USA und *Genecraft*, Köln bezogen.

Alle verwendeten Lösungen wurden mit autoklaviertem aqua-bidest. angesetzt und entsprechen, sofern nicht anders angegeben, Standardlösungen wie in „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Third Edition), Sambrook, J. et al, 2001 (Cold Spring Harbor Press) beschrieben.

Verwendete Kitsysteme:

- Nucleobond AX, *Macherey-Nagel*, Düren
- Nucleospin Extract Kit, *Macherey-Nagel*, Düren
- pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit, *Invitrogen*, Groningen, NL
- Gateway<sup>R</sup> LR Clonase™ II Enzyme Mix, *Invitrogen*, Groningen, NL
- DNeasy Blood & Tissue Kit, *Qiagen GmbH*, Hilden
- FuGENE® HD Transfection Reagent der Firma *Roche Diagnostics*, Mannheim
- µMACS One-step cDNA Kit der Firma *Miltenyi*, Bergisch Gladbach
- µMACS mRNA Isolation Kit der Firma *Miltenyi*, Bergisch Gladbach,
- BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate (POD), *Roche Diagnostics*, Mannheim

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch die Abteilung Entwicklungsbiochemie, AG Pieler, GZMB Göttingen.

### 2.1.1. Photoarbeiten und Bildbearbeitung

Angefertigte Präparate wurden mit dem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss LSM510, Zeiss, Oberkochen) ausgewertet und in Form von Bildern festgehalten.

Das zur Bildaufnahme verwendete Computersystem war Microsoft Windows XP. Weiterhin wurde als Computersystem ein Macintosh PowerPC von Apple, Ismaningen verwendet. Die Bilder wurden mit der Software Adobe Photoshop 7.0, Adobe Systems, San Jose, USA, bearbeitet.

Zur Analyse von Sequenzen und Erstellung von Genkarten wurde das DNA-Star-Softwarepaket, DNASTAR, Inc., Madison, USA, verwendet.

## 2.2 Genetische Methoden

### 2.2.1 Fliegenzucht und Fliegenstämme

Die verwendeten Stämme wurden bei 18°, RT und 25°C auf einem wie in Ashburner (1989) beschriebenen Standardmedium gehalten. Fliegen wurden zur Eiablage auf Apfelsaft-Agarplatten gesetzt, die zur Stimulation der Eiproduktion mit Hefe bestrichen wurden.

Standardmedium: 356 g Maisschrot, 47,5 g Sojamehl, 84 g Trockenhefe, 225 g Malzextrakt, 75 mL 10% Nipagin, 22,5 mL Propionsäure, 28 g Agar, 200 g Zuckerrübensirup mit 4,9 Liter Wasser auffüllen.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit folgenden Fliegenstämmen durchgeführt:

Bezeichnung	Genotyp	Beschreibung/ Bemerkungen	Referenz
Wildtyp	Wildtyp	rotäugig, gerade Flügel; trägt <i>CG12340</i> auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms an Position 47C1	Aus Stammsammlung A.Wodarz
P{EP}EP2024	P{EP}EP2024: w;P{w <sup>+mC</sup> ori kanR TrlBR <sup>cRA</sup> , Scer\UAS[14x.hs](>)=EP }/CyO	P-Element enthält UAS- Sequenz, Fliegen auch homozygot lebensfähig	Szeged Drosophila Stock Center #EP(2)2024
P{XP}	P{XP}CG12340 <sup>d06198</sup>	homozygot letales Allel von	Exelixis



CG12340 <sup>d06198</sup>	w <sup>+mC</sup> TrlBR <sup>cRa</sup> Scer\UAS <sup>14x.hs.XP</sup> Scer\UAS <sup>14x.hs.XP.Scer\FRT</sup> gypsy\su(Hw)BR <sup>348</sup>	CG12340, entstanden durch P-Element-Insertion; P-Element (XP) enthält UAS flankierende FRT-Sequenzen	Collection der Harvard Medical School #d06198
P{XP}d03942	P{XP}d03942 w <sup>+mC</sup> TrlBR <sup>cRa</sup> Scer\UAS <sup>14x.hs.XP</sup> Scer\UAS <sup>14x.hs.XP.Scer\FRT</sup> gypsy\su(Hw)BR <sup>348</sup>	homozygot lebensfähig, entstanden durch P-Element-Insertion; P-Element (XP) enthält UAS flankierende FRT-Sequenzen	Exelixis Collection der Harvard Medical School #d03942
P{XP}d01917	P{XP}d01917 w <sup>+mC</sup> TrlBR <sup>cRa</sup> Scer\UAS <sup>14x.hs.XP</sup> Scer\UAS <sup>14x.hs.XP.Scer\FRT</sup> gypsy\su(Hw)BR <sup>348</sup>	homozygot lebensfähig, entstanden durch P-Element-Insertion in 47B14; P-Element (XP) enthält UAS flankierende FRT-Sequenzen	Exelixis Collection der Harvard Medical School #d01917
P{EPgy2}CG12340 <sup>EY00884</sup>	y[1] w[67c23]; P{w[+mC]y[+mDint2]=EPgy2}BcDNA:LD26050 [EY00884]/CyO	homozygot letales Allel von CG12340, entstanden durch P-Element-Insertion	Bloomington #15045
P{EPgy2}CG12340 <sup>EY02179</sup>	y[1] w[67c23]; P{w[+mC]y[+mDint2]=EPgy2}BcDNA:LD26050 [EY02179]	homozygot lebensfähiges Allel von CG12340, entstanden durch P-Element-Insertion	Bloomington #15088
Df(2R)27	Df(2R)27/CyO	homozygot letales Allel von CG12340; Defizienz mit den Bruchpunkten: 47A;47D	Bloomington #8109
<i>daughterless</i> Gal4	w[*]; P{w[+mW.hs]=GAL4-da.G32}UH1	treibt Gal4 Expression im Muster des <i>daughterless</i> Gens; auf dem 3. Chromosom lokalisiert; homozygot lebensfähig	Bloomington #5460 bzw. aus Stammsammlung E. Knust
<i>engrailed</i> Gal4	y[1] w[*]; P{w[+mW.hs]=en2.4-GAL4}e16E P{w[+mC]=UAS-FLP1.D}	treibt Gal4 Expression im Muster des <i>engrailed</i> Gens; auf dem 2. Chromosom lokalisiert; homozygot lebensfähig	Bloomington #6356
<i>tubulin</i> Gal4	y[1] w[*]; P{w[+mC]=tubP-GAL4}LL7/TM3, Sb[1]	treibt Gal4 Expression im Muster des <i>tubulin</i> Gens; auf dem 3. Chromosom lokalisiert	Bloomington #5138
<i>mat67</i> Gal4	w[*]; P{w[+mC]=matalpha4-	treibt GAL4-VP16 Fusionsprotein Expression	Bloomington #7062

	GAL-VP16}V2H	unter der Kontrolle des alphaTub67C Promoters; maternal exprimiert und in die Eier geladen;	
egg1473	W; bw, egg <sup>1473</sup> /GFP CyO	EMS-vermittelte Deletion der SET-Domäne von eggless; eggless lokalisiert in 60E des rechten Arms von Chromosom 2	Tulle Hazelrigg, Dept. Biological Sciences, New York, USA
w; Gla/ CyO, P{ftz::lacC}	w; Gla/ CyO, P{ftz::lacC}	trägt Glaced Marker über einem CyO-Balancer mit P-Element, welches $\beta$ -Galaktosidase im fushi tarazu Muster exprimiert	Aus Stammsammlung A.Wodarz
w; Gla/CyO {twi::GFP}	w; Gla/CyO {twi::GFP}	trägt Glaced Marker über einem CyO-Balancer mit P-Element, welches GFP im twist Muster exprimiert	Benni Shilo, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel
w; IF/CyO; MKRS/TM6b	w; IF/CyO; MKRS/TM6b	trägt <i>irregular facettes</i> Marker auf dem 2. Chromosom über CyO-Balancer; trägt MKRS Marker/Balancer auf dem 3. Chromosom über TM6b-Balancer, der $\beta$ -Gal im fushi tarazu Muster exprimiert	Aus Stammsammlung A.Wodarz
P[w <sup>+</sup> FRT42B] GFP	w[1118]; P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}G13 P{w[+mC]=Ubi-GFP.nls}2R1 P{Ubi-GFP.nls}2R2	trägt FRT-Sequenz auf zweitem Chromosom in 42B (P-Element trägt auch GFP, unter dem ubiquitin Promoter exprimiert	Bloomington #5826
P[w <sup>+</sup> FRT42B] neo	w[1118]; P{ry[+t7.2]=neoFRT}40A P{w[+mW.hs]=FRT(w[hs])}G13/CyO	trägt FRT-Sequenzen auf dem zweitem Chromosom in 40A (P-Element trägt auch Neomycinresistenz) und in 42B	Bloomington #8217
ywhsFlp; Sco/CyO	P{ry[+t7.2]=hsFLP}12, y[1] w[*]; noc[Sco]/CyO	trägt P-Element auf dem ersten Chromosom mit Flipase, unter dem Hitzeschock-Promotor exprimiert	Bloomington #1929

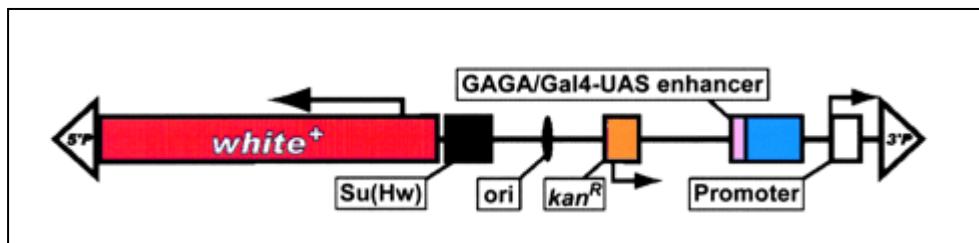
### 2.2.2 P-Element-Insertionslinien

Für einige der unten beschriebenen Experimente wurden P-Element-Insertionslinien verwendet (Herkunft: siehe Liste der Fliegenstämme). Die XP-Element-Linie P{XP} CG12340<sup>d06198</sup> stammt aus der Exelixis Collection der Harvard Medical School und sollte laut

Vorhersage im dritten Exon von *CG12340* inseriert haben. Die Untersuchung des Insertionsortes erfolgte in Kapitel 3.1.1. Ein Schema sowie eine Beschreibung des XP-Elementes ist Abschnitt 2.2.4 zu entnehmen, da dieses P-Element die Grundlage der Transdeletion mit Hilfe der Linien P{XP}d03942 und P{XP}d01917 darstellte. Die exakten Insertions-Positionen der XP-Elemente dieser Linien sind ebenfalls Kapitel 3.1.1 zu entnehmen.

Die EP-Element-Linie P{EP}2024 ist in einem P-Element-Insertionsverfahren entstanden, welches in Rørth, 1996 beschrieben wird. Es enthält ein *white*<sup>+</sup>-Gen und ein Verstärker-Element vor einer UAS-Kopie, welche durch Gal4-Bindung den nachgeschalteten Promoter im Muster der Gal4-Expression zur Transkription des nachfolgenden Gens aktiviert (Abbildung 2.2.2.1).

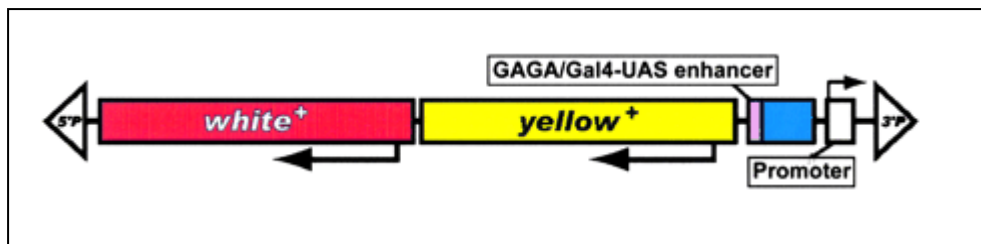
Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, erfolgte zunächst die Verifizierung des auf der Internetseite von FlyBase (<http://flybase.org/>) vorhergesagten Insertionsortes im 5'-Bereich von *CG12340*, um anschließend die in Abschnitt 2.2.3.1 beschriebenen Kreuzungen zur Überexpression von *CG12340* vorzunehmen.



**Abbildung 2.2.2.1: Schematische Darstellung des P{EP}-Elementes, das dem P-Element-Insertionsverfahren zugrunde liegt, aus dem die Linie P{EP}2024 hervorgegangen ist (Rørth, 1996).** Das P{EP}-Element enthält ein *white*<sup>+</sup>-Gen und ein Verstärker-Element vor einer UAS-Kopie. Durch die Bindung von Gal4 an die UAS-Kopie wird der nachgeschaltete Promoter im Muster der Gal4-Expression aktiviert und vermittelt die Transkription des nachfolgenden Gens. Die Abbildung wurde Bellen et al., 2004 entnommen.

Auch die EY-Element-Linie P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> wurde aus einem P-Element-Insertionsverfahren erhalten (Bellen et al., 2004) und enthält ein *white*<sup>+</sup>-Gen, sowie ein *yellow*<sup>+</sup>-Gen, welche der Selektion nach der Keimbahntransformation dienen. Ebenfalls besitzt das EY-Element ein Verstärker-Element vor einer UAS-Kopie und einen Promoter zur Expression nachgeschalteter Gene (Abbildung 2.2.2.2). Diese P-Element-Linie sollte

allerdings auf Grund ihrer vorhergesagten Insertion im dritten Exon von *CG12340* nach Verifizierung des Insertionsortes (Kapitel 3.1.1) nicht der Überexpression dienen, sondern möglicherweise ein mutantes Allel von *CG12340* darstellen, da die Insertion das Leseraster zerstört haben könnte.



**Abbildung 2.2.2.2: Schematische Darstellung des P{EPgy2}-Elementes, welches in dem P-Element-Insertionsverfahren, aus dem die Linie P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> hervorgegangen ist (Bellen et al, 2004), verwendet wurde.** Das P{EPgy2}-Element enthält ein *white*<sup>+</sup>- und ein *yellow*<sup>+</sup>-Gen, sowie ein Verstärker-Element vor einer UAS-Kopie. Durch die Bindung von Gal4 an die UAS-Sequenz erfolgt die Aktivierung des nachgeschalteten Promoters im Muster der Gal4-Expression und damit verbunden die Transkription des nachfolgenden Gens. Die Abbildung wurde Bellen et al., 2004 entnommen.

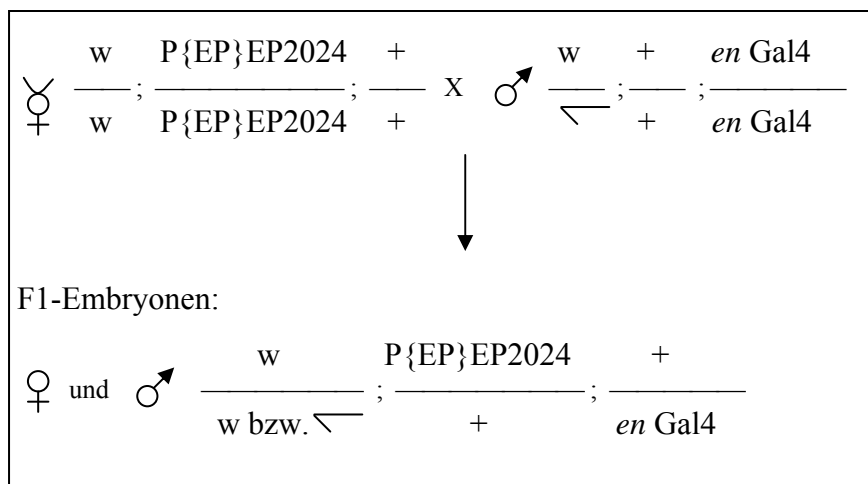
### 2.2.3 Kreuzungen zur Überexpression mittels UAS-Gal4-System

Das aus der Hefe adaptierte UAS-Gal4-System ist ein ideales Mittel, um in *Drosophila* die ektopische Expression von Genen zu vermitteln (Brand und Perrimon, 1993), da die Fruchtfliege weder das Gal4-Protein exprimiert, noch die davon erkannten UAS-Bereiche (UAS= *upstream activating sequence*) besitzt. Dabei aktiviert der „eingeschleuste“ Transkriptionsfaktor Gal4 die Transkription von Genen, die in ihrem 5'-Bereich eine solche UAS-Kopie besitzen im räumlichen und zeitlichen Muster des Gens, unter dessen Promoter das Gal4-Protein exprimiert wurde. Die UAS-Kopie kann zum Beispiel in Form eines P-Elementes, welches im 5'-Bereich des Zielgens insertiert hat, in das Fliegen-genom gelangen. Zusätzlich ist es möglich, eine derartige Sequenz in einem Plasmid vor die codierende Sequenz des Zielgens zu klonieren und das gesamte Konstrukt durch Keimbahntransformation in das Genom zu integrieren.

### 2.2.3.1 Kreuzung zur Überexpression von *CG12340* mittels UAS-Sequenz des P-Elementes EP2024 und *engrailed* Gal4

Die UAS-Gal4 vermittelte Überexpression von *CG12340* erfolgte mit Hilfe des P-Element-Stammes EP2024, wobei der Insertionsort sowie die Orientierung des P-Elementes in Kapitel 3.1.1 verifiziert wurden. Als Gal4-Treiber-Linie diente ein *engrailed*-Gal4-Stamm.

Nach Ansetzen einer Kreuzung von jungfräulichen Weibchen des homozygot lebensfähigen P-Element-Insertions-Stammes mit Männchen des *engrailed*-Gal4-Stammes wurden diese Tiere auf eine Apfelsaftablage mit Hefe überführt. Die erhaltenen Embryonen (Kreuzungsschema 2.2.3.1) wurden dann wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben gefärbt. Die Dokumentation der Überexpression von *CG12340* erfolgte in Kapitel 3.4.1.



**Kreuzungsschema 2.2.3.1: Übersicht über die Kreuzungen zur Überexpression von *CG12340* mit Hilfe des P-Element-Stammes EP2024 und des UAS-Gal4-Systems**

### 2.2.3.2 Kreuzung zur Überexpression von *CG12340*- und *eggless*-Transgenen mittels UAS-Gal4-System

Für die Herstellung transgener Fliegen wurden jeweils mit Hilfe des Gateway-Systems (siehe Abschnitt 2.4.10.2) Konstrukte hergestellt, welche die gesamte cDNA von *CG12340* bzw. *eggless* unter dem Einfluss des UASp-Promoters enthielten, der mit geeigneten Gal4-Treiberlinien aktiviert, in der Lage ist, die nachfolgende DNA in der Keimbahn und in somatischen Zellen zu exprimieren. Zusätzlich trug das *CG12340*-Konstrukt einen N-terminalen *GFP*-Anhang und das *eggless*-Konstrukt einen C-terminalen *RFP*-Anhang.

Die Konstrukte wurden dann vom *VANEDIS Drosophila injection service* (<http://www.embl-heidelberg.de/~voie/>) in Oslo, Norwegen, in Embryonen injiziert, welche homo- bzw.

hemizygot mutant für eine Mutation im *white*-Lokus waren. In einigen erhaltenen, injizierten Larven hatte mit der vom Injektions-Service angegebenen Wahrscheinlichkeit von ca. 20 % eine Integration der Konstrukte in die Zellen der Keimbahn stattgefunden, so dass nach dem Auskreuzen der einzelnen Fliegen gegen Balancer-Stämme und Selektion auf einen Augenmarker transgene Fliegenstämme mit Insertionen der injizierten Konstrukte auf dem ersten, zweiten oder dritten Chromosom erhalten wurden. Anschließend konnte eine Aktivierung der UAS-Konstrukte in den transgenen Fliegen mittels Gal4-Treiber-Stamm erfolgen.

Die anschließenden Kreuzungen zur Überexpression des *CG12340-GFP*-Konstruktes und des *eggless-RFP*-Konstruktes in Fliegen erfolgten mit den transgenen Linien 52 (*CG12340*) und 22 (*eggless*). Es wurden Stämme etabliert, welche in jeweils einer Kopie das *daughterless*-Gal4-Konstrukt und das Transgen tragen.

Durch Kreuzen der beiden Stämme welche entweder ein *GFP-CG12340*-Konstrukt oder ein *eggless-RFP*-Konstrukt in Kombination mit dem *daughterless*-Gal4-Treiber tragen, konnte eine Coüberexpression der beiden Transgene im *daughterless*-Muster erzeugt werden. Dabei können die Nachkommen, welche sowohl das *CG12340*-Transgen wie auch das *eggless*-Transgen besitzen, an den geraden Flügeln erkannt werden.

Bei dieser Kreuzung können auch Nachkommen entstehen, welche homozygot für das *daughterless*-Gal4-Konstrukt sind, jedoch traten solche Tiere nahezu nicht auf.

#### 2.2.4 Kreuzungen zur Erzeugung eines Transdeletions-Allels von *CG12340*

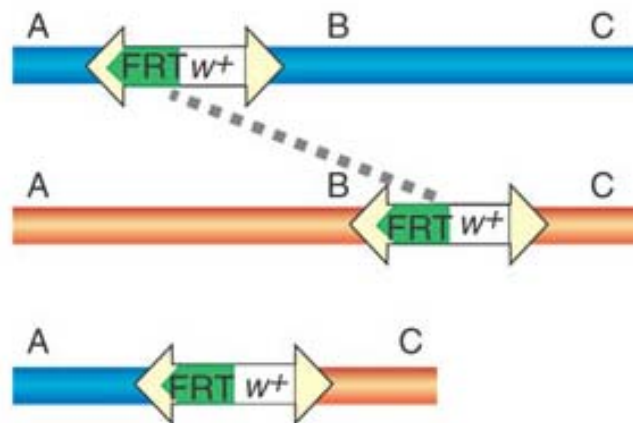
Für die Herstellung eines Transdeletions-Allels von *CG12340* nach Parks et al. wurden die homozygot lebensfähigen P-Element-Insertionslinien P{XP}d03942 und P{XP}d01917 verwendet. Zunächst wurde die genaue Insertions-Position der P-Elemente sowie die Orientierungen bestimmt (Kapitel 3.1.1), um sicherzustellen dass diese für die Durchführung der Transdeletion geeignet waren.



**Schema 2.2.4.1: Schematische Darstellung des XP-Elementes.** Das XP-P-Element trägt bidirektionale UAS-Kopien und zwei FRT-Sequenzen, welche Flipase vermittelt die FRT-flankierte UAS-Kopie deletieren können. Die schematische Darstellung wurde Parks et al., 2004 entnommen.

Die Erzeugung der Transdeletion sollte über Flipase vermittelte Rekombination zwischen zwei FRT-Sequenzen der P-Elemente stattfinden. Diese waren ursprünglich dazu gedacht, eine zwischen zwei FRT-Sequenzen eines XP-Elementes liegende UAS-Kopie zu entfernen (Schema 2.2.4.1).

In diesem Fall aber soll durch die Flipase die Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen zweier Chromosomen eines Homologen-Paares vermittelt werden. (Parks et al., Schema 2.2.4.2).



**Schema 2.2.4.2: Schematische Darstellung der FRT-Flp vermittelten Transdeletion.** Durch die Flipase-Aktivität entsteht ein kurzzeitiges Hybrid-Element, in welchem die Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen zweier Chromosomen stattfindet. Das Ergebnis ist ein rekombinantes Chromosom, in welchem der durch die P-Elemente flankierte Bereich (hier: **B**) deletiert wurde. Die Abbildung wurde Parks et al., 2004 entnommen.

Im Fall von *CG12340* lagen die beiden flankierenden P-Elemente so günstig, dass die gesamte Genkassette deletiert werden konnte. Dazu wurde zunächst die erste P-Element-Insertionslinie P{XP}d03942 mit einem Stamm gekreuzt, welcher eine Flipase unter einem Hitzeschock-Promoter exprimiert. Die männlichen Nachkommen wurden im nächsten Schritt mit den jungfräulichen Weibchen des zweiten P-Element-Insertions-Stammes verpaart. Die Larven, welche aus dieser Kreuzung hervorgingen, wurden nun zur Aktivierung der Flipase und somit zur Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen einem jeweils zweistündigen Hitzeschock bei 37°C an zwei aufeinander folgenden Tagen ausgesetzt. In der folgenden Kreuzung wurden die Weibchen, welche als Larven dem Hitzeschock ausgesetzt waren, mit Männchen eines CyO-Balancer-Stammes gekreuzt.

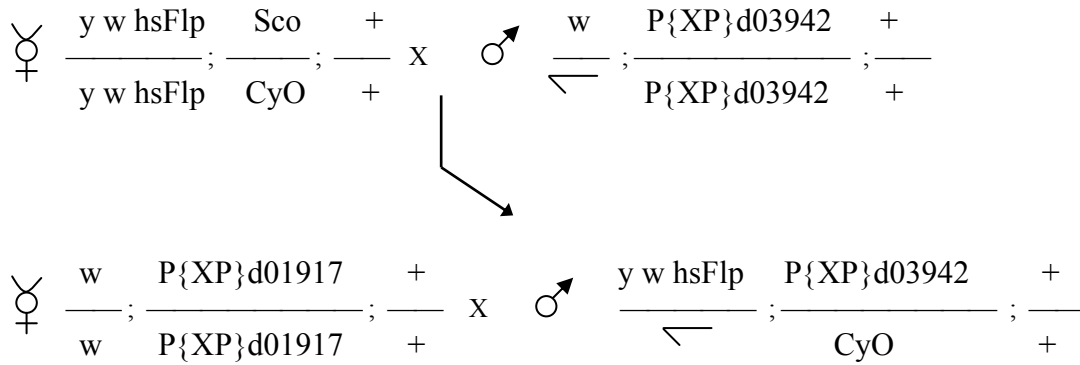
Die männlichen Nachkommen dieser Kreuzung trugen nun entweder eines der beiden ursprünglichen P-Elemente oder aber das neu entstandene rekombinante Chromosom mit der Transdeletion von *CG12340*. Daher wurden diese Männchen nun einzeln mit jungfräulichen

Tieren des CyO-Balancer-Stammes verpaart und daraus Cyo-balancierte Stämme etabliert (Kreuzungsschema 2.2.4.3). Anschließend wurden diese Stämme in der Folgegeneration auf Letalität hin untersucht, da die ursprünglichen P-Elemente homozygot und transheterozygot lebensfähig waren und von den übrigen mutanten Allelen von *CG12340* bereits bekannt war, dass diese homozygot letal sind. Für das Transdeletions-Allel wurde somit ebenso in homozygotem Zustand Letalität erwartet.

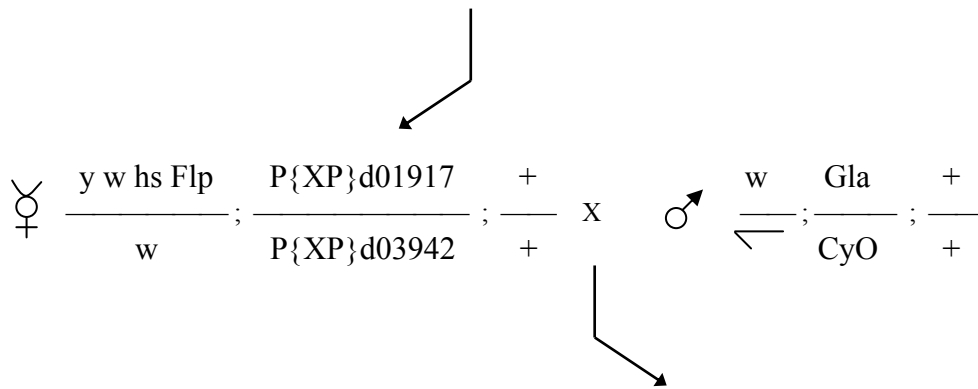
Es wurden 120 Einzelkreuzungen angesetzt. Insgesamt konnten dabei vier Stämme erhalten werden, welche definitiv die Transdeletion tragen (siehe Kapitel 3.2.1), wobei nach Erhalt der ersten sequenzierten Erfolge nicht mehr alle angesetzten Stämme untersucht wurden.

Es sollte hier erwähnt werden, dass natürlich auch die Rekombination zwischen den beiden FRT-Sequenzen eines P-Elementes sicherlich stattgefunden haben wird, aber diese sollte so effektiv sein, dass sie die Effizienz der seltener stattfindenden Rekombination zwischen den homologen Chromosomen nicht weiter beeinträchtigt haben dürfte.

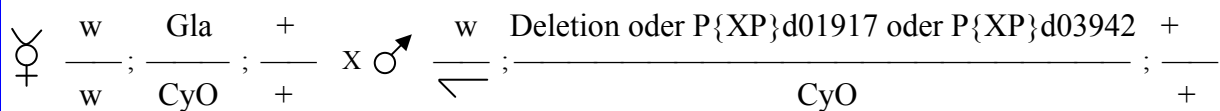




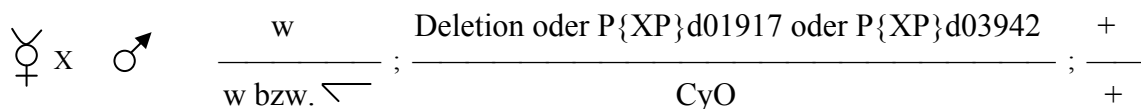
Die Larven dieser Kreuzung wurden zwei Hitzeschocks bei 37°C von je zwei Stunden an zwei aufeinander folgenden Tagen ausgesetzt.



Einzelkreuzungen:



Diese Kreuzung erfolgte in Form von Einzelkreuzungen, so dass jeweils ein Männchen mit fünf Weibchen des Balancer-Stammes gekreuzt wurde. Dabei konnte das zweite Chromosom der einzelnen Männchen entweder eines der ursprünglichen P-Elemente tragen oder aber die erfolgte Transdeletion.



→ In der F1: Suche nach homozygot letalen Stämmen als Hinweis auf erfolgte Deletion.

**Kreuzungsschema 2.2.4.3: Schema der erfolgten Kreuzungen zur Herstellung des Transdeletions-Allels von *CG12340*.**

### 2.2.5 Kreuzungen zur Rettung der Letalität des Transdeletions-Allels mittels UAS-Gal4-System

Die mutanten Allele von *CG12340* einschließlich des Transdeletions-Allels sind wie bereits erwähnt homozygot letal. Es ist zwar möglich, homozygot mutante Adulte zu erhalten, jedoch nur unter ganz bestimmten Bedingungen. So müssen dafür die homozygot mutanten Embryonen oder Larven von den heterozygoten Tieren derselben Generation getrennt werden. Die Tiere, die homozygot den CyO-balancer tragen, sterben am Ende der Embryogenese und müssen daher nicht aussortiert werden. Homozygot mutante Adulte treten allerdings selbst ohne die „stärkeren“ heterozygoten Tiere im Aufzuchttröhrchen extrem selten auf, niemals aber in den heterozygoten Stämmen der *CG12340*-Allele.

In den Rettungsexperimenten sollte daher überprüft werden, ob die üblicherweise auftretende pupale Letalität hier am Beispiel des Transdeletions-Allels durch die Expression eines *CG12340*-Transgens gerettet werden kann, so dass homozygote mutante, adulte Tiere auftreten. Sofern diese Tiere erhalten werden können, zeigt dieser Versuch einerseits, dass die Transdeletion von *CG12340* tatsächlich die Letalität verursacht und andererseits, dass das *CG12340*-Transgen diese Letalität spezifisch retten kann.

Dazu wurden zunächst jungfräuliche Weibchen, welche die Transdeletion (TD63) auf dem 2. Chromosom und eine Kopie des *CG12340*-Transgens auf dem 3. Chromosom jeweils über einem Balancer-Chromosom trugen, mit Männchen gekreuzt. Diese trugen ebenfalls die balancierte Transdeletion und eine Kopie eines *daughterless*-Gal4-Transgens über einem Balancer-Chromosom. In der F1-Generation konnten verschiedene Genotypen erwartet werden, wobei nur derjenige den geretteten Tieren entspricht, welcher phänotypisch keinerlei Balancer-Chromosom aufweist. Das Ergebnis dieses Experimentes inklusive Kreuzungsschema ist dem Ergebnisteil zu entnehmen (Kreuzungsschema 3.3.1.1, Kapitel 3.1.1).

Versuche zur Rettung der Letalität des Transdeletions-Allels durch das *CG12340*-Transgen wurden zusätzlich reziprok angesetzt und auch mit einem MKRS-Chromosom statt des TM6b-Balancers. Später erfolgten analog die Kreuzungen mit einem *tubulin*-Gal4-Treiber-Stamm (Kapitel 3.1.1).

### 2.2.6 Erzeugung von Keimbahnklonen mittels FRT-Flp-System

Das FRT-Flp-System wurde ebenfalls aus der Hefe adaptiert (Golic und Lindquist, 1989) und dient dazu, den Austausch von Chromosomenbereichen durch mitotische Rekombination auszulösen. Dabei findet der Austausch an definierten Stellen, den FRT-Sequenzen (FRT=

Flipase Recombination Target) statt, welche durch P-Element-Insertionen in räumliche Nähe zu den Zentromeren der verschiedenen Chromosomen gelangt sind. Die Rekombination zwischen den an gleicher Stelle befindlichen FRT-Sequenzen zweier homologer Chromosomen wird durch die an anderer Stelle im Genom kodierte Flipase-Rekombinase (Flp) aktiviert, wobei deren Expression zum Beispiel zeitlich steuerbar ist, wenn diese unter der Kontrolle eines Hitzeschock-Promoters exprimiert wird. Durch Temperatur-Erhöhung kann dann die Rekombination zu jedem gewünschten Zeitpunkt in allen Geweben katalysiert werden.

Liegt ein mutantes Allel eines zu untersuchenden Gens distal der FRT-Sequenzen, so können durch mitotische Rekombination Zellen erzeugt werden, welche homozygot für dieses Allel in einem ansonsten heterozygoten Umfeld sind.

Im vorliegenden Fall wurde dadurch in Fliegen, die heterozygot für ein mutantes Allel von *CG12340* und für das GFP-Protein (Green Fluorescent Protein, siehe Abschnitt 2.3.6) waren, Zellen erzeugt, die homozygot für das Allel oder das GFP wurden.

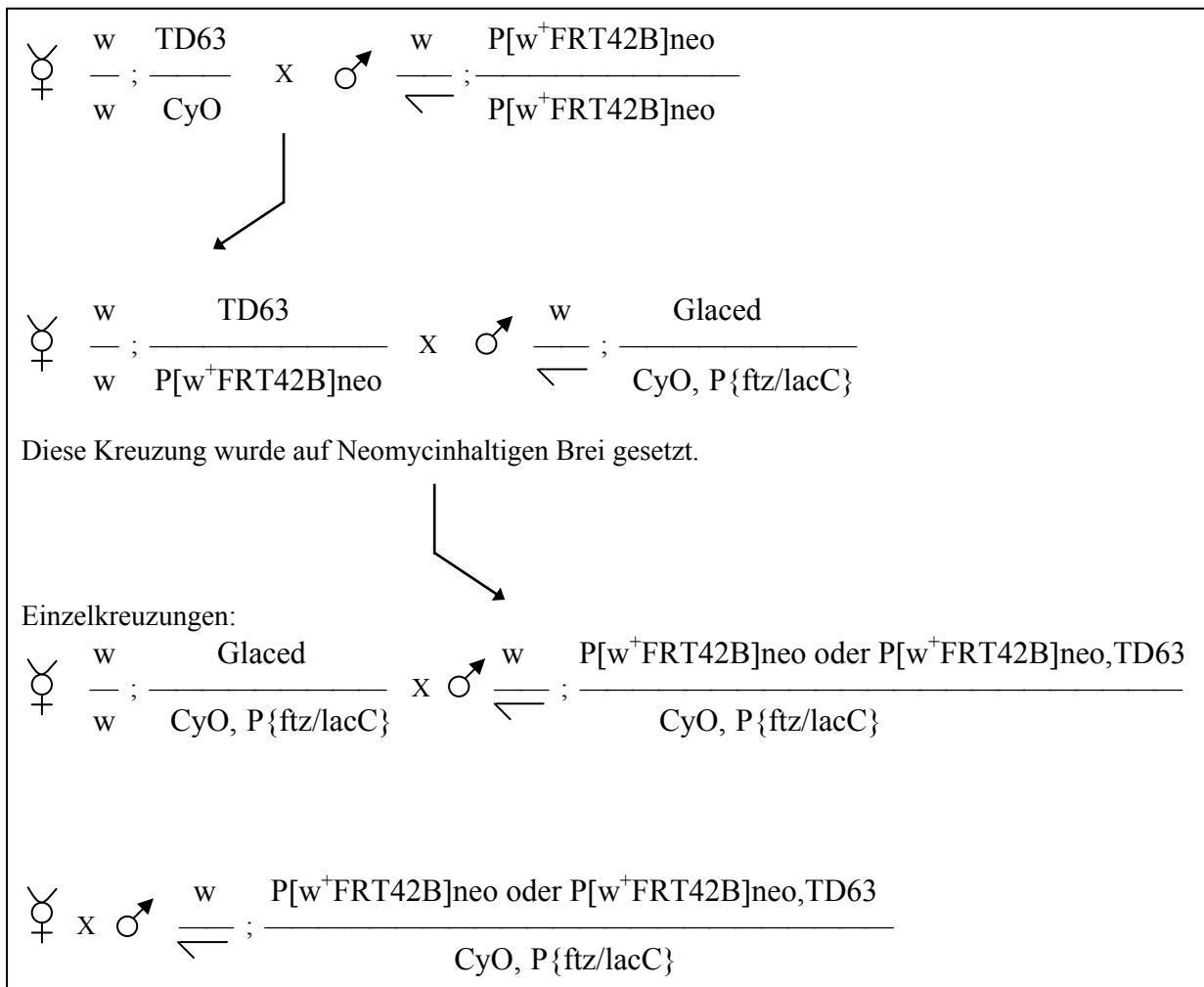
#### 2.2.6.1 Herstellung von FRT-Rekombinanten der *CG12340* mutanten Allele

Zur Erzeugung homozygot mutanter Keimbahnklone in einer ansonsten heterozygoten Umgebung mittels FRT-Flp-System müssen die verwendeten *CG12340*-Allele zunächst mit einem FRT-Chromosom rekombiniert werden, so dass die jeweilige Mutation distal der centromernahen FRT-Sequenz liegt. Dafür wird die in *Drosophila* Weibchen in der Keimbahn auftretende meiotische Rekombination genutzt, wobei abhängig vom Abstand zweier Orte auf einem Chromosom mit proportionaler Häufigkeit eine Rekombination zwischen homologen Bereichen in der Meiose auftritt.

Die folgenden Kreuzungen zur Herstellung von FRT-Rekombinanten werden am Beispiel der Transdeletion erklärt, haben aber auf die gleiche Weise auch für die *CG12340* Allele mit den P-Element-Insertionen P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> und P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> stattgefunden.

Zunächst wurden heterozygote, die Transdeletion tragende Jungfrauen mit Männchen gekreuzt, welche homozygot für ein FRT-Chromosom waren. Die transheterozygoten Weibchen der nächsten Generation wurden zusammen mit Männchen eines CyO-Balancer-Stammes auf Futterbrei-Röhrchen gesetzt, welcher 200 µL Neomycin (Stammlösung: 25 mg/mL) pro 10 mL Fliegenbrei enthielt. Dabei handelt es sich um ein Antibiotikum, welches eine letale Wirkung auf die Larven hat, so dass auf dem Brei ausschließlich diejenigen Larven überleben, die das P[w<sup>+</sup>FRT42B]neo besitzen, das auf einem weiteren P-Element in 40A ein Neomycin-Resistenzgen trägt.

In einem Teil der weiblichen Keimzellen hat unterdessen Rekombination stattgefunden, so dass die daraus entstehenden Nachkommen neben der FRT-Sequenz auch die Transdeletion auf dem gleichen Chromosom tragen. Die männlichen Nachkommen mit CyO-Balancer wurden dann einzeln mit je 5 Jungfrauen des CyO-Balancer-Stammes gepaart (Kreuzungsschema 2.2.6.1). In der Folgegeneration wurden die rotäugigen Tiere mit CyO-Balancer untereinander gekreuzt, um Stämme zu etablieren, wobei deren Nachkommenschaft auf Letalität untersucht wurde. Da in den Einzelkreuzungen noch nicht ersichtlich ist, ob die Männchen ein rekombinantes Chromosom tragen oder nicht, das FRT-Chromosom ohne die Transdeletion aber homozygot lebensfähig ist, deutet die Letalität in den etablierten Stämmen auf die erfolgte Rekombination hin.



**Kreuzungsschema 2.2.6.1: Kreuzungen zur Herstellung von FRT-Rekombinanten des Transdeletions-Allels**

Es wurden pro Allel etwa 40-50 Einzelkreuzungen angesetzt, da bei der Entfernung der FRT42B-Sequenz zu CG12340 in 47C1 die Rekombinationshäufigkeit bei ca. 12,5% liegt.

Wie bereits erwähnt, wurden diese Kreuzungen analog auch für die Linie P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup>/CyO durchgeführt, wobei hier das erste Chromosom nicht nur eine Mutation im white- sondern auch im yellow-Lokus besitzt. Dadurch konnten einige Männchen mit gelber Körperfarbe, die auf dem Antibiotika-Brei gewachsen waren und demnach die FRT-Sequenz trugen, vorzeitig als nicht rekombinant ausgeschlossen werden. Denn das Vorhandensein der gelben Körperfarbe schließt aus, dass das entsprechende Tier das P-Element mit der *intronless-yellow*-Sequenz trug. Es war daher zu erwarten, dass ein höherer Prozentsatz an rekombinanten Stämmen für diese P-Element-Linie erhalten wird.

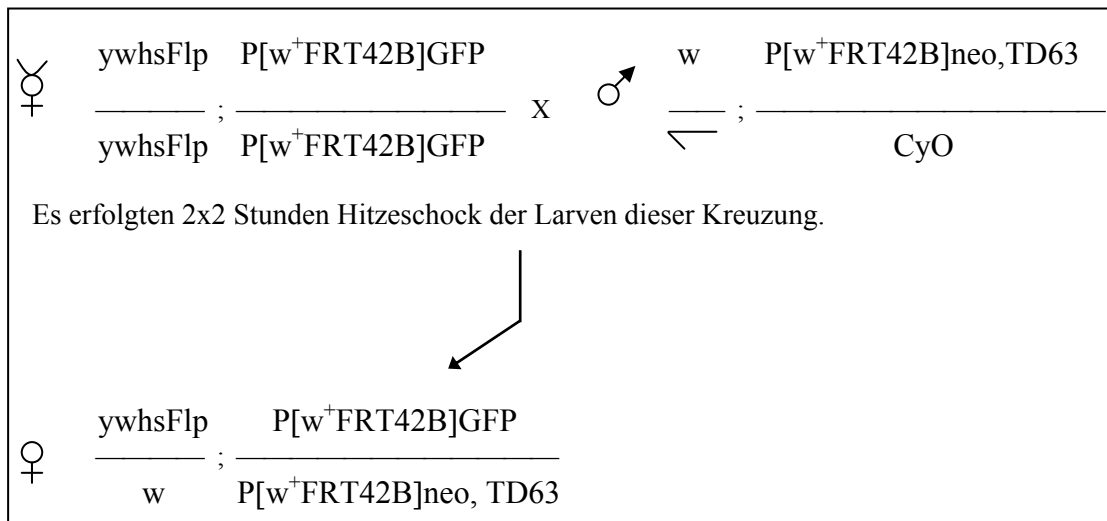
Außerdem sollte erwähnt werden, dass auf die gleiche Weise wie für die Transdeletion beschrieben auch die FRT-Rekombinanten mit der *CG12340-eggless* Doppelmutation hergestellt worden sind. Hierzu wurden die FRT-Rekombinanten mit dem Allel P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> verwendet und mit Fliegen des *eggless*-Allels 1473 gekreuzt. Nachdem diese Kreuzung auf neomycinhaltigem Brei gehalten wurde, konnten die Nachkommen, welche das FRT-Chromosom besessen haben mussten, nach dem Durchlaufen der in Kreuzungsschema 2.2.6.1 beschriebenen Einzelkreuzungen und Stammetablierung zunächst auf Letalität untersucht werden. In einem weiteren Schritt erfolgten Tests auf das Vorhandensein der Allele von *CG12340* und *eggless* (siehe Anhang).

#### 2.2.6.2 Herstellung von Keimbahnklonen

Die in Abschnitt 2.2.6.1 beschriebenen und getesteten FRT-Rekombinanten (siehe Anhang) der verschiedenen mutanten Allele von *CG12340* und *eggless*, sowie der Doppelmutante wurden dann zur Herstellung von Keimbahnklonen verwendet.

Zunächst erfolgte durch die Kreuzung von Fliegen der Linien *ywhsFlp*; *Sco*/CyO und P[w<sup>+</sup>FRT42B]GFP die Etablierung eines Fliegenstammes, welcher homozygot bzw. hemizygot für die Hitzeschock aktivierbare Flipase war und homozygot für das FRT-Chromosom mit den distalen GFP-Sequenzen unter einem *ubiquitin*-Promoter. Nach der Verpaarung von jungfräulichen Weibchen dieses neuen Stammes mit Männchen der FRT-Rekombinanten mit den mutanten *CG12340*-Allelen, wurden die aus dieser Kreuzung hervorgehenden Larven an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils einem zweistündigen Hitzeschock ausgesetzt, um in der weiblichen Keimbahn die Flipase-vermittelte Rekombination auszulösen. In den transheterozygoten Weibchen, welche als Larven den

Hitzeschock erlebt hatten, sollte die mitotische Rekombination einzelne homozygot mutante Keimbahn-Stammzellen und somit im Verlauf auch Eikammern erzeugt haben. Daher wurden die Ovarien dieser Weibchen, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, präpariert und gefärbt. Kreuzungsschema 2.2.6.2 gibt die zur Herstellung von Keimbahnklonen durchgeführten Kreuzungen am Beispiel der FRT-Rekombinanten mit dem Transdeletions-Allel wider.



**Kreuzungsschema 2.2.6.2: Kreuzungen zur Erzeugung von Keimbahnklonen mittels FRT-Transdeletions-Rekombinanten**

Die entstandenen Klone lassen sich in den Ovarien über das Fehlen des GFP detektieren.

## 2.3 Histologische Methoden

### 2.3.1 Antikörperfärbungen an Embryonen

Zunächst wurden die Kreuzungen oder Fliegenstämme, deren Embryonen gefärbt werden sollten, in Ablagegefäße mit Apfelsaftplatten und Hefe gesetzt und auf Raumtemperatur gehalten. Die Embryonen von ü/N-Ablagen wurden mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit NaOCl in ca. 3-5 Minuten vom Chorion befreit. Zur Entfernung des NaOCl erfolgte eine Waschung mit dH<sub>2</sub>O über eine Wasserstrahlpumpe. Die Fixierung der Embryonen wurde dann in einem Szintillationsröhrchen durchgeführt, wobei das Fixativ für etwa 20 Minuten auf den Embryonen belassen wurde. Das Fixativ setzt sich aus einem 1:1-Gemisch aus 4% Formaldehyd in 1xPBS und Heptan zusammen. Das enthaltene Formaldehyd bewirkt dabei

eine Vernetzung des Gewebes durch Bindung an die Aminogruppen und eine Hemmung der Proteasen, während das Heptan die Embryonen porös macht.

Am Ende der Fixierzeit wurde die untere, wässrige Phase abgesaugt, während sich die Embryonen in der Zone zwischen der Heptan- und der Formaldehyd-Phase befanden. Nach der Zugabe von 2 Volumen Methanol wurden die Embryonen etwa 30 Minuten kräftig geschüttelt, um über Scherkräfte zwischen der Heptan- und der Methanolphase die Vitellinmembranen zu entfernen. Sofern die Devitellinisierung erfolgreich war, sinken die Embryonen auf den Gefäßboden ab, wobei nun die obere, heptanhaltige Phase abgezogen wurde. Die Embryonen konnten dann aus der Methanolphase heraus mit Hilfe einer Pasteurpipette in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt und zwei weitere Male mit Methanol gewaschen werden. Nach diesem Schritt konnten die Embryonen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder einer Färbung unterzogen werden.

Vor der Antikörperfärbung mussten die Embryonen zunächst  $3 \times 20$  Minuten mit PBT auf einem Taumler bei Raumtemperatur rehydriert werden. Im sich anschließenden Blockierschritt wurden mittels 5% NHS (Normal Horse Serum) in PBT unspezifische Bindungsstellen an den Proteinen abgesättigt.

Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte dann über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ , wobei die verwendeten Erst-Antikörper in PBT mit 5% NHS verdünnt wurden. Am darauf folgenden Tag erfolgten drei 20 minütige Waschschriffe der Embryonen mit PBT auf einem Taumler bei Raumtemperatur. Die Zugabe der zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper fand zwei Stunden bei Raumtemperatur ebenfalls in einem PBT/NHS-Gemisch statt. Der erste nun folgende Waschschriff mit PBT enthielt zusätzlich den DNA-Farbstoff DAPI (siehe Abschnitt 2.3.5). Nach zwei weiteren Waschschriffen á 20 Minuten wurden die Embryonen auf Objektträgern in Mowiol/Dabco (1,4-DIAZABICYCLO(2.2.2)OCTANE) eingedeckelt. Das Dabco diente dabei als „Ausbleichschutz“ für die Fluoreszenzmarkierung.

Mowiol: 5 g Elvanol (Mowiol Höchst) wurden in 20 ml PBS pH 7,4 gelöst. 10 ml Glycerin wurden hinzugegeben und für 16 h gerührt. Es wurde für 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand verwendet. Zur Anwendung wurde eine Spatelspitze DABCO gegen das Ausbleichen hinzugegeben und für 30 min auf den Taumler gestellt.

### 2.3.2 Antikörperfärbungen an Ovarien

Für Antikörperfärbungen an Ovarien wurden die Ovarien von befruchteten Weibchen verwendet, welche ca. 3-4 Tage auf Futterbrei mit zusätzlicher Hefe zur Stimulierung der Eiproduktion verbracht hatten. Die Präparation erfolgte in 1xPBS im Blockschälchen. Vor der Fixierung wurden die Ovarien zunächst und mittels einer mit NHS abgesättigten Pipette durch

Hoch- und Herunterziehen in die Ovariolen vereinzelt und in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt. Nach Abziehen des PBS schloss sich ein Fixierungsschritt von etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur an, wobei das Fixativ aus 4% Formaldehyd in PBS bestand. Zur Entfernung des überschüssigen Fixativs folgten drei 10 minütige Waschschrte in PBT und anschließend die Inkubation mit Blockierlösung. Diese bestand aus 5% NHS in PBS mit 0,5% Triton X-100 und erfolgte entweder drei Stunden bei Raumtemperatur oder ü/N auf 4°C jeweils auf einem Taumler. Diese Inkubation diente einerseits der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen an den Proteinen und andererseits dazu die Ovarien mit Hilfe des Detergents durchlässiger für die folgenden Antikörperlösungen zu machen. An die Blockierung schloss sich die Inkubation mit den Primärantikörpern, verdünnt in PBT mit 5% NHS, über Nacht bei 4°C an. Nach drei Waschungen der Ovarien à 20 Minuten mit PBT erfolgte die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern in 5% NHS in PBT bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Der erste nun folgende Waschschrte mit PBT enthielt zusätzlich den DNA-Farbstoff DAPI (siehe Abschnitt 2.3.5). Nach zwei weiteren Waschschritten á 20 Minuten wurden die Ovarien auf Objektträgern in Mowiol/Dabco (1,4-DIAZABICYCLO(2.2.2)OCTANE) eingedeckelt.

### 2.3.3. Antikörperfärbungen an Polytäanchromosomen

Die Behandlung der Polytäanchromosomen erfolgte mit leichten Abwandlungen nach dem Protokoll: Preparation and immunostaining of polytene chromosome squashes (PROT01) (<http://www.epigenome-noe.net/researchtools/protocol.php?protid=1>). Zunächst wurden in Blockschälchen die Speicheldrüsen von gut gefütterten L3-Larven in PBS mit 0,1% Triton X-100 herauspräpariert. Daraufhin wurden die Speicheldrüsen für 30 bis maximal 60 Sekunden in ein weiteres Blockschälchen überführt, welches eine erste Fixierlösung enthielt. Diese bestand aus 3,7 % Formaldehyd in PBS mit 1% Triton X-100. Für einzelne Antikörper erwies sich eine Fixierung mit der gleichen Menge Paraformaldehyd als sinnvoll. Es folgte eine zügige Überführung der Speicheldrüsen in einen Tropfen der zweiten Fixierlösung, welcher sich auf einem Deckglas befand. diese Fixierlösung setzte sich aus 3,7% Formaldehyd in Wasser, sowie 50% Essigsäure zusammen. Die Fixierdauer betrug 2 Minuten. Es war dabei wichtig, die Zeiten so exakt wie möglich einzuhalten. Eine zu lange Dauer würde zwar die Fixierung durch Formaldehyd verstärken, jedoch verhindert dies gleichzeitig die vom Eisessig vermittelte Ausbreitung der Chromosomenarme. Auch hier konnte je nach Antikörper Paraformaldehyd eingesetzt werden. Das Deckgläschen wurde gegen Ende der Fixierzeit mit einem Objektträger aufgenommen und umgedreht. Nun folgte das Quetschen der



Speicheldrüsen durch wiederholtes, kreisförmiges Drücken auf das Deckglas mit dem Daumen. Es wurde dabei versucht, einen gleichmäßigen Druck auf das Präparat auszuüben, so dass zwar die Polytänochomosen freigelegt, nicht aber völlig zerschert werden. Anschließend wurden die Objektträger für etwa 15 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht, um ein paar Sekunden später das Deckgläschen mit einer Rasierklinge zu entfernen, wobei die Chromosomen-Präparation auf dem Objektträger verblieb. Die verwendeten Objektträger sind speziell für die Verarbeitung formaldehydfixierter, in flüssigen Stickstoff getauchter Präparationen geeignet. Es wurde nun mit einem Fettstift (Liquid Blocker, *SCI Science Services*, München) eine Markierung um die Präparation auf dem Objektträger gesetzt, welche zum Einen dazu diente, die Position der Chromosomen zu markieren und zum Anderen gewährleisten sollte, dass die später eingesetzten Antikörper-Lösungen nicht herauslaufen.

Die Objektträger wurden anschließend zunächst in ein Bad aus 80% Ethanol getaucht, danach in 40% Ethanol und schließlich in PBS, wobei jeder Schritt 10 Minuten dauerte. Es folgte das Einstellen der Objektträger für eine Stunde bei Raumtemperatur in ein Bad mit Blockierlösung, welche aus 0,5% Triton X-100 in PBS, versetzt mit 2% BSA (Bovines Serum Albumin), bestand. Die Verdünnung der Primärantikörper erfolgte in KCM mit 2% BSA (KCM: 120 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 in dH<sub>2</sub>O). Die Inkubation der Objektträger mit der Antikörperlösung wurde in einer feuchten Kammer vorgenommen. Dies geschah bei 4°C über Nacht. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Lösung in die zuvor markierten Bereiche der Objektträger pipettiert wurde. Am folgenden Tag wurden die Objektträger 15 Minuten in KCM gewaschen und anschließend erneut in der feuchten Kammer mit der Verdünnung der Sekundärantikörper in KCM versehen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 4°C. Dabei enthielt hier die Lösung mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern bereits den DNA-Farbstoff DAPI (siehe Abschnitt 2.3.5). Im Anschluss an die Inkubation folgte ein 15 minütiger Waschschrift in KCM, sowie das Eindeckeln der Chromosomen-Quetschpräparate auf den Objektträgern mit Mowiol/DABCO.

## 2.3.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.3.4.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Primärantikörper und Tabelle 2.3.4.2 über die Sekundärantikörper unter Angabe der Quelle und der eingesetzten Verdünnung.

Zielprotein/ Epitop	Organismus	Bezeichnung	Verdünnung			Referenz
			Embryonen /Ovarien	Polytän- chromo- somen	Western Blot	
CG12340 N- Terminus	Kaninchen	EY 033845	1:5000	1:500	1:1000 -1:2000	eigene Herstellung
POF	Kaninchen	285N7.0	1:500 -1:1200	1:400	1:3000 -1:4000	Jan Larsson, Umeå University, Schweden
H3K9me2	Kaninchen	07-441	1:500 -1:1000	n.d.	n.d.	Upstate/ Millipore
H3K9me3	Kaninchen	07-442	1:500 -1:1000	n.d.	n.d.	Upstate/ Millipore
activated Drice	Kaninchen	activated Drice	1:2500 teils prä- adsorbiert	n.d.	n.d.	Arno Müller, University of Dundee, Schottland
Aktin	Kaninchen	A2066	n.d.	n.d.	1:1000	Sigma- Aldrich
GFP	Kaninchen	ab6556	1:1000	1:500	n.d.	Abcam
GFP	Maus	A11120	1:1000	1:500	n.d.	Molecular Probes
GFP	Maus	Kat. Nr.: 11814460001	1:1000	1:500	1:1000	Roche
HA	Maus	12C25	1:1000	n.d.	1:1000	Roche
β-Galakto- sidase	Maus	JIE7	1:50	n.d.	n.d.	DSHB
Futsch	Maus	22C10	1:25-1:50	n.d.	n.d.	DSHB
HP1	Maus	C1A9	1:25-1:30	1:25-1:30	n.d.	DSHB
Lamin	Maus	ADL67.10	1:25-1:50	n.d.	n.d.	DSHB
Orb	Maus	4H8	1:25-1:50	n.d.	n.d.	DSHB
SUMO	Kaninchen	SUMO	1:500	n.d.	1:5000	Albert Courey, UCLA, USA

**Tabelle 2.3.4.1: Auflistung der verwendeten Primärantikörper unter Angabe der eingesetzten Verdünnung und der Bezugsquelle.** Die Abkürzung n.d. steht für nicht durchgeführt.

Bezeichnung	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
Esel- $\alpha$ -Kaninchen	Cy3	1:200	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Alexa 647	1:200	Dianova
Esel- $\alpha$ -Maus	Cy2, Cy3	1:200	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Maus	Alexa 647	1:200	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Kaninchen	Meerrettichperoxidase {HRP ( <i>horse redish peroxidase</i> ) }	1:200	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Maus	Meerrettichperoxidase {HRP ( <i>horse redish peroxidase</i> ) }	1:200	Dianova

**Tabelle 2.3.4.2: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper unter Angabe der eingesetzten Verdünnung und der Bezugsquelle**

### 2.3.5 DNA-Fluoreszenzmarkierung mit DAPI

4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) ist ein blauer Fluoreszenz-Farbstoff, welcher bevorzugt doppelsträngige DNA färbt, dabei liegt das Emissionsmaximum bei etwa 460 nm. DAPI ist zwar auch in der Lage RNA zu binden, jedoch nur mit 1/5 der Quantenausbeute. Zudem liegt das Emissionsmaximum hier bei etwa 500 nm.

DAPI wurde in der Regel im ersten Waschschrift nach dem zweiten Antikörper zu den Präparaten gegeben oder, wie im Falle der Polytäanchrosomen, zusammen mit dem zweiten Antikörper, da hier nur ein Waschschrift folgte. Dabei wurde der DNA-Farbstoff jeweils 1:2000 verdünnt, die Stammlösung war 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, Katalog-Nr.: 9542) angesetzt.

### 2.3.6 GFP-Färbung

Das Grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein ca. 27 kDa großes Protein, welches aus der Qualle *Aequorea Victoria* gewonnen wurde und nach Anregung durch UV-Licht grünes Licht emittiert. Dabei zeigt es ein Emissionsmaximum bei etwa 509 nm.

Das für die Herstellung der Keimbahnklone verwendete FRT-Chromosom mit der *ubi-GFP*-Sequenz trug zusätzlich eine nls-Sequenz (nls= nuclear localization signal) und wurde zusammen mit dem GFP unter dem *ubiquitin*-Promotor exprimiert. Ubiquitin ist ein kleines Protein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt und im Zuge posttranslationaler Modifikationen durch kovalente Bindung an Zielproteine angehängt wird. Durch die nls-Sequenz kann hier das GFP zusätzlich zur sonstigen Expression innerhalb der Zellen auch in die Kerne transportiert werden und färbt diese somit an.

Das in den UAS-*CG12340*-Transgenen verwendete GFP wurde dagegen jeweils im Muster des verwendeten Gal4-Treibers als GFP-*CG12340*-Fusionsprotein exprimiert. Auf diese Weise konnte über die Fluoreszenz des GFP die Lokalisierung des Fusionsproteins überprüft werden. Dabei ist zwar auch hier das GFP selbst nicht toxisch, jedoch kann durch die Fusion mit einem anderen Protein, in diesem Fall *CG12340*, theoretisch die Faltung des Proteins und damit seine Lokalisierung oder Funktion derart verändert werden, dass Defekte auftreten. Zusätzlich zur Eigenfluoreszenz des GFP kann dieses außerdem mit Hilfe von GFP-Antikörpern sichtbar gemacht werden, zum Beispiel wenn das GFP-Signal sehr schwach ist.

### 2.3.7. RFP-Färbung

Für die Fluoreszenz-Markierung des durch das UAS-*eggless*-Konstrukt codierten Proteins wurde RFP (red fluorescent protein) verwendet. Dieses stellt eine monomere Form des tetrameren Ds-Red dar. Monomeres RFP zeigt zwar eine geringere Photostabilität und Quantenausbeute als DsRed, faltet sich aber mehr als 10-fach schneller, so dass die Helligkeit in lebenden Zellen der von DsRed nicht nachsteht (Campbell et al, 2002). Das mRFP Extinktionsmaximum von 584 nm und das Emissionsmaximum von 607 nm sind zudem um jeweils etwa 25 nm weiter in den roten Bereich verschoben gegenüber DsRed und somit leichter von Autofluoreszenzen zu unterscheiden (Campbell et al, 2002). Eine zusätzliche Detektion des RFP-Fusionsproteins mittels Antikörperfärbung war allerdings nicht möglich, da kein RFP-Antikörper zur Verfügung stand, welcher das RFP spezifisch erkannte. Ähnlich wie das etwa 27 kDa große GFP scheint auch das ebensgroße RFP für lebende Zellen nicht toxisch zu sein, wobei analog zu GFP die Fusion von RFP an andere Proteine deren Faltung und Funktion beeinträchtigen könnte.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung von genomischer DNA konnte entweder aus einem Pool von 30 Fliegen eines Stammes oder aber aus einzelnen Fliegen bzw. ein paar Larven oder Embryonen erfolgen. Dabei besitzt die erhaltene DNA je nach Verfahren unterschiedliche Reinheit und DNA-Gehalt. Dementsprechend sind in Abschnitt 2.4.5 verschiedene PCR-Protokolle für die jeweils verwendete DNA angegeben.

#### 2.4.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus 30 Fliegen

Für die Gewinnung von genomischer DNA aus 30 Fliegen wurde das Qiagen DNeasy Tissue Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution der DNA erfolgte entgegen der Herstellerangaben in 100 µL dH<sub>2</sub>O. Die eluierte DNA kann vor der Weiterverarbeitung einer Nukleinsäuremessung (Abschnitt 2.4.7), sowie einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen werden (Abschnitt 2.4.4). Die auf diese Weise hergestellte DNA ist bei 4°C oder -20°C lagerbar.

#### 2.4.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus einer Fliege

Zur Isolierung der genomischen DNA aus einer Fliege wird zunächst auch diese in einem 1,5 mL Eppendorf-Gefäß in flüssigen Stickstoff getaucht und danach mit der Hälfte einer Mischung aus 50 µL SB-Puffer und 0,5 µL Proteinase K ( 200µg/ml ) versehen. Es folgte die Zerkleinerung der gefrorenen Fliege mit Hilfe einer Pipettenspitze. Nach Zugabe der restlichen Mischung und erneutem zerkleinern konnte die Probe für 20 Minuten bei 37°C inkubiert werden. Zur Hitzeinaktivierung der Proteinase schloss sich eine dreiminütige Inkubation bei 95°C an. Das Eppendorf-Gefäß wurde auf Eis gestellt und konnte für die Weiterverarbeitung genutzt werden. Optional konnte nach kurzer Zentrifugation der Überstand in ein neues Gefäß überführt werden, um eine Separation von den übrigen Geweberesten der Fliege vorzunehmen. Die DNA ist auf -20°C lagerbar.

#### 2.4.1.3 Isolierung von DNA aus Larven und Embryonen mittels Chelex

In einigen Fällen sollten PCR-Experimente auf der DNA von Embryonen oder Larven durchgeführt werden, welche zuvor über einen *CyO*, *twi::GFP*-Balancer auf das Vorhandensein bzw. Fehlen des GFP hin sortiert worden waren. In der Regel entsprachen dabei die Tiere ohne GFP den homozygot mutanten. Es wurden entweder etwa fünf L2-L3 Larven oder 10 Embryonen der jeweiligen Fraktion in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und in flüssigen Stickstoff getaucht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µL Chelex-Lösung (5% Chelex in dH<sub>2</sub>O) und das Zerkleinern der Larven/ Embryonen mit dem Biovortex. Die Eppendorf-Gefäße mit den Proben wurden dann für 10 Minuten in kochendes Wasser gestellt und anschließend 10 Minuten bei 4°C und 13000 RPM zentrifugiert, um eine Separation der DNA-Lösung von den Geweberesten zu erreichen. Die Lagerung sollte bei -20°C erfolgen.

#### 2.4.2 Isolierung von polyA<sup>+</sup>-mRNA

Die Herstellung von polyA<sup>+</sup>-mRNA erfolgte mit dem  $\mu$ MACS mRNA Isolation Kit der Firma *Miltenyi*, Bergisch Gladbach, wobei zunächst eine Menge von etwa 50-100  $\mu$ L Wildtyp-Embryonen dechorionisiert wurden, wie es in Abschnitt 2.3.1: Antikörperfärbungen an Embryonen, beschrieben ist. Jedoch wurden die Embryonen nach der Waschung mit dH<sub>2</sub>O nicht in Fixierlösung gegeben, sondern mit einem Pinsel in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Dort erfolgte die Überschichtung mit 1 mL Lysispuffer und die sich anschließende Prozedur wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Sofern nur die Herstellung von polyA<sup>+</sup>-mRNA gewünscht wurde, konnte an dieser Stelle deren Elution mit 120  $\mu$ L eines auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffers erfolgen. Dabei sollten nur der 2. bis 5. Tropfen aufgefangen werden. Die RNA kann auf ihren Nukleinsäuregehalt hin gemessen und auf -20°C gelagert werden.

Im vorliegenden Fall erfolgte allerdings keine Elution, da die erhaltene mRNA der Herstellung von Gesamt-cDNA dienen sollte (siehe Abschnitt 2.4.3).

#### 2.4.3 Herstellung von cDNA aus polyA<sup>+</sup>-mRNA

Sofern aus der wie in Abschnitt 2.4.2 gewonnenen polyA<sup>+</sup>-mRNA die gesamte cDNA der Embryonen hergestellt werden sollte, konnte die mRNA auf der Magnetsäule verbleiben. Die Herstellung der cDNA erfolgte mit dem  $\mu$ MACS One-step cDNA Kit der Firma *Miltenyi*, Bergisch Gladbach welches auf das für die mRNA-Herstellung verwendete Kit abgestimmt ist. Das Verbleiben der RNA auf der Säule minimiert dabei die Gefahr der Zersetzung der RNA, zum Beispiel durch RNAsen. Die Herstellung der cDNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Das Eluat wurde in einem 1,5 mL Eppendorf-Gefäß aufgefangen und konnte weiterverarbeitet werden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### 2.4.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten, welche im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe separiert werden. Da Nukleinsäuren durch die zahlreichen Phosphatgruppen negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode, dem Pluspol, wobei die Wanderung von verschiedenen Parametern abhängig ist, zum Beispiel von der Molekülmasse, der Molekülladung sowie der elektrischen Feldstärke, der Ionenkonzentration des Laufpuffers und der Porengröße der Gelmatrix. Unter optimalen Bedingungen ist die Geschwindigkeit linearer, doppelsträngiger DNA umgekehrt proportional

zum Logarithmus ihrer Molekülmasse. Die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden entweder durch Restriktionsverdau mit Endonukleasen (Abschnitt 2.4.11.1) oder durch Polymerase-Ketten-Reaktion (Abschnitt 2.4.5) erhalten. Als Gelmatrix diente das Polysaccharid Agarose, wobei die Agarosekonzentration in Abhängigkeit von der erwarteten Größe der aufzutrennenden Moleküle variiert werden konnte. In Bereichen von 200 bis 10000 Basenpaaren wurde in der Regel eine 1%ige Agaroselösung in 1xTAE-Puffer angesetzt. Dieser Lösung wurde nach dem Aufkochen 0,5µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, welches der Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht diente. Dies ist möglich, weil das Ethidiumbromid in die DNA interkaliert. Vor dem Auftragen in die Geltaschen der ausgehärteten Gele wurde die DNA mit einem Laufpuffer (6x loading dye, Fermentas) versehen, welcher zum Einen durch das enthaltene Glycerin die Proben beschwert und zum Anderen die Lauffront der Proben im Gel sichtbar macht. Die ungefähre Größe der DNA-Fragmente ließ sich durch Vergleich mit dem ebenfalls aufgetragenen 1kB Längenstandard (SM0311 Fermentas) ablesen.

Die Auftrennung erfolgte bei 110 Volt für etwa 20-35 Minuten, je nach erwarteten Fragmentgrößen. Danach wurden die Gele einer UV-Quelle ausgesetzt, um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wobei diese photographisch dokumentiert werden konnten. Sofern einzelne Fragmente aus den Gelen für die Weiterverarbeitung zur Sequenzierung oder Klonierung bestimmt waren, wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und wie in Abschnitt 2.4.6 beschrieben, aufgereinigt.

#### 2.4.5 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basiert auf der selektiven, enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, welche gegenläufig an zwei komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Dabei binden die Primer an ihre komplementären DNA-Sequenzen bei einer Temperatur von 50-70°C (*Annealing*), wobei diese Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur der Primer ist. Zudem muss die DNA zuvor einem Denaturierungsschritt bei 95°C ausgesetzt werden, damit die Primer an die DNA-Einzelstränge binden können. Um zu gewährleisten, dass die DNA vorzugsweise mit den Primern hybridisiert statt zu renaturieren, werden die Primer in erheblichem Überschuss zugesetzt. Zusätzlich wird eine thermostabile DNA-Polymerase zugefügt, welche in Anwesenheit von dNTPs die 3'OH-Enden der Primer verlängert (*Elongation*). Dabei liegt die optimale Elongations-Temperatur in der Regel bei 72°C. Als Matrize für die Elongation der Primer dient dabei der jeweilige DNA-Einzelstrang. Diese drei Phasen der PCR werden

zyklisch wiederholt, so dass das zu amplifizierende Fragment am Ende in einer enormen Molekülanzahl vorliegt.

Für die Elongation der Primer können verschiedene Arten von thermostabilen Polymerasen eingesetzt werden. Eine der gebräuchlichsten ist die Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, welche zwar besonders schnell, aber dafür mit größerer Fehlerrate arbeitet. Dagegen besitzt beispielsweise die Pfu-Polymerase aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, welche es ermöglicht, falsch eingebaute Nukleotide wieder zu entfernen. Diese Eigenschaft des „Korrektur-Lesens“ ist gerade für Klonierungen unerlässlich, da fehlerhaft eingebaute Nukleotide das Leseraster verändern können.

#### 2.4.5.1 PCR mit Taq- und Pfu-Polymerasen

Sofern eine PCR dazu diente, einen DNA-Bereich zu amplifizieren, um diesen zu sequenzieren, beispielsweise zur Bestimmung der Insertions-Position von P-Elementen, wurde eine Taq-Polymerase eingesetzt. Dagegen wurde für Klonierungen von PCR-Fragmenten ausschließlich eine Pfu-Polymerase verwendet.

Tabelle 2.4.5.1.1 gibt ein üblicherweise verwendetes PCR-Programm wieder, wobei die verwendeten Mastercycler von der Firma Eppendorf waren.

Schritt	Dauer	Temperatur
1 Denaturierung	2 Min	95°C
2 Denaturierung	30 Sek	95°C
3 Annealing	30 Sek	52-65°C
4 Elongation	30-60 Sek pro kB (Taq) und 1,5 Min pro kB (Pfu)	72°C
5	gehe 30 Mal zu Schritt 2	
6 finale Elongation	5 Min	72°C
7	beliebig	4°C

**Tabelle 2.4.5.1.1: Verwendetes PCR-Programm**

Dabei wurde eine PCR generell in 0,5 mL PCR-Reaktions-Gefäßen in einem Volumen von 50 µL angesetzt. In Abhängigkeit der jeweiligen Polymerase wurde der entsprechende Puffer zugesetzt. Dabei sind verschiedene Pipettierschemata zum Einsatz gekommen, bedingt durch die Art der verwendeten DNA. Um vergleichbare Mengen DNA im PCR-Ansatz vorliegen zu haben, reichten geringe Volumina von genomischer oder Plasmid-DNA, sowie von cDNA, wohingegen die genomische DNA der Einzel-Fliegen-Präparation und der DNA-Isolierung



mittels Chelex in deutlich größeren Volumina verwendet wurde (siehe Tabellen 2.4.5.1.2 und 2.4.5.1.3).

genomische-/Plasmid DNA/cDNA	1 µL
50 µM vorwärts Primer	0,5 µL
50 µM rückwärts Primer	0,5 µL
12,5 mM von jedem dNTP	5 µL
10x Polymerase Puffer	5 µL
Taq oder Pfu Polymerase	0,5 µL
auf 50 µL auffüllen mit dH <sub>2</sub> O	37,5 µL

**Tabelle 2.4.5.1.2: Pipettierschema für die PCR auf cDNA, genomischer und Plasmid-DNA**

Einzel-Fliegen- / Chelex-DNA	5-10 µL
50 µM vorwärts Primer	0,5 µL
50 µM rückwärts Primer	0,5 µL
12,5 mM von jedem dNTP	5 µL
10x Polymerase Puffer	5 µL
Taq oder Pfu Polymerase	1 µL
auf 50 µL auffüllen mit dH <sub>2</sub> O	28-33 µL

**Tabelle 2.4.5.1.3: Pipettierschema für die PCR auf genomischer Einzel-Fliegen und Chelex-DNA**

#### 2.4.5.2 Long Template PCR

Eine Amplifizierung von DNA-Fragmenten, welche größer als 4-5 kB groß sind, ist selbst mit einer Pfu-Polymerase in der Regel nicht mehr erfolgreich, wobei mit der Taq-Polymerase auf Grund der fehlenden 3'-5'-Exonuklease-Aktivität schon eine Amplifizierung von etwa 3 kB großen Fragmenten problematisch sein kann.

Für die Amplifizierung von DNA-Bereichen mit wesentlich größeren Längen, wurde daher das Expand Long Template PCR System der Firma *Roche Diagnostics*, Mannheim, verwendet. Dieses wurde für die effiziente Amplifizierung großer DNA-Bereiche bis 20 kB optimiert. Der verwendete Enzymmix enthält eine Taq-Polymerase, um eine geeignete Geschwindigkeit in der Reaktion zu erreichen und eine Tgo-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermococcus gorgonarius*, welche die benötigte 3'-5'-Exonuklease-Aktivität liefert. Auf Grund dieser Eigenschaften konnte das System daher für die Amplifizierung des erwarteten DNA-Bereiches von ca. 8 kB verwendet werden, welcher die potenzielle Transdeletion flankierte.

Tabelle 2.4.5.2.1 ist das verwendete PCR-Programm und Tabelle 2.4.5.2.2 das entsprechende Pipettierschema zu entnehmen, wobei verschiedene Pufferlösungen zur Verfügung standen

und auch verwendet wurden. Die Puffer unterscheiden sich vorwiegend in der  $MgCl_2$ -Konzentration, welche in den Pufferlösungen 2 und 3 deutlich höher ist, sowie im Zusatz von Detergenzien in Puffer 3.

Schritt	Dauer	Temperatur
1 Denaturierung	2 Min	93°C
2 Denaturierung	10 Sek	93°C
3 Annealing	30 Sek	52-65°C
4 Elongation	8 Min	68°C
5	gehe 10 Mal zu Schritt 2	
6 Denaturierung	15 Sek	93°C
7 Annealing	30 Sek	52-65°C
8 Elongation	8 Min + 20 Sek pro weiterem Zyklus	68°C
9	gehe 20 Mal zu Schritt 6	
10 finale Elongation	7 Min	68°C
11	Beliebig	4°C

**Tabelle 2.4.5.2.1: PCR-Programm für die Expand Long Template PCR**

	Puffer 1	Puffer 2	Puffer 3
genomische DNA	1-2 $\mu$ L	1-2 $\mu$ L	1-2 $\mu$ L
50 $\mu$ M vorwärts Primer	0,3 $\mu$ L	0,3 $\mu$ L	0,3 $\mu$ L
50 $\mu$ M rückwärts Primer	0,3 $\mu$ L	0,3 $\mu$ L	0,3 $\mu$ L
12,5 mM von jedem dNTP	7 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
5x Puffer	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Enzymmix	0.75 $\mu$ L	0.75 $\mu$ L	0.75 $\mu$ L
auf 50 $\mu$ L auffüllen mit dH <sub>2</sub> O	34,65-35,65 $\mu$ L	31,65-32,65 $\mu$ L	31,65-32,65 $\mu$ L

**Tabelle 2.4.5.2.2: Pipettierschema für die Expand Long Template PCR**

### 2.4.5.3 Verwendete Oligonukleotide

Die in den Polymerase-Ketten-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen *Biotez*, Berlin und *metabion*, Martinsried erhalten und nach Angaben der Bezugsquelle jeweils in so viel dH<sub>2</sub>O aufgenommen, dass sie eine Konzentration von 50  $\mu$ M besaßen. Der Tabelle 2.4.5.3.1 sind die Sequenzen der jeweils verwendeten Oligonukleotidpaare für die verschiedenen PCR-Reaktionen unter Angabe der erhaltenen Fragmentgrößen zu entnehmen.

Primerpaar	Verwendungszweck	Primersequenz (jeweils 5' → 3')	Fragmentgröße (in Bp)
d03942 long UP	Transdel.	GGATGTACACGTGCATGAACTG GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	440
d03942 R UP	Transdel.	TACCCGTACCCAGTCCA GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	412
d01917 L UP	Transdel.	GCTGGCCACGTGCCGTTCTCAT GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	681
d01917 R UP	Transdel.	CAAGCGCACACTAATTTTCGGC GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	448
XP5`Minus d03942 Long	d03942 XP-Element	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG GGATGTACACGTGCATGAACTG	606
XP5`Minus d03942 L	d03942 XP-Element	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG ATGTTACCGTTGTATTTTC	813
XP3`Minus d03942R	d03942 XP-Element	TACTATTCCTTTCACTCGCACTTATTG TACCCGTACCCAGTCCA	469
XP5`Minus d01917 L	d01917 XP-Element	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG GCTGGCCACGTGCCGTTCTCAT	847
XP3`Minus d01917 R	d01917 XP-Element	TACTATTCCTTTCACTCGCACTTATTG CAAGCGCACACTAATTTTCGGC	505
d03942Long d01917R	Transdel. für Sequenzierung	GGATGTACACGTGCATGAACTG CAAGCGCACACTAATTTTCGGC	ca. 7300 bis ca. 8900 je nach "ver- wendeter" FRT-Seq.
00884L 00884R	z.B. für Rescue	TCGGCAATGAAGTGGAACCTCT AGGCAAAGGCATCAAACCTCGTC	712 m. Int 651 o. Int
02179L 00884R	Transdeletion über ATG von Wde hinweg	GGAGAAACTGCCATACCAAAG AGGCAAAGGCATCAAACCTCGTC	1989
02179L 02179R	z.B. für Rescue	GGAGAAACTGCCATACCAAAG CTCCGTTGTTATTGTTCTTGTGT	702
EP2024L UP	EP2024 Charakt.	AAATGCTGCTTCTCCTCA GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	378
EP2024R UP	EP2024 Charakt.	TACCCGTACCCAGTCCA GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	416
d03942L UP	EP2024 Charakt.	ATGTTACCGTTGTATTTTC GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	643
00884L UP	d06198 Charakt.	TCGGCAATGAAGTGGAACCTCT GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	402
00884R	d06198	AGGCAAAGGCATCAAACCTCGTC	378

UP	Charakt.	GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	
00884L XP5`	d06198 Charakt.	TCGGCAATGAAGTGGAACCTCT TTTACTCCAGTCACAGCTTTG	568
00884R XP3`	d06198 Charakt.	AGGCAAAGGCATCAAACCTCGTC TACTATTCCTTTCACTCGCACTTATTG	435
00884L UP	00884 Charakt.	TCGGCAATGAAGTGGAACCTCT GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	402
00884R UP	00884 Charakt.	AGGCAAAGGCATCAAACCTCGTC GACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCAT G	378
GFP for GFP rev	z.B. für Rescue	CACAAGTTCAGCGTGTCCG CTTCTCGTTGGGGTCTTTG	570
Egg Seq c Egg cc-term	Egg 1473 FRT- Rekombinante	CTACGTGGACGACGAGAACAG GAGCAGACGAAGGCGGCAAT	1591 in Wt, 720 in Mutante
Egg n-term Egg cc-term	Egg 4	CACCATGTCTGGGCAGCCAACAGC GAGCAGACGAAGGCGGCAAT	3790
Egg n-term Tudor rev	Egg 5	CACCATGTCTGGGCAGCCAACAGC TTGGGACACGCAGCTGCTGTG	2104
cterm half Egg cc-term	Egg6	CACCATGTACAAGTGCCACGAGTG GAGCAGACGAAGGCGGCAAT	1470
cterm half mbd preset rev	Egg 7	CACCATGTACAAGTGCCACGAGTG CTCTAGGGAGAACTGCACCAC	667
SET for Egg cc-term	Egg 8	CACCATGAAGAAGAATTGCCTGAAC GAGCAGACGAAGGCGGCAAT	775
Tudor for Tudor rev	Egg 9	CACCATGCAGATGATCAAGACAGTG TTGGGACACGCAGCTGCTGTG	581
HDAC for HDAC rev	Egg 10	CACCATGAGTCGACCAGCAGAAGA TGACCAGGACAGCTGAGCCG	589
Egg n-term n-term rev	Egg11	CACCATGTCTGGGCAGCCAACAGC GGCAATGTGCTTGGCCGTCA	1567
Egg n-term PCR 12 rev	Egg12	CACCATGTCTGGGCAGCCAACAGC GTATTCTTCTGCTGGTCTGACT	610
PCR 13 for n-term rev	Egg 13	CACCATGGAAGATGAACTCGATGATGCC GGCAATGTGCTTGGCCGTCA	475
n-term cn-term	Wde 1	CACCATGATGGGAGTAAACCAG CTACGACCAGGTCTTGGGAACAC	4267
coiled-coil for coiled-coil rev	Wde 3	CACCATGGAGCTGGTGTGCAGAA  GAAATGAGAGTTCTTAGCCTCCA	205
n-term PCR 16 rev	Wde 16	CACCATGATGGGAGTAAACCAG CAGCACCAGCTCCTCCAGGT	2539
PCR 17 for cc-term	Wde 17	CACCATGCTCTCATTTCACCGCTCC CGACCAGGTCTTGGGAACACTG	1556
POF n-term POF cc-term	POF	CACCATGGATTCAAACGCGCGGC AGGATCAGGATCGCGTTCCAG	1489

**Tabelle 2.4.5.3.1: Auflistung der verwendeten Primer unter Angabe der erhaltenen Bandengrößen.** Angegeben sind die tatsächlichen, nicht die erwarteten Bandengrößen. Eine Ausnahme stellt die Transdeletion dar. Hier ist der Bereich der bei erfolgter Transdeletion zu erwartenden Bandengrößen angegeben.

Die für Sequenzierreaktionen verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.4.5.3.2 aufgeführt.

Primer-bezeichnung	Sequenzierung von cDNAs, Vektorübergängen oder P-Element-Positionen	Primersequenz (jeweils 5' → 3')
M13 for	aus dem pENTR-Vektor von 5' in die jeweiligen Inserts	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	aus dem pENTR-Vektor von 3' in die jeweiligen Inserts	CAGGAAACAGCTATGAC
d03942Long	Transdeletion, XP-Element	GGATGTACACGTGCATGAACTG
d01917R	Transdeletion, XP-Element	CAAGCGCACACTAATTTTCGGC
00884L	P- und XP-Element	TCGGCAATGAAGTGGAACCTCT
00884R	P- und XP-Element	AGGCAAAGGCATCAAACCTCGTC
Seq Pri a	Windei	GGAAGAGGATGAAGTCCCAGCC
Seq Pri b	Windei	GCCCAACCCAGGAAGTGG
Seq Pri c	Windei	CAGCAGAGCAGAGGGTGG
Seq Pri d	Windei	CACCAGCAACAGCAGCCAGC
Seq Pri a rev	Windei	GGCTGGGACTTCATCCTCTTCC
Seq Pri b rev	Windei	GTAGCGTGCCTTCGTGGGAGC
Seq Pri c rev	Windei	GAAGGCGTGGAGCCAGGCGT
Egg Seq a	Eggless	GACGATGTCCTAGAGGTGGAG
Egg Seq b	Eggless	GGTACCTCAACACTCCGTAC
Egg Seq c	Eggless	CTACGTGGACGACGAGAACAG

**Tabelle 2.4.5.3.2: Auflistung der für Sequenzierungen verwendeten Primer**

Die Primer für die Sequenzierungen der Zielvektoren sind der Internetseite: <http://www.ciwemb.edu/labs/murphy/Gateway%20vectors.html> zu entnehmen.

#### 2.4.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Sofern die Aufreinigung eines PCR-Produktes erfolgen sollte, welches nach der Gelelektrophorese von 10 µL der Probe das gewünschte DNA-Fragment enthielt, wurden die zurückbehaltenen 40 µL mit 60 µL dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und nach den Angaben des Herstellers mit dem Nucleo Spin Extract II Kit der Firma *Macherey-Nagel*, Düren aufgereinigt, in 20-25 µL dH<sub>2</sub>O eluiert und für weitere Experimente verwendet.

Von denjenigen PCR-Proben, welche Beiprodukte in Form von anderen DNA-Fragmenten enthielten, wurden die zurückbehaltenen 40 µL PCR-Ansatz auf ein weiteres Agarosegel

aufgetragen und nach der Auftrennung ein Gelblöckchen mit dem benötigten DNA-Fragment ausgeschnitten. Die Auflösung des Gelblockes sowie die Aufreinigung der enthaltenen DNA erfolgte ebenfalls mit dem oben genannten Kit nach den Angaben des Herstellers.

#### 2.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Verwendung von DNA zu Klonierungs- oder Sequenzierungszwecken ist eine vorherige photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes und der Reinheit unerlässlich. Das Absorptionsmaximum von doppelsträngiger DNA liegt bei 260 nm. Daher erfolgt die Messung der Extinktion bei dieser Wellenlänge. Als Referenz wird zunächst die Extinktion von 99  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  bei 260 nm in einer Küvette mit der Schichtdicke 1 cm gemessen. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  der zu messenden DNA-Lösung in die gleiche Küvette erfolgt eine erneute Messung. Für doppelsträngige DNA in einer Küvette mit der verwendeten Schichtdicke gilt:

$$1 E_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$$

Unter Einbeziehung des Verdünnungsfaktors ergibt sich aus dem photometrisch ermittelten Wert die Konzentration der DNA in der Angabe  $\mu\text{g/mL}$ .

Zusätzlich kann die Reinheit der DNA-Probe durch Bestimmung des Quotienten der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm bestimmt werden. Idealerweise liegt der erhaltene Wert bei 1,8.

#### 2.4.8 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierungen erfolgten über den Sequenzier-Service der Entwicklungsbiochemie, AG Pieler, GZMB Göttingen, wobei die Sequenzierreaktion, sowie die anschließende Proben-Aufreinigung nach den folgenden Protokollen durchgeführt wurden, bevor die Proben dem Sequenzier-Service zur Sequenzanalyse übergeben werden konnten. Die Sequenz-Dateien wurden nach etwa 2 Tagen per Email erhalten.

##### Protokoll für die Sequenzier-Reaktion von Plasmid-DNA:

In einem 0,5 mL Eppendorf-Gefäß wurden 300 ng der Plasmid-DNA mit 8 pmol des Sequenzier-Primers, sowie 1,5  $\mu\text{L}$  Seq-Mix und 1,5  $\mu\text{L}$  Seq-Puffer versehen und mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 10  $\mu\text{L}$  aufgefüllt.

Die Sequenzierreaktion erfolgte in einem Mastercycler der Firma Eppendorf wie in Tabelle 2.4.8.1:

Schritt	Dauer	Temperatur
1	2 Min	96°C
2	20 Sek	96°C
3	30 Sek	55°C
4	4 Min	60°C
5	gehe 26 Mal zu Schritt 2	
6	Halten	12°C

**Tabelle 2.4.8.1: Programm der Sequenzierreaktion**

Protokoll für die Sequenzier-Reaktion von PCR-Produkten nach vorheriger Aufreinigung (siehe Abschnitt 2.4.6):

Für die Sequenzier-Reaktion von PCR-Produkten wurden in einem 0,5 mL Eppendorf-Gefäß 20-30 ng des PCR-Produktes mit 8 pmol des Sequenzier-Primers, sowie 1 µL Seq-Mix und 1 µL Seq-Puffer versehen und mit dH<sub>2</sub>O auf 10 µL aufgefüllt.

Das sich anschließende Sequenzierprogramm war identisch mit dem für Plasmid-DNA (Tabelle 2.4.8.1).

Aufreinigung der Sequenzierreaktionen:

Die Aufreinigung der Sequenzierreaktionen war für die eingesetzte PCR- und Plasmid-DNA identisch.

Dafür wurden die Sequenzierreaktionen jeweils in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt, mit 1 µL 125 mM EDTA, 1 µL 3 M NaAc sowie 50 µL 100 % Ethanol versehen und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Nach einem 15 minütigen Zentrifugationsschritt bei 14000 RPM und Verwerfen des Überstandes erfolgte die Zugabe von 70 µL 70% Ethanol zum Pellet. Nach erneutem Zentrifugieren von 5 Minuten und bei 14000 RPM, sowie dem Verwerfen des Überstandes, musste das Pellet mindestens 2 Minuten an der Luft trocknen, bevor es in 15 µL HiDi gelöst werden konnte. Die so behandelten Proben wurden daraufhin an den Sequenzier-Service übergeben.

#### 2.4.9 Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit für Klonierungen und zur Amplifizierung von Plasmiden verwendeten Bakterien-Stämme waren die chemisch kompetenten *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stämme DH5 $\alpha$ , TOP10 und XL1-blue. Diese sind allesamt restriktions- und rekombinationsnegativ und besitzen eine hohe Transformationseffizienz.

#### 2.4.10 Manipulation von DNA-Molekülen:

##### 2.4.10.1 DNA-Spaltung mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktions-Verdau)

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche dem Abbau eingedrungener Fremd-DNA dienen. Diese wird am Fehlen spezifischer Nukleotid-Modifizierungen, wie beispielsweise der Methylierung von Cytosin, von der eigenen, auf diese Weise geschützten DNA unterschieden. Es ist bereits eine Vielzahl verschiedener Restriktionsenzyme aus unterschiedlichen Bakterienstämmen bekannt, wobei jedes Enzym kurze Sequenzen von Basenpaarfolgen spezifisch erkennt und durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen eine Spaltung beider Stränge einer DNA-Doppelhelix verursacht. Sofern zwei Restriktionsendonukleasen aus verschiedenen Bakterien die gleiche Erkennungssequenz besitzen, werden sie als Isoschizomere bezeichnet. Es wird zudem zwischen verschiedenen Arten von Enzymen unterschieden. Eine Gruppe von Restriktionsenzymen verursacht die Spaltung der DNA unter Erzeugung eines 5'-Überhanges von Nukleotiden, während eine weitere Gruppe 3'-Überhänge hinterlässt (= klebrige Enden). Die dritte Gruppe dagegen erzeugt keine Überhänge (=glatte Enden).

Für die Spaltung von DNA-Molekülen wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen *Roche Diagnostics*, Mannheim und *MBI Fermentas*, St. Leon Rot verwendet. Diese besaßen jeweils eine Aktivität von 10 U/ $\mu$ L, wobei eine Unit (1U) Enzym 1  $\mu$ g DNA pro Stunde (1 $\mu$ g/h) schneidet.

Der folgende Ansatz wurde standardmäßig verwendet:

x $\mu$ l DNA (konz.-abhängig; etwa 200-1000 ng)
1 $\mu$ l 10x Puffer
<u>0,3 <math>\mu</math>L Enzym</u>
dH <sub>2</sub> O ad 10 $\mu$ L Gesamtvolumen

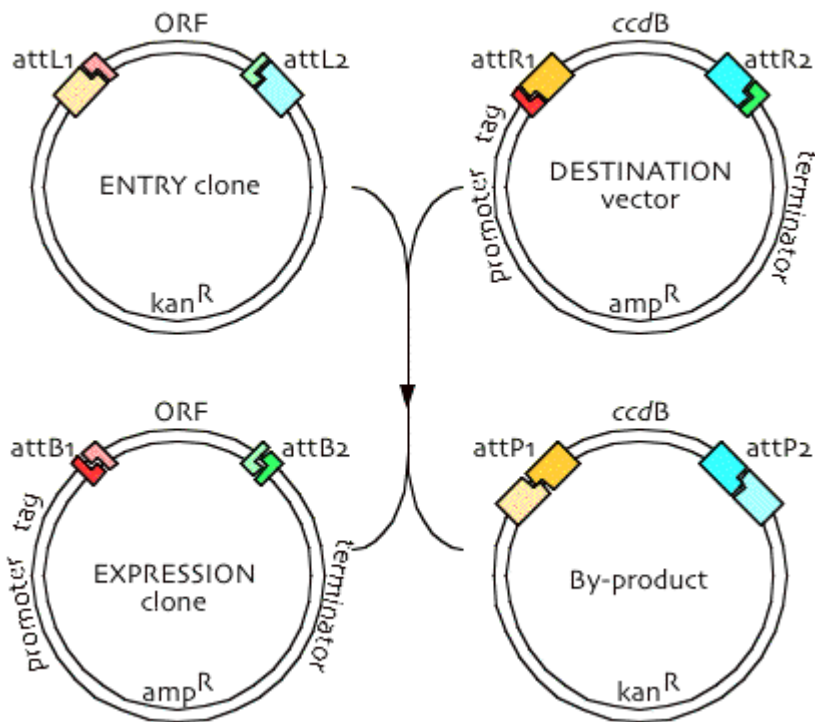
Die Inkubation erfolgte 1 Stunde oder über Nacht bei 37° C. Alle Klonierungen wurden mittels Restriktionsverdau über die Größe der erhaltenen Restriktionsfragmente auf die Aufnahme des erwünschten Inserts in die entsprechenden Vektoren untersucht. Sofern die Größen den Erwartungen entsprachen, erfolgte die vollständige Sequenzierung der Insertbereiche (siehe Abschnitt 2.4.8).



#### 2.4.10.2 Gateway pEntr/D-Topo-Klonierung und Rekombination mit Ziel-Vektoren

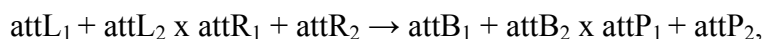
Die Gateway-Technologie ermöglicht die Klonierung einer DNA-Sequenz aus einem Ausgangsvektor in eine Vielzahl von Zielvektoren. Dabei besitzt der Ausgangs-Vektor pENTR aus dem Gateway pEntr/D-Topo Cloning Kit, *Invitrogen*, Groningen, NL, eine Rekombinationskassette, in welche das offene Leseraster der erwünschten cDNA über einen angehängten 5'-Überhang integriert wird. Diese Gateway-Kassette erlaubt die Rekombination der cDNA in einen der Zielvektoren, so dass die cDNA im gleichen Leseraster mit dem entsprechenden Tag des Vektors exprimiert wird. Die verschiedenen Zielvektoren der *Drosophila Gateway Vector Collection*, *Terence Murphy Labor*, *Abteilung für Entwicklungsbiologie*, *Carnegie Institut*, Washington, halten diverse Anhänge bereit, wie beispielsweise GFP, RFP, Myc oder HA, welche je nach gewähltem Vektor N-terminal oder C-terminal mit der integrierten cDNA zu einem Fusionsprotein translatiert werden. Zudem stehen für die Expression der Fusionsproteine Zielvektoren mit verschiedenen Promotoren zur Verfügung. Es besteht unter anderem die Wahl zwischen Vektoren mit einem Aktin-Promoter oder aber UASp- und UAS<sub>T</sub>-Promotoren, welche durch Gal4 aktivierbar sind. Diese bieten sich vor allem für die Keimbahntransformation von Fliegen an.

Die Rekombination der Gateway-Kassette in diese Zielvektoren wird über eine Lambda-Integrase vermittelt, welche die Erkennungssequenzen attL1 und attL2, die die cDNA im Ausgangsvektor flankieren, mit den komplementären Erkennungssequenzen attR1 und attR2 in den Zielvektoren zu neuen, zweiteiligen Erkennungssequenzen rekombiniert (siehe auch Abbildung 2.4.10.2).



**Abbildung 2.4.10.2: Schematische Darstellung der in der LR-Rekombination involvierten Plasmide.** Die Abbildung zeigt den pENTR-Vektor und einen Zielvektor, wobei durch die LR-Rekombination der gewünschte Expressionsvektor und ein Bei-Produkt entstehen, das negativ selektiert wird, ebenso wie die Ursprungsvektoren. Dies geschieht zum Einen über die Wahl des Antibiotikums in den LB-Platten nach der Transformation und zum Anderen über die sogenannte Todeskassette. Die schematische Darstellung wurde der Internetseite des *Terence Murphy Labors, Abteilung für Entwicklungsbiologie, Carnegie Institut, Washington* entnommen: [www.ciwemb.edu/labs/murphy/Gateway%20vectors.html](http://www.ciwemb.edu/labs/murphy/Gateway%20vectors.html)

Die Rekombination läuft dabei nach folgendem Schema ab:



wobei der unterstrichene Bereich den Expressionsklon mit den richtig rekombinierten bzw. ausgetauschten Kassetten und dem offenen Leseraster des Gens von Interesse darstellt. Der rekombinierte Zielvektor besitzt zudem ein Ampicillin-Resistenzgen, so dass Zellen mit nicht rekombiniertem pENTR-Vektor nicht überleben können. Bei der Rekombination entsteht außerdem als Nebenprodukt der pENTR-Vektor mit der *ccdB*- oder auch „Todeskassette“, welche ursprünglich Teil des Zielvektors war. Abgesehen vom Erhalt des *ccdB*-Motivs sollten die Zellen mit diesem Vektor auch wegen der Kanamycin-Resistenz des pENTR-Vektors negativ selektiert werden.

#### 2.4.10.2.1 Topo-Klonierung in den Gateway-Ausgangsvektor

Das Klonieren von DNA erfolgte über den Ausgangsvektor aus dem Gateway pEntr/D-Topo Cloning Kit. Dabei wurde die DNA nach dem folgenden Pipettierschema in den Vektor

integriert. Es wurden jeweils aufgereinigte PCR-Produkte verwendet, welchen während der PCR eine N-terminale CACC-Erkennungssequenz mit speziell zu diesem Zweck synthetisierten Primern angehängt worden war. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die Fragmente richtig orientiert in die Gateway-Kassette des Vektors eingebaut wurden, da dieser am 5'-Ende die komplementäre Sequenz GTGG besaß.

4 µl DNA
1 µl Salzlösung
<u>1 µL pENTR-Vektor</u>
6 µL Gesamtvolumen

#### **Pipettierschema für die pENTR-Reaktion**

Es folgte eine Inkubation der Reaktion auf Raumtemperatur. Dabei war die Dauer abhängig von der Größe der verwendeten PCR-Fragmente. Für sehr kurze DNA waren bereits 5 Minuten ausreichend, wohingegen für Fragmente von 3 bis 4,5 kb eine Inkubationszeit von 30 Minuten notwendig war. Im Anschluss erfolgte die im Abschnitt 2.4.12.1 beschriebene Transformation von Bakterien, wobei jeweils 3 µL der pENTR-Reaktion eingesetzt wurden. Die Selektion der erhaltenen Kolonien auf das Vorhandensein des pENTR-Vektors erfolgte stets über Kanamycin-haltige LB-Platten, da der Vektor über ein Kanamycin-Resistenzgen verfügte.

Von den erhaltenen Kolonien wurden Mini-Kulturen angesetzt und präpariert (Abschnitt 2.4.13.1). Ein Restriktionsverdau gab Aufschluss darüber, ob das gewünschte Insert enthalten war. Von Kulturen, welche in diesem kleinen Maßstab positiv getestet worden waren, wurden Midi-Präparationen durchgeführt (Abschnitt 2.4.13.2). Nach einem weiteren Test-Verdau wurde generell das gesamte Insert aus dem Vektor heraus durchsequenziert, um die Sequenz auf ihre vollständige Richtigkeit hin zu überprüfen, da nur so gewährleistet war, dass das offene Leseraster nicht gestört war. Daraufhin konnte die Rekombination der jeweiligen pENTR-Vektoren mit entsprechenden Zielvektoren erfolgen.

#### 2.4.10.2.2 LR-Rekombination in den Gateway-Zielvektoren

Die verwendeten Zielvektoren aus der *Drosophila Gateway Vector Collection* sowie die entsprechenden Inserts sind der Tabelle 2.4.11.1 in Abschnitt 2.4.11 zu entnehmen. Die Rekombination mit Hilfe des Gateway<sup>R</sup> LR Clonase<sup>TM</sup> II Enzyme Mix, *Invitrogen*, Groningen, NL, erfolgte nach dem folgenden Pipettierschema:

1 bis 10 $\mu$ l pENTR-Vektor (100 bis 300 ng)
2 $\mu$ l Ziel-Vektor (150 ng/ $\mu$ l)
<u>4 <math>\mu</math>l 5 x LR Clonase-Reaktions-Puffer</u>
auf 16 $\mu$ l mit TE-Puffer, pH 8,0

**Pipettierschema für LR-Rekombination**

Der bei 80°C gelagerte LR-Recombinase-Mix wurde etwa 2 Minuten auf Eis aufgetaut und danach 2x2 Sekunden gevortext. Anschließend wurden 4  $\mu$ l des Enzym-Mixes zu jedem Rekombinations-Ansatz pipettiert und gut gemischt. Es folgte eine 60 minütige Inkubation bei 25°C. Durch Zugabe von jeweils 2  $\mu$ l Proteinase K aus dem Clonase-Kit und Inkubation bei 37°C für 10 Minuten wurde die Reaktion beendet. Aus jedem Ansatz wurden 3  $\mu$ l für die Transformation von Bakterien verwendet. Das Ausplattieren erfolgte auf Ampicillin-haltigen Platten.

Am folgenden Tag wurde analog zur Prozedur im vorherigen Abschnitt verfahren, in dem ebenfalls Mini- und Midi-Präparationen sowie Restriktionsverdauung zur Selektion auf die rekombinanten Zielvektoren mit dem gewünschten Insert durchgeführt wurden. Da in diesem Versuch keine PCR oder Klonierungsreaktion stattgefunden hat, sondern lediglich die Rekombination an den Erkennungssequenzen innerhalb der Vektoren, war hier die Sequenzierung der Übergänge von Vektor zu Insert ausreichend.

#### 2.4.11 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide (Tabelle 2.4.11.1) stammten vorwiegend aus der *Drosophila Gateway Vector Collection*.

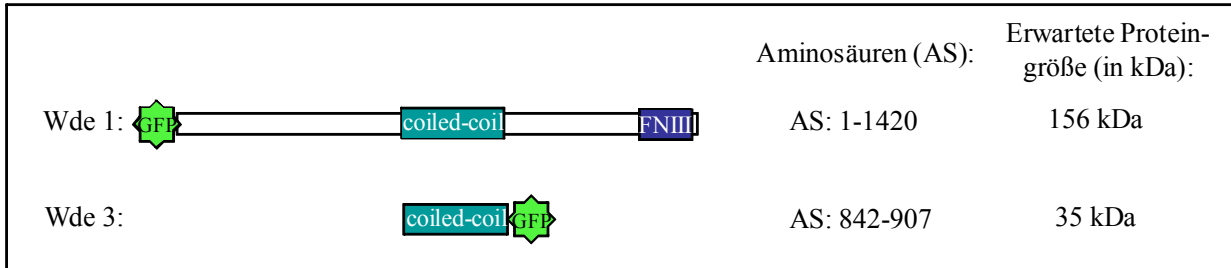
Eine Ausnahme bildete der EST-Klon GH06075 vom *Berkeley Drosophila Genome Project*, bezogen über das *Drosophila Genomics Resource Center (DGRC)*, Indiana University, USA, welcher die Vollängen-cDNA von *CG12340* trug und für die anschließende Verwendung dieser cDNA in der Gateway-Klonierung einer PCR unterzogen wurde. Zusätzlich fand ein Aktin5C-Gal4-Vektor Verwendung (Sequenz siehe Anhang). Die Tabelle 2.4.11.1 listet die verwendeten Plasmide unter der Angabe der Bezugsquelle und des Inserts auf.

Insert	Plasmid	Herkunft des Plasmids
—	pEntr/D-Topo	Gateway pEntr/D-Topo Cloning Kit, <i>Invitrogen</i>
<i>CG12340</i> cDNA (für Keimbahntransformation)	pPGW	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>CG12340</i> cDNA (Wde-1)	pTGW	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>CG12340</i> cDNA nur coiled-coil-Domäne (Wde-3)	pAWG	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (für Keimbahntransformation)	pPWR	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-4)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-5)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-6)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-7)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-8)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-9)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-10)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-11)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-12)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>eggless</i> cDNA (Egg-13)	pAWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
<i>POF</i> cDNA	pTWH	Drosophila Gateway Vector Collection, Murphy Labor
Aktin5C-Gal4	pWAGAL4	Vektorsammlung A. Wodarz
EST-Klon GH06075	pOT2	Berkeley Drosophila Genome Project über das Drosophila Genomics Research Center

**Tabelle 2.4.11.1: Auflistung der verwendeten Plasmide unter Angabe der Inserts und der Herkunft der Vektoren**

Die Tabelle 2.4.11.1 gibt unter anderem die Plasmide wider, welche als Insert die Volllängen-*CG12340*-cDNA bzw. zwei verschiedene *CG12340*-Deletionskonstrukte in GFP-Expressionsvektoren tragen. Eine schematische Darstellung der davon kodierten GFP-Fusionsproteine mit der Angabe der kodierten Aminosäuren und der erwarteten Proteingrößen ist der Abbildung 2.4.11.2 zu entnehmen. Zusätzlich zum Volllängen-Protein (Wde 1)

entstehen zwei Fusionsproteine, welche entweder nur die coiled coil-Domäne von *CG12340* (Wde 3) oder das gesamte Protein bis auf die coiled coil-Domäne vor einer GFP-Sequenz besitzen.



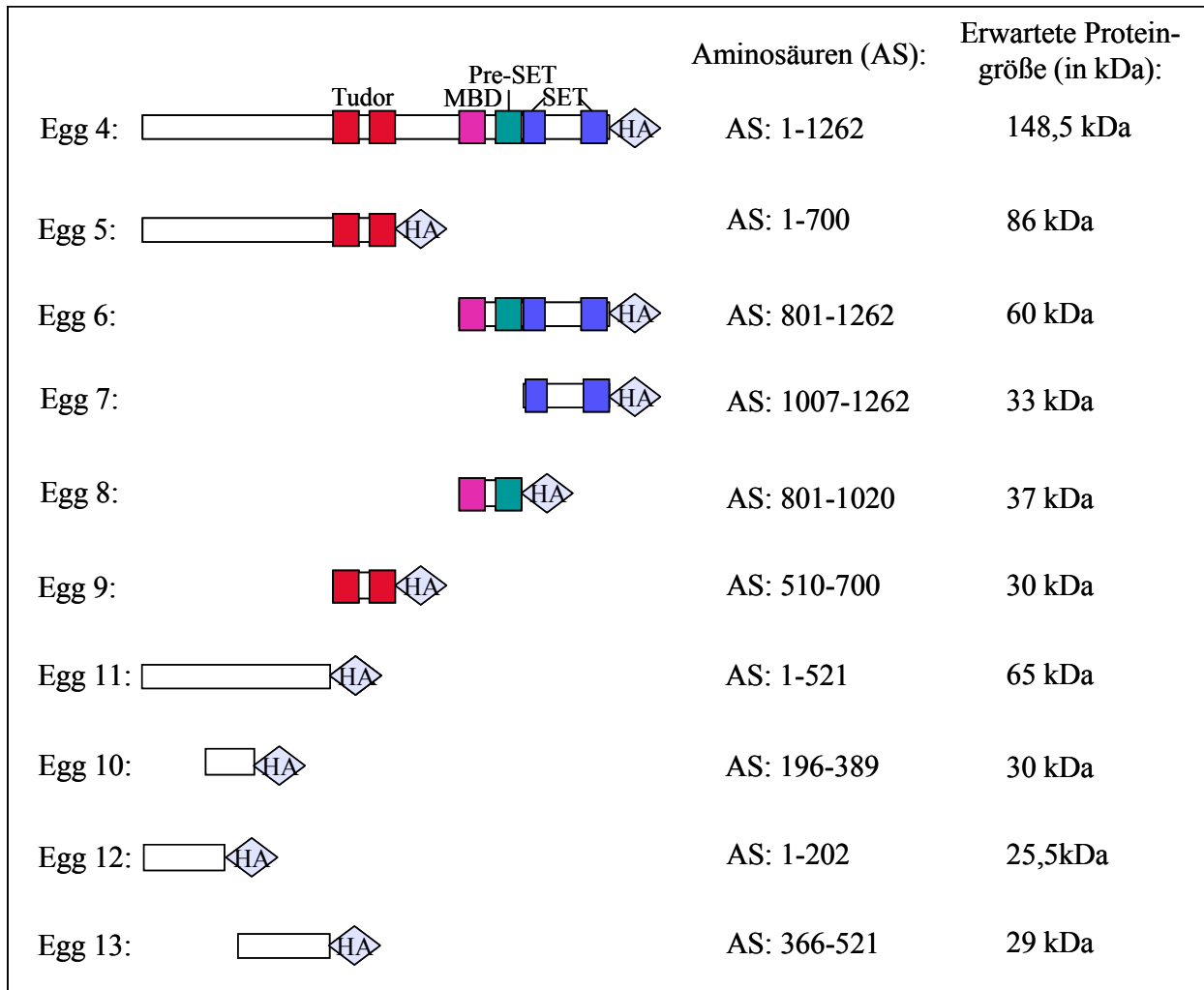
**Abbildung 2.4.11.2: Übersicht über die Wde-Deletionskonstrukte unter Angabe der kodierten Aminosäuren und der erwarteten Größen der GFP-Fusionsproteine**

Dabei befindet sich die coiled coil-Domäne von *CG12340* an Aminosäure-Position 857-892 und die Fibronectin III-Domäne an Position 1320-1411 des Proteins (Tabelle 2.4.11.3). Diese Angaben stammen von einer Domänenanalyse der SMART-Internetseite (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

Windei Domänen	Domänen-Lokalisierung gemessen am Windei-Gesamtprotein (1420AS)
coiled coil	AS: 857-892
Fibronectin III	AS: 1320-1411

**Tabelle 2.4.11.3: Angabe der Domänenlokalisierung innerhalb des Windei-Proteins in Aminosäuren**

Ebenfalls gibt Tabelle 2.4.11.1 diejenigen Plasmide wider, welche das Volllängenkonstrukt (Egg 4) und die Deletionskonstrukte (Egg 5 bis Egg 13) von *eggless* in einem HA-Expressionsvektor kodieren. Die schematische Darstellung der kodierten Eggless-HA-Fusionsproteine ist in Abbildung 2.4.11.4 zu sehen. Zusätzlich sind die kodierten Aminosäuren und die erwarteten Proteingrößen dargestellt.



**Abbildung 2.4.11.4: Übersicht über die Eggless-Deletionskonstrukte unter Angabe der kodierten Aminosäuren und der erwarteten Größen der HA-Fusionsproteine**

Die Lokalisierung der Domänen innerhalb des Eggless-Proteins sind der Tabelle 2.4.11.5 zu entnehmen und wurden ebenfalls durch eine Domänenanalyse der SMART-Internetseite (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) erhalten.

Eggless Domäne	Domänen-Lokalisierung gemessen am Eggless-Gesamtprotein (1262 AS)
Tudor 1	AS: 528-600
Tudor 2	AS: 628-684
MBD	AS: 821-891
pre-SET	AS: 898-1005
SET	AS: 1021-1243
post-SET	AS: 1246-1262

**Tabelle 2.4.11.5: Angabe der Domänenlokalisierung innerhalb des Eggless-Proteins in Aminosäuren**

## 2.4.12 Transformation von Bakterien

### 2.4.12.1 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Die Transformation von Bakterien führt zu einer schnellen Amplifizierung der eingeschleusten, rekombinanten Plasmid-DNA. Die Replikation der Plasmide mit eigenem Replikationsursprung in der Bakterienzelle und deren Teilung mit geringer Generationszeit ermöglicht die Isolierung großer DNA-Mengen aus diesen Zellen.

Für die Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden E.coli Bakterien der Stämme DH5 $\alpha$ , XL1-blue oder TOP10 verwendet. Die Aliquots mit den Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu jeweils 50  $\mu$ L Zellen wurden dann 2  $\mu$ L Plasmid-DNA gegeben, und es folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis. Durch den anschließenden Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42 °C sollte die DNA-Aufnahme in die Bakterien induziert werden. Unmittelbar nach dem Hitzeschock wurden die Zellen wieder auf Eis gestellt und mit jeweils 250  $\mu$ L SOC-Medium versehen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C konnten die Zellen auf LB-Agar-Platten ausplattiert werden, welche ein Antibiotikum enthielten. Dabei wurde das Antibiotikum so gewählt, dass die Zellen, die das gewünschte Plasmid mit dem entsprechenden Antibiotika-Resistenzgen aufgenommen hatten, auf der Platte wachsen konnten. Die Platten wurden über Nacht auf 37°C inkubiert.

## 2.4.13 Präparation von Plasmid-DNA

### 2.4.13.1 Schnell-Präparation der Plasmid-DNA („Mini-Präparation“)

Mit einer sogenannten „Mini-Präparation“ lässt sich in kurzer Zeit die Plasmid-DNA vieler einzelner Bakterienkulturen untersuchen. Dazu wurden „Mini“-Kulturen angesetzt, indem jeweils 3 mL LB-Medium mit dem, der Plasmid-Resistenz entsprechenden, Antibiotikum versehen und mittels einer Pipettenspitze mit einer Einzelkolonie angeimpft wurden. Die Einzelkolonien stammten dabei von entsprechenden Antibiotika-haltigen LB-Platten, auf welche transformierte Bakterien ausplattiert worden waren (Abschnitt 2.4.12). Die Mini-Kulturen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und am folgenden Tag der Plasmid-DNA-Präparation (Alkali-Lyse-Methode) unterzogen. Dazu wurden die Puffer-Lösungen aus dem Nucleobond AX-Kit von *Macherey Nagel*, Düren verwendet.

Zunächst erfolgte die Überführung von jeweils 1,5 mL der Kulturen in Eppendorf-Gefäße, welche dann für 3 Minuten bei 13000RPM zentrifugiert wurden. Nach Verwerfen des Überstandes folgte die Resuspendierung der Pellets in 200  $\mu$ L S1-Puffer. Nach Zugabe von 200  $\mu$ L S2-Puffer und 6 maligem Invertieren der Gefäße schloss sich eine Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur an. Nach der Inkubation wurden 200  $\mu$ L S3-Puffer hinzugefügt,



6 Mal invertiert und danach 20 Minuten bei 13000 RPM zentrifugiert. Nach Überführung der Überstände in neue Eppendorf-Gefäße folgte die Zugabe von 400 µL Isopropanol. Im anschließenden 30 minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 RPM wurde die DNA gefällt. Das Pellet wurde dann mit eisgekühltem 70% Ethanol durch 5 minütige Zentrifugation bei 13000 RPM gewaschen. Nach Verwerfen der Überstände mussten die Pellets so lange trocknen, bis kein Ethanol mehr in den Eppendorf-Gefäßen verblieben war. Die Resuspendierung der Pellets erfolgte in 20 µL dH<sub>2</sub>O.

Die erhaltene DNA der verschiedenen Kulturen konnte nun durch Restriktions-Verdau dahingehend getestet werden, ob das gewünschte Plasmid enthalten war.

#### 2.4.13.2 Präparation einer größeren Plasmid-DNA-Menge („Midi-Präparation“)

Sofern eine DNA einer Mini-Kultur durch Präparation, Aufreinigung und Restriktions-Verdau als die gewünschte identifiziert wurde, sollte diese in größeren Mengen und mit größerer Reinheit, beispielsweise für Sequenzierungen, Klonierungen oder Keimbahntransformation von Fliegen, zur Verfügung stehen. Daher wurden Midi-Kulturen in einem Volumen von 50 mL LB-Medium angesetzt, welche mit 1,5 mL der entsprechenden Mini-Kultur angeimpft und mit dem nötigen Antibiotikum versehen wurden. Am folgenden Tag wurde die Präparation der Plasmid-DNA mit dem Nucleobond AX-Kit, *Macheray-Nagel*, Düren nach den Herstellerangaben mit den mitgelieferten Säulen (modifizierte alkalische/SDS-Lyse) durchgeführt. Die Aufnahme der erhaltenen Plasmid-DNA erfolgte in 50 µL dH<sub>2</sub>O. Nach photometrischer Messung des DNA-Gehaltes und der Reinheit konnte die DNA bei -20°C gelagert werden.

#### 2.4.13.3 Präparation von EST-Klonen

Der vom *Drosophila Genomics Research Center* erhaltene EST-Klon GH06075 wurde nach den Angaben der Bezugsquelle behandelt und die transformierte Plasmid-DNA durch Mini- und danach durch Midi-Präparation vermehrt und aufgereinigt. Anschließend konnte neben der Sequenzierung auch die Verwendung der Plasmide für Polymerase-Ketten-Reaktionen erfolgen, um die erhaltenen PCR-Fragmente zum Beispiel in den pENTR-Vektor zu klonieren.

#### 2.4.14 Zellkultur

##### 2.4.14.1 Transiente Transfektion von SII-Zellen

Die transiente Transfektion der SII-Zellen erfolgte mit Hilfe des FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent der Firma *Roche Diagnostics*, Mannheim. Die Anwendung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Dabei wurden jeweils 1 Million Zellen in 2 mL SII-Medium vorgelegt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer Zählkammer. Eine Gesamtmenge von 2 µg DNA wurde mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 100 µL aufgefüllt und mit 4 µL des FuGENE HD Transfektions-Reagenz versehen und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten konnte die gesamte Lösung auf die vorgelegten Zellen gegeben werden. Es folgte ein vorsichtiges Schwenken der Zellen. Sofern die Expression fluoreszenzmarkierter Fusionsproteine erwartet wurde, konnte diese nach etwa 24-72 Stunden an einem Fluoreszenz-Mikroskop überprüft werden.

Zur Vermehrung der Zellen für die Gewinnung größerer Mengen Proteine zur Herstellung von Lysaten wurden die transfizierten Zellen nach ca. 24-30 Stunden, je nach Zelldichte in den Kammern der Transfektionsschale, in Flaschen mit einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> überführt und mit 5 mL frischem Medium versehen. Das weitere Vorgehen zur Gewinnung von Proteinlysaten ist dem Abschnitt 2.5.1.2 zu entnehmen.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Herstellung von Proteinextrakten

#### 2.5.1.1. Herstellung von Proteinextrakten aus Embryonen

Die Proteinextrakte aus Embryonen wurden gewonnen, indem jeweils 10 Embryonen von Apfelsaftplatten mit einer Nadel in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt wurden. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 15 µL 2x SDS-Puffer und die Zerkleinerung der Embryonen mit einem Biovortex. Nachdem die Extrakte für etwa 5-10 Minuten aufgekocht und gegebenenfalls zur Separation von Überresten der Embryonen zentrifugiert wurden, konnten sie eingefroren oder direkt auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden (Abschnitt 2.5.2).

Zur Detektion der Vollängen-Proteinbande von Wde bei etwa 250 kDa erfolgte die beschriebene Prozedur mit jeweils 100 Embryonen in der gleichen Menge SDS-Puffer, um eine höhere Protein-Konzentration zu erzielen.

Eine photometrische Messung der Extrakte war auf Grund des gewählten Puffers nicht möglich, jedoch wurden stets gleiche Mengen Embryonen der verschiedenen Genotypen verwendet.

#### 2.5.1.2 Herstellung von Proteinlysaten aus SII-Zellen

Die Herstellung der Proteinlysate erfolgte je nach Zelldichte etwa 3-4 Tage nachdem die transfizierten Zellen in Flaschen umgesetzt worden waren. Dazu wurden die Zellsuspensionen zunächst in 15 mL Falcon-Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 1000 RPM zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände folgten 2 Waschschriffe mit 1xPBS und jeweils 3 minütiger Zentrifugation bei 1000 RPM. Das Lösen der Zellpellets wurde in Abhängigkeit von der Pelletgröße in 300 bis 1200  $\mu$ L kaltem TNT-Lysispuffer inklusive Proteinase-Inhibitoren durch Hoch- und Herunter-Pipettieren vorgenommen. Nach einer Inkubation auf Eis von 20 Minuten, wurden die Proben in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt, 20 Minuten bei 4°C und 13000 RPM zentrifugiert und anschließend die Überstände in neue Eppendorf-Gefäße dekantiert.

Bevor die Proben auf -80°C eingefroren oder weiterverarbeitet wurden, erfolgte die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes bei OD<sub>600</sub>. Zunächst wurden als Referenz 800  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O und 200  $\mu$ L Bradford-Lösung (*Roti-Quant*, Roth) in einer Küvette gemischt und zum Nullabgleich gemessen. In diese Küvette wurden dann 2  $\mu$ L des zu messenden Proteinextraktes gegeben und erneut gemessen. Nach Einbeziehung des Verdünnungsfaktors ergibt sich die Proteinkonzentration in mg/mL (OD<sub>595</sub>= 1 entspricht etwa 1 mg/mL Gesamtprotein).

Proteinase-Inhibitoren: Die Proteinase-Inhibitoren (Pefabloc, Aprotinin, Pepstatin, Leupeptin) wurden von der Firma *Roche diagnostics*, Mannheim bezogen und nach Herstellerangaben verdünnt.

#### 2.5.2 Western Blot

Die Western Blot-Analyse der Proteine erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Diese wurde mit dem Mini-Protean 3-System der Firma *BioRad*, München nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden für Proteine bis maximal 130 kDa Trenngele mit 10% Polyacrylamid verwendet und für größere Proteine Trenngele mit 7,5% Acrylamid. Die entsprechenden Pipettierschemata sind der Tabelle 2.5.2 zu entnehmen.

Trenngel			Sammelgel	
	10 %	7,5%		
30% Acrylamid BIS (29:1)	2,5 mL	1,9 mL	30% Acrylamid BIS (29:1)	310 µL
1 M Tris pH 8,8 (TrisCl)	2,8 mL	2,8 mL	1 M Tris pH 6,8 (TrisCl)	235 µL
20 % SDS	38 µL	38 µL	20 % SDS	10 µL
demineralisiertes H <sub>2</sub> O	2,1 mL	2,7 mL	demineralisiertes H <sub>2</sub> O	1,3 mL
10 % APS	30 µL	30 µL	10 % APS	10 µL
TEMED	8 µL	8 µL	TEMED	5 µL

**Tabelle 2.5.2: Pipettierschema zur Herstellung von Trenn- und Sammelgelen.** Durch Variation der Acrylamid BIS:dH<sub>2</sub>O-Menge im Trenngel kann die Porengröße an das zu erwartende Fragment angepaßt werden.

Die Proteinextrakte wurden mit SDS-Puffer versehen, aufgekocht und maximal 15 µL Gesamtvolumen pro Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte 1 Stunde bei 200 Volt, bzw. 70 Minuten für besonders große Fragmente, in SDS-Gelelektrophoresepuffer. Zusätzlich wurde als Größenstandard ein Page Ruler Prestained Protein Ladder (*Fermentas*) #0671 auf 10% Gele bzw. #1811 auf 7,5% Gele mit aufgetragen. Der anschließende Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran der Firma *Schleicher und Schuell*, Dassel, wurde mit dem Mini Trans-Blot (*BioRad*, München) nach Herstellerangabe in Western-Transferpuffer durchgeführt. Der Transfer erfolgte auf 1 Stunde bei 4°C und 100 Volt. Nach dem Blotten konnte der Proteintransfer qualitativ überprüft werden, in dem die Membran in Ponceau S geschwenkt wurde. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen vor der Antikörperfärbung erfolgte 1 Stunde in einer Blockierlösung aus 50 mL TBS-T mit 3% Milch (1,5 g Milchpulver) und 1% BSA (0,5 g bovines Serumalbumin). Die anschließende Inkubation mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach 3 zehnmütigen Waschungen der Membran in TBS-T konnte diese für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert werden. Dabei waren die ebenfalls in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörper jeweils mit Meerrettichperoxidase gekoppelt. Nach 3 erneuten Waschungen der Membran erfolgte die Chemilumineszenz-Reaktion. Dafür wurden 3 mL Blotting Substrat Lumineszenz Lösung A und 30 µL Blotting Substrat Starter Lösung B (BM Chemiluminescence Western Blotting Substrate (POD), *Roche*) gemischt und gleichmäßig auf dem Blot verteilt. In einer Photokassette wurde der Blot dann mit Röntgenfilmen versehen, wobei verschiedene

Belichtungszeiten gewählt wurden, bevor die Entwicklung der Filme nach Angaben des Herstellers erfolgte.

### 2.5.3 Coimmunpräzipitation

Für Coimmunpräzipitationen wurden SII-Zellen mit Plasmiden cotransfiziert, welche die zu testenden Fusionsproteine kodierten. Falls die Plasmide einen UAS-Promoter besaßen, erfolgte zusätzlich die Transfektion mit einem Gal4-Treiber-Plasmid. Dabei wurden die Transfektionen, wie in Abschnitt 2.4.14.1 beschrieben, durchgeführt. Die Herstellung der Lysate sowie die Messung der Proteinsgehalte sind den Abschnitten Y und Z zu entnehmen. Dabei sollten die zu testenden Lysate jeweils einen Gesamt-Proteingehalt von 0,5 bis 2 mg in 500 bis 1000  $\mu\text{L}$  TNT-Puffer besitzen. Eine Menge von etwa 50  $\mu\text{L}$  wurden von jedem Lysat abgenommen und für den späteren Western Blot als „Input“ verwendet.

Anschließend wurden die Lysate mit 30  $\mu\text{L}$  Protein-Agarose-A-beads der Firma *Roche diagnostics*, Mannheim versehen, um eventuell auftretende unspezifische Bindungen von Proteinen an die beads stattfinden zu lassen. Nach ca. zweistündiger Inkubation bei 4°C auf einem Taumler folgte ein kurzer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13000 RPM, sowie die Überführung der Überstände in neue 1,5 mL Eppendorf-Gefäße. Im nächsten Schritt wurden die Lysate jeweils in zwei Gefäße zu 500  $\mu\text{L}$  aufgeteilt und mit Antikörpern versehen, welche entweder gegen eines der exprimierten Proteine oder des daran anhängenden Anhänges gerichtet waren bzw. im jeweils zweiten Reaktionsgefäß mit den entsprechenden Präimmunsereen oder Negativkontroll-Antikörpern versehen. Nach erneuter zweistündiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 30  $\mu\text{L}$  Protein-Agarose-A-beads zu jeder Probe und eine Inkubation bei 4°C über Nacht auf einem Taumler. Am folgenden Tag wurden die Proben insgesamt dreimal bei 4°C und 13000 RPM für je drei Minuten zentrifugiert und die beads dabei mit 300-500  $\mu\text{L}$  TNT-Puffer (inklusive Proteinase-Inhibitoren) gewaschen. Dabei erfolgte das Abziehen der Überstände mit einer Hamilton-Spritze (*Hamilton*, Bonaduz, Schweiz). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die beads und die zuvor abgenommenen Inputs mit jeweils 50  $\mu\text{L}$  2xSDS versehen und aufgeköcht. Es folgte die Verarbeitung der so gewonnenen Proben mittels Western Blot-Analyse wie im vorigen Abschnitt erläutert.

### III Ergebnisse:

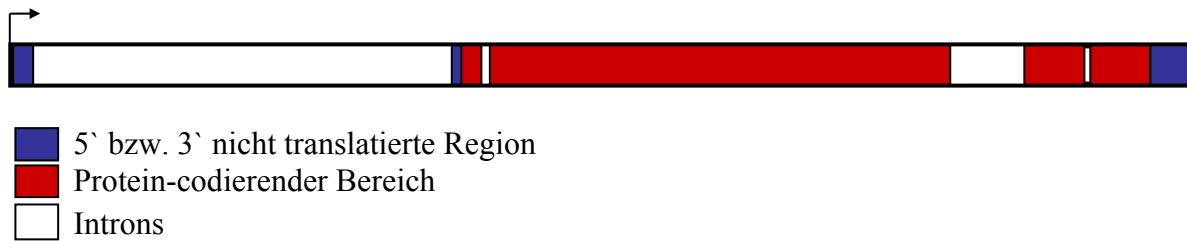
Die Reprimierung der Genexpression spielt eine wichtige Rolle in vielen Entwicklungsstadien und wird häufig über die Modifizierung von Histonen vermittelt. In *Drosophila* sind bereits mehrere Proteine und Proteinkomplexe bekannt, die an verschiedenen Aminosäuren der Histone Modifizierungen vornehmen, so dass das Expressionsmuster von Genen beeinflusst wird. Besonders wichtig ist die Regulation der Transkription in Stammzellen, welche durch Differenzierung in spezialisierte Zelltypen ihren Stammzellcharakter verlieren würden.

Die Methylierung des Histons 3 am Lysin 9 (H3K9) führt zu einer höheren Kondensierung des Chromatins und macht somit die DNA dieses Bereiches weniger zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie. Eine der Methyltransferasen, die die Methylierung an dieser Aminosäure vermittelt, ist Eggless. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym essentiell für die Trimethylierung von H3K9 in der *Drosophila* Oogenese ist, wo das Fehlen dieses Proteins sowohl die Keimbahnstammzellen wie auch somatische Follikelstammzellen derart betrifft, dass ein Arrest der Oogenese und somit eine Sterilität der Weibchen verursacht wird (Clough et al., 2007).

In Säugetieren bindet das Eggless Homolog SETDB1 an den Cofaktor mAM/MCAF, welcher für die Konversion von H3K9me2 in H3K9me3 durch SETDB1 essenziell ist. Das *Drosophila* Homolog dieses Cofaktors, das vorhergesagte Gen *CG12340*, sollte daher näher untersucht werden, wobei verschiedene Methoden zur Anwendung kamen, um die mögliche Funktion dieses Gens bzw. seines Genproduktes als potenzieller Bindungspartner von Eggless innerhalb der Oogenese näher zu untersuchen.

#### 3.1 Untersuchung der verschiedenen Allele von *CG12340*

Die genomische Struktur von *CG12340* umfasst 5 Exons und 4 Introns, wobei der vorhergesagte Translationsstart im zweiten Exon liegt und der Translationsstop im fünften. Diese Daten sind der Annotierung von *CG12340* auf der Internetseite von FlyBase (<http://flybase.org/>) zu entnehmen, wobei der kodierende Bereich des Gens durch einen EST-Klon (*Drosophila Genomics Resource Center*, Klon GH06075), welcher die vorhergesagte cDNA auf ganzer Länge bestätigt hat, verifiziert wurde.



**Schema 3.1: Die genomische Struktur von *CG12340* umfasst 5 Exons.** Das Schema zeigt maßstabsgetreu die genomische Anordnung von *CG12340*. Dabei sind die nicht translatierten Bereiche in Blau, die Introns in Weiß und die Protein-codierenden Regionen in Rot dargestellt.

### 3.1.1 Untersuchung zur Insertionsposition der P-Elementlinien

Da die folgenden Experimente, welche auf den verschiedenen Allelen von *CG12340* basieren, unter der Voraussetzung durchgeführt wurden, dass es sich bei den auf der FlyBase-Internetseite angegebenen P-Element-Insertionslinien tatsächlich um Allele des Gens *CG12340* handelt, mussten die Insertionsorte zunächst verifiziert werden. Dafür wurde die genomische DNA von Fliegen der entsprechenden Stämme isoliert und für Polymerase-Ketten-Reaktionen verwendet. Die Generierung der Primerpaare erfolgte dabei unter der Annahme, dass die vorhergesagten Insertionsorte zutreffend sind. Jeweils ein Primer war so gewählt, dass er an die genomische DNA von *CG12340* bzw. seiner unmittelbaren Umgebung bindet und der andere so, dass er eine Sequenz innerhalb der P-Elemente erkennt.

Für alle getesteten P-Elemente wurden Banden erhalten, welche eine Insertion zumindest in unmittelbarer Nähe der jeweils vorhergesagten Position bestätigten. Diese wurden anschließend sequenziert, um den genauen Insertionsort zu bestimmen (Tabelle 3.1.1.1). Dabei ergab sich, dass die beiden P-Elemente in den Linien P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> und P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> an der gleichen Stelle innerhalb des dritten Exons von *CG12340* inseriert haben (Tabelle 3.1.1.1). Somit scheint dieser Bereich von *CG12340* ein bevorzugter Insertionsort für verschiedene Arten von P-Elementen zu sein.

Die P-Element-Insertionslinie P{EP}EP2024 trägt eine vorhergesagte P-Element-Insertion 46 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart von *CG12340*. Diese besitzt eine „*upstream activating sequence*“ und sollte somit in der Lage sein, die Expression von *CG12340* mittels Gal4-Treiber zu vermitteln. Daher war hier neben der Bestimmung des Insertionsortes auch ausschlaggebend, in welcher Orientierung das P-Element inseriert hat.

Tatsächlich hat die Insertion 41 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart stattgefunden, aber mit geeigneter Orientierung für die Überexpression von *CG12340* (Tabelle 3.1.1.1).

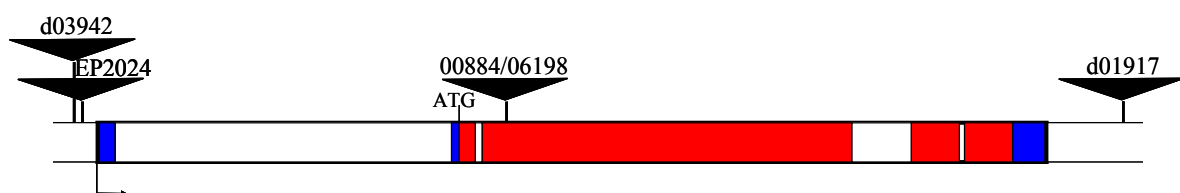
Für die Erzeugung eines Nullallels von *CG12340* mittels Transdeletion sollten zudem die P-Element-Insertionslinien P{XP}d03942 und P{XP}d01917 verwendet werden. Es war daher notwendig, sowohl die Insertions-Positionen wie auch die Orientierungen zu verifizieren.

Beide P-Elemente befinden sich etwa an vorhergesagter Stelle und besitzen die gleiche Orientierung (Tabelle 3.1.1.1), somit sind sie für die Generierung eines Transdeletions-Allels geeignet.

P-Element-Insertionslinie	tatsächlicher Insertionsort	Orientierung des P-Elementes
P{EP}EP2024	6696473	+
P{EPgy2}CG12340 <sup>EY00884</sup>	6692742	-
P{XP}CG12340 <sup>d06198</sup>	6692742	+
P{XP}d03942	6696472	+
P{XP}d01917	6686413	+

**Tabelle 3.1.1.1: Vergleich der vorhergesagten und der tatsächlichen Insertionsorte verschiedener P-Element-Linien unter teilweiser Angabe der jeweiligen Orientierung.** Die Tabelle gibt Aufschluss über die jeweils tatsächlichen Insertionsorte der verschiedenen P-Elemente. Außerdem ist der Tabelle zu entnehmen, welche Orientierung die XP-Elemente in den Linien P{XP}d01917 und P{XP}d03942 besitzen, sowie das EP-Element. Die Positionen sind an der Flybase-Annotierung orientiert (siehe Anhang). (+ bedeutet in Orientierung von Windei, - bedeutet in Gegenrichtung)

Zusammenfassend haben die beiden P-Elemente P{EP}EP2024 und P{XP}d03942 vor dem Transkriptionsstart des Gens und P{XP}d01917 hinter dem Translationsstop inseriert, während die beiden P-Elemente P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> und P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> an derselben Position innerhalb des dritten Exons lokalisiert wurden (Schema 3.1.1.2).



**Schema 3.1.1.2: Das Schema zeigt die Insertionsorte der P-Elemente in Bezug auf die Lokalisierung innerhalb von CG12340 bzw. dessen Umgebung.** Die Insertion von P{XP}d03942 und P{EP}EP2024 erfolgte 40 bzw. 41 Basenpaare vor der genomischen Sequenz von CG12340, die von P{XP}d01917 hinter dieser. Dagegen haben die P-Elemente P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> und P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> innerhalb des Protein-codierenden Bereiches von CG12340 inseriert.



### 3.1.2 Komplementationstest mit den Insertionslinien und einer Defizienz

Nachdem die homozygot lebensfähigen Insertions-Linien P{EP}EP2024, P{XP}d01917 und P{XP}d03942 jeweils in nicht codierenden Bereichen in und um *CG12340* inseriert haben, beschränkten sich die Komplementationstests auf die homozygot letalen Stämme von P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup>. Da diese jeweils an der gleichen Stelle innerhalb des dritten Exons von *CG12340* inseriert hatten, wurde damit gerechnet, dass sie sich gegenseitig nicht komplementieren können, da sie mutante Allele desselben Gens darstellen. Dies ist tatsächlich der Fall, da die beiden Allele auch transheterozygot letal sind (Tabelle 3.1.2.1). Ebenfalls kann P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> die Defizienz Df(2R)27 nicht komplementieren, welche mehrere Gene des rechten Chromosomenarms deletiert, inklusive *CG12340*. Somit stellen P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> zwei mutante Allele von *CG12340* dar.

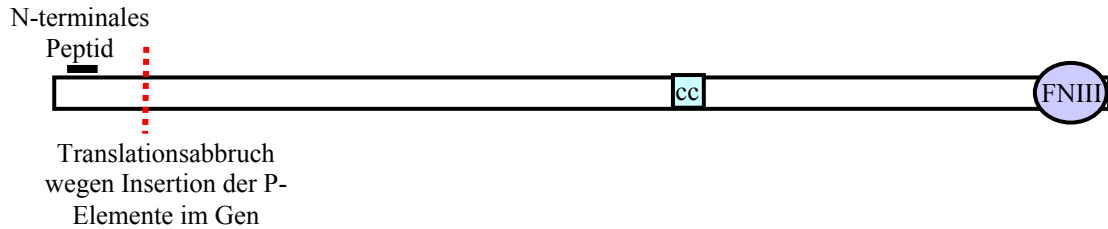
♀ \ ♂	P{EPgy2} CG12340 <sup>EY00884</sup> / CyO	P{XP} CG12340 <sup>d06198</sup> / CyO	Df(2R)27/ CyO
P{EPgy2} CG12340 <sup>EY00884</sup> / CyO	—	—	—
P{XP} CG12340 <sup>d06198</sup> / CyO	—	—	n.d.

**Tabelle 3.1.2.1: Die P-Element-Insertionslinien P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> komplementieren nicht die Letalität und sind somit Allele von *CG12340*.** Die Tabelle zeigt das Ergebnis eines Komplementationstests, wobei jungfräuliche Weibchen von P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> mit Männchen der jeweils anderen Linie bzw. auch einer Defizienz gekreuzt wurden. Die beiden P-Element-Linien P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> komplementieren dabei gegenseitig nicht die Letalität und P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> auch nicht transheterozygot über einer Defizienz. Die Abkürzung n.d. steht für nicht durchgeführt.

### 3.1.3 Analyse der mutanten Allele mittels Western Blot

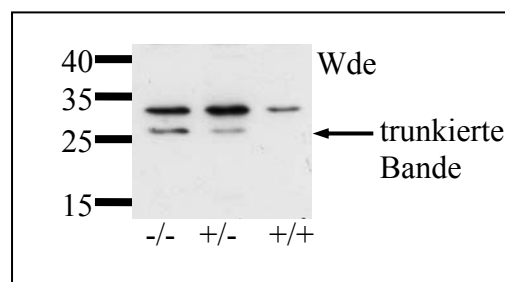
In genetischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die P-Element-Insertionen der Linien P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> zu mutanten Allelen von *CG12340* geführt haben (Abschnitte 3.4.2.2 und 3.6.3.4), daher sollten diese Allele auch auf Proteinebene analysiert werden. Es ist dabei zu erwarten, dass es durch die jeweiligen P-Element-Insertionen zur Verschiebung des Leserasters und somit zum vorzeitigen Abbruch der Translation kommt. Ein möglicherweise trunkiertes Protein sollte allerdings vom

affinitätsgereinigten Antikörper 033845 detektiert werden können, da dieser ein N-terminales Peptid erkennt (Schema 3.1.3.1).



**Schema 3.1.3.1:** Die maßstabsgetreue, schematische Darstellung von CG12340 zeigt das Peptid, gegen das der Antikörper gerichtet ist, sowie den vermutlichen Ort des Translationsabbruchs auf Grund der P-Element-Insertionen. Die angegebenen Domänen wurden über die Domänenanalyse der SMART-Internetseite gefunden.

Es wurde zunächst ein Western Blot mit Embryonen des P-Element-Insertions-Stammes P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup>/ CyO *twi::GFP* durchgeführt. Dabei wurden die Embryonen über das Vorhandensein von GFP sortiert und anschließend Lysate aus je 10 homozygot mutanten, 10 homozygot GFP exprimierenden und 10 heterozygoten Embryonen hergestellt und im Western Blot eingesetzt. Dort erkennt der affinitätsgereinigte CG12340 Antikörper eine Bande bei etwa 26 kDa in den homozygot mutanten Embryonen und etwas schwächer auch in den heterozygoten, nicht jedoch in den Embryonen, welche homozygot den Balancer besaßen (Abbildung 3.1.3.2).



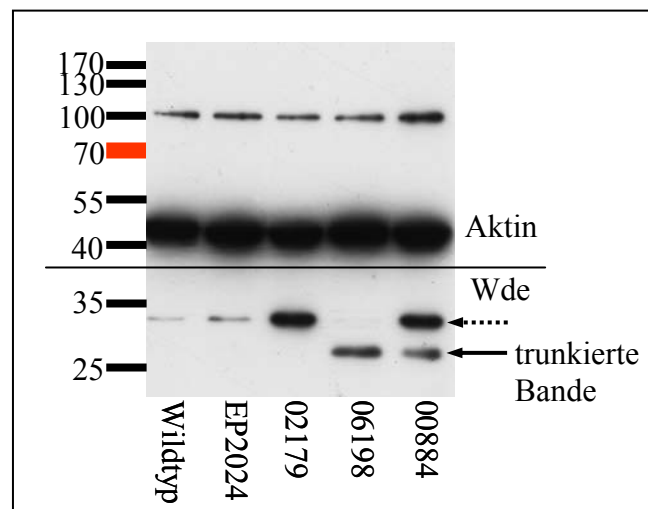
**Abbildung 3.1.3.2:** Der gegen ein N-terminales Peptid von CG12340 gerichtete Antikörper 033845 erkennt ein trunkiertes Protein von etwa 26 kDa in mutanten Embryonen des Allels P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup>. Für den abgebildeten Western Blot wurden Proteinlysate von je 10 Embryonen eingesetzt, welche zuvor auf GFP-Expression untersucht worden waren. Dabei wurden homozygot mutante (-/-), heterozygote (+/-) und homozygot den Balancer tragende (+/+) Embryonen unterschieden. Es läßt sich in mutanten Embryonen ein trunkiertes Protein der Größe 26 kDa detektieren.

Da die beiden P-Elemente in den Insertionslinien P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> an der gleichen Stelle im Genom insertiert haben, war zu erwarten, dass

sich eine trunkierte Bande derselben Größe auch für homozygote Embryonen von P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> zeigen lässt.

Tatsächlich kann eine solche Proteinbande in den homozygoten Embryonen der Linie P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> nachgewiesen werden (Abbildung 3.1.3.3, Pfeil).

Zusätzlich wurden auch Lysate aus je 10 homozygoten Embryonen der Linien P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup>, P{EP}EP2024 und P{EPgy2}CG12340<sup>EY02179</sup> sowie des Wildtyps als Kontrolle aufgetragen. Dabei wird deutlich, dass eine verstärkte Bande von etwa 30 kDa nur in den Lysaten von Embryonen der Linien P{EPgy2}CG12340<sup>EY02179</sup> und P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> auftritt (gestrichelter Pfeil). Beide Linien entstammen dem gleichen P-Element-Insertions-Screen. Hierfür werden isogenisierte Chromosomen verwendet, um zu gewährleisten, dass ein identischer genetischer Hintergrund besteht. Die oben genannte Bande stellt daher gegenüber dem Wildtyp ein Artefakt dar, bedingt durch den genetischen Hintergrund der im Screen verwendeten Fliegen.



**Abbildung 3.1.3.3: Der gegen ein N-terminales Peptid von *CG12340* gerichtete Antikörper 033845 erkennt ein trunkiertes Protein von etwa 26 kDa in mutanten Embryonen der Allele P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup>.** Für den abgebildeten Western Blot wurden Proteinlysate von je 10 homozygoten Embryonen der Linien P{EP}EP2024, P{EPgy2}CG12340<sup>EY02179</sup>, P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup>, P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> und des Wildtyps eingesetzt. Es lässt sich in mutanten Embryonen der Linien P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> jeweils ein trunkiertes Protein der Größe 26 kDa detektieren (Pfeil). Die wildtypische Bande der Embryonen der homozygot lebensfähigen Linien P{EP}EP2024, P{EPgy2}CG12340<sup>EY02179</sup> und des Wildtyps lässt sich auf diesem Proteingel zur Auftrennung kleiner Fragmente nicht detektieren. Die P-Element-Insertionslinie P{EPgy2}CG12340<sup>EY02179</sup>, welche nicht im codierenden Bereich von *CG12340* inseriert hat, dient hier zum Nachweis, dass die ebenfalls für P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> detektierte, verstärkte Bande von etwa 30 kDa Größe ein Artefakt aus dem P-Element-Insertions-Screen ist (gestrichelter Pfeil). Die Aktin-Lade-Kontrolle dient der Vergleichbarkeit der geladenen Proteinmengen.

Zusammengefaßt verfügen die beiden mutanten Allele von *CG12340*, P{EPgy2}*CG12340*<sup>EY00884</sup> und P{XP}*CG12340*<sup>d06198</sup>, lediglich noch über ein stark trunkiertes Protein, wobei die Translation deutlich vor den konservierten Domänen des Wildtyp-Proteins abbricht. Die Auswirkung dieser Mutation wird in Abschnitt 3.4.4.1 näher untersucht.

## 3.2 Herstellung eines Nullallels von *CG12340*

### 3.2.1 Herstellung eines Nullallels von *CG12340* durch Entfernung der gesamten Genkassette mittels Transdeletion

Die Herstellung eines Nullallels von *CG12340* mittels Transdeletion erfolgte wie in Kapitel 2.2.4 (Material und Methoden) beschrieben nach Parks et al., 2004.

Nach der hitzeschockinduzierten Rekombination zwischen den FRT-Sequenzen der XP-Elemente (Abbildung 3.2.1.1) wurden die F1-Weibchen gegen Balancer-Tiere ausgekreuzt (Kapitel 2.2.4) und die männlichen Nachkommen der Folgegeneration in Einzelkreuzungen erneut mit Balancer-Tieren verpaart. Da aus den Versuchen zur Analyse der mutanten Allele P{EPgy2}*CG12340*<sup>EY00884</sup> und P{XP}*CG12340*<sup>d06198</sup> bereits bekannt war, dass diese Stämme homozygot letal sind, bedingt durch die Mutationen in *CG12340*, wurde auch bei diesem Experiment vorab nach homozygot letalen Stämmen gesucht.

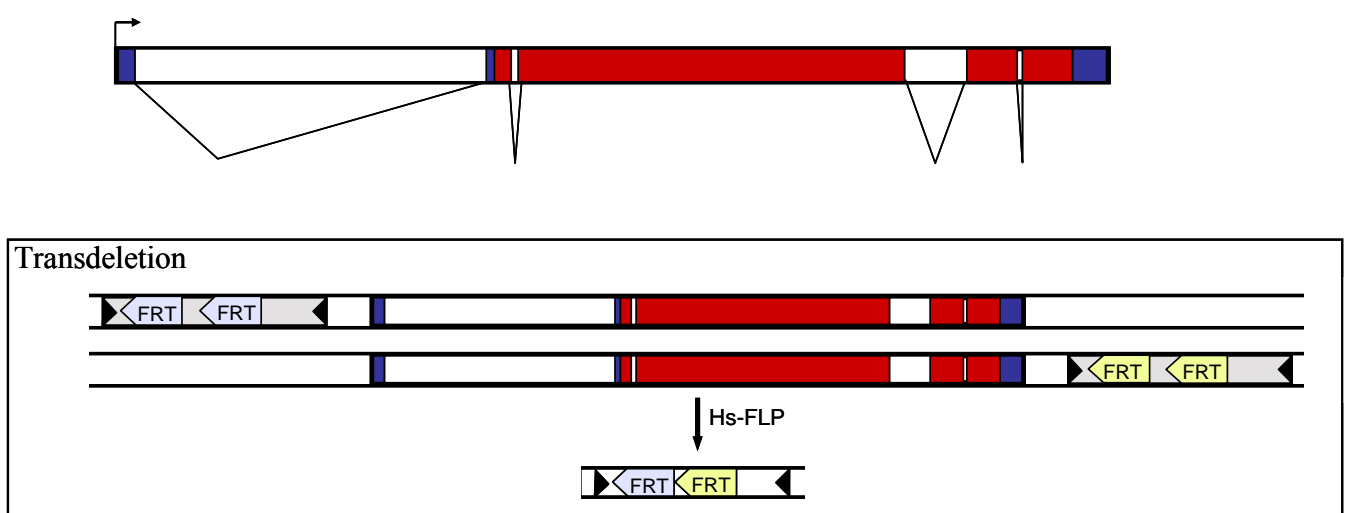


Abbildung 3.2.1.1: Übersicht über die genomische Struktur von *CG12340* und die Erzeugung eines Transdeletions-Chromosoms mittels Hitzeschock-vermittelter Flipase

Durch Komplementationstests mit anderen mutanten Allelen von *CG12340* und einer Defizienz wurde verifiziert, ob die letalen Stämme ein mutantes Allel von *CG12340* darstellen. Dabei stellte sich heraus, dass die erhaltenen letalen Stämme Transdeletion (TD) 8, 12, 55 und 63 tatsächlich neue Allele von *CG12340* darstellen, da keine Komplementation mit den getesteten Allelen von *CG12340* auftrat (Tabelle 3.2.1.2).

♀ +	♂	P{EPgy2} CG12340 <sup>EY00884</sup> / CyO	TD8/ CyO
P{EPgy2} CG12340 <sup>EY00884</sup> / CyO		—	—
	TD12/ CyO	—	n.d.
	TD55/ CyO	—	n.d.
	TD63/ CyO	—	n.d.

**Tabelle 3.2.1.2: Die P-Element-Insertionslinie P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> komplementiert nicht die Letalität der neuen Transdeletions-Allele.** Die Tabelle zeigt das Ergebnis eines Komplementationstests, wobei jungfräuliche Weibchen von P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> bzw. der Transdeletions-Allele mit Männchen der jeweils anderen Linie gekreuzt wurden. Die P-Element-Linie P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> komplementiert dabei nicht die Letalität der neuen Allele, welche somit neue mutante Allele von *CG12340* darstellen. Die Abkürzung n.d. steht für nicht durchgeführt.

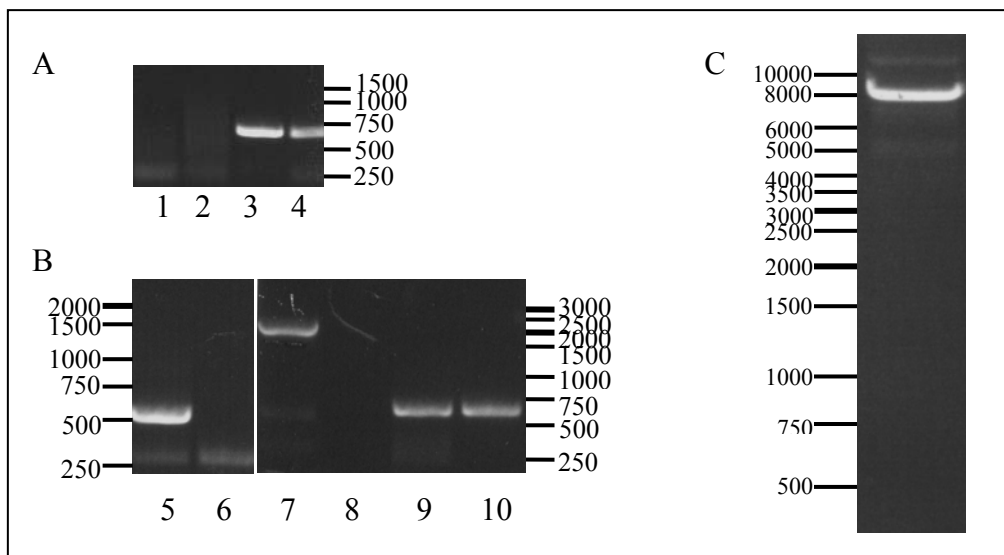
Im weiteren Verlauf wurde mit der Transdeletions-Linie TD63 weiter gearbeitet. Um die Mutation genauer zu untersuchen, wurden PCR-Tests auf genomischer DNA von Fliegen des potentiellen Allels über einem Balancerchromosom mit CyO durchgeführt, welche zeigten, dass die jeweils äußeren, von *CG12340* weiter entfernt gelegenen, Enden der P-Elemente noch auf dem mutanten Chromosom vorhanden sind, nicht jedoch die jeweils inneren Enden (Abbildung 3.2.1.3, A).

Zusätzliche PCR-Tests auf DNA von homozygoten Larven, welche durch Sortieren von je 5 Larven des potentiellen neuen Allels über einem twist-GFP-CyO Balancer nach dem Fehlen von GFP erhalten wurden, zeigten, dass die getesteten genomischen Bereiche innerhalb von *CG12340* inklusive des Translationsstartes fehlen (Abbildung 3.2.1.3, B). Somit handelt es sich hier um ein neues Allel von *CG12340*.

Um jedoch sicherzugehen, dass nicht nur Teile von *CG12340*, sondern der gesamte genomische Bereich zwischen den rekombinierenden FRT-Sequenzen exzidiert wurde, diente eine „Long Template PCR“, welche es ermöglicht, besonders lange DNA-Fragmente zu amplifizieren. Dabei wurde ein Primer stromaufwärts des 1. P-Elementes und ein zweiter

stromabwärts des 2. P-Elementes gewählt, sodass diese die beiden P-Elemente und den von ihnen flankierten genomischen Bereich amplifizieren konnten.

Denkbar wäre, dass ohne stattgefundenene Rekombination nur jeweils eines der P-Elemente und die wildtypische genomische Sequenz von *CG12340* erhalten würden. Da aber die vorhergehenden PCR-Tests bereits das Fehlen von genomischen Bereichen von *CG12340* bestätigt hatten, wurde nur mit zwei der möglichen Banden gerechnet, mit der wildtypischen Bande vom Balancer-Chromosom, welche jedoch durch die gewählten PCR-Bedingungen nicht erhalten werden konnte, und mit dem PCR-Fragment, welches die Transdeletion flankiert. Tatsächlich wurde eine Bande im erwarteten Größenbereich erhalten, deren Enden nach erfolgter Aufreinigung der DNA ansequenziert und als Transdeletion bestätigt wurden (Abbildung 3.2.1.3, C).



**Abbildung 3.2.1.3: Der PCR-Test zeigt, dass das potenzielle Transdeletions-Allel tatsächlich die erwartete Deletion trägt und dass die Rekombination zwischen den beiden die P-Elemente tragenden Chromosomen inklusive der Transdeletion der flankierten genomischen DNA in der Linie TD63 stattgefunden hat.** **A** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der PCR auf genomischer DNA heterozygoter Fliegen von TD63 mit 4 Primerpaaren, wobei Primerpaar 1 den Übergang zwischen dem rechten Ende des linken P-Elementes und der genomischen DNA amplifiziert und Primerpaar 2 den Übergang zwischen dem linken Ende des rechten P-Elementes und der genomischen DNA. Das Fehlen der Banden beweist den Verlust der beiden inneren P-Elementenden. Dagegen werden die beiden Banden, welche die Übergänge zwischen dem rechten Ende des rechten P-Elementes zur genomischen DNA (Primerpaar 3) und den Übergang des linken Endes des linken P-Elementendes zur genomischen DNA (Primerpaar 4) amplifizieren, nach wie vor detektiert. **B** Der Abbildung ist das Gelbild einer PCR auf der DNA von Larven der Transdeletions-Fliegen über einem GFP-Balancer zu entnehmen, wobei die Larven über das Fehlen bzw. Vorhandensein von GFP sortiert worden waren. 6, 8 und 10 markieren Spuren, in denen die DNA von homozygot mutanten Larven für die PCR verwendet wurde. Dagegen wurde in 5, 7 und 9 die DNA heterozygoter Larven eingesetzt. In den ersten beiden Spuren wurde ein Primerpaar zur Amplifizierung innerhalb der GFP-Sequenz verwendet, in den nächsten beiden ein Primerpaar zur Amplifizierung genomischer DNA von *CG12340* um die Region des Translationsstartes und in den letzten beiden ein Primerpaar zum Test der beiden DNA-Fraktionen in einem Bereich stromaufwärts von *CG12340*. Die PCR-Tests belegen,

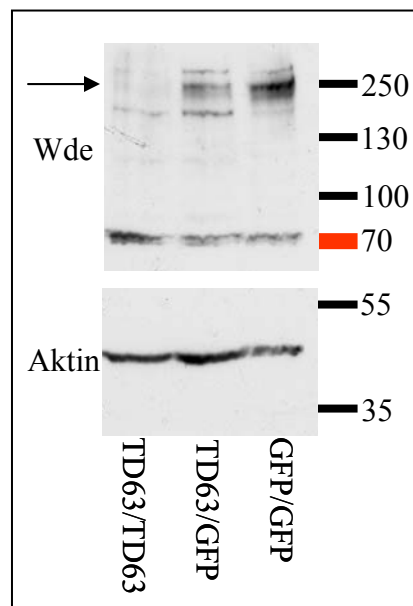
dass die DNA beider Fraktionen intakt war, aber nur in den homozygoten Larven ein genomischer Bereich von *CG12340* fehlt. C Diese PCR erfolgte auf genomischer DNA heterozygoter Fliegen des TD63 Stammes mit einem Primerpaar, welches die beiden P-Elemente flankiert und ergab eine etwa 8000 Basenpaar große Bande. Diese konnte nur erhalten werden, wenn die Rekombination zwischen den beiden, die P-Elemente tragenden Chromosomen inklusive der Exzision der gesamten genomischen DNA von *CG12340* stattgefunden hatte.

Dies bedeutet, dass eine Rekombination zwischen den beiden, die P-Elemente tragenden Chromosomen stattgefunden haben musste, da das linke Ende des stromaufwärts gelegenen und das rechte Ende des stromabwärts gelegenen P-Elementes durch die PCR detektiert wurden. Auch die Größe der Bande ist nur erklärbar durch die Exzision des gesamten Bereiches zwischen den FRT-Sequenzen der beiden P-Elemente, inklusive der vollständigen Genkassette von *CG12340*.

Zusammenfassend belegen diese Resultate, dass ein mutantes Allel von *CG12340* erhalten wurde, welches durch das Fehlen des gesamten genomischen Bereiches von *CG12340* als Nullallel bezeichnet werden kann.

### 3.2.2 Analyse des Transdeletions-Allels mittels Western Blot

Die Ergebnisse des vorigen Abschnittes belegen bereits auf genetischer Ebene, dass die Transdeletion erfolgreich war und die erhaltenen und getesteten Linien neue mutante Allele von *CG12340* darstellen. Jedoch sollte auch überprüft werden, ob das *CG12340*-Protein in homozygoten Embryonen dieser Tiere fehlt. Dazu wurden Embryonen auf das Vorhandensein von GFP-Expression eines *Cyo twi::GFP*-Balancers hin sortiert. Aus jeweils 10 Embryonen der homozygot mutanten, der heterozygoten und der Fraktion, welche homozygot für den Balancer war, wurden Proteinlysate hergestellt und auf ein Proteingel aufgetragen. Dabei ergab sich bei Beladung mit gleichen Proteinmengen (Abbildung 3.2.2.1, Aktin-Lade-Kontrolle), dass die wildtypische Proteinbande von *CG12340* in den homozygot mutanten Embryonen fehlt und in den heterozygoten Embryonenlysaten schwächer ist, als in der GFP-Kontrolle (Abbildung 3.2.2.1, Pfeil). Diese Bande hat neben weiteren detektierten Abbaubanden des Proteins eine Größe von etwa 250 kDa, wobei nur 156 kDa erwartet würden. Wie in Abschnitt 3.7.1 erwähnt, ist diese Verschiebung in der Bandengröße höchstwahrscheinlich auf posttranslationale Modifikationen des Proteins zurückzuführen.



**Abbildung 3.2.2.1: Die wildtypische Proteinbande von CG12340 fehlt in den homozygot mutanten Embryonen des Transdeletions-Allels.** Für den abgebildeten Western Blot wurden Proteinlysate von je 10 Embryonen eingesetzt, welche zuvor auf GFP-Expression untersucht worden waren. Dabei wurden homozygot mutante (TD63/TD63), heterozygote (TD63/GFP) und homozygot den Balancer tragende (GFP/GFP) Embryonen unterschieden. Das wildtypische Protein zeigt in den GFP-Kontroll-Embryonen und schwächer in den heterozygoten Embryonen eine Größe von etwa 250 kDa, wobei die erhöhte Laufhöhe vermutlich auf posttranslationalen Modifikationen des Proteins beruht. Diese Bande fehlt in den homozygot mutanten Embryonen. Etwaige, sehr schwache Abbaubanden in dieser Spur sind wahrscheinlich auf eine maternale Proteinkomponente zurückzuführen. Eine Aktin-Lade-Kontrolle bestätigt die gleichmäßige Beladung des Gels mit Proteinlysate.

Die Auswirkung des Fehlens des CG12340-Proteins wird in den Abschnitten 3.4.2.2 und 3.4.4.1 näher untersucht.

### 3.3 Rettungsexperimente

#### 3.3.1 Rettung von *CG12340* homozygot mutanten Tieren mittels UAS-*GFP-CG12340*-Konstrukt und *daughterless* Gal4 Treiber

Das Rettungsexperiment wurde wie in Kapitel 2.2.5 (Material und Methoden) beschrieben durchgeführt. Anschließend erfolgte die Auszählung der erhaltenen Tiere dahingehend, ob sie zur Fraktion der geretteten Tiere zählen oder zu den übrigen Tieren mit Balancer-Chromosomen.

Dabei wurde das Experiment mit verschiedenen Kreuzungsansätzen bzw. Balancer-Chromosomen durchgeführt und wird hier exemplarisch anhand eines Ansatzes gezeigt:



$$1.) \text{ P: } \begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{+} \end{array} \frac{\text{TD63}}{\text{CyO}} ; \frac{\text{UAS::GFP-CG12340 (23)}}{\text{TM6b}} \times \begin{array}{c} \text{♂} \\ \text{+} \end{array} \frac{\text{TD63}}{\text{CyO}} ; \frac{\text{daughterless Gal4}}{\text{TM6b}}$$

Die möglichen F1-Genotypen ergeben sich aus dem Kreuzungsschema 3.3.1.1.

♀ \ ♂	TD63; <i>da Gal4</i>	TD63; TM6b	CyO; <i>da Gal4</i>	CyO; TM6b
TD63; UAS::GFP	$\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{da Gal4}}{\text{---}}$ $\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{UAS::GFP}}{\text{---}}$	$\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$ $\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{UAS::GFP}}{\text{---}}$	$\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{da Gal4}}{\text{---}}$ $\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{UAS::GFP}}{\text{---}}$	$\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$ $\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{UAS::GFP}}{\text{---}}$
TD63; TM6b	$\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{da Gal4}}{\text{---}}$ $\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$	$\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$ $\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$	$\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{da Gal4}}{\text{---}}$ $\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$	$\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$ $\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$
CyO; UAS::GFP	$\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{da Gal4}}{\text{---}}$ $\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{UAS::GFP}}{\text{---}}$	$\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$ $\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{UAS::GFP}}{\text{---}}$	$\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{da Gal4}}{\text{---}}$ $\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{UAS::GFP}}{\text{---}}$	$\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$ $\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{UAS::GFP}}{\text{---}}$
CyO; TM6b	$\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{da Gal4}}{\text{---}}$ $\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$	$\frac{\text{TD63}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$ $\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$	$\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{da Gal4}}{\text{---}}$ $\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$	$\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$ $\frac{\text{CyO}}{\text{---}} ; \frac{\text{TM6b}}{\text{---}}$

**Kreuzungsschema 3.3.1.1: Übersicht über die theoretisch erhaltenen Genotypen innerhalb der F1-Generation.** Der Rot hinterlegte Genotyp spiegelt die geretteten Fliegen dar. Grau hinterlegte Genotypen sind letal. Abkürzungen: UAS::GFP= UAS::GFP-CG12340 (23); *da Gal4*= *daughterless Gal4*.

In Kreuzungsschema 3.3.1.1 stellt der Rot markierte Genotyp die geretteten Tiere dar. Die Kreuzung entspricht einem dihybriden, nicht gekoppelten Erbgang. Statistisch betrachtet sollten 1/7 aller F1 Nachkommen gerettete Tiere sein. Dies entspricht 14,3%. Erhalten wurden 15,8% gerettete Tiere.

Bei dem reziproken Ansatz (2.) sowie der Verwendung eines MKRS- statt des TM6b-Balancers (3.) wurden 14,0 und 14,9% gerettete Tiere erhalten (Tabelle 3.3.1.2).

Kreuzung:	Gesamtzahl F1	Anzahl erwarteter geretteter Tiere		Anzahl erhaltener geretteter Tiere	
		relativ	absolut	relativ	absolut
1)	120	14,3%	17	15,8%	19
2)	47	14,3%	7	14,9%	7
3)	107	14,3%	15	14,0%	15

**Tabelle 3.3.1.2: Die verschiedenen Rettungskreuzungen haben jeweils eine Anzahl geretteter F1-Tiere ergeben, die den Erwartungen gleich oder sehr nahe kommt .** Der Tabelle ist zu entnehmen, wie viele Nachkommen der verschiedenen Kreuzungen insgesamt ausgezählt wurden und ob die Anzahl geretteter F1-Tiere relativ bzw. absolut den erwarteten Zahlen entsprechen. Dabei wurde bei der Anzahl erwarteter Tiere auf ganze Zahlen gerundet.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Rettung der Letalität des mutanten *CG12340*-Allels mit Hilfe des *GFP-CG12340*-Konstruktes unter der Kontrolle von *daughterless*-Gal4 erfolgreich ist. Wie jedoch in Abschnitt 3.4.4.4 gezeigt wird, ist dieser Gal4-Treiber nicht in der Lage, die Fertilität der geretteten Weibchen zu gewährleisten. Daher wurde im folgenden Experiment ein *tubulin*-Gal4-Treiber getestet.




### 3.3.2 Rettung von *CG12340* homozygot mutanten Tieren mittels UAS-

#### *CG12340-GFP* Konstrukt und *tubulin*-Gal4-Treiber

In einem weiteren Rettungsexperiment wurde statt des *daughterless*-Gal4-Treibers ein *tubulin*-Gal4-treiber verwendet, um das UAS::*GFP-CG12340*-Konstrukt zu exprimieren. Dabei wurde folgende Kreuzung durchgeführt:

$$P: \begin{array}{c} \text{♀} \\ \text{+} \end{array} \frac{\text{TD63}}{\text{CyO}} ; \frac{\text{UAS}::\text{GFP-}CG12340 (23)}{\text{UAS}::\text{GFP-}CG12340 (23)} \times \begin{array}{c} \text{♂} \\ \text{○} \end{array} \frac{\text{TD63}}{\text{CyO}} ; \frac{\text{tubulin Gal4}}{\text{MKRS}}$$

Kreuzungsschema 3.3.2.1 fasst die möglichen F1-Genotypen zusammen.

 		TD63; <i>tub Gal4</i>	TD63; MKRS	CyO; <i>tub Gal4</i>	CyO; MKRS
TD63; UAS:: <i>GFP</i>	TD63 <i>tub Gal4</i> — ; — TD63 UAS:: <i>GFP</i>	TD63 MKRS — ; — TD63 UAS:: <i>GFP</i>	CyO <i>tub Gal4</i> — ; — TD63 UAS:: <i>GFP</i>	CyO MKRS — ; — TD63 UAS:: <i>GFP</i>	
CyO; UAS:: <i>GFP</i>	TD63 <i>tub Gal4</i> — ; — CyO UAS:: <i>GFP</i>	TD63 MKRS — ; — CyO UAS:: <i>GFP</i>	CyO <i>tub Gal4</i> — ; — CyO UAS:: <i>GFP</i>	CyO MKRS — ; — CyO UAS:: <i>GFP</i>	

**Kreuzungsschema 3.3.2.1: Übersicht über die möglichen F1-Genotypen der Kreuzung zur Rettung der Letalität der Transdeletion mittels *tubulin Gal4*-Treiber.** Der ROT hinterlegte Genotyp stellt die geretteten Tiere dar. Grau hinterlegte Genotypen sind letal. Abkürzungen: UAS::*GFP*= UAS::*GFP-CG12340* (23); *tub Gal4*= *tubulin Gal4*

In Kreuzungsschema 3.3.2.2 stellt der Rot markierte Genotyp die geretteten Tiere dar. Die Kreuzung entspricht einem dihybriden, nicht gekoppelten Erbgang. Statistisch betrachtet sollten 20% aller F1 Nachkommen gerettete Tiere sein. Erhalten werden etwa 12,7% (Tabelle 3.3.2.2).

Kreuzung:	Gesamtzahl F1	Anzahl erwarteter geretteter Tiere		Anzahl erhaltener geretteter Tiere	
		relativ	absolut	relativ	absolut
1)	221	20,0%	44	12,7%	28

**Tabelle 3.3.2.2: Die Rettungskreuzung hat 12,7% gerettete F1-Tiere ergeben.** Der Tabelle ist zu entnehmen, wie viele Nachkommen der Kreuzung insgesamt ausgezählt wurden und ob die Anzahl geretteter F1-Tiere relativ bzw. absolut der erwarteten Zahl entspricht. Dabei wurde bei der Anzahl erwarteter Tiere auf eine ganze Zahl gerundet.

Zusätzlich sollte in diesem Fall getestet werden, ob die DNA der geretteten Fliegen tatsächlich den erwarteten Genotyp widerspiegelt. Daher wurde jeweils die DNA von einer einzigen Fliege präpariert, um auszuschließen, dass bei Verwendung von DNA aus 30 Fliegen maskiert würde, wenn einzelne einen anderen Genotyp aufwiesen. Tatsächlich besaßen alle getesteten Tiere den erwarteten Genotyp (siehe Anhang).

### 3.4 Antikörperfärbungen

Es standen zu Beginn der Arbeit bereits verschiedene Seren und affinitätsgereinigte Antikörper gegen CG12340 zur Verfügung. Dabei waren zwei Kaninchen jeweils gegen zwei Peptide des Proteins immunisiert worden. Das N-terminale Peptid EP033845 entsprach der Sequenz der Aminosäuren 70-84 und das C-terminale Peptid EP033846 den Aminosäuren 1286-1301. Teile der erhaltenen Rohseren (3250 und 3251) wurden vereinigt und affinitätsgereinigt für die einzelnen Peptide. Da mit dem affinitätsgereinigten Antikörper EP033845 die besten Färbeergebnisse erzielt werden konnten, wurde dieser für die folgenden Versuche verwendet.

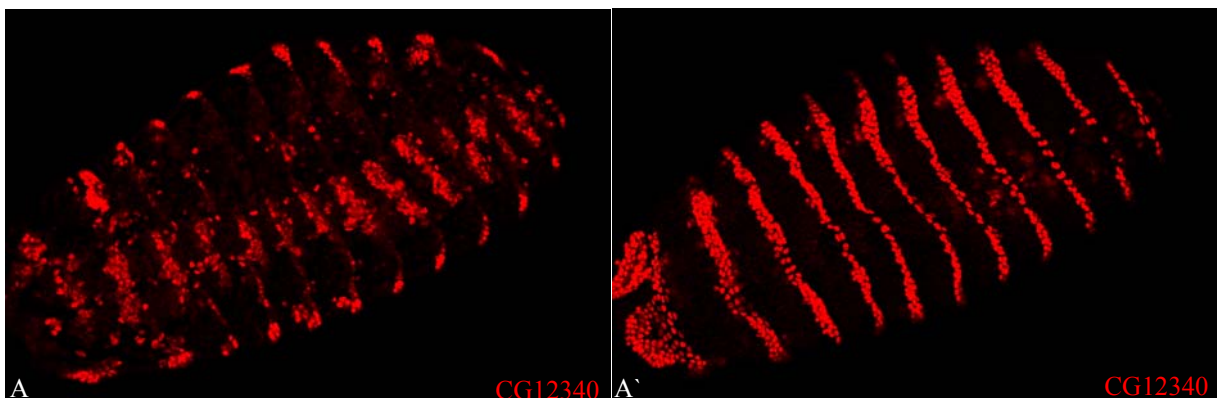
Generell ist in allen gezeigten Abbildungen anterior links. Weiße Quadrate in einer Abbildung bedeuten, dass in der darauffolgenden Abbildung dieser umrandete Bereich vergrößert aufgenommen wurde.

#### 3.4.1 Spezifitätstest des Antikörpers

Um sicherzustellen, dass der affinitätsgereinigte Antikörper gegen EP033845 spezifisch das CG12340 Protein erkennt, wurde *CG12340* mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems im Muster des Segment-Polaritätsgens *engrailed* überexprimiert. Dafür wurden Fliegen des P-Element-Insertionsstammes P{EP}EP2024 mit Fliegen eines Gal4 Treiberstammes gekreuzt und die F1-Nachkommen einer Antikörperfärbung unterzogen. Der P-Element-Insertionsstamm hat

46 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart von *CG12340* inseriert und trägt eine UAS-Kopie (upstream activating sequence), welche zur Transkription von *CG12340* führt, sofern eine Aktivierung durch das Gal4 Protein erfolgt ist. Das Einkreuzen des Engrailed-Gal4 Treiberstammes führt nun zur Bildung von Gal4 im Muster des Segmentpolaritäts-Gens Engrailed, so dass *CG12340* in allen Zellen, welche Gal4 Protein enthalten, aktiviert wird. Sofern der Antikörper gegen *CG12340* spezifisch ist, sollte er sowohl das endogene *CG12340*, wie auch das ektopisch in 14 Streifen des Engrailed-Musters exprimierte Protein erkennen. Die Streifen entsprechen dabei einzelnen Zellreihen anterior in den embryonalen Parasegmenten.

Der Versuch führt zu einer drastischen Überexpression von *CG12340* im Engrailed-Muster, so dass der Antikörper als spezifisch betrachtet werden kann (Abbildung 3.4.1.1). Zwar wird *CG12340* nach wie vor in allen Zellen exprimiert, in denen es auch im Wildtyp exprimiert wird, doch ist die Proteinmenge in den Zellen, in denen das Gen durch das UAS-Gal4-System aktiviert wurde, so drastisch erhöht, dass bei den gewählten Mikroskop-Einstellungen das endogene Protein nicht detektiert werden konnte.



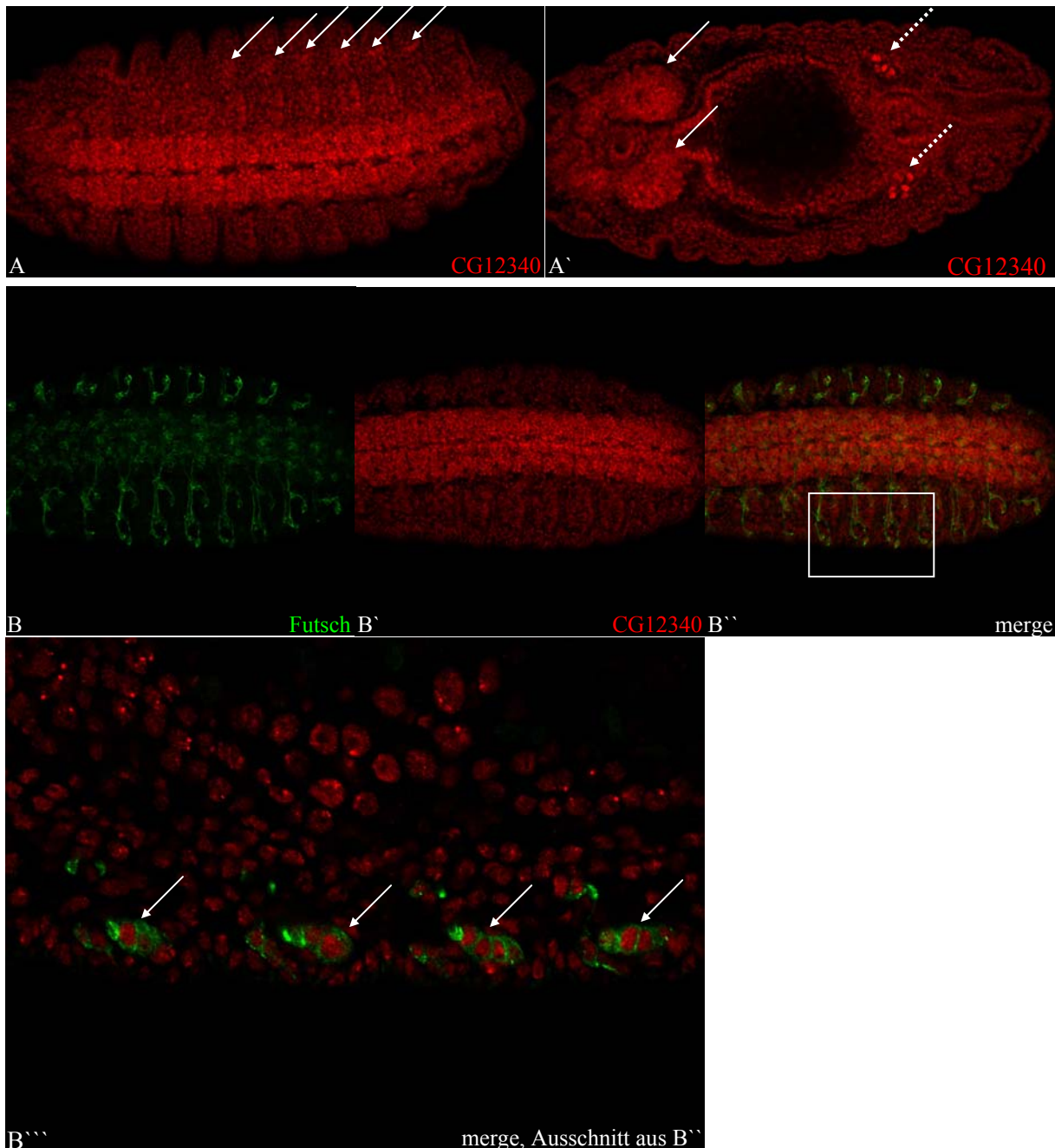
**Abbildung 3.4.1.1: Der affinitätsgereinigte Antikörper EP033845 erkennt *CG12340* nach Überexpression in Engrailed-Streifen.** A, A' zeigen *CG12340* in Rot. *CG12340* lokalisiert im abgebildeten Embryo in den Streifen des Engrailed-Musters. Dabei stellen A und A' verschiedene Fokusebenen desselben Embryos dar. Die Überexpression wurde mit Hilfe der P{EP}EP2024-Linie und einem Engrailed-Gal4-Treiber erzeugt.

### 3.4.2 Antikörperfärbungen an Embryonen

#### 3.4.2.1 Antikörperfärbung an Wildtyp-Embryonen

Zunächst wurde die Lokalisierung von *CG12340* in Wildtyp-Embryonen untersucht, um festzustellen, in welchen Zellen und Geweben das Gen exprimiert wird. Generell kann die Lokalisierung des Proteins von der Zellularisierung an als nukleär und ubiquitär bezeichnet werden. Das Protein ist in allen abgebildeten Zellen sichtbar, jedoch mit deutlich verstärkter Expression im Zentralnervensystem, sowohl im ventralen Nervenstrang wie auch in den

Gehirnhemisphären, außerdem in den Polzellen und in einzelnen Zellen des peripheren Nervensystems (PNS) (Abbildung 3.4.2.1, A). Dies wird deutlicher in der Vergrößerung, in welcher das PNS durch eine Färbung gegen Futsch markiert wurde. Die markierten Zellen zeigen gegenüber den umgebenden Zellen eine erhöhte Proteinmenge von CG12340 (Abbildung 3.4.2.1, B).

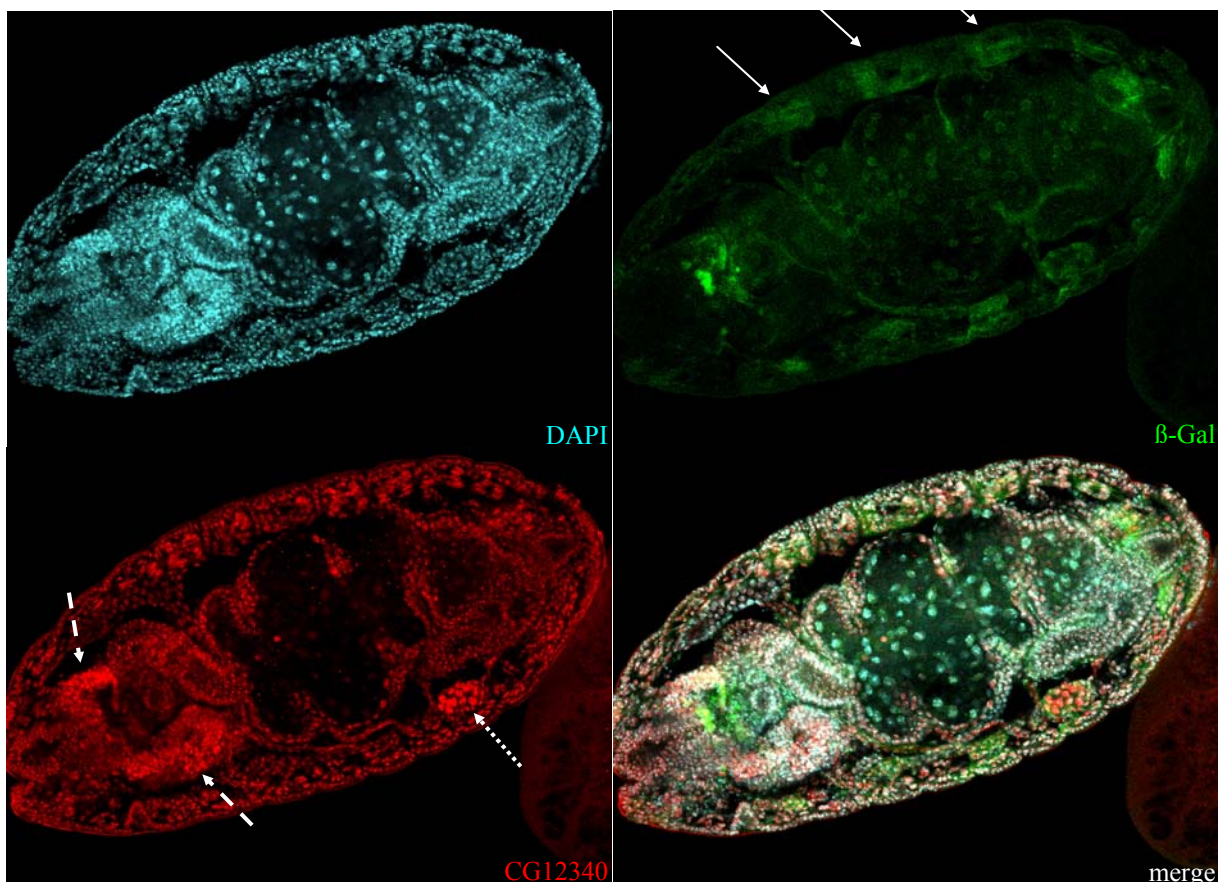


**Abbildung 3.4.2.1: CG12340 lokalisiert in Wildtyp-Embryonen ubiquitär und nukleär, mit einer Anreicherung im ZNS, PNS und in den Polzellen.** A, A' zeigen CG12340 in Rot. Wie lokalisiert im abgebildeten Embryo ubiquitär und nukleär. Deutlich ist eine Anreicherung des Proteins im ZNS (A, A' Pfeile) sowie in den Polzellen (A' gestrichelte Pfeile) zu sehen. Dabei stellen A und A' verschiedene Fokusebenen desselben Embryos dar. B' - B''' zeigen CG12340 in Rot und B, B''' zeigen Futsch in Grün. Futsch ist ein Marker für das PNS und umrandet in B''' Zellen, die deutlich mehr CG12340 enthalten, als die umliegenden Zellen.

### 3.4.2.2 Antikörperfärbung an Embryonen der Transdeletions-Mutante

Im Folgenden sind beispielhaft Färbungen an Embryonen des Stammes gezeigt, der das Chromosom mit der Transdeletion von *CG12340* über einem Balancerchromosom mit *CyOFtzLacZ* trägt. Dieses Chromosom trägt ein Transgen, welches das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase im räumlichen und zeitlichen Muster des Paarregelgens *fushi tarazu* exprimiert. Eine Antikörperfärbung gegen  $\beta$ -Galaktosidase ermöglicht somit die Unterscheidung von Embryonen in homozygot mutante Embryonen ohne *fushi tarazu*-typische Streifen und heterozygot bzw. homozygot das Balancerchromosom besitzende Embryonen mit Streifen (Abbildung 3.4.2.2.1, Pfeile). Dabei stellen die Embryonen mit den Streifen gleichzeitig die Kontrolle dar, in denen die Lokalisierung von *CG12340* wildtypisch sein sollte. Dagegen kann in den Embryonen ohne die Streifen die Auswirkung des Fehlens von *CG12340* untersucht werden.

In Kontroll-Embryonen ist deutlich die wildtypische Färbung von *CG12340* zu erkennen, inklusive einer Lokalisierung in den Gehirnhemisphären und den Polzellen (Abbildung 3.4.2.2.1, gestrichelte Pfeile).

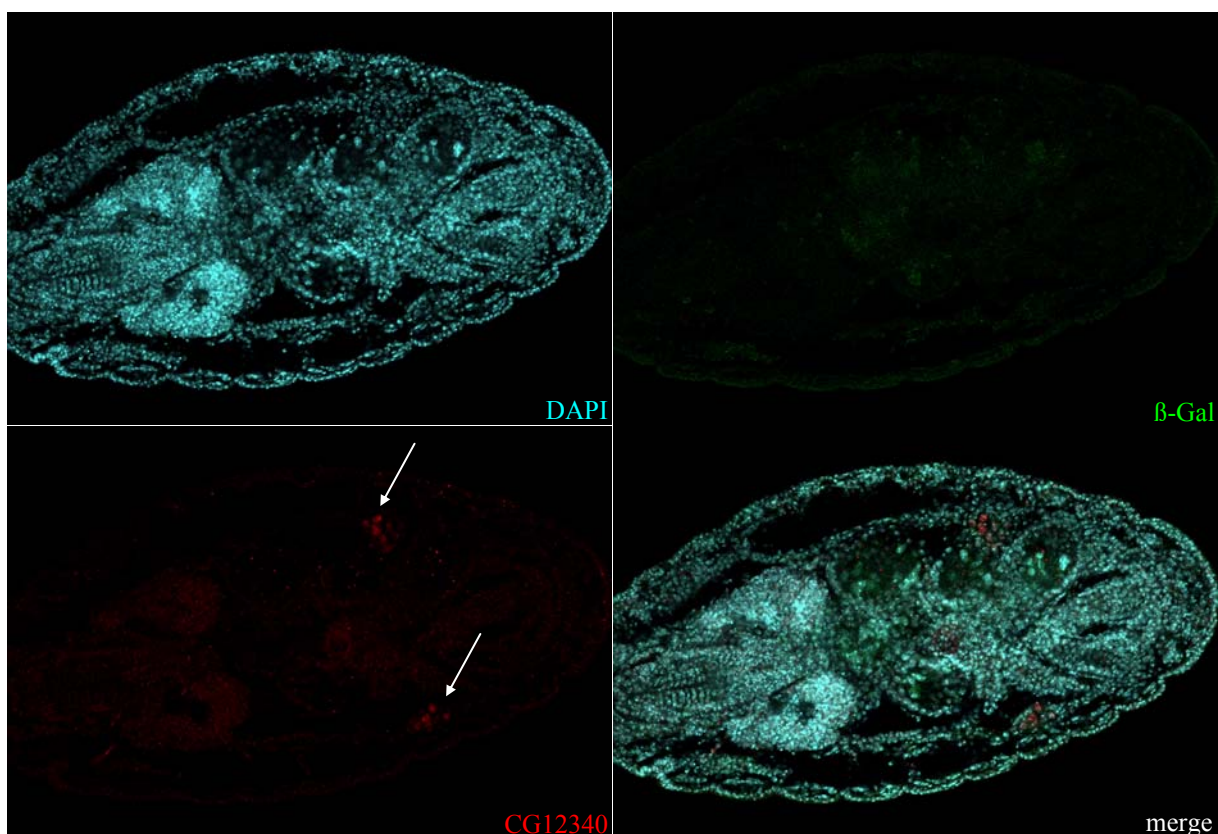


**Abbildung 3.4.2.2.1: *CG12340* lokalisiert in Kontroll-Embryonen analog zum Wildtyp und ist auch hier im ZNS und in den Polzellen angereichert.** Die Abbildung zeigt *CG12340* in Rot,  $\beta$ -Gal in Grün und DAPI in Türkis. Die Pfeile deuten auf die  $\beta$ -Gal-Streifen im *fushi tarazu*-Muster des Balancer-Chromosoms. Wde lokalisiert im abgebildeten Embryo genau wie im Wildtyp. Das Protein

ist in den Gehirnhemisphären (unterbrochene Pfeile) und in den Polzellen (gestrichelter Pfeil) angereichert.

Ein weiterer Embryo, welcher keine  $\beta$ -Galaktosidase-Streifen aufweist und somit einen homozygot mutanten Embryo darstellt, befand sich auf demselben Objektträger wie der Kontrollembryo und wurde somit in der Fixier- und Färbeprozedur gleich behandelt. Die Abbildung entstand unter exakt denselben Bedingungen unter denen auch die vorherige aufgenommen wurde. Dadurch soll gewährleistet werden, dass eine Reduktion der Intensität der Antikörperfärbung tatsächlich auf den Verlust der zygotischen Proteinkomponente von CG12340 und nicht auf die gewählten Bedingungen zurückzuführen ist.

Tatsächlich ist die Färbung gegen CG12340 gegenüber der Kontrolle sehr stark reduziert und unter diesen Bedingungen kaum noch detektierbar, abgesehen von einer schwachen Lokalisierung in den Polzellen (Abbildung 3.4.2.2.2, Pfeile).



**Abbildung 3.4.2.2.2: CG12340 ist in mutanten Embryonen der Transdeletion kaum noch detektierbar, abgesehen von einer schwachen Kernlokalisierung und einer Färbung in den Polzellen.** Die Abbildung zeigt CG12340 in Rot,  $\beta$ -Gal in Grün und DAPI in Türkis. Der mutante Embryo kann am Fehlen einer spezifischen  $\beta$ -Gal-Färbung identifiziert werden. Die CG12340-Färbung ist bis auf ein Minimum reduziert. Lediglich die Polzellen zeigen noch eine CG12340-Lokalisierung (Pfeile). Dies deutet darauf hin, dass CG12340 eine maternale Komponente besitzt, die mindestens während der Embryogenese bestehen bleibt.

Unter deutlicher Erhöhung der Laserintensität ist eine schwache Färbung von CG12340 in den meisten Zellkernen noch sichtbar, was darauf hinweist, dass es eine maternale Komponente des Proteins gibt, welche während der Embryogenese erhalten bleibt.

Erwähnenswert ist zudem, dass keine auffälligen phänotypischen Auswirkungen des Verlustes von *CG12340* sichtbar sind. Die Embryogenese scheint völlig normal abzulaufen, ebenso wie die verschiedenen Larvenstadien. Jedoch sind die Stämme, die das Chromosom mit der Transdeletion tragen, homozygot letal. Ein Sortieren der Nachkommen des Stammes mit diesem Chromosom über einem mit GFP markierten Balancer ergab, dass homozygot mutante Tiere das Puppenstadium erreichen, in der Regel jedoch nicht das Adultstadium, mit der Ausnahme, dass unter speziellen Bedingungen einzelne homozygote Adulte auftraten. Dazu mussten die sortierten homozygoten Embryonen oder L1-Larven in mäßiger Anzahl getrennt von den heterozygoten Tieren in Aufzuchttröhrchen gesetzt werden. Ein Teil der Tiere konnte die Puppe öffnen, jedoch gelang es nur einem sehr kleinen Prozentsatz der Tiere die Puppen gänzlich zu verlassen. Diese homozygot mutanten Adulten starben etwa 1-3 Tage nach dem Schlüpfen und zeigten ansonsten einen deutlich geschwächten, jedoch phänotypisch nicht weiter auffälligen Habitus, allerdings häufig nicht ganz ausgefaltete Flügel.

Eine weitergehende Analyse der Ovarien der homozygot mutanten adulten Weibchen ist in Abschnitt 3.4.4.3 gezeigt.

Des Weiteren sei erwähnt, dass die hier gezeigten und beschriebenen Resultate auch für die mutanten Allele P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> und P{XP}CG12340<sup>d06198</sup> in der gleichen Weise gelten, jedoch mit der Ausnahme, dass die homozygoten Nachkommen des Allels P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup> im späten Embryonalstadium sterben, was auf die Insertion eines zweiten P-Elementes im Genom hinweist. Dies bedeutet, dass in dem P-Element-Insertionsverfahren das verwendete P-Element mehrfach in das Genom inseriert hat und somit die embryonale Letalität von der Insertion in ein weiteres essenzielles Gen stammt.

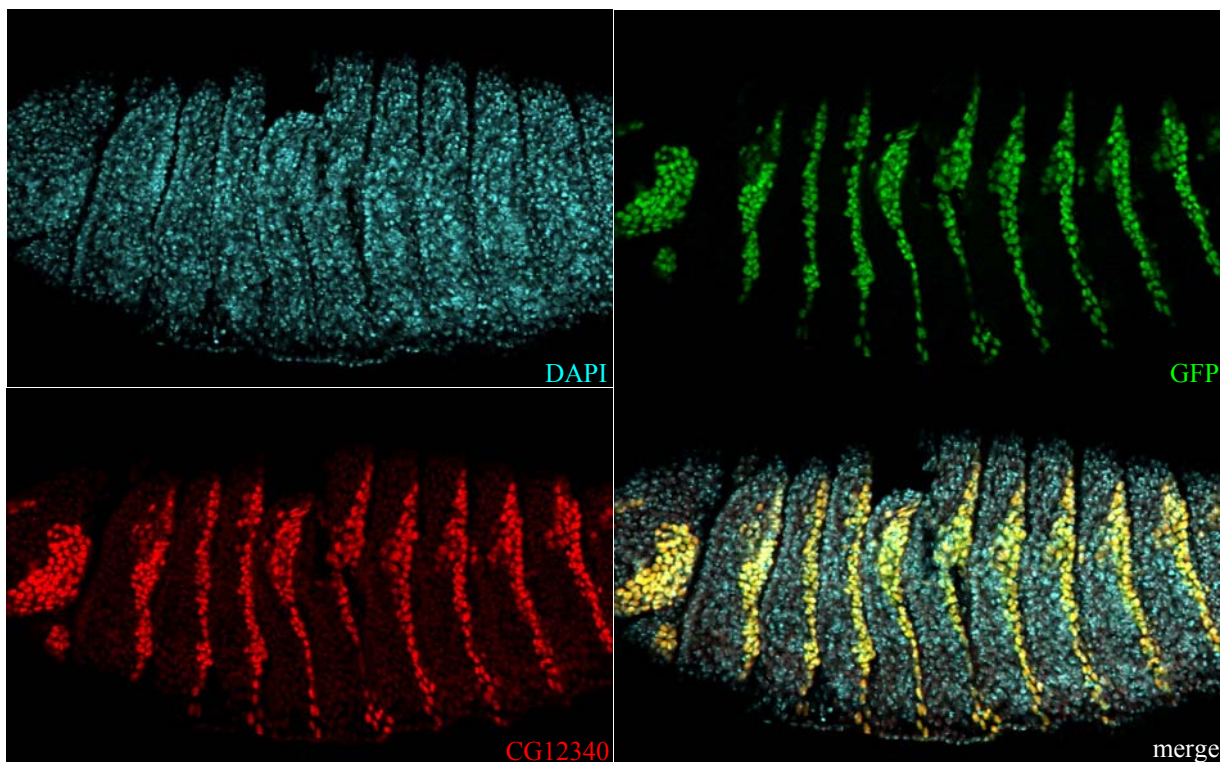
### 3.4.2.3 Antikörperfärbung an transgenen Embryonen

Im folgenden Versuch wurden Embryonen gefärbt, welche ein Transgen mit dem codierenden Bereich von *CG12340* unter dem Einfluss einer UAS-Kopie auf dem 3. Chromosom tragen. Stromaufwärts der *CG12340* Sequenz befindet sich eine GFP Sequenz, welche ohne Stop-Codon und im selben Leseraster wie *CG12340*, welches hier kein eigenes Startcodon besitzt, vorhanden ist. Die Expression dieser Sequenz soll daher zur Bildung eines GFP-CG12340 Fusionsproteins führen. Des Weiteren besitzen die Embryonen ein Transgen mit der Gal4



Sequenz unter dem Einfluss eines regulatorischen Bereiches des *engrailed* Gens, wodurch das Gal4 Protein im räumlichen und zeitlichen Muster von *engrailed* exprimiert wird.

Durch die Expression des *engrailed*-Gal4 Treibers wurde die Expression des Transgens tatsächlich in der Weise aktiviert, dass ein GFP-Fusionsprotein entstand. Deutlich ist die Lokalisierung des GFP-Proteins in den Zellkernen innerhalb der Streifen zu erkennen. Dass es sich um das Fusionsprotein mit CG12340 handelt, wird aus der Färbung mit dem CG12340 Antikörper deutlich. Auch hier lokalisiert das Protein in den Zellkernen innerhalb der Streifen. Zusätzlich ist die endogene Lokalisierung des CG12340 Proteins auch schwach in den Zellreihen zwischen denen, die das Gal4 Protein exprimieren, erkennbar (Abbildung 3.4.2.3.1).

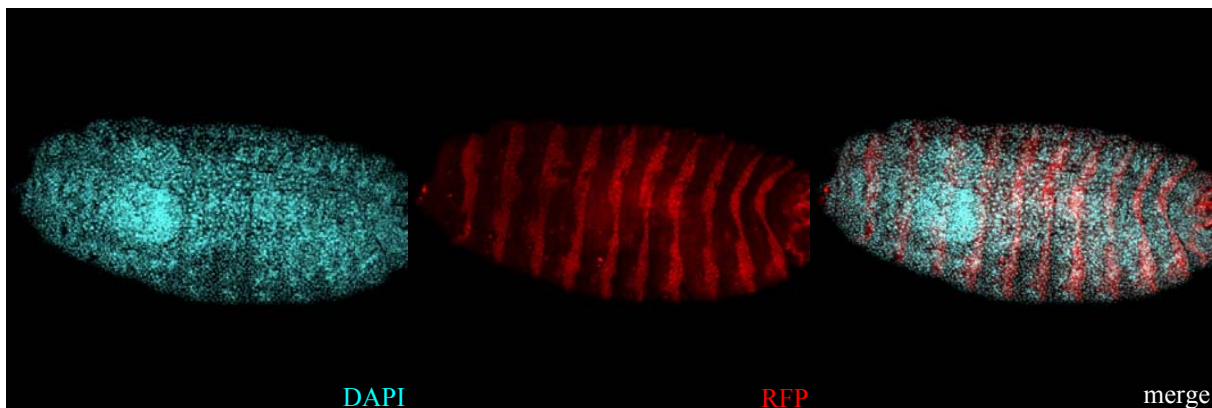


**Abbildung 3.4.2.3.1:** Das GFP-CG12340-Fusionsprotein lokalisiert nach Überexpression mit *engrailed*-Gal4 im typischen Streifenmuster, während der CG12340 Antikörper zusätzlich zum Fusionsprotein auch endogenes CG12340 in den Zellreihen zwischen den Streifen detektiert. Die Abbildung zeigt GFP-CG12340 in Grün ohne weitere Antikörper-Färbung, CG12340 in Rot, DAPI in Türkis. Während CG12340 in Rot sowohl in Streifen des *engrailed*-Treibers als Fusionsprotein exprimiert wird, wie auch endogen in allen Zellen (siehe zwischen den Streifen), wird das GFP-CG12340-Fusionsprotein ausschließlich in den Streifen des Gal4-Treibers exprimiert.

Auf die gleiche Weise wurden Embryonen eines Stammes gekreuzt und behandelt, der ein Transgen mit der codierenden Sequenz des *eggless* Gens auf dem 2. Chromosom trägt. In diesem Fall befindet sich die Sequenz, die für das RFP Protein codiert im selben Leseraster hinter der *eggless* Sequenz ohne Stop-Codon. Auch hier wird das Transgen unter der

*engrailed* vermittelten Gal4 Produktion exprimiert. Es wird ein Fusionsprotein, bestehend aus Eggless und RFP gebildet. Es stand leider kein spezifisch Eggless erkennender Antikörper zur Verfügung. Jedoch ist hier unwahrscheinlich, dass es sich um das RFP-Protein alleine handelt, da dieses nur exprimiert werden konnte, wenn auch die davor liegende *eggless* Sequenz fehlerfrei transkribiert wurde, da der Anhang über kein eigenes Start-Codon verfügte.

Das Fusionsprotein lokalisiert eindeutig und spezifisch in den *engrailed* vermittelten Streifen, (Abbildung 3.4.2.3.2).

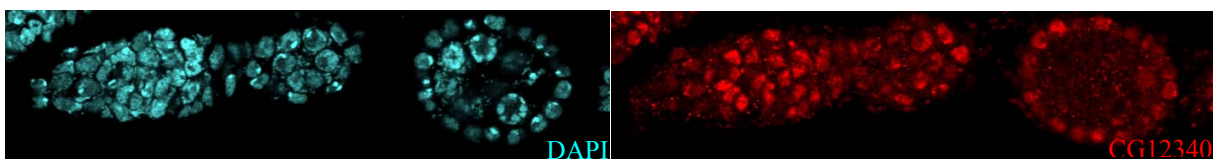


**Abbildung 3.4.2.3.2: Das Egg-RFP-Fusionsprotein lokalisiert nach Überexpression mit Engrailed-Gal4 im typischen Streifenmuster.** Die Abbildung zeigt Egg-RFP in Rot ohne weitere Antikörper-Färbung, DAPI in Türkis. Die Abbildung zeigt, dass Egg in Streifen des Engrailed-Treibers als Fusionsprotein mit RFP exprimiert wird.

### 3.4.3 Antikörperfärbung an Ovarien

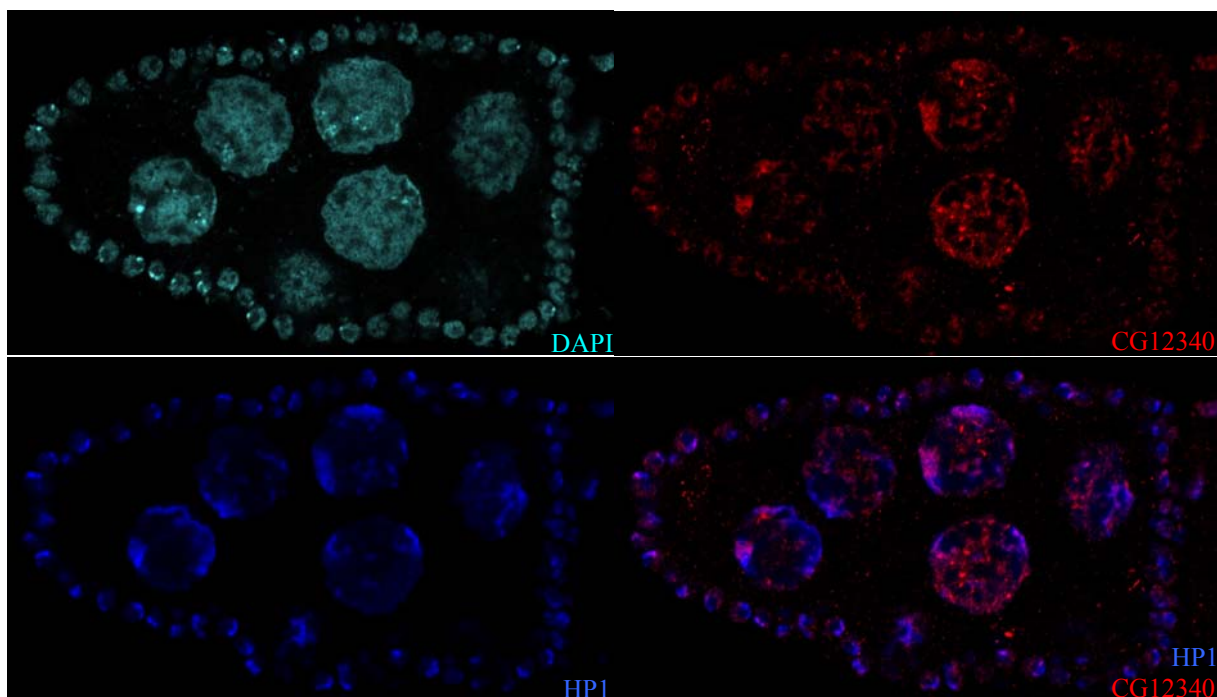
#### 3.4.3.1 Antikörperfärbung an Wildtyp-Ovarien

Analog zu den Antikörperfärbungen an Wildtyp-Embryonen sollte nun die Lokalisierung von CG12340 in Wildtyp-Ovarien untersucht werden. Auch hier ist die Lokalisierung als ubiquitär und nukleär zu bezeichnen. CG12340 ist sowohl in den abgebildeten Keimzellen wie auch in den die Eikammern umgebenden Follikelzellen von Germarien und jungen Eikammern exprimiert (Abbildung 3.4.3.1.1).



**Abbildung 3.4.3.1.1: CG12340 lokalisiert in frühen Wildtyp-Ovarien ebenfalls ubiquitär und nukleär.** Gezeigt ist CG12340 in Rot, DAPI in Türkis. CG12340 lokalisiert innerhalb der Germarien und früher Eikammern in den Kernen der Keimbahn- und Follikelzellen. Die Färbung gegen CG12340 ist in den Nährzellen der posterioren Eikammer etwas schwach, bedingt durch die Fokusebene.

In älteren Eikammern ist die Lokalisierung von CG12340 in den Nährzellen deutlicher. Sowohl hier wie auch in den Follikelzellen füllt die Färbung jedoch nicht den ganzen Kern aus, sondern zeigt viel mehr eine Lokalisierung in kleinen Bereichen der Nuclei (Abbildung 3.4.3.1.2). Es wurde ebenfalls eine Färbung gegen HP1, Heterochromatin Protein 1, vorgenommen. Dieses Protein markiert in der Regel heterochromatische Bereiche des Genoms, wobei auch einzelne euchromatische Chromatinregionen HP1 rekrutieren. Die Lokalisierung von CG12340 und HP1 in den Nähr- und Follikelzellen ist zwar überlappend, jedoch nicht gänzlich colokalisierend (Abbildung 3.4.3.1.2).

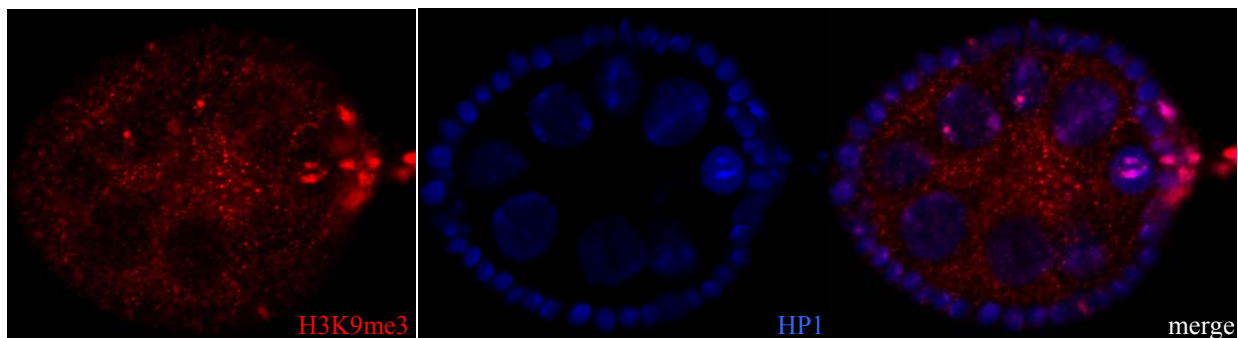


**Abbildung 3.4.3.1.2: CG12340 lokalisiert in Wildtyp-Ovarien des Stadiums 5-6 sowohl in Follikel- wie auch in Nährzellen in kleinen Bereichen, die nur teilweise mit HP1 colokalisieren, jedoch größtenteils daran angrenzen.** Die Abbildung zeigt DAPI in Türkis, CG12340 in Rot, HP1 in Blau und eine Überlagerung von CG12340 und HP1 ohne DAPI. CG12340 lokalisiert innerhalb der Follikel- und Nährzellkerne in unmittelbarer Nähe zu HP1. Dabei fallen in den Nährzellkernen meist ein bis zwei größere HP1 gefärbte Bereiche und in deren Nachbarschaft CG12340 gefärbte Bereiche auf.

Deutlich wird auch, dass zusätzlich zu den Bereichen, in denen HP1 und CG12340 in räumlicher Nähe zueinander in ein bis zwei größeren Regionen liegen, weitere CG12340 gefärbte Bereiche innerhalb der Nährzellen auffallen. Diese vielen kleinen Punkte liegen zwischen DAPI-gefärbten Kernbereichen und könnten somit Chromatinregionen darstellen, die kein konstitutives Heterochromatin enthalten. Diese punktuelle Färbung von CG12340 in den Nährzellen kann in verschiedenen Eikammerstadien beobachtet werden, tritt aber nicht

generell auf, so dass anzunehmen ist, dass es sich möglicherweise um zellzyklusbedingte Zustandsformen handelt.

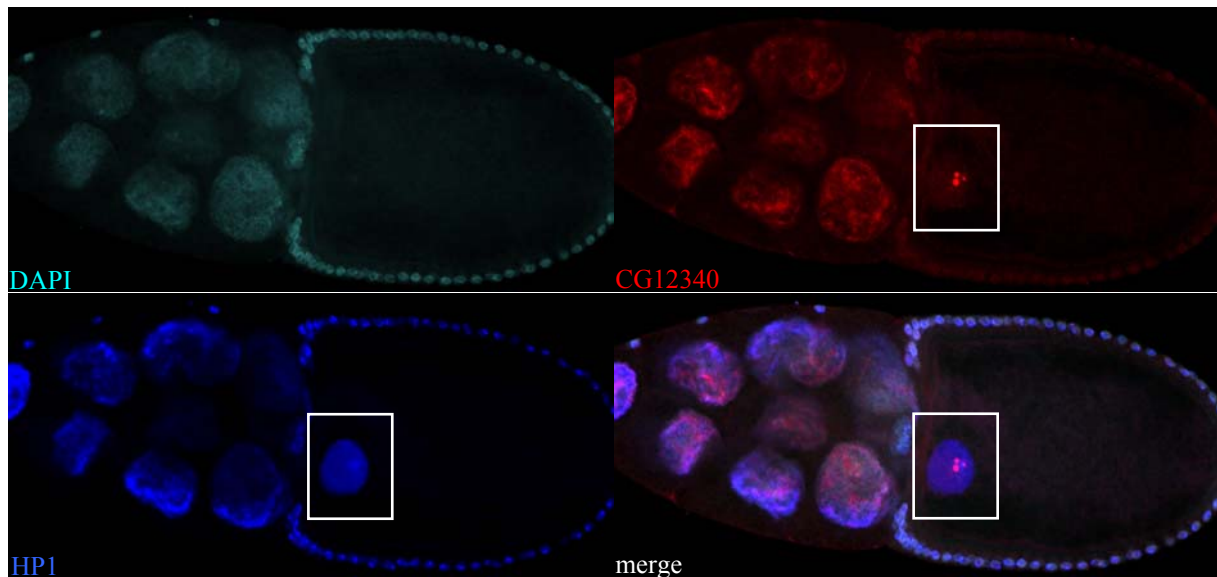
Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen den bereits gezeigten HP1-Färbungen und der trimethylierten Form von H3K9 gibt, welche bereits dafür bekannt ist, HP1 zu rekrutieren, wurden auch Wildtyp-Ovarien mit HP1 und H3K9me3 Antikörpern gefärbt. Dabei wird deutlich, dass HP1 und H3K9me3 perfekt im Oozytenkern des Stadiums 4-5 colokalisieren (Abbildung 3.4.3.1.4). Dagegen kann in früheren Stadien auch eine Colokalisierung der beiden Proteine in Nähr- und Follikelzellen beobachtet werden. Die H3K9me3 Färbung außerhalb des Oozytenkerns nimmt jedoch rasch an Intensität ab mit steigendem Stadium.



**Abbildung 3.4.3.1.3: H3K9me3 und HP1 colokalisieren in Wildtyp-Ovarien im Oozytenkern.** Gezeigt ist H3K9me3 in Rot, HP1 in Blau. H3K9me3 lokalisiert im Oozytenkern von Wildtyp-Ovarien genau wie HP1, jedoch zeigt der H3K9me3 Antikörper in diesem Stadium 4 nur noch eine schwache Färbung in den Nährzellen und ist in Follikelzellen kaum noch detektierbar.

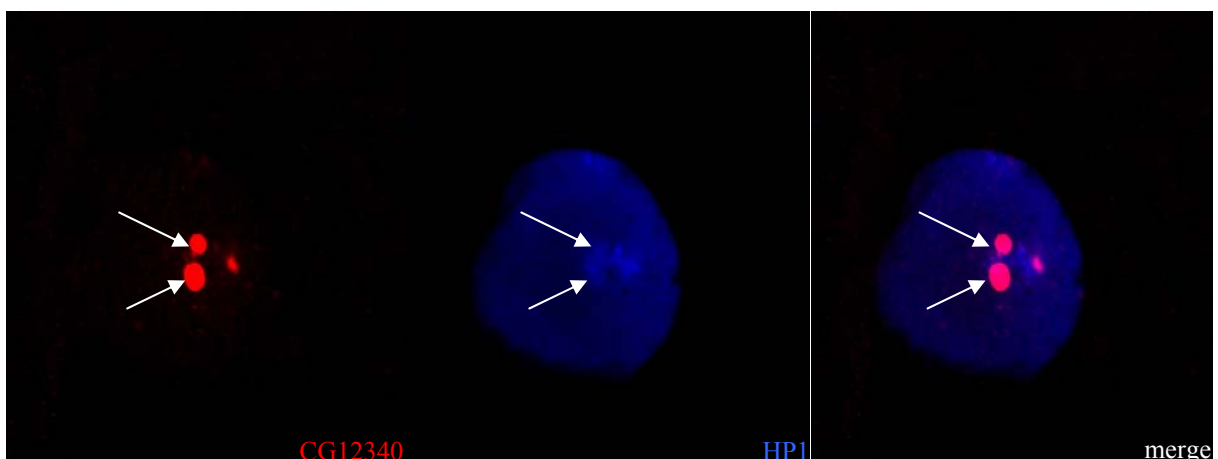
In Anlehnung an diese Resultate ist es daher naheliegend, dass HP1 auch in *Drosophila*-Oozyten durch die Trimethylierung von H3K9 rekrutiert werden könnte.

In Eikammern des Stadiums 10 liegt das Hauptaugenmerk auf der Lokalisierung des HP1 Proteins ebenfalls im Oozytenkern. Jedoch sollte hier getestet werden, wie sich die Lokalisierung von CG12340 in Bezug auf HP1 verhält. Deutlich sind dort zwei größere und eine kleinere globuläre CG12340-Strukturen zu erkennen (Abbildung 3.4.3.1.4). Der Oozytenkern nimmt insgesamt eine Sonderstellung ein, da er während der gesamten Oogenese bis auf einzelne Ausnahmen transkriptionell inaktiv ist und das Genom dort im Karyosom angeordnet ist. HP1 lokalisiert hier in einem einzigen, größeren Bereich des Oozytenkerns. Die kugelförmigen CG12340-Strukturen scheinen nicht komplett mit HP1 zu colokalisieren, jedoch erneut in deutlicher räumlicher Nähe zu liegen.



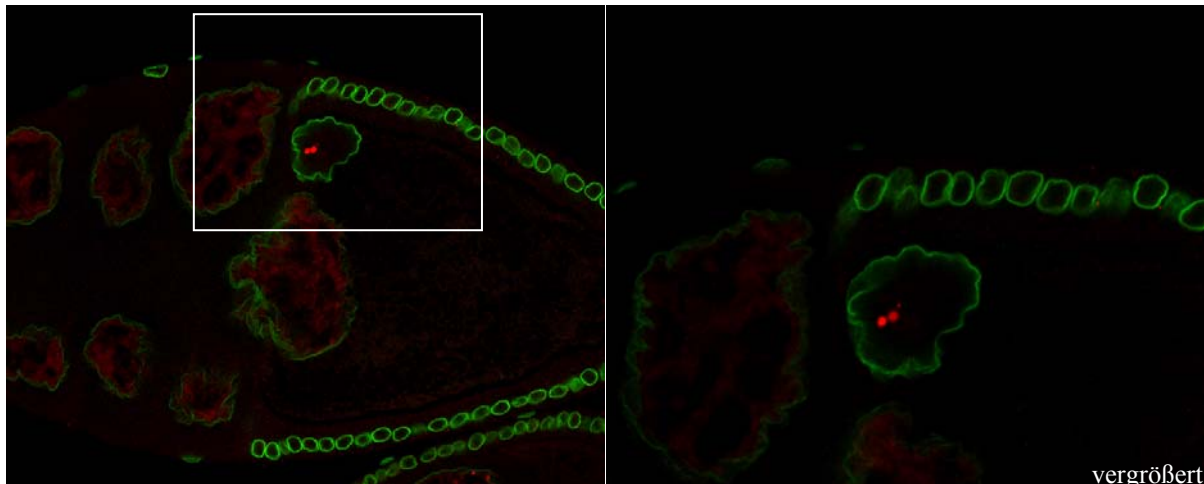
**Abbildung 3.4.3.1.4: CG12340 lokalisiert in Wildtyp-Eikammern des Stadiums 10-11 in 1-3 globulären Strukturen im Oozytenkern.** Gezeigt ist CG12340 in Rot, DAPI in Türkis und HP1 in Blau. Während HP1 in einem Bereich des Oozytenkerns lokalisiert, verteilt sich die CG12340-Färbung auf 3 Punkte, welche an das HP1-Areal angrenzen.

Eine vergrößerte Aufnahme des Oozytenkerns der obigen Eikammer zeigt tatsächlich nur eine partielle Colokalisierung von CG12340 und HP1 (Abbildung 3.4.3.1.5). Vielmehr sieht es so aus, als würde das CG12340 Protein nur an ganz bestimmten, deutlich scharf abgegrenzten Bereichen in räumlicher Nähe zu dem durch HP1 markierten Karyosom liegen. Anzumerken bleibt, dass die Anzahl an sichtbaren Punkten von der Fokusebene und auch der Lage der Eikammern auf den Objektträgern abhängt. Daher sind in der Regel zwischen 1 und 3 Punkten erkennbar, welche teils mit HP1 überlappen (Pfeile).



**Abbildung 3.4.3.1.5: CG12340 lokalisiert in Wildtyp-Eikammern des Stadiums 10-11 in 1-3 Punkten im Oozytenkern.** Gezeigt ist CG12340 in Rot, DAPI in Türkis und HP1 in Blau. Während HP1 in einem Bereich des Oozytenkerns lokalisiert, verteilt sich die CG12340-Färbung auf 3 Punkte, welche an das HP1-Areal angrenzen bzw. damit überlappen (Pfeile).

Um sicherzustellen, dass das CG12340 Protein innerhalb des Oozytenkerns und nicht etwa an der Kernmembran oder außerhalb des Kerns lokalisiert, wurde eine Cofärbung mit einem Antikörper gegen Lamin durchgeführt.



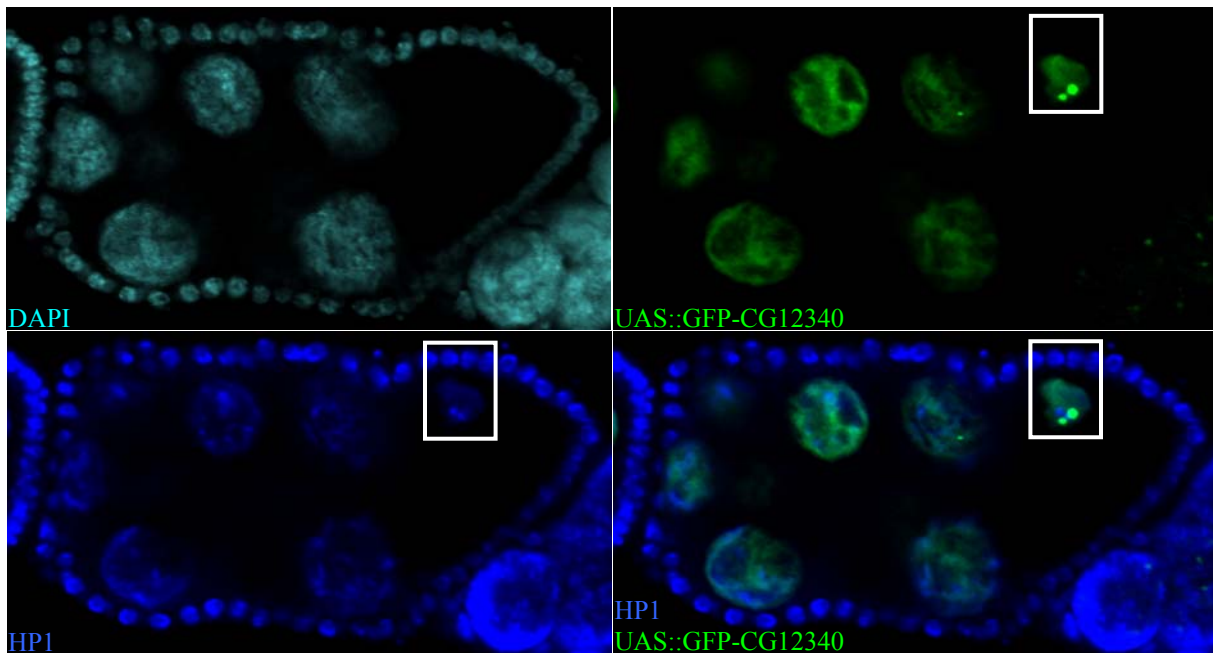
**Abbildung 3.4.3.1.6: CG12340 lokalisiert in Wildtyp-Ovarien innerhalb des Kernbereichs der Oocyte.** Gezeigt ist CG12340 in Rot, DAPI in Türkis und Lamin in Grün. Lamin markiert die Kernmembran der Kerne des Oozytenkerns sowie der Follikel- und Nährzellkerne. Deutlich ist die CG12340-Lokalisierung innerhalb des Oozytenkerns zu erkennen. Da hier das Hauptaugenmerk auf die Punkte im Kern gelegt wurde, ist die Belichtung für die Färbung in Nähr- und Follikelzellen sehr schwach. Der Pfeil markiert einen dritten, erneut schwächeren Punkt in der Nähe der beiden größeren.

Lamin markiert dabei deutlich die Kernmembran der Oocyte und die CG12340-Punkte liegen eindeutig innerhalb des Kerns (Abbildung 3.4.3.1.6, A). Die Vergrößerung verdeutlicht dies und zeigt erneut einen dritten, kleineren Punkt etwas abseits der beiden größeren (Abbildung 3.4.3.1.6, B).

### 3.4.3.2 Antikörperfärbung an Ovarien von transgenen Fliegen

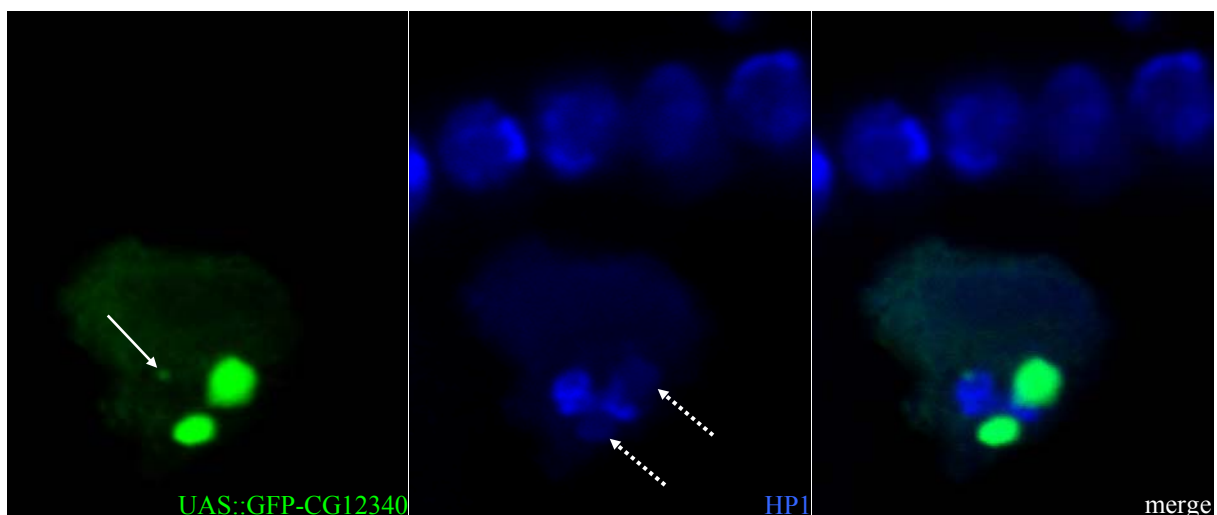
Im folgenden Versuch wurden Antikörperfärbungen an Ovarien von Weibchen durchgeführt, welche heterozygot für das in Abschnitt beschriebene *UAS-GFP-CG12340*-Transgen, hier jedoch auf dem 2. Chromosom, und für eine Tubulin-Gal4 Treiberlinie mit maternalen Expression (*mat67*) waren. In einer Eikammer Stadium 8, in der das GFP-CG12340 Fusionsprotein exprimiert wurde, wird analog zu den Wildtypfärbungen zusätzlich zur Verteilung in den Nährzellen eine Lokalisierung des Fusionsproteins in Form von Punkten im Oozytenkern sichtbar (Abbildung 3.4.3.2.1).

Die Antikörperfärbung gegen HP1 zeigt erneut eine räumliche Nähe der beiden Proteine zueinander.



**Abbildung 3.4.3.2.1: Das GFP-CG12340-Fusionsprotein lokalisiert in Ovarien von transgenen Fliegen nach Überexpression mit einem maternalen Tubulin-Gal4-Treiber analog zum Wildtyp.** Gezeigt ist das GFP-CG12340-Fusionsprotein in Grün ohne weitere Antikörperfärbung, DAPI in Türkis und HP1 in Blau. Während HP1 in einem Bereich des Oozytenkerns lokalisiert, verteilt sich die CG12340-Färbung auf 3 Punkte, welche an das HP1-Areal angrenzen.

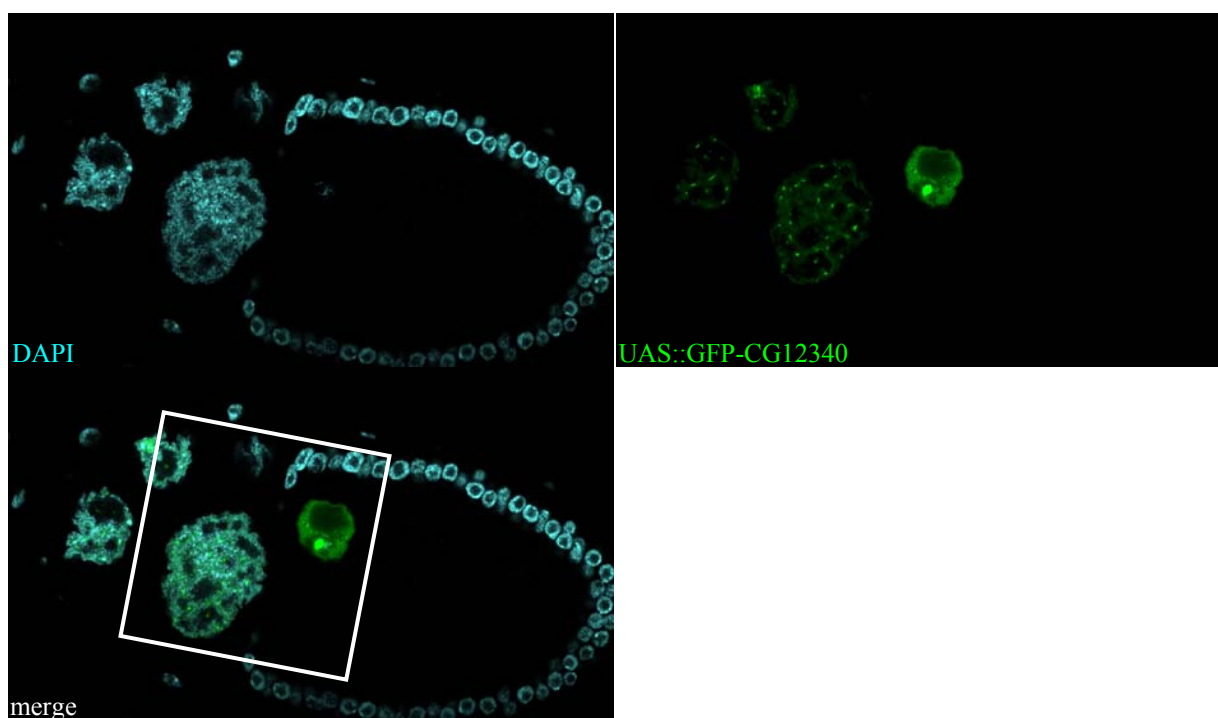
Eine vergrößerte Aufnahme dieses Oozytenkerns zeigt deutliche Ähnlichkeit zu den obigen Wildtyp-Färbungen. Sowohl die beiden großen Punkte, die mit den schwach gefärbten Bereichen der HP1 Färbung (Abbildung 3.4.3.2.2, gestrichelte Pfeile) colokalisieren, wie auch der deutlich kleinere Punkt (Pfeil), sind zu erkennen.



**Abbildung 3.4.3.2.2: Der vergrößerte Ausschnitt aus dem Oozytenkern zeigt die Lokalisierung des GFP-CG12340-Fusionsproteins in drei Bereichen, die an HP1 angrenzen bzw. damit überlappen.** Gezeigt ist eine vergrößerte Aufnahme des Oozytenkerns aus der vorherigen Abbildung. Das GFP-CG12340-Fusionsprotein ist in Grün abgebildet ohne weitere Antikörperfärbung, DAPI in Türkis und HP1 in Blau. Das GFP-Fusionsprotein lokalisiert genau wie das CG12340 Wildtyp-Protein unmittelbar an HP1, teilweise mit schwächeren HP1-Signalen überlappend (gestrichelte Pfeile). Erneut ist ein zusätzlicher, kleinerer CG12340-Punkt sichtbar (Pfeil).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass das vom Transgen kodierte CG12340-Fusionsprotein innerhalb der Nährzellen und der Oozyte genauso lokalisiert wie das Wildtyp-Protein.

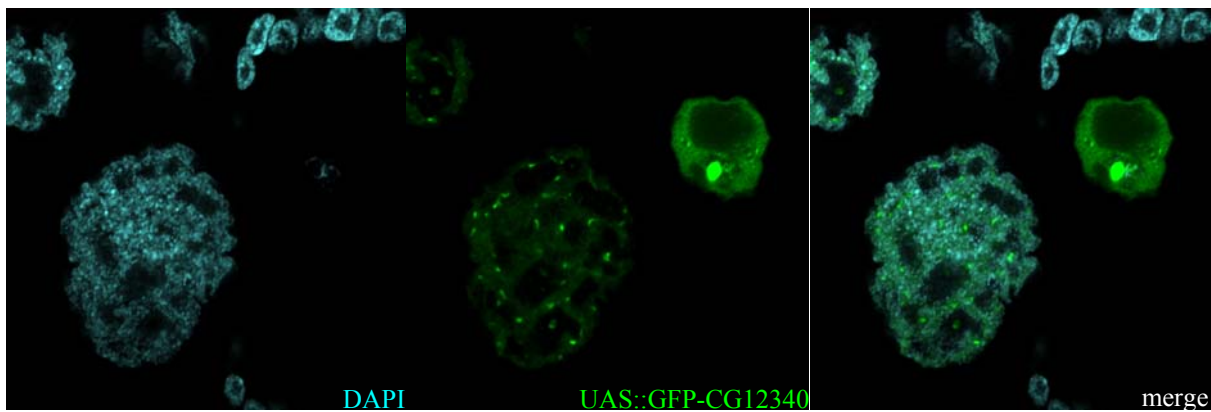
Dies gilt auch für die zuvor erwähnte, möglicherweise zellzyklusabhängige Lokalisierung des Proteins in zusätzlichen Bereichen der Nährzellen und auch der Oozyte. In einer Eikammer im Stadium 10 bis 11 wurde das GFP-CG12340-Fusionsprotein mittels des maternalen Tubulin-Gal4-Treibers exprimiert. Zusätzlich zu dem sehr großen Punkt in der Oozyte können dort, wie auch in den Nährzellkernen, viele weitere kleine beobachtet werden (Abbildung 3.4.3.2.3).



**Abbildung 3.4.3.2.3: Das GFP-CG12340-Fusionsprotein lokalisiert in Ovarien von transgenen Fliegen nach Überexpression mit einem maternalen Tubulin-Gal4-Treiber in einigen Fällen auch in vielen Punkten in den Nährzellkernen.** Gezeigt ist das GFP-CG12340-Fusionsprotein in Grün ohne weitere Antikörperfärbung und DAPI in Türkis. Zusätzlich zu dem deutlichen GFP-Punkt im Oozytenkern können in dieser Eikammer Stadium 10 auch noch sehr viele kleine weitere Punkte in den Nährzellkernen beobachtet werden. Analog zum Wildtyp tritt auch hier diese Art der Lokalisierung von CG12340 nicht in allen Eikammern desselben Präparates auf, so dass von einer zellzyklusabhängigen Lokalisierung ausgegangen werden kann.

Der vergrößert aufgenommene Ausschnitt aus dieser Eikammer (Abbildung 3.4.3.2.4) zeigt noch einmal deutlich die subzelluläre Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins. Die vielen kleinen Punkte in den Nährzellen lokalisieren scheinbar zwischen den DAPI gefärbten Chromatinregionen und könnten daher euchromatische Bereiche darstellen.

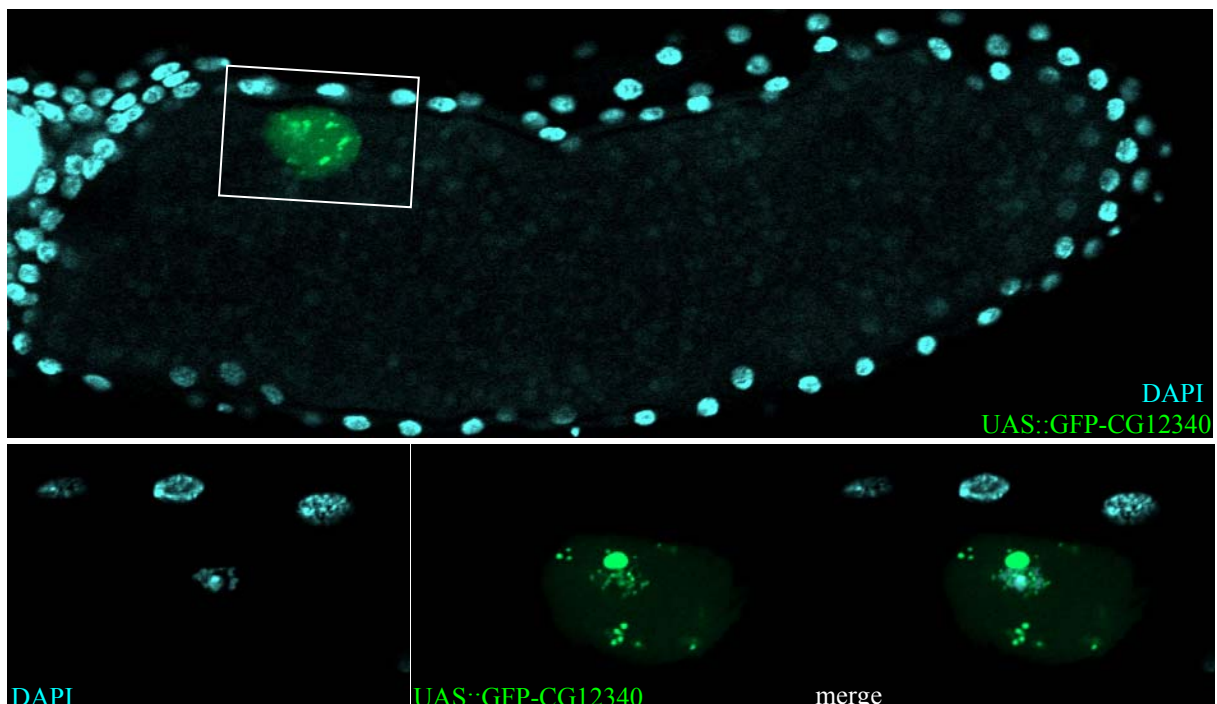




**Abbildung 3.4.3.2.4:** Das GFP-CG12340-Fusionsprotein lokalisiert in Nährzellkernen von Ovarien transgener Fliegen nach Überexpression mit einem maternalen Tubulin-Gal4-Treiber in einigen Fällen auch in vielen Punkten. Gezeigt ist das GFP-CG12340-Fusionsprotein in Grün ohne weitere Antikörperfärbung und DAPI in Türkis. Erneut ist in diesem vergrößerten Ausschnitt der vorigen Abbildung der sehr prominente GFP-Punkt im Oozytenkern zu sehen, zusätzlich zu weiteren kleinen. Analog zum Wildtyp tritt auch hier die Lokalisierung von CG12340 in vielen, vermutlich euchromatische Regionen darstellenden punktförmigen Bereichen auf.

Ein ähnliches Phänomen zeigt die folgende Eikammer Stadium 14, wobei hier das sogenannte „Nährzell-Dumping“, also die Auflösung der Nährzellen bei gleichzeitiger Abgabe des Materials an die Oozyte, bereits sehr weit fortgeschritten ist (Abbildung 3.4.3.2.5).

Die vergrößerte Aufnahme des Oozytenkerns zeigt zusätzlich zu dem großen GFP Punkt in der räumlichen Nähe zum DAPI markierten Karyosom viele weitere kleine. Diese punktförmige Lokalisierung scheint ebenfalls eine stadienabhängige Verteilung darzustellen.



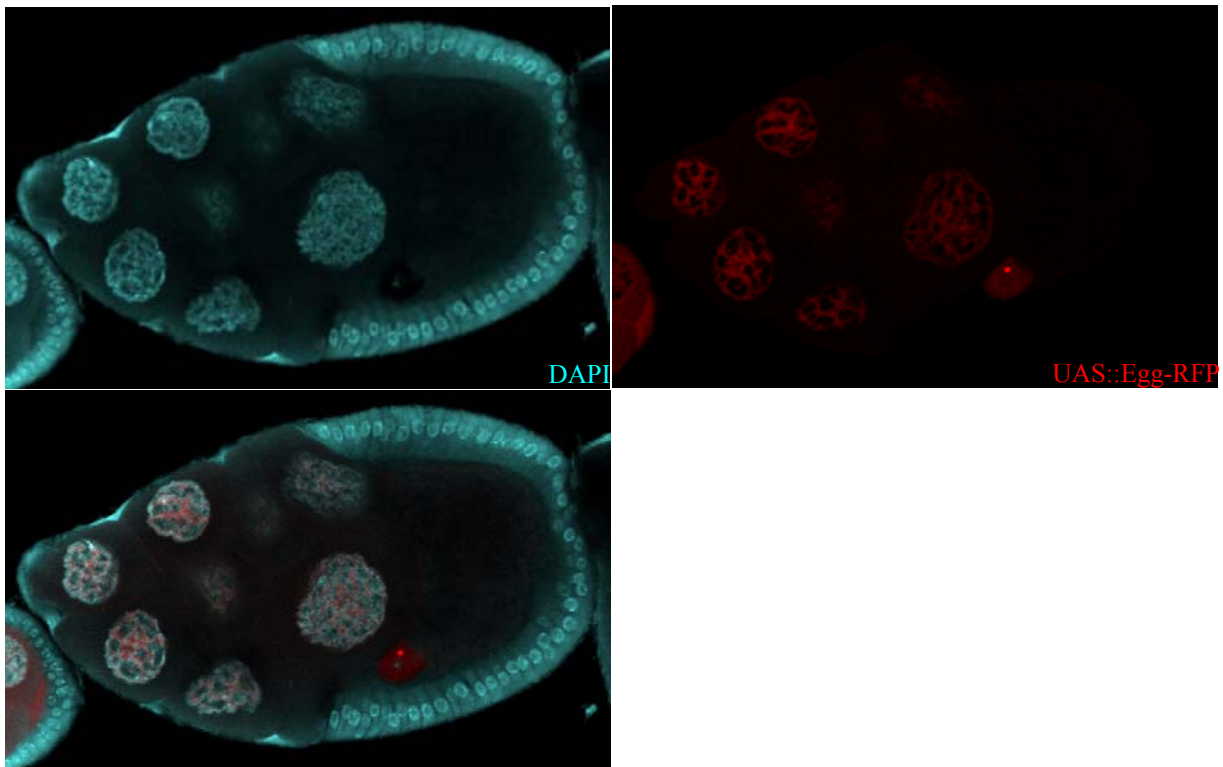
**Abbildung 3.4.3.2.5:** Das GFP-CG12340-Fusionsprotein lokalisiert in Ovarien von transgenen Fliegen nach Überexpression mit einem maternalen Tubulin-Gal4-Treiber auch in einzelnen Oozytenkernen in vielen Punkten. Gezeigt ist das GFP-CG12340-Fusionsprotein in Grün ohne

weitere Antikörperfärbung und DAPI in Türkis. Zusätzlich zu dem deutlichen GFP-Punkt im Oozytenkern können in dieser Eikammer Stadium 14 auch sehr viele kleine weitere Punkte im Oozytenkern beobachtet werden. Diese Lokalisierung im Oozytemkern tritt ebenfalls nur in einzelnen Eikammern auf.

Die Überexpression einer Kopie des Transgens verursachte keine nennenswerten phänotypischen Defekte. Gelegentlich traten apoptotische Eikammern auf, wobei dies in ähnlichem Maße auch für den Wildtyp zutreffend ist. Die Fliegen sind außerdem fertil.

Es war überdies möglich, einen heterozygoten Stamm mit dem Transgen und einem *daughterless*-Gal4 Treiber zu etablieren. Dabei treten bisweilen Tiere auf, die zusätzlich zu einer Kopie des Transgens homozygot für den *daughterless*-Gal4 Treiber waren, oder umgekehrt bei einer Kopie des Treibers homozygot für das Transgen. Es war nicht möglich aus diesen Tieren Stämme zu etablieren. Ebenso wenig war es möglich aus den sporadisch auftretenden, für Treiber und Transgen homozygoten Tieren homozygote Nachkommen zu erhalten. Die Präparation solcher Ovarien zeigte eine erhebliche Zunahme an apoptotischen Eikammern in allen beobachteten Eikammerstadien.

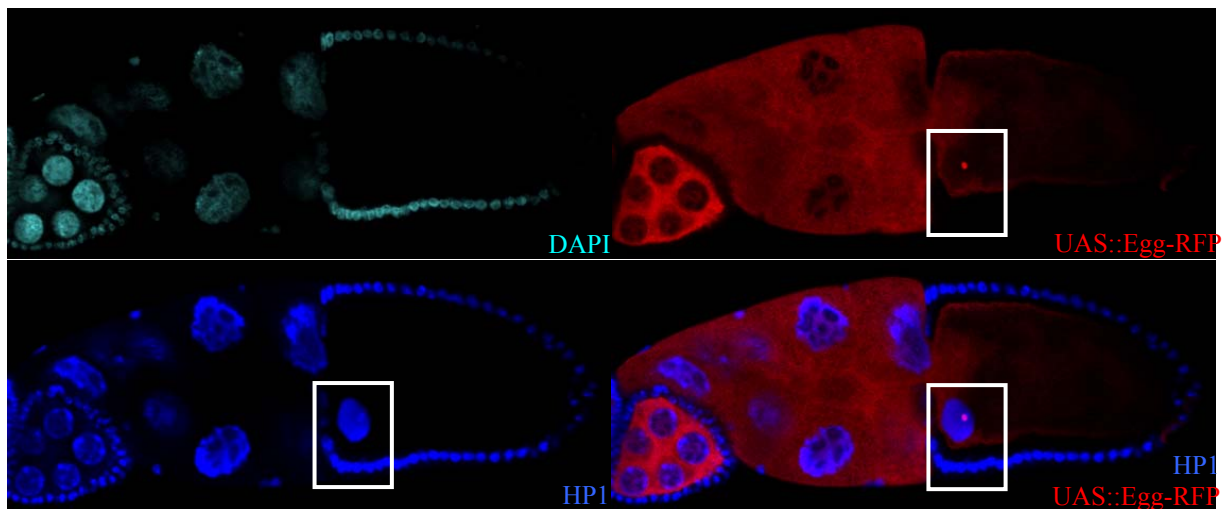
Analog zu den Ovarien-Färbungen mit dem CG12340-Transgen wurden auch Ovarien-Präparationen an Weibchen durchgeführt, welche heterozygot für das in Abschnitt 3.4.2.3 beschriebene UAS-*eggless*-RFP-Transgen und für eine *daughterless* Gal4 Treiberlinie waren. In dieser Eikammer Stadium 9, in der das Eggless-RFP-Fusionsprotein exprimiert wurde, entspricht die Lokalisierung den bereits veröffentlichten Daten (Clough et al., 2007) in Bezug auf eine Lokalisierung in den Nährzellen und der Expression in 1 bis 3 Punkten im Oozytenkern (Abbildung 3.4.3.2.6). Das Expressionsmuster ähnelt auffällig den Wildtyp-Antikörperfärbungen gegen CG12340 und der GFP-CG12340 Expression des Fusionsproteins der vorigen Abbildungen.



**Abbildung 3.4.3.2.6: Das Egg-RFP-Fusionsprotein lokalisiert in Ovarien von transgenen Fliegen nach Überexpression mit einem *daughterless*-Gal4-Treiber in den Nährzellkernen sowie als Punkt im Oozytenkern.** Gezeigt ist das Egg-RFP-Fusionsprotein in Rot ohne weitere Antikörperfärbung und DAPI in Türkis. Das Egg-RFP-Fusionsprotein lokalisiert nach Überexpression mit *daughterless*-Gal4 in einer Weise, wie sie bereits für das Wildtyp Eggless Protein beschrieben wurde (Clough et al., 2007). Dabei gleicht die Lokalisierung des Fusionsproteins in den Nährzellkernen und im Oozytenkern sehr stark der von CG12340 und dessen GFP-Fusionsproteins.

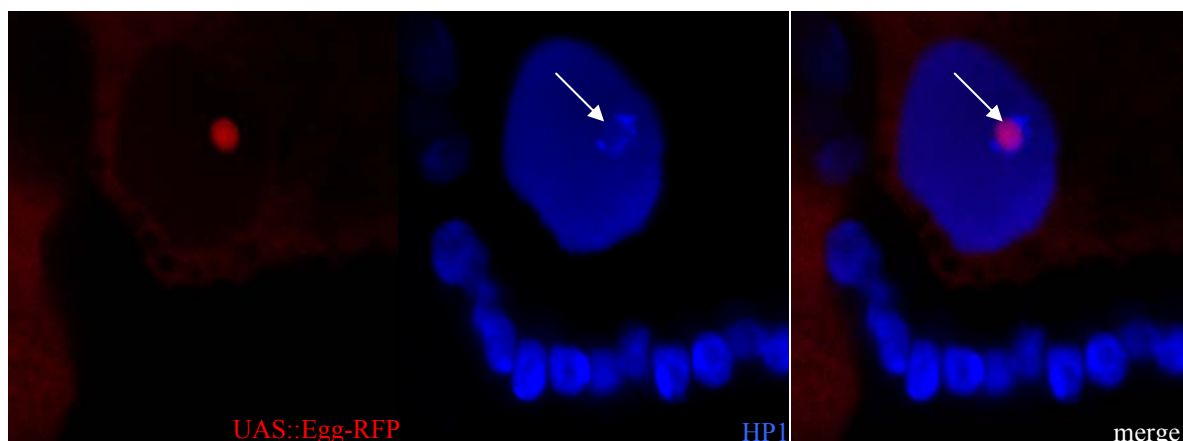
Auch hier wurden daher Ovarien präpariert, die zusätzlich zur Expression des Fusionsproteins gegen HP1 gefärbt worden sind. Allerdings wurde hier die Expression des Transgens mittels maternalem *tubulin*-Gal4-Treiber aktiviert.

Der maternale *tubulin*-Gal4-Treiber verändert das Expressionsmuster dahingehend, dass eine zusätzliche Anreicherung im Zytoplasma auftritt (Abbildung 3.4.3.2.7). Jedoch bleibt die Lokalisierung in Arealen der Nährzellkerne, sowie die Punkte im Oozytenkern erhalten. Allerdings ist die subzelluläre Lokalisierung des Fusionsproteins in Bezug auf die HP1-Färbung bei dieser Vergrößerung nicht zu erkennen.



**Abbildung 3.4.3.2.7:** Das Egg-RFP-Fusionsprotein lokalisiert in Ovarien von transgenen Fliegen nach Überexpression mit einem maternalen *tubulin*-Gal4-Treiber als Punkt im Oozytenkern in räumlicher Nähe zu HP1. Gezeigt ist das Egg-RFP-Fusionsprotein in Rot ohne weitere Antikörperfärbung, HP1 in Blau und DAPI in Türkis. Das Egg-RFP-Fusionsprotein lokalisiert nach Überexpression mit maternalem *tubulin*-Gal4-Treiber stärker zytoplasmatisch als mit daughterless-Gal4. Dennoch ist eine Lokalisierung in den Nährzellkernen zu sehen, ebenso wie die Punkt-förmige Struktur in der unmittelbaren Nähe zu HP1.

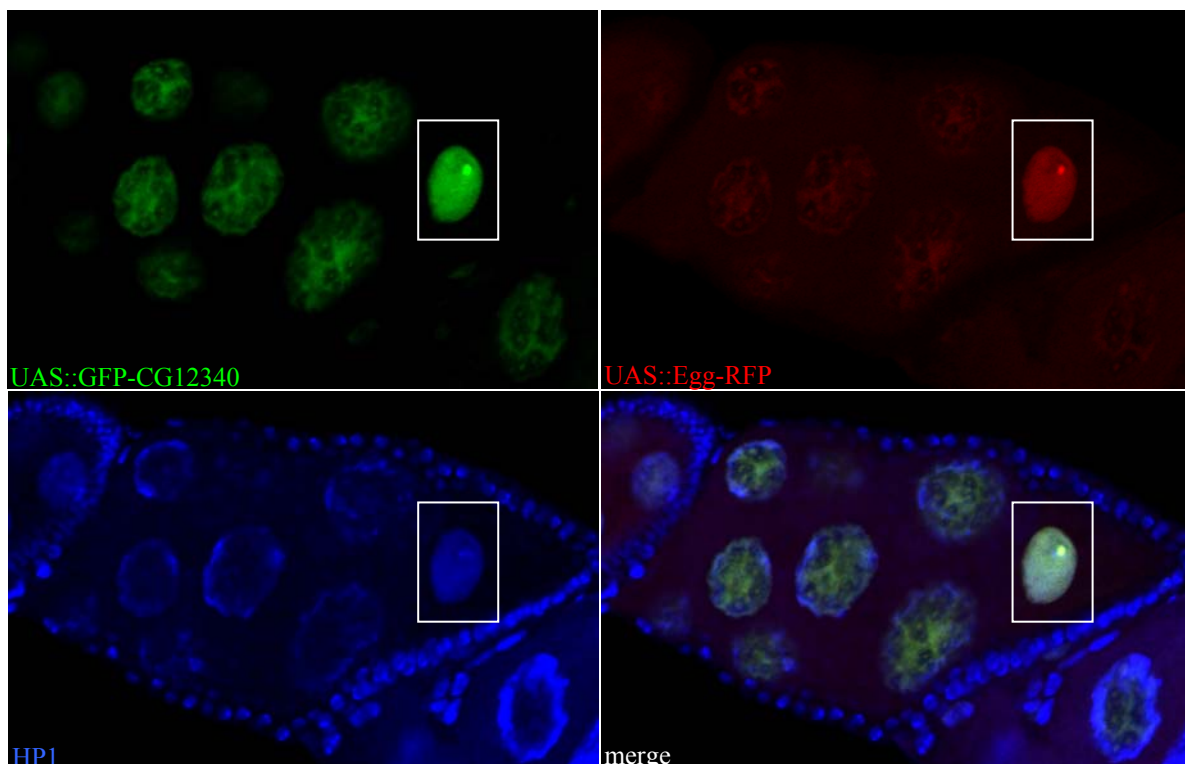
Die vergrößerte Aufnahme dieser Eikammer Stadium 10 zeigt analog zu den Ergebnissen des GFP-*CG12340*-Transgens eine Lokalisierung des *eggless*-RFP-Punkte in direkter räumlicher Nähe zur HP1 Lokalisierung (Abbildung 3.4.3.2.8, Pfeil).



**Abbildung 3.4.3.2.8:** In der vergrößerten Aufnahme des Oozytenkerns der vorigen Abbildung lokalisiert das Egg-RFP-Fusionsprotein deutlich an der durch HP1 markierten Struktur. Gezeigt ist das Egg-RFP-Fusionsprotein in Rot ohne weitere Antikörperfärbung und HP1 in Blau. Das Egg-RFP-Fusionsprotein lokalisiert nach Überexpression mit maternalem *tubulin*-Gal4-Treiber als kreisrunde Struktur (Pfeil) überlappend mit der HP1-Färbung.

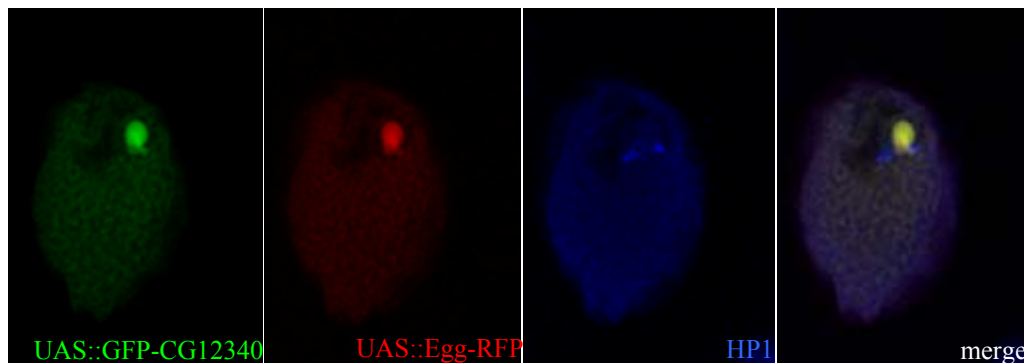
Um zu testen, ob dieses Expressionsmuster tatsächlich mit dem von CG12340 identisch ist, wurden Ovarien von Weibchen, die das GFP-CG12340-Transgen und das *eggless*-RFP-Transgen jeweils in einer Kopie auf dem 2. Chromosom und das *daughterless*-Gal4-Transgen auf dem 3. Chromosom trugen, präpariert.

Das GFP-CG12340-Fusionsprotein und das Eggless-RFP-Fusionsprotein colokalisieren sowohl in den Nährzellen, wie auch in dem Punkt im Oozytenkern (Abbildung 3.4.3.2.9).



**Abbildung 3.4.3.2.9:** Nach Überexpression der GFP-CG12340- und Egg-RFP-Fusionsproteine mit einem *daughterless*-Gal4-Treiber colokalisieren beide Proteine sowohl in den Nährzellkernen wie auch im Oozytenkern und lokalisieren dabei in einem Punkt in räumlicher Nähe zur HP1-Färbung. GFP-CG12340 ist in Grün und RFP-Egg in Rot dargestellt ohne Antikörperfärbung, HP1 in Blau. Die beiden Fusionsproteine colokalisieren in den Nährzellen und im Oozytenkern. Erneut zeigt sich dabei eine räumliche Nähe des GFP- und des RFP-Punktes zum HP1.

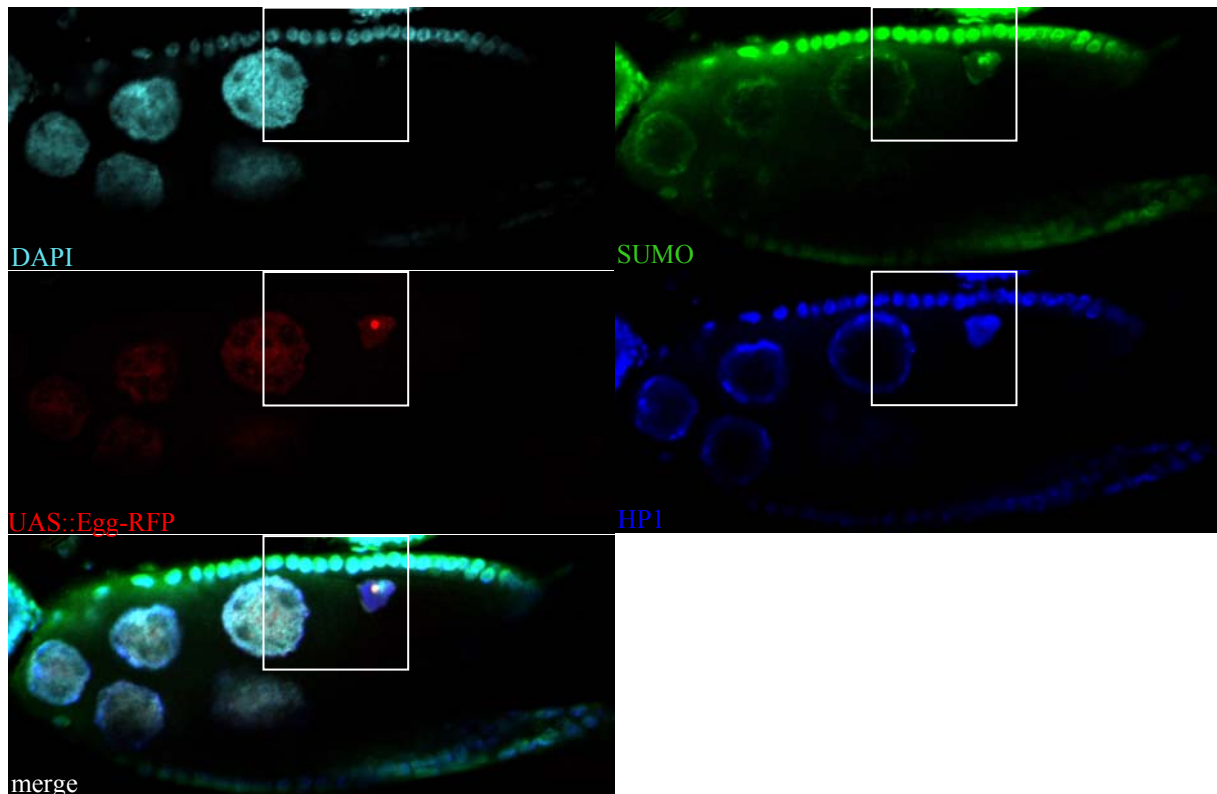
Die vergrößerte Aufnahme des Oozytenkerns aus Abbildung 3.4.3.2.9 zeigt die deutliche Colokalisierung der beiden Fusionsproteine, sowie eine erneute Lokalisierung dieser unmittelbar am HP1-markierten Karyosom (Abbildung 3.4.3.2.10).



**Abbildung 3.4.3.2.10: Die vergrößerte Aufnahme des Oozytenkerns der vorigen Abbildung zeigt die Colokalisierung des GFP-CG12340- und des Egg-RFP-Fusionsproteins in punktförmiger Struktur am HP1.** Gezeigt ist das GFP-CG12340-Fusionsprotein in Grün und das Egg-RFP-Fusionsprotein in Rot ohne weitere Antikörperfärbung, HP1 in Blau. Die vergrößerte Aufnahme des Oozytenkerns verdeutlicht die Colokalisierung der beiden Fusionsproteine an der von HP1 markierten Struktur.

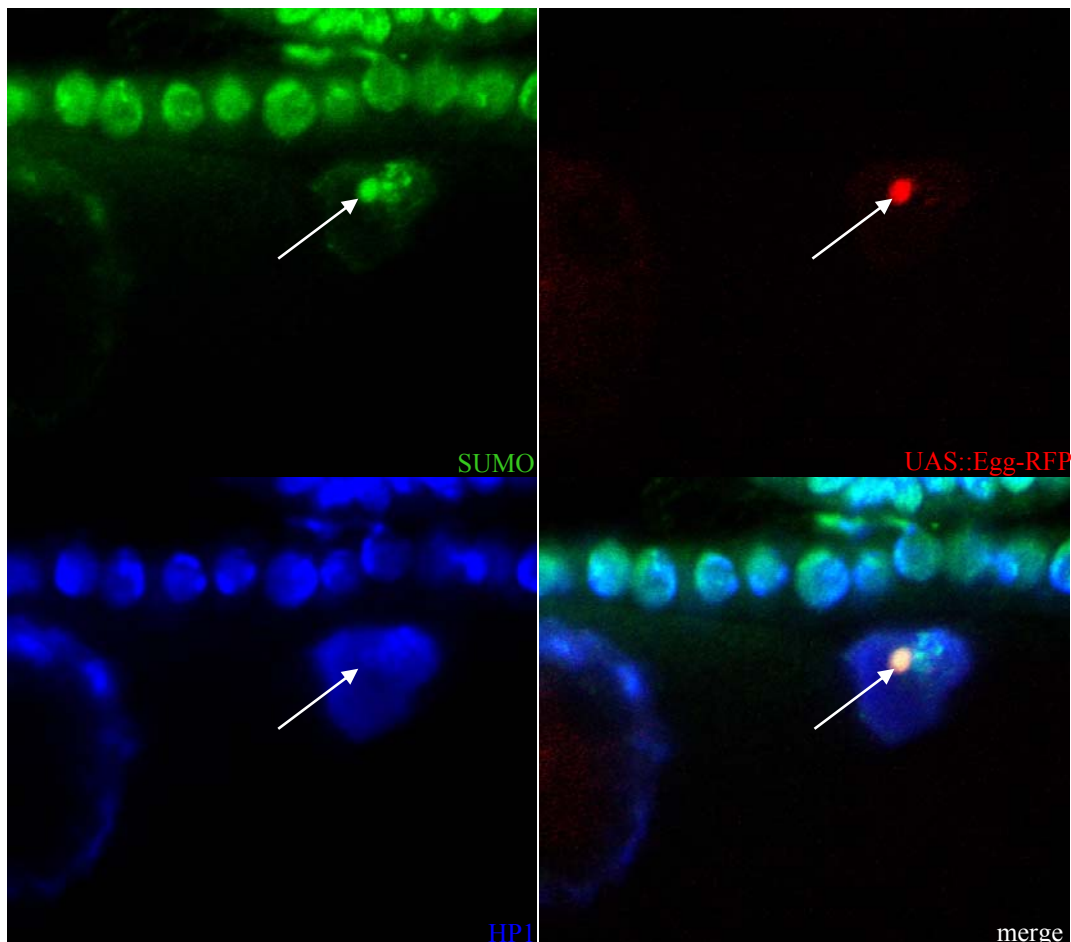
In einer aktuellen Veröffentlichung wurde das Expressionsmuster von SUMO untersucht (Hashiyama et al, 2008), welches in vielen transkriptionell reprimierenden Bereichen eine Rolle spielt und das Eggless-Homolog SETDB1 modifiziert (Rosendorff et al, 2006) und über SUMOylierte Transkriptionsfaktoren auch zusammen mit HP1 zur Bildung von kondensiertem Chromatin rekrutiert (Stielow et al, 2008). In dieser Studie fiel eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zur hier gefundenen Lokalisierung von HP1 im Oozytenkern auf, so dass in weiteren Färbungen von transgenen, Egg-RFP oder GFP-CG12340 überexprimierenden Ovarien die SUMO-Lokalisierung im Vergleich zur Verteilung von HP1 untersucht werden sollte. Beispielhaft ist hier eine Färbung von transgenen Ovarien gezeigt, welche *daughterless* Gal4-getriebenes Egg-RFP überexprimieren, das Resultat in GFP-CG12340-Transgenen war allerdings identisch.

Das SUMO-Protein lokalisiert in den Zellkernen von Keimzellen und Follikelzellen, dabei verursacht die Färbung mit dem SUMO-Antikörper weniger Hintergrund im Oozytenkern, als mit dem HP1-Antikörper und zeigt so eine noch deutlichere Markierung des Karyosoms (Abbildung 3.4.3.2.11). Dort sowie in den Follikel- und Nährzellen scheinen SUMO und HP1 weitestgehend zu colokalisieren. Auch die globuläre Egg-RFP-Struktur lokalisiert in bzw. an diesem Bereich.



**Abbildung 3.4.3.2.11: Das SUMO-Protein colokalisiert weitestgehend mit HP1 im Oozytenkern, Follikel- und Nährzellen.** Dargestellt ist die DNA in Türkis, SUMO in Grün, HP1 in Blau und Egg-RFP in Rot. Neben der Colokalisierung von SUMO und HP1 am Karyosom ist erneut auch eine räumliche Nähe des Egg-RFP-Fusionsproteins zum Karyosom zu sehen.

Eine vergrößerte Aufnahme des in Abbildung 3.4.3.2.11 gezeigten Oozytenkerns bestätigt die Colokalisierung von SUMO und HP1 im Karyosom, wobei der SUMO-Antikörper eine bessere Auflösung dieser Struktur erlaubt und auch punktförmige Areale sichtbar macht, wohingegen die HP1-Färbung hier im Vergleich viel Hintergrundfärbung aufweist (Abbildung 3.4.3.2.12). Auffallend ist die markante Colokalisierung des Egg-RFP-Fusionsproteins mit dem SUMO-Protein in der globulären Struktur, welche am Karyosom anhängig ist (Pfeil).



**Abbildung 3.4.3.2.11: Das SUMO-Protein colokalisiert mit Egg-RFP in der globulären Struktur im Oozytenkern.** Die DNA ist in Türkis, SUMO in Grün, HP1 in Blau und Egg-RFP in Rot dargestellt. SUMO und HP1 colokalisieren im Oozytenkern und beide Proteine colokalisieren mit dem Egg-RFP-Fusionsprotein in der globulären Struktur nahe dem Karyosom (Pfeil).

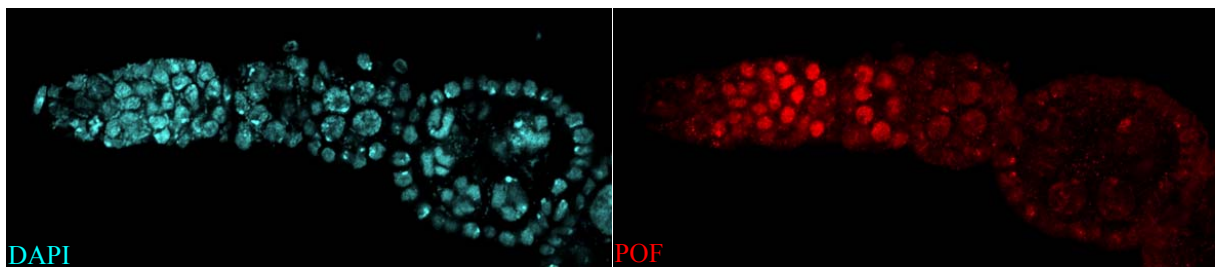
#### 3.4.3.3 Antikörperfärbungen an wildtypischen Ovarien zur Detektion der POF-Lokalisierung

Sowohl Eggless-RFP wie auch CG12340 zeigen abhängig von der Fokusebene in der Regel die globulären Strukturen im Oozytenkern in paariger Lokalisierung und es ist davon auszugehen ist, dass es sich bei diesen Strukturen um Chromatin-Bereiche handelt, welche am Karyosom liegen oder Teil dessen sind. Daher war es nahe liegend, unter diesen Aspekten die zugrunde liegenden Bereiche näher zu untersuchen. Es wurde deshalb in Betracht gezogen, dass es sich hier um das paarig vorliegende vierte Chromosom handeln könnte. Dieses ist das kleinste Chromosom der Fruchtfliege mit hoher Gen- und P-Element-Insertionsdichte, welches größtenteils durch HP1 vermittelte Kondensierung repräsentiert wird. Neuere Veröffentlichungen bringen in Speicheldrüsen-Polytänchromosomen-Präparaten Eggless in direkte Verbindung mit dieser Chromatinregulierung des vierten Chromosoms und zeigen



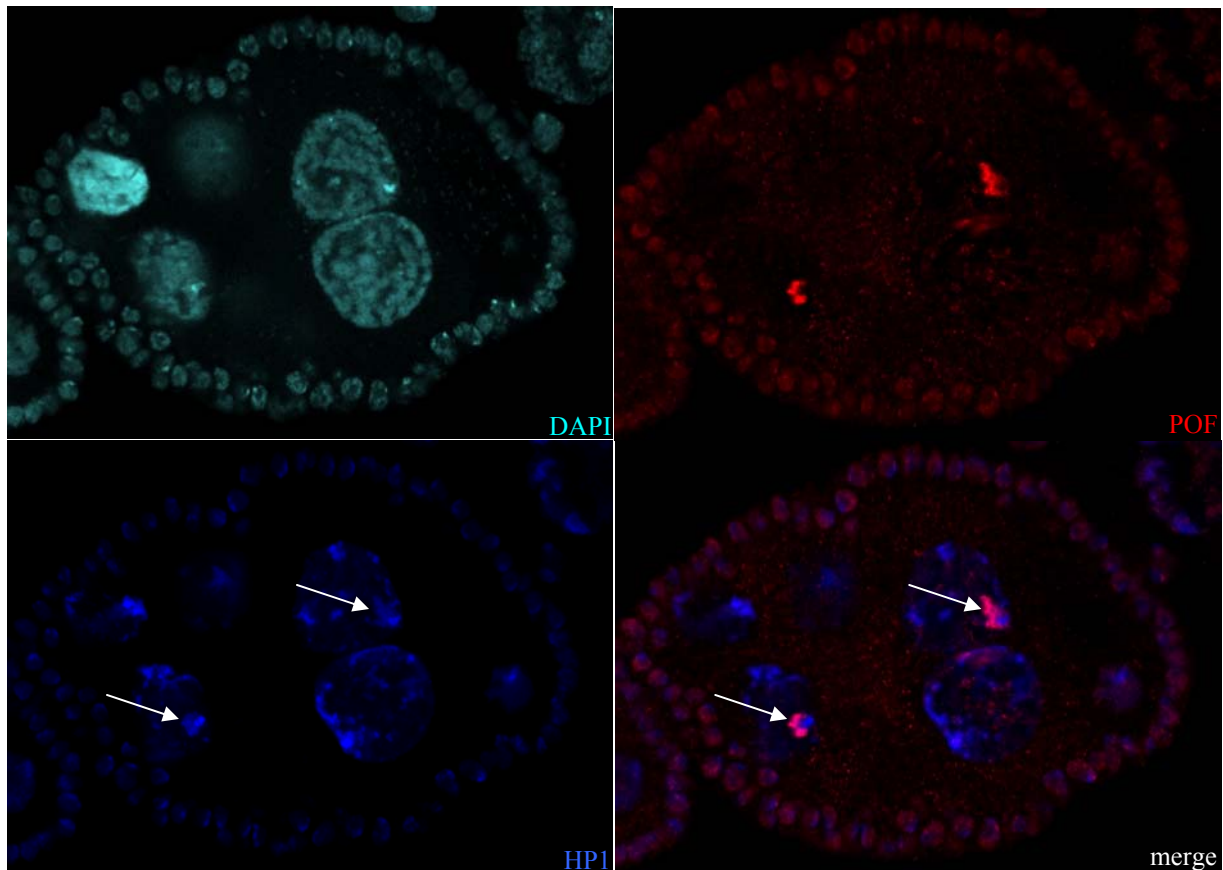
eine Interaktion von Eggless mit Painting Of Fourth (POF) (Seum et al, 2007; Tzeng et al, 2007), welches spezifisch das gesamte vierte Chromosom markiert (Larsson et al, 2001).

Daher wurde zunächst die Lokalisierung von POF in Wildtyp-Ovarien untersucht. POF kann im Wildtyp im Germarium und in jungen Eikammern sowohl in den Kernen der Keimzellen wie auch der Follikelzellen detektiert werden (Abbildung 3.4.3.3.1). Dabei ähnelt die Färbung der Lokalisierung von CG12340 im selben Stadium (Abbildung 3.4.3.1.1). Auch hier wird die Färbung mit zunehmendem Stadium insgesamt schwächer. Leider ist eine Cofärbung gegen POF und CG12340 nicht möglich, da beide Antikörper durch Immunisierungen von Kaninchen gewonnen wurden.



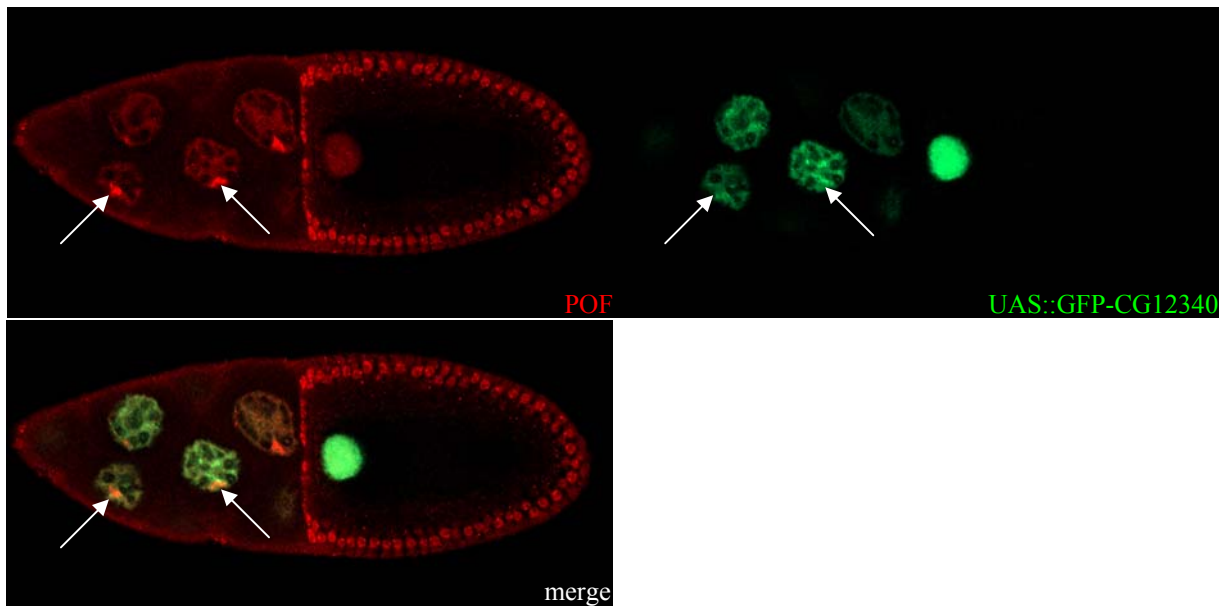
**Abbildung 3.4.3.3.1: POF lokalisiert in frühen Wildtyp-Ovarien ebenfalls ubiquitär und nukleär.** Gezeigt ist POF in Rot, DAPI in Türkis. POF lokalisiert innerhalb der Germarien und früher Eikammern in den Kernen der Keimbahn- und Follikelzellen.

In Eikammern des Stadiums 4-5 ist die POF-Färbung bereits sichtlich schwächer (Abbildung 3.4.3.3.2). Analog zu CG12340 lokalisiert das Protein in den Follikelzell- und deutlich sichtbar in den Nährzellkernen in Arealen, die ebenfalls an HP1-gefärbte Bereiche anlagern, bzw. mit schwächer HP1 gefärbten Bereichen colokalisieren (Abbildung 3.4.3.3.2, Pfeil). Es kann daher spekuliert werden, dass es sich bei diesen Bereichen der Nährzellen um das jeweils vierte Chromosom von *Drosophila* handelt.



**Abbildung 3.4.3.3.2: POF lokalisiert in Wildtyp-Eikammern Stadium 4-5 in den Follikelzellkernen und vor allem in den Nährzellkernen am vierten Chromosom an HP1-Signalen.** Gezeigt ist POF in Rot, DAPI in Türkis und HP1 in Blau. POF lokalisiert in den Kernen der Follikel- und der Nährzellen. Dabei ist in den Nährzellen deutlich zu sehen, dass die Färbung mit schwächer HP1 gefärbten Chromatinregionen colokalisiert (Pfeile). Auf Grund der Spezifität des POF-Proteins für das vierte Chromosom ist davon auszugehen, dass das Signal das POF-Protein an diesem Chromosom widerspiegelt.

Auch in späteren Stadien der Oogenese bleibt diese Lokalisierung von POF erhalten. In Eikammern des Stadiums 10 ist das POF Protein ebenfalls in den Kernen der Follikel- und Nährzellen detektierbar (Abbildung 3.4.3.3.3). Diese Eikammern stammen aus einer transgenen Fliege, welche das GFP-CG12340-Fusionsprotein unter der Kontrolle eines *daughterless*-Gal4-Treibers exprimiert. Diese Treiberlinie exprimiert Gal4 nicht immer in allen Zellen einer Eikammer und auch in den exprimierenden Zellen nicht unbedingt gleich stark. In den GFP exprimierenden Nährzellen sind die Bereiche, in denen das Fusionsprotein lokalisiert, auch POF-gefärbt. Jedoch zeigen die Areale mit der stärksten POF-Lokalisierung, welche vermutlich das vierte Chromosom widerspiegeln, ein schwächeres Signal des GFP-Fusionsproteins (Abbildung 3.4.3.3.3, Pfeile). Dagegen ist die POF-Färbung im Oozytenkern hier eher diffus, während das Signal des GFP-Fusionsproteins im Oozytenkern bewusst überbelichtet ist, um eine Detektion dessen an den Nährzellkernen zu ermöglichen.



**Abbildung 3.4.3.3.3: POF colokalisiert partiell mit dem GFP-CG12340-Fusionsprotein in den Nährzellen von Ovarien transgener Fliegen, die das Fusionsprotein mittels daughterless-Gal4 überexprimieren.** Gezeigt ist POF in Rot und das GFP-CG12340-Fusionsprotein in Grün ohne Antikörperfärbung. POF lokalisiert in den Kernen der Follikel- und der Nährzellen. Dabei ist die Färbung in den Nährzellen erneut am vierten Chromosom deutlich stärker, als in den übrigen Kernbereichen. Das Fusionsprotein dagegen ist auf Grund der Treiberlinie nicht in allen Zellen exprimiert. Um die Lokalisierung desselben in den Nährzellen zu detektieren, musste die Belichtung erhöht werden, weshalb der Oozytenkern überbelichtet wurde. Es ist eine schwache Colokalisierung von POF mit dem Fusionsprotein am vierten Chromosom zu erkennen (Pfeile).

#### 3.4.4 Antikörperfärbungen an Keimbahnklon-Ovarien

Die Antikörperfärbungen gegen das wildtypische CG12340 Protein in Ovarien haben die Lokalisierung dieses Proteins in den Nährzellen und der Oozyte gezeigt. Da während der gesamten Oogenese die Oozyte transkriptionell bis auf wenige Ausnahmen nahezu inaktiv ist, muss es sich bei dem beobachteten Protein um das Genprodukt des maternalen *CG12340* handeln. In vielen Fällen wird ein möglicher Phänotyp von Mutationen in der Keimbahn durch eine maternale Komponente des betroffenen Gens maskiert. Sofern eine derartige Mutation wie im Falle von *CG12340* homozygot zu Letalität führt, ist es in der Regel nicht möglich, homozygot mutante Fliegen zu erhalten, deren Keimbahn das maternale Genprodukt fehlt. Es ist jedoch möglich, in Fliegen, die für die Mutation heterozygot sind, Keimbahnklone zu erzeugen. Dabei aktiviert eine durch Hitzeschock induzierte Flippase die mitotische Rekombination an FRT-Sequenzen und erzeugt dadurch homozygot mutante Keimzellen in einem ansonsten heterozygoten genetischen Hintergrund. Je nachdem, zu welchem Zeitpunkt der Hitzeschock erfolgte, bzw. in welchem Stadium sich die Zellen gerade befanden, können homozygot mutante Stammzellen entstanden sein, welche dann ebenfalls homozygot mutante

Zystoblasten und damit im Verlauf ganze mutante Eikammern hervorbringen. Wurden Zellen erst im Zystozyten-Stadium während der Mitose homozygot mutant, können auch Mosaik-Eikammern entstehen.

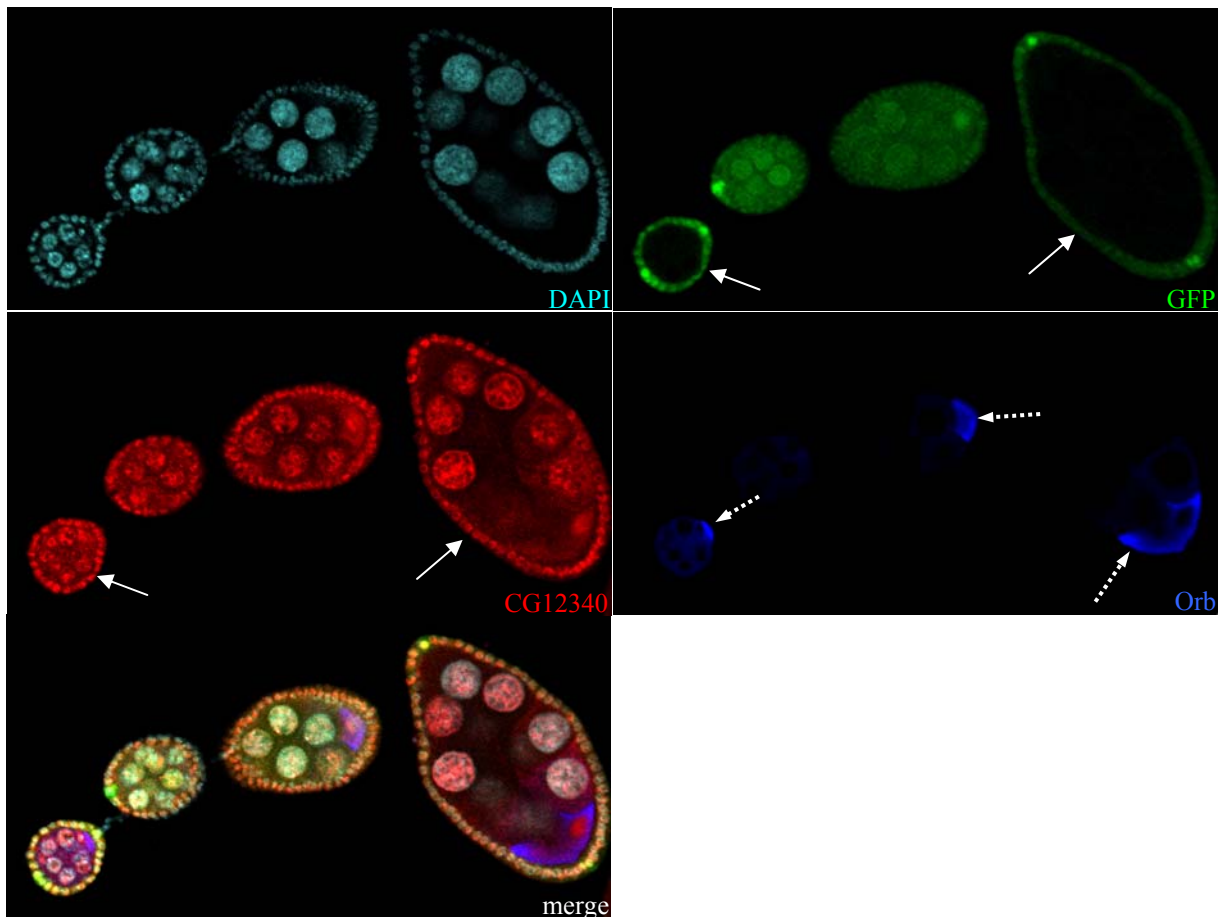
Da jedes Ovariol über 2-3 Stammzellen verfügt, können bei nur einer von der mitotischen Rekombination betroffenen Stammzelle mutante und heterozygote und damit wildtypische Eikammern hintereinander im Ovariolschlauch liegen. Sofern alle Stammzellen eines Ovariols betroffen sind, kann es auch zu einer Aufreihung ausschließlich mutanter Eikammern kommen.

#### 3.4.4.1 Antikörperfärbungen an *CG12340*-mutanten Keimbahnklonen

Für die Erzeugung von Keimbahnklonen, welche homozygot für Mutationen in *CG12340* waren, wurden verschiedene mutante Allele von *CG12340* verwendet. Diese wurden wie in Kapitel X beschrieben zunächst auf ein FRT tragendes Chromosom rekombiniert und mit Fliegen gekreuzt, welche sowohl eine Hitzeschock getriebene Flipase zur Rekombination an den FRT-Sequenzen trugen, wie auch ein FRT-Chromosom mit distalem *GFP*.

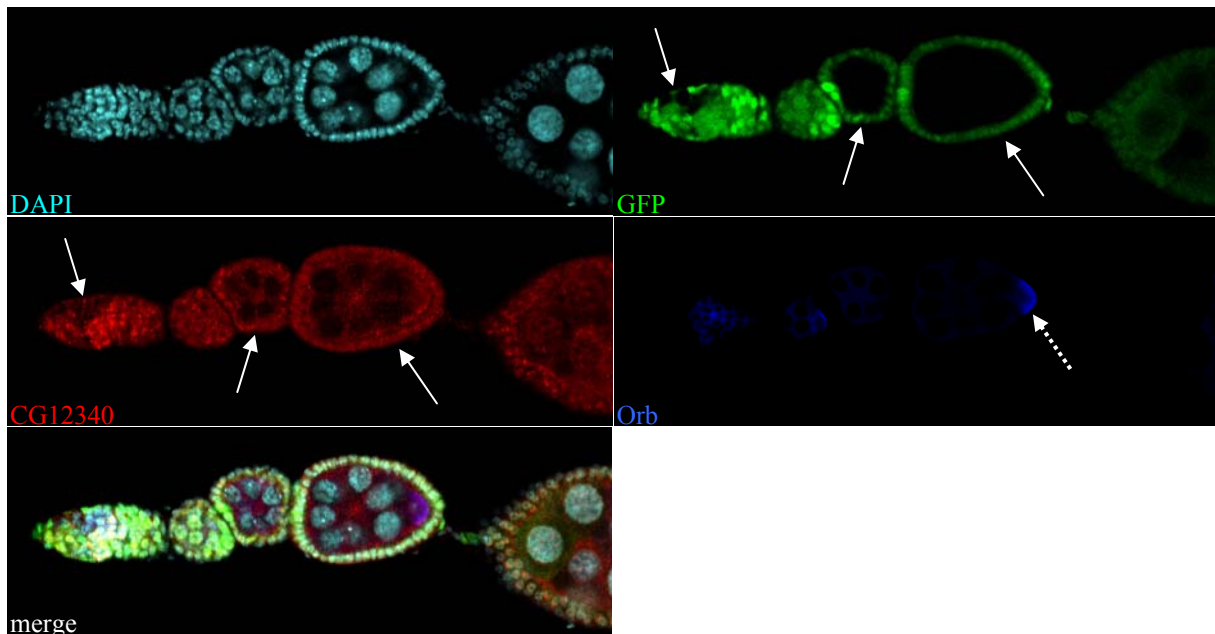
Des Weiteren wurden auch Klone in Ovarien von Fliegen erzeugt, welche ein Chromosom mit FRT-Sequenz ohne distale Mutation, sowie das FRT-Chromosom mit *GFP* trugen. Die Ovarien dienten als Kontrolle, da in den Klonen keine Veränderung gegenüber dem Wildtyp erwartet würde.

Tatsächlich zeigen Klone von Kontrollfliegen eine wildtypische Lokalisierung von *CG12340*, sowohl in den Follikel- und Nährzellen wie auch in der Oozyte (Abbildung 3.4.4.1.1, Pfeile). Innerhalb der beiden Klone ist die *CG12340* Färbung identisch zur Lokalisation im Wildtyp. Eine Orb-Färbung zeigt ebenfalls eine wildtypische posteriore Anreicherung in der Oozyte, so dass die Polarität innerhalb der Eikammern bestehen geblieben ist. Die Induktion von Klonen durch Hitzeschock vermittelte mitotische Rekombination zerstört daher weder die Lokalisierung von *CG12340*, noch die Polarität der Oozyte.



**Abbildung 3.4.4.1.1: Die Erzeugung von Keimbahnklonen in Ovarien von FRT-Kontroll-Fliegen verändert weder die Lokalisation von CG12340, noch die Polarität der Oozyte.** Gezeigt ist CG12340 in Rot, GFP in Grün ohne Antikörperfärbung, Orb in Blau und DAPI in Türkis. Die Keimbahnklone ohne GFP sind mit Pfeilen markiert und zeigen eine wildtypische Färbung gegen CG12340. Auch die Kerne, markiert durch DAPI, sind innerhalb der Klone morphologisch unauffällig. Ebenso ist die posteriore Anreicherung von Orb sowohl in den Klonen wie auch in einer GFP-exprimierenden Eikammer vorhanden (gestrichelte Pfeile).

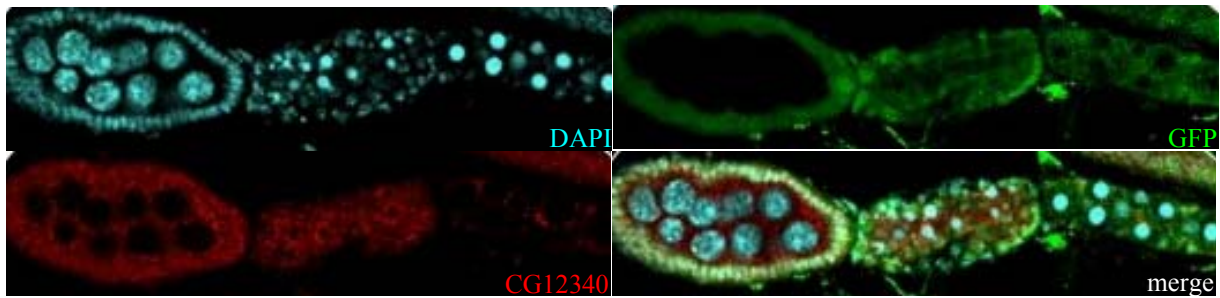
Im Gegensatz zu diesem Ergebnis zeigen die Keimbahnklone, welche homozygot mutant für das  $P\{EPgy2\}CG12340^{EY00884}$  von *CG12340* geworden sind, ein völliges Fehlen von CG12340 Signal in den Kernen der Keimzellen. Die Klone (Abbildung 3.4.4.1.2, Pfeile) besitzen zwar immer noch eine zytoplasmatische Restfärbung, diese könnte aber ein unspezifisches Artefakt sein oder ein trunkiertes Protein dieses Allels, welches vom N-terminal gerichteten Antikörper erkannt wird. Das Fehlen der spezifischen Kernfärbung von CG12340 hat jedoch keine Auswirkung auf die Oozyten-Polarität, wie die Orb-Färbung beweist (gestrichelte Pfeile).



**Abbildung 3.4.4.1.2: Die Erzeugung von Keimbahnklonen in Ovarien von Fliegen mit mutantem P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup>-Allel führt zum Verlust der Kernfärbung von CG12340, jedoch nicht zum Verlust der Polarität der Oozyte.** Gezeigt ist CG12340 in Rot, GFP in Grün ohne Antikörperfärbung, Orb in Blau und DAPI in Türkis. Die Keimbahnklone ohne GFP sind mit Pfeilen markiert und zeigen ein Fehlen der Kern-Färbung von CG12340. Allerdings ist die posteriore Anreicherung von Orb innerhalb des mit einem gestrichelten Pfeil markierten Klons vorhanden.

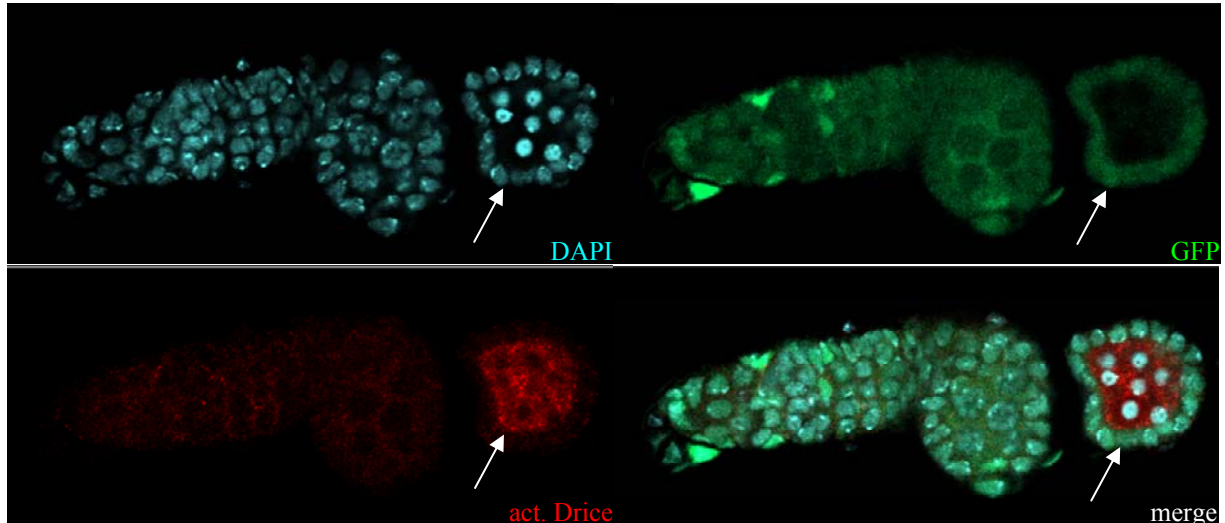
Es sollte noch erwähnt werden, dass die Resultate der Keimbahnklon-Färbungen für alle verwendeten mutanten Allele von *CG12340* identisch sind. Dabei scheint auch der second site hit des P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup>-Allels keine Rolle zu spielen, da auch hier kein Unterschied zu den Ergebnissen mit den anderen Allelen auftritt. Des Weiteren legen die Weibchen, welche die Keimbahnklon beinhaltenden Ovarien beherbergen, keine Eier ohne GFP. Dies bedeutet, dass die Eikammern, in denen *CG12340* defekt ist oder fehlt, die Oogenese nicht überdauern. Stattdessen degenerieren sie in unterschiedlichen Stadien der Oogenese. Es können keine mutanten Eikammern mehr detektiert werden, welche älter sind als ca. Stadium 9. Dies belegen auch seltener vorkommende Ovatiolschläuche mit durchweg mutanten Eikammern. Hier ist eine Degenerierung im Verlauf der Oogenese deutlich zu erkennen (Abbildung 3.4.4.1.3).

In allen untersuchten Allelen gleichermaßen kann die Degenerierung bereits in den Germarien oder in späteren Stadien einsetzen.



**Abbildung 3.4.4.1.3:** Ein ausschließlich aus mutanten Eikammern bestehender Ovariolschlauch zeigt deutlich die Degenerierung der Eikammern um die Stadien 8-9. Der abgebildete Ovariolschlauch zeigt CG12340 in Rot, DAPI in Türkis und GFP in Grün. Die Keimbahnklone des mutanten Allels  $P\{EPgy2\}CG12340^{EY00884}$  degenerieren deutlich vor Eikammer-Stadium 10.

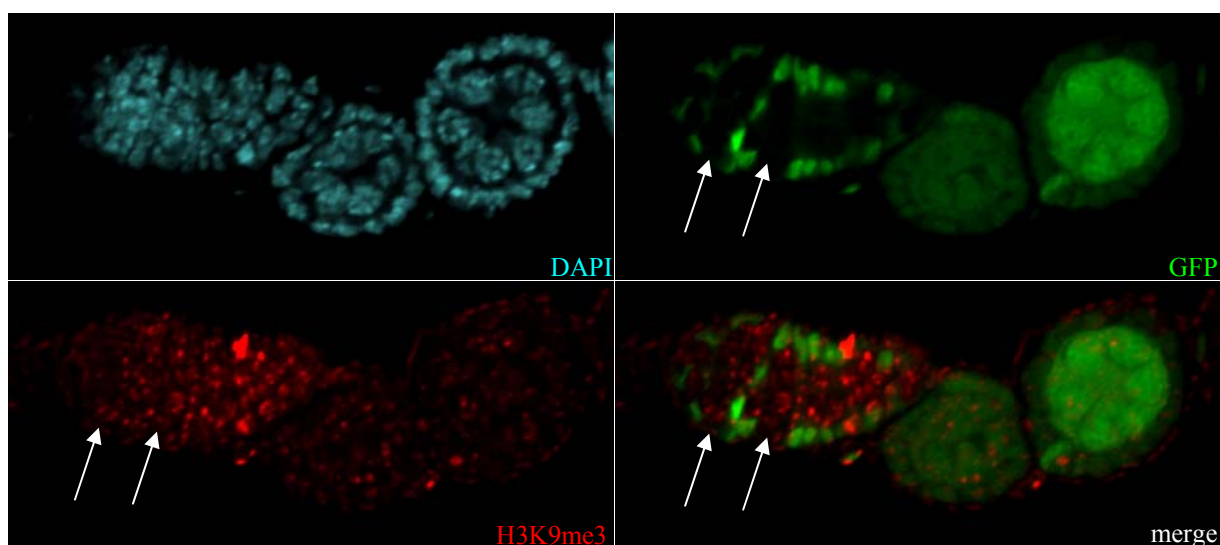
Die Degenerierung der Eikammern des mutanten Allels  $P\{XP\}CG12340^{d06198}$  zeigt apoptotische Merkmale, wie kondensierte Kerne (Abbildung 3.4.4.1.4). Diese sind deutlich kompakter und mit stärker mit DAPI angereichert als die Kerne in nicht mutanten Eikammern. Zusätzlich kann eine Antikörperfärbung gegen die aktivierte Caspase Drice, ein Anzeichen erhöhter apoptotischer Aktivität, in mutanten Eikammern in starkem Maße nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.4.4.1.4:** Keimbahnklon-Eikammern von *CG12340* mutanten Allelen (hier:  $P\{XP\}CG12340^{d06198}$ ) degenerieren und zeigen apoptotische Merkmale. Gezeigt ist GFP in Grün, DAPI in Türkis und *activated Drice* in Rot. Der Keimbahnklon ohne GFP ist mit einem Pfeil markiert und zeigt kompaktere Kerne. Die Färbung gegen eine Caspase des Apoptose Signalwegs ist deutlich verstärkt gegenüber den anderen Eikammern.

Allerdings ist der „programmierte Zelltod“ nur die Folge der Defekte durch die Mutationen in *CG12340*. Auslöser der Degeneration könnte aber ein verändertes Methylierungsmuster des Chromatins sein. Da *CG12340* und *Eggless* eine völlige Colokalisierung zeigen und für Ovarien von homozygot mutanten, sterilen *eggless*-Mutanten bereits beschrieben wurde, dass diese kein oder nur reduziertes H3K9me3 Signal mehr in Germarien besitzen (Clough et al., 2007), war es nahe liegend, eine Färbung gegen H3K9me3 in *CG12340* Keimbahnklonen durchzuführen.

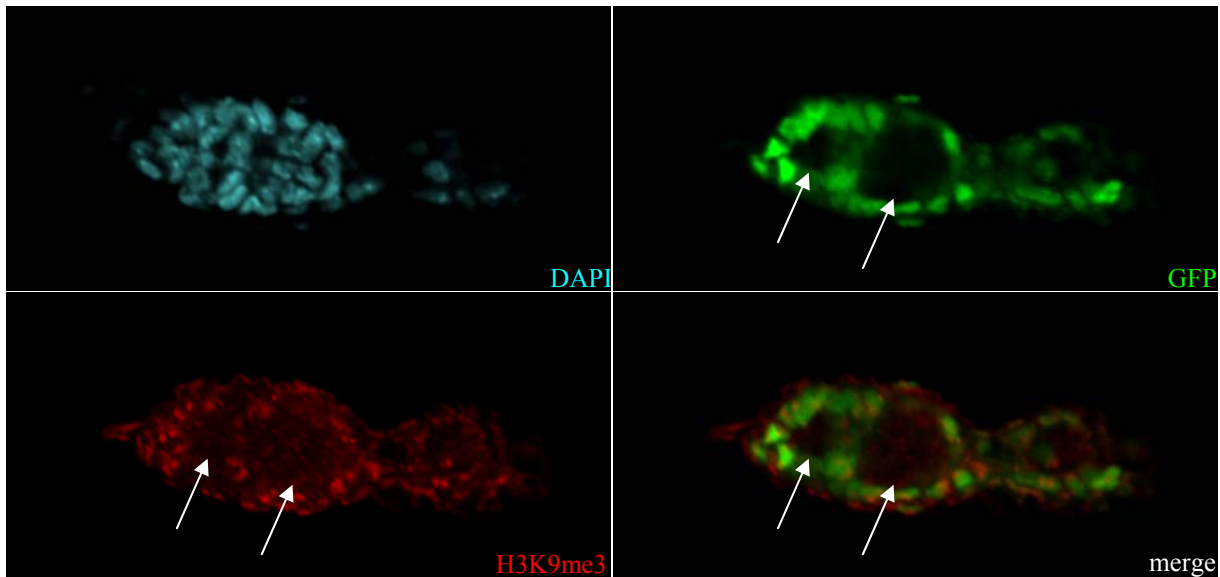
In Germarien von Kontrollklonen (Pfeile) lokalisiert H3K9me3 deutlich innerhalb der Kerne (Abbildung 3.4.4.1.5).



**Abbildung 3.4.4.1.5: H3K9me3 lokalisiert in Germarien von FRT-Kontroll-Fliegen innerhalb der Kerne von Klonen.** Gezeigt ist H3K9me3 in Rot, GFP in Grün und DAPI in Türkis. Die Keimbahnklone ohne GFP innerhalb des Germariums sind mit Pfeilen markiert und zeigen eine Kernfärbung von H3K9me3.

Dagegen zeigen Keimbahnklone in Germarien von *CG12340* mutanten Allelen, hier am Beispiel der P-Element-Insertionslinie  $P\{EPgy2\}CG12340^{EY00884}$ , eine Reduktion der H3K9me3-Färbung (Abbildung 3.4.4.1.6, Pfeile). Die verbliebene Lokalisierung beschränkt sich auf die Kerne der nicht mutanten Follikelzellen.

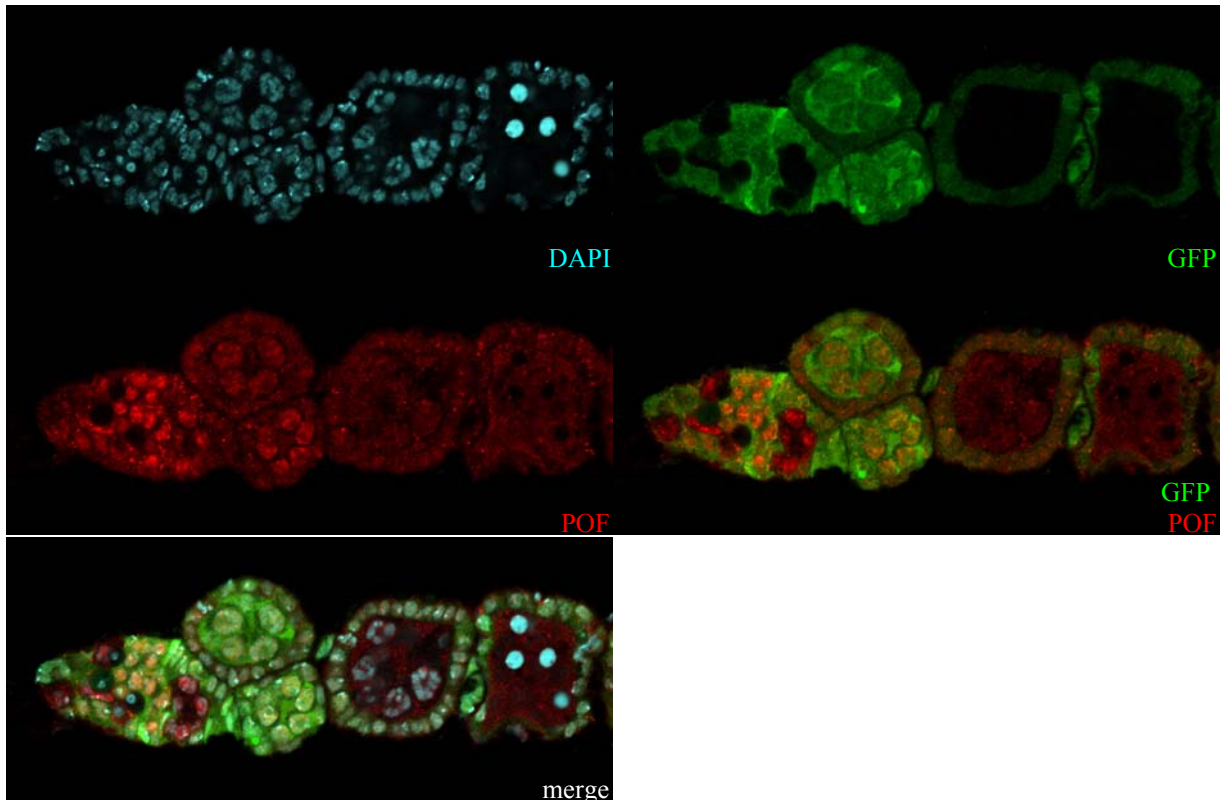




**Abbildung 3.4.4.1.6:** In Germarien von Keimbahnklonen *CG12340* mutanter Allele (hier:  $P\{EPgy2\}CG12340^{EY00884}$ ) ist die H3K9me3-Färbung deutlich reduziert. Gezeigt ist H3K9me3 in Rot, GFP in Grün und DAPI in Türkis. Die Keimbahnklone ohne GFP innerhalb des Germariums sind mit Pfeilen markiert und zeigen den Verlust der Kernfärbung von H3K9me3. Lediglich in den somatischen Follikelzellen ist die Kernfärbung des Proteins unverändert.

Eine Reduktion der ohnehin schwächeren H3K9me3 Färbung in Eikammern, die das Germarium bereits verlassen hatten, konnte nicht beobachtet werden. Dies korreliert mit bereits veröffentlichten Resultaten, nach denen die H3K9 Trimethylierung dort von einer anderen Methyltransferase, *Su(var)3-9*, übernommen wird (Yoon et al. 2008). Jedoch hat das Fehlen von *su(var)3-9* im Gegensatz zum Verlust von *eggless* oder *CG12340* keine Auswirkung auf das Überleben der Eikammern.

Da sich aus den Färbungen von Polytänochrosomen ein Zusammenhang zwischen der Lokalisierung von *CG12340* und von POF ergeben hat, sollten weitere *CG12340* mutante Keimbahnklone Aufschluss darüber geben, ob das Fehlen von *CG12340* gleichzeitig die Lokalisierung von POF in den Kernen der Keimzellen verändert. Jedoch erscheint die POF-Färbung in den Keimbahnklonen unverändert gegenüber dem Wildtyp (siehe Abbildung 3.4.3.3.1), ausgenommen in denjenigen Kernen, welche durch den Verlust von *CG12340* bereits deutliche Merkmale von Apoptose zeigen, wie kondensierte Kerne (Abbildung 3.4.4.1.7, Pfeile). Dabei scheint der Verlust der POF-Lokalisierung eine Folge der fortschreitenden Apoptose zu sein.



**Abbildung 3.4.4.1.7: Keimbahnklone des *CG12340*-Transdeletions-Allels zeigen keine Veränderung der POF-Lokalisierung.** Dargestellt ist die DNA in Türkis, GFP in Grün, POF in Rot, sowie jeweils eine Überlagerung von POF und GFP mit und ohne DAPI. Das POF-Protein zeigt eine wildtypische Lokalisierung, ausgenommen in bereits apoptotischen Kernen, wo die Färbung fehlt.

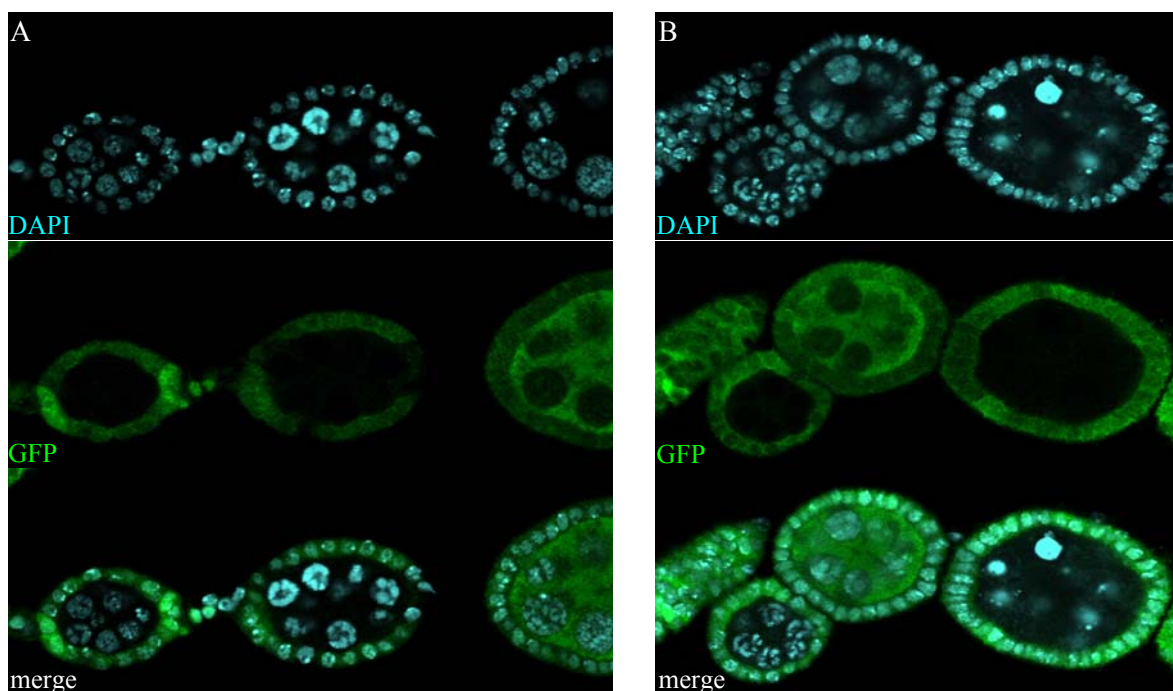
Ähnliches gilt für die HP1-Lokalisierung in Keimbahnklonen von *CG12340* und *eggless*. Dies wird in Abbildung 3.4.4.2 beispielhaft an Färbungen von Keimbahnklonen der *eggless* Mutante und der *CG12340\eggless*-Doppelmutante gezeigt.

#### 3.4.4.2 Antikörperfärbungen an *eggless*-mutanten und *CG12340/eggless* mutanten Keimbahnklonen

Der Phänotyp der homozygoten Ovarien von *eggless* Mutanten wirkt auf den ersten Blick drastischer als der von *CG12340* mutanten Keimbahnklonen, welche durchaus das Germarium verlassen können, während in den *eggless* mutanten Ovarien das Abknospen von Eikammern ausbleibt. Allerdings gibt es einen entscheidenden Unterschied zwischen den homozygoten mutanten *eggless* Ovarien und den *CG12340* Keimbahnklonen, dadurch dass erstere ebenfalls mutante Follikelzellen besitzen, während diese in den *CG12340* Keimbahnklonen heterozygot sind. Denkbar wäre daher, dass Eikammern von *eggless*

mutanten Keimbahnklonen ebenso das Germarium verlassen könnten, um dann im Verlauf der Oogenese zu degenerieren, wie es in *CG12340* mutanten Klonen der Fall ist.

Um dies zu testen, wurden auf die bereits beschriebene Weise Keimbahnklone in Fliegen hergestellt, welche neben dem FRT-Chromosom mit GFP auch ein FRT-Chromosom mit der *eggless* Mutation 1473 (Clough et al., 2007) besaßen. Der erhaltene Phänotyp ist dabei identisch zu dem der *CG12340*-Mutanten. Die Eikammern werden im Verlauf der Oogenese apoptotisch (Abbildung 3.4.4.2.1), wobei auch hier die Apoptose bereits früh in den Germarien auftreten kann oder aber erst im Verlauf der weiteren Stadien.

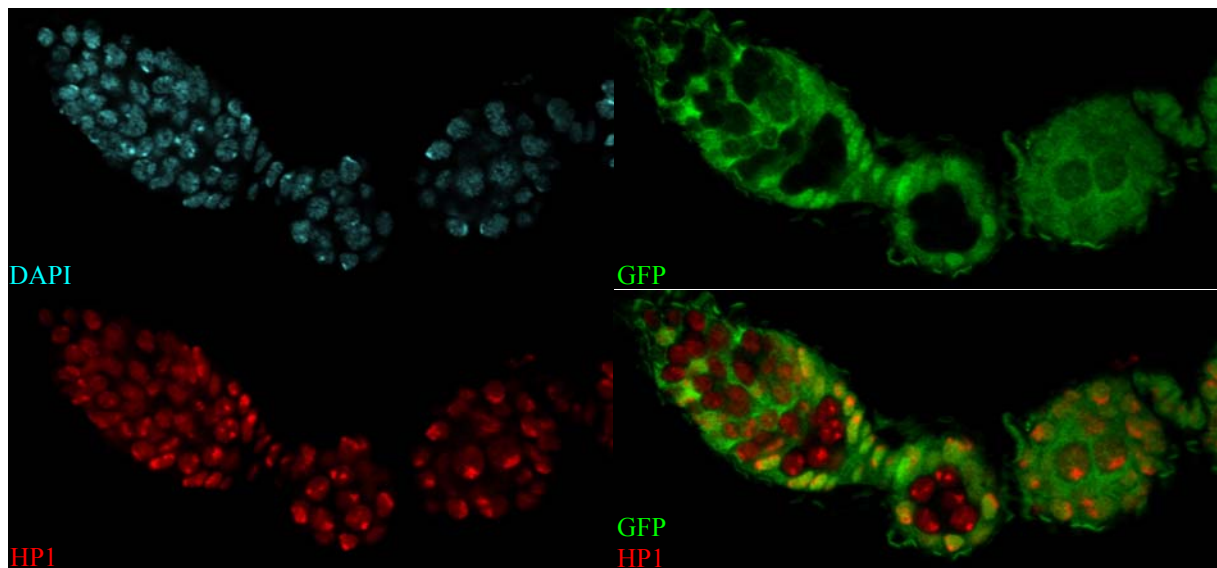


**Abbildung 3.4.4.2.1: Keimbahnklone der *eggless*-Mutante zeigen apoptotische Merkmale gegenüber der Kontrolle.** Gezeigt sind Keimbahnklon-Ovarien von FRT-Kontrollfliegen (A) und der *eggless*-Mutante (B). Dargestellt ist GFP in Grün und die DNA in Türkis.

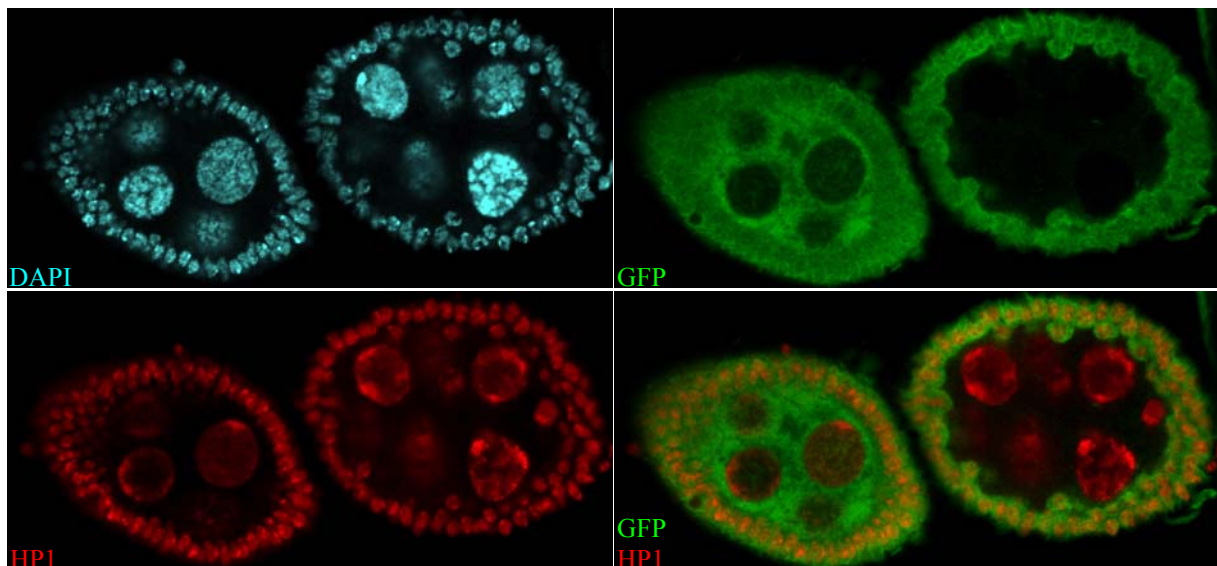
Im Gegensatz zu homozygoten, *eggless*-mutanten Ovarien können in den Keimbahnklon-Ovarien die Eikammern abknospen, wie dies auch für *CG12340*-mutante Klone der Fall ist.

Die für *CG12340*-Klone gezeigten Färbungen zeigen in *eggless*-Klonen identische Resultate in Bezug auf POF, H3K9me3 und akt. Drice, daher werden diese hier nicht erneut gezeigt. Ebenso identisch ist die unveränderte Lokalisierung von HP1 in mutanten Klonen von *CG12340*, *eggless* und der *CG12340*/*eggless*-Doppelmutante, hier dargestellt am Beispiel von *eggless*-Klonen und solchen der Doppelmutante (Abbildungen 3.4.4.2.2 und 3.4.4.2.3). Die

Kernlokalisierung von HP1 in verschiedenen Stadien ist unverändert gegenüber dem Wildtyp (siehe Abbildung 3.4.3.1.3) und angrenzenden heterozygoten Eikammern.



**Abbildung 3.4.4.2.2: Keimbahnklone der *eggless*-Mutante 1473 zeigen keine Veränderung der HP1-Lokalisierung.** Gezeigt ist die DNA in Türkis, GFP in Grün und HP1 in Rot, sowie eine Überlagerung dieser beiden Kanäle. Das Fehlen von Eggless verändert nicht die Kern-Lokalisierung von HP1 im Vergleich mit den nicht mutanten Eikammern.

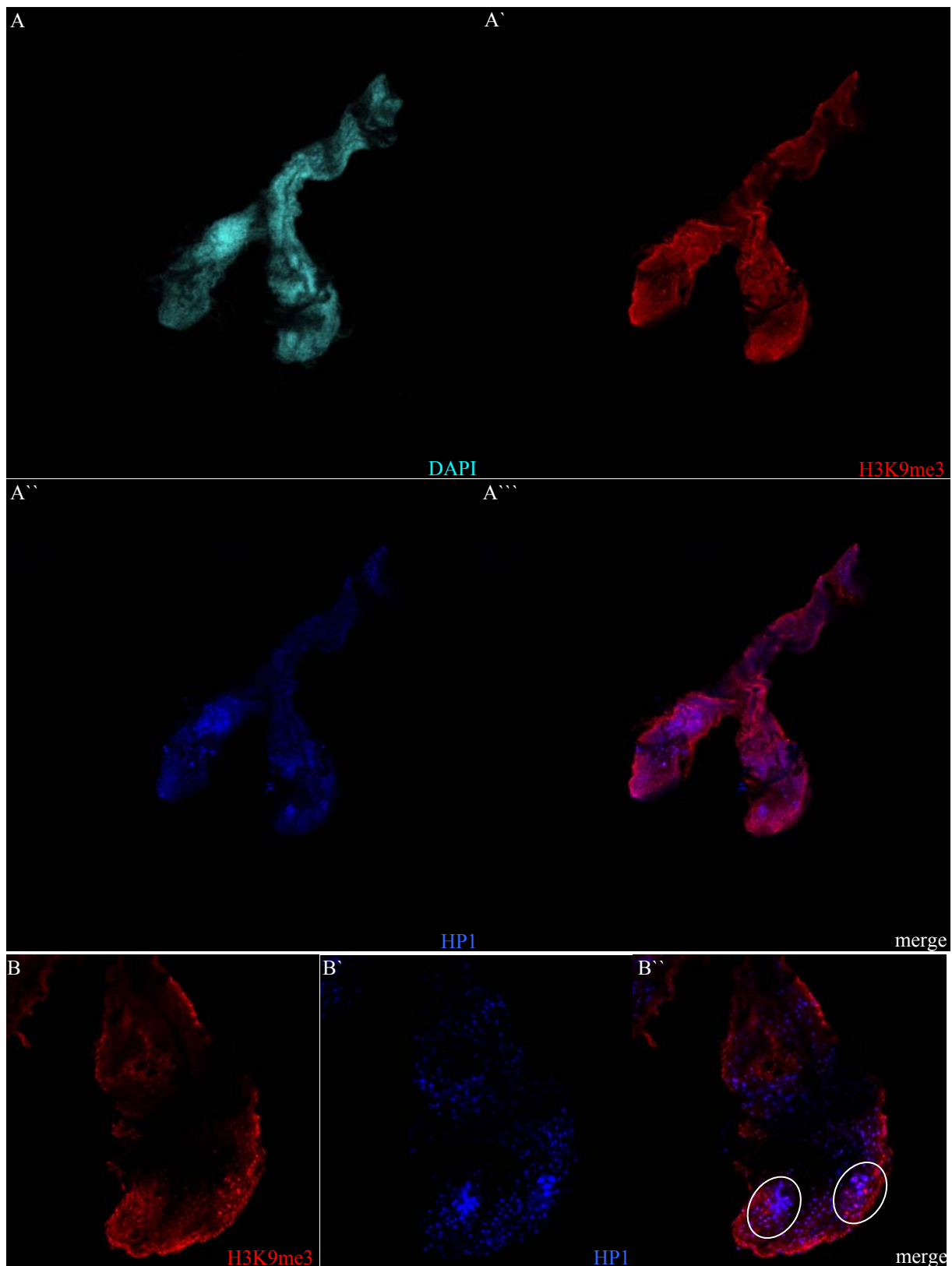


**Abbildung 3.4.4.2.3: In Keimbahnklonen der *CG12340/eggless*-Doppelmutante ist die HP1-Lokalisierung nicht verändert.** Dargestellt ist die DNA in Türkis, GFP in Grün und HP1 in Rot. Die Überlagerung von GFP und HP1 zeigt keine Veränderung der HP1-Lokalisierung im mutanten Klon gegenüber der heterozygoten Eikammer.

### 3.4.4.3 Färbungen an rudimentären Ovarien von *CG12340*- und *eggless*-Mutanten

Wenn davon ausgegangen wird, dass *CG12340* ein essenzieller Cofaktor von *Eggless* ist, würde erwartet werden, dass *CG12340* homozygot mutante Ovarien denselben drastischen Phänotyp zeigen, wie die der *eggless*-Mutante 1473, in welcher die Eikammern nicht in der Lage sind, vom Germarium abzuknospen. Allerdings treten in den heterozygoten Stämmen, welche ein mutantes *CG12340* Allel tragen, keine homozygoten Tiere auf. Wie aber bereits erwähnt, konnten einzelne homozygote Tiere erhalten werden, indem sie als Embryonen oder Larven über das Fehlen von GFP, exprimiert durch einen GFP-Balancer, selektiert wurden. Nachdem diese Tiere die restliche Entwicklung getrennt von den Heterozygoten absolvierten, konnten die Ovarien der selten erhaltenen adulten Weibchen präpariert werden. Diese Ovarien bestanden im gleichen Maße wie es für *Eggless* bereits gezeigt wurde (Clough et al., 2007) aus Germarien ohne ältere Eikammerstadien, so dass auch die homozygot mutanten Ovarien der *CG12340* Allele als rudimentär bezeichnet werden können.

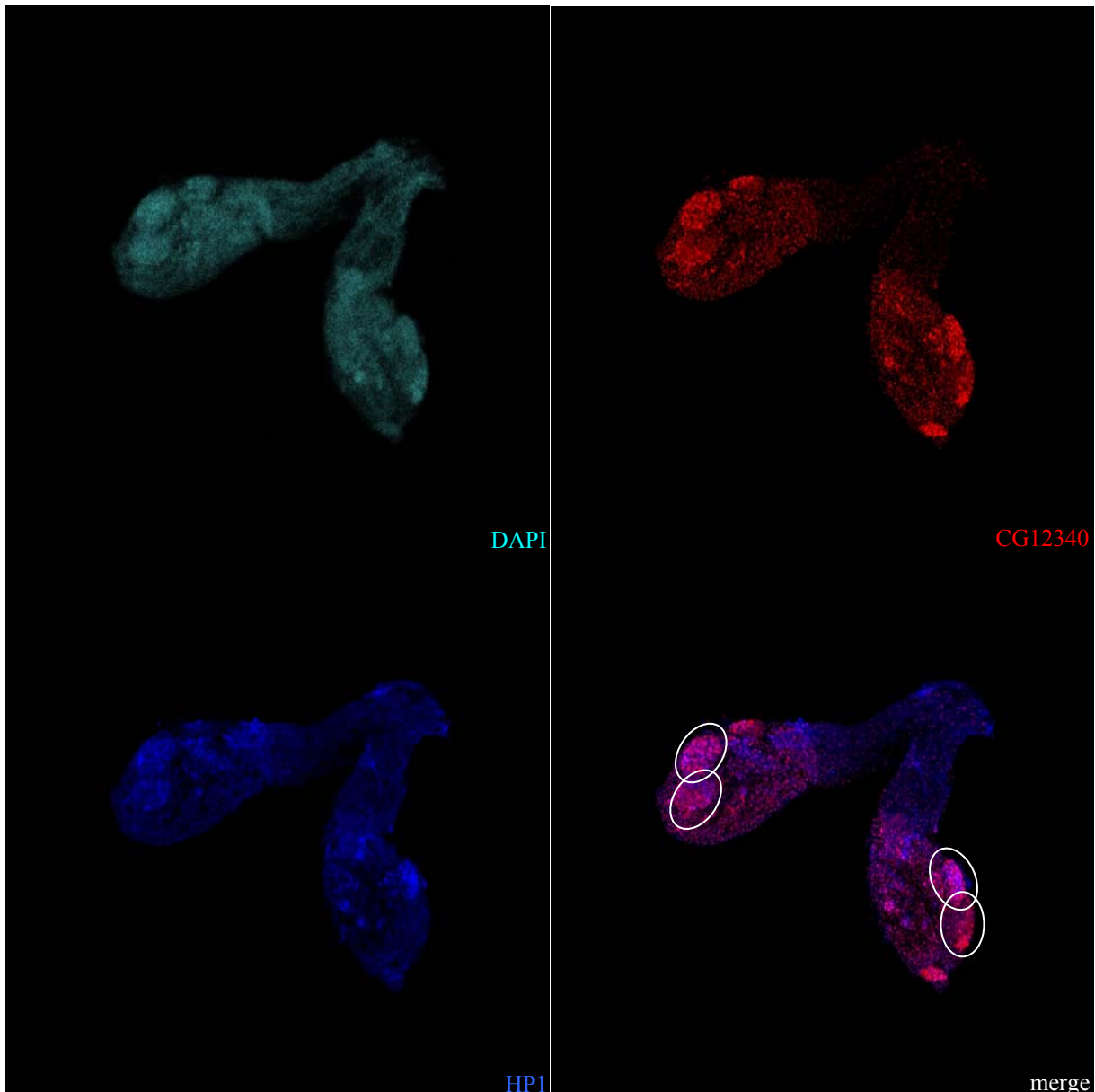
Abbildung 3.4.4.3.1 zeigt beispielhaft ein mit 10 facher Vergrößerung aufgenommenes Ovar einer Fliege, welche homozygot für das Chromosom mit der Transdeletion war.



**Abbildung 3.4.4.3.1: Die Ovarien von CG12340 homozygot mutanten Fliegen sind rudimentär und bestehen aus Überresten von Germarien, ohne ältere Eikammerstadien zu besitzen.** Gezeigt ist H3K9me3 in Rot, HP1 in Blau und DAPI in Türkis. B-B'' stellt eine vergrößerte Aufnahme des rechten Ovars von A-A'' dar. Die homozygot mutanten Ovarien des Transdeletions-Allels sind rudimentär und beherbergen keine Eikammern, welche das Germarium verlassen haben. A-A'' zeigt ein solches Ovarienpaar, in welchem keine Ovariolschläuche mit Eikammern erkennbar sind. Die vergrößerte Aufnahme eines Ovars aus A-A'' bestätigt dies (B-B''), jedoch sind zwei Areale mit Ovalen markiert, welche Germarien darstellen könnten, da dort mehrere dicht nebeneinander liegende,

stärker HP1 gefärbte Kerne sichtbar sind. Jedoch könnte diese Färbung ebenso wie schwächere H3K9me3 Signale auch Artefakte darstellen, da die meisten Zellen bereits apoptotisch zu sein scheinen.

Zum Vergleich ist in Abbildung 3.4.4.3.2 ein rudimentäres Ovarienpaar von dem *eggless* Allel 1473 abgebildet, welches ebenso mit 10 facher Vergrößerung aufgenommen wurde. Es lassen sich in diesem Beispiel-Ovar zwar noch einzelne Germarien erkennen, jedoch ebenfalls keine abgeknospten Eikammern.



**Abbildung 3.4.4.3.2: Die Ovarien von *eggless* homozygot mutanten Fliegen sind rudimentär und bestehen aus Überresten von Germarien, ohne ältere Eikammerstadien zu besitzen.** Gezeigt ist CG12340 in Rot, HP1 in Blau und DAPI in Türkis. Die homozygot mutanten Ovarien sind rudimentär und beherbergen keine Eikammern, welche das Germarium verlassen haben. Ebenfalls sind keine Ovariolschläuche erkennbar. Vier Areale sind mit Ovalen markiert, die Germarien darstellen könnten, da dort mehrere dicht nebeneinander liegende Kerne sichtbar sind. Die CG12340 Färbung ist noch vorhanden.

Da sich die Morphologie der mutanten Ovarien von *CG12340* und *eggless* gleicht, ist davon auszugehen, dass das Genprodukt von *CG12340* ebenso essentiell für die Proliferation der somatischen Stammzellen in den Germarien ist, wie es für *eggless* gezeigt wurde (Clough et al., 2007). In beiden Fällen führt der Verlust dazu, dass keine intakten Eikammern mehr vom Germarium abknospen können.

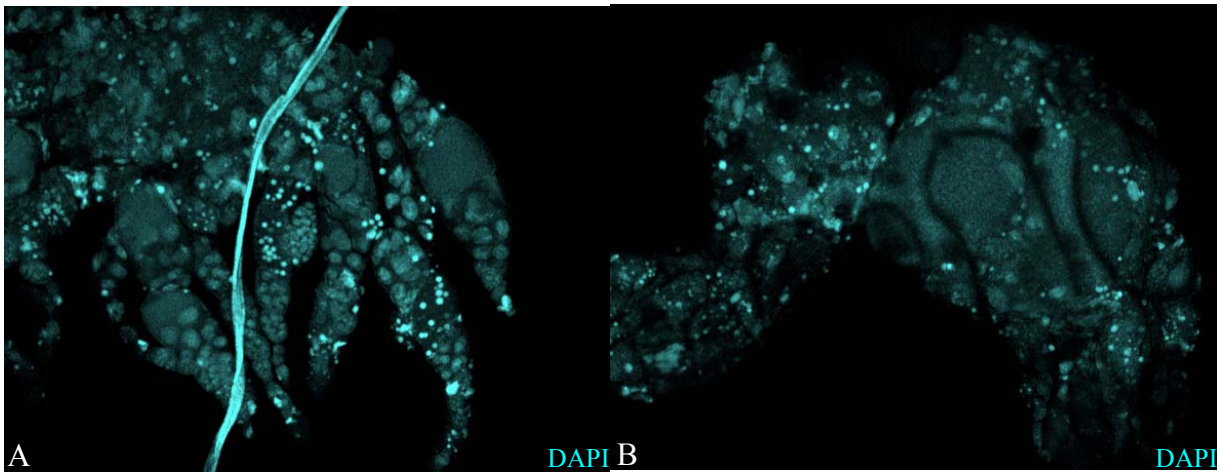
#### 3.4.4.4 Färbungen an rudimentären Ovarien geretteter Fliegen

In diesem Zusammenhang sollten auch die Färbeergebnisse der Ovarien aus dem Rettungsexperiment Erwähnung finden. Die in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen „geretteten“ Tiere, welche homozygot mutant für das Transdeletions-Chromosom waren, und zusätzlich ein *daughterless*-Gal4 getriebenes *GFP-CG12340* Konstrukt unter dem Einfluss einer UAS-Kopie exprimierten, waren nahezu infertil. Auffällig war an diesen Tieren, dass die Weibchen entweder gar keine oder nur kurz nach der Geschlechtsreife einzelne Eier legten. Mit zunehmender Lebensdauer wurde dies jedoch in der Regel ganz eingestellt. Die Männchen waren jedoch fertil, was in Kreuzungen mit Wildtyp-Weibchen beobachtet wurde.

Wurde das Rettungsexperiment mit dem *tubulin*-Gal4-Treiber durchgeführt, waren die geretteten Weibchen ebenfalls fertil, so dass möglicherweise der Grund für die zunehmende Infertilität im Gal4-Expressionsmuster liegen könnte. Wie bereits aus den Überexpressionsexperimenten von *CG12340* und *eggless* mit dem *daughterless*-Gal4-Treiber bekannt war, exprimiert dieser zwar in somatischen Zellen wie Keimbahnzellen, jedoch nicht konstant in allen Nähr- und Follikelzellen. Für die Eikammern der überexprimierenden Ovarien war dies nicht dramatisch, da diese generell auch die jeweils wildtypischen Proteine zusätzlich exprimierten. Im Falle der Fliegen, die durch *daughterless* Gal4 getriebene *GFP-CG12340*-Expression gerettet wurden, lag aber ein *CG12340* mutanter Hintergrund vor. Es ist daher denkbar, dass durch nicht gleichmäßige Expression des GFP-CG12340-Fusionsproteins in den Ovarien dieser Fliegen, zunehmend der mutante Hintergrund der Fliegen zum Tragen kam. Daher wurden die Ovarien einiger geretteter Weibchen präpariert.

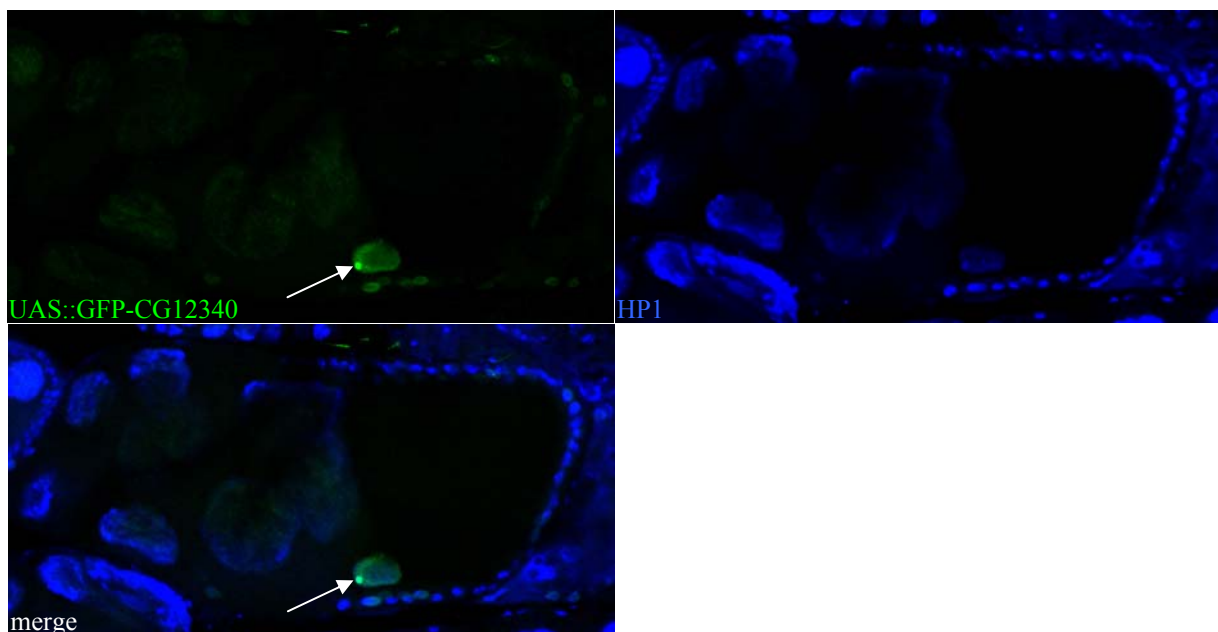
Dabei fiel auf, dass diese Ovarien viele apoptotische Zellen und Eikammern besitzen (Abbildung 3.4.4.4.1, A,B). Oftmals zeigen sie auch eine veränderte Gesamtmorphologie, in der die Ovariolschläuche nicht mehr klar auseinander zu halten sind (Abbildung 3.4.4.4.1, B). Die Schwere des Phänotyps ist nicht in allen Ovarien identisch, sondern scheinbar abhängig von der Expression des *GFP-CG12340*-Konstruktes und dem Alter der Fliegen.



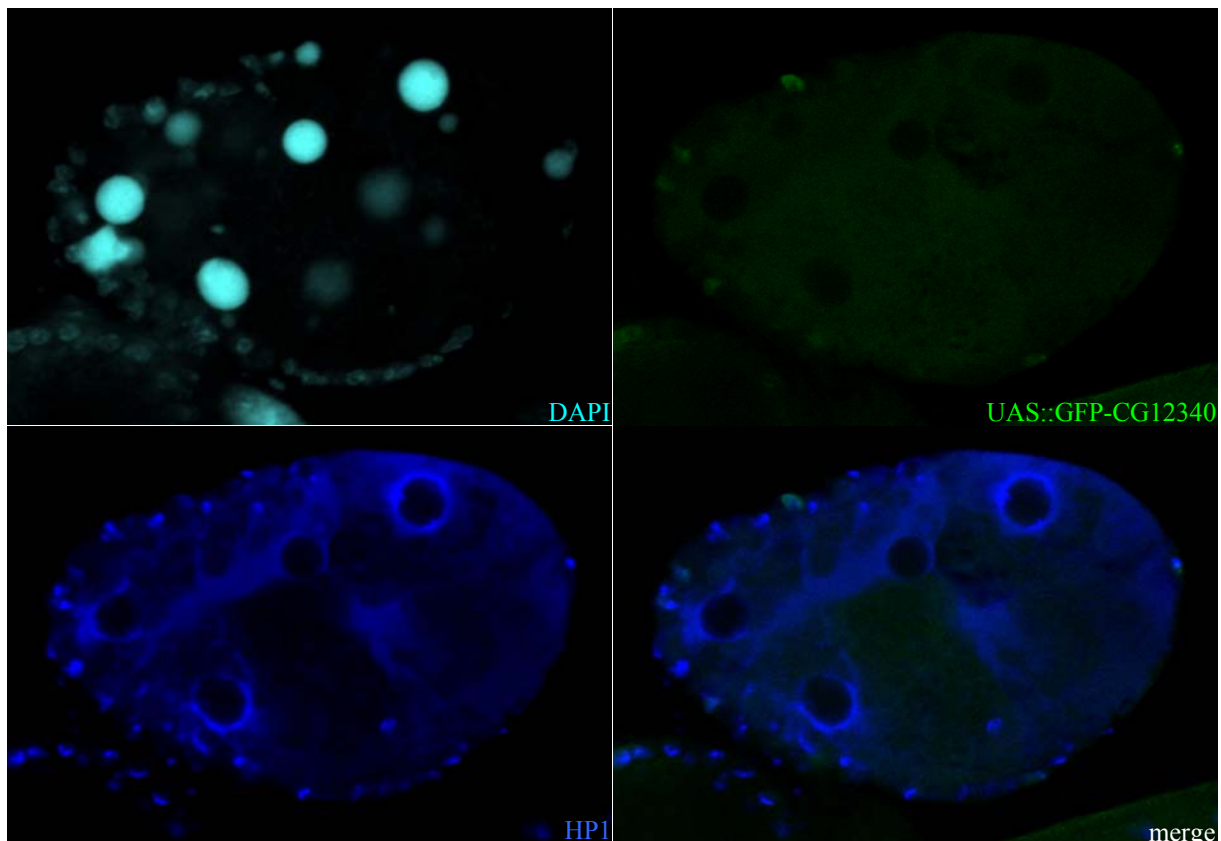


**Abbildung 3.4.4.4.1: Die Übersicht über Ovarien geretteter Weibchen zeigt vermehrt kondensierte Kerne mit apoptotischen Merkmalen.** Abgebildet ist DAPI in Türkis. A und B zeigen jeweils Ovarien geretteter, TD63 mutanter Weibchen. Beide Abbildungen zeigen vermehrt apoptotische Zellen mit kondensierten Kernen. Das Ovarienpaar in B zeigt zusätzlich eine auffällig deformierte Morphologie und kaum abgegrenzte Eikammern bzw. Ovariolschläuche.

Zwar zeigen gerade diejenigen Eikammern, welche morphologisch unauffällig sind, eine Expression des GFP-Konstruktes inklusive der Punkte im Oozytenkern (Abbildung 3.4.4.4.2, Pfeil), jedoch werden die Ovarien insgesamt mit zunehmender Lebensdauer kleiner, was auf der Degeneration von Eikammern durch Apoptose beruhen könnte (Abbildung 3.4.4.4.3).



**Abbildung 3.4.4.4.2: Die Ovarien von geretteten, *CG12340* mutanten Weibchen besitzen Eikammern, welche eine erwartungsgemäße Lokalisierung des GFP-*CG12340*-Fusionsproteins inklusive der Punkte im Oozytenkern zeigen.** Abgebildet ist GFP in Grün ohne weitere Antikörperfärbung und HP1 in Blau. Der Pfeil deutet auf einen GFP-Punkt im Oozytenkern, wie er in den Ovarien von Fliegen, die *GFP-CG12340* überexprimieren, auch auftritt.



**Abbildung 3.4.4.3: Die Ovarien von geretteten, *CG12340* mutanten Weibchen besitzen ebenso Eikammern, welche apoptotische Merkmale aufweisen.** Abgebildet ist GFP in Grün ohne weitere Antikörperfärbung, DAPI in Türkis und HP1 in Blau. Die abgebildete Eikammer besitzt kondensierte Kerne, keinerlei GFP-Signal und eine diffuse Verteilung von HP1 außerhalb der Kerne.

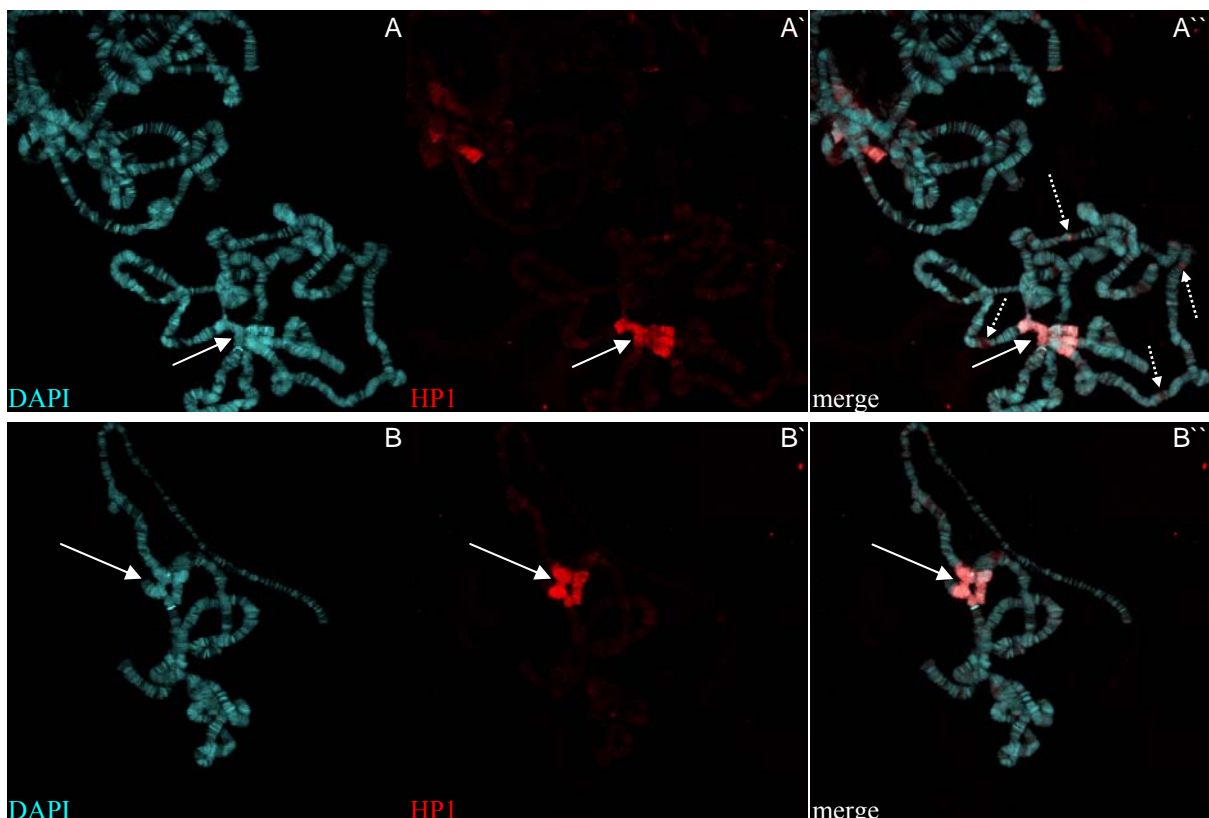
Auf Grund des in diesem Abschnitt beschriebenen mutanten Phänotyps von *CG12340*, sowohl in den Keimbahnklonen, wie auch in den wenigen zu beobachtenden homozygot mutanten Ovarien, erfolgte eine Umbenennung des bisher nur vorhergesagten Gens *CG12340* in *windei* (*wde*). Dieser Name soll den vorzeitigen Verlust der Eikammern (und damit der „Frucht“) während der Oogenese zum Ausdruck bringen und ist zudem in zweierlei Hinsicht passend. Zum Einen bedeutet Windei im Säuger das frühzeitige Zugrundegehen der Embryoblastanlage und somit eine ovuläre Fehlgeburt, was mit dem hier beobachteten Verlust der Eikammern durch Apoptose verglichen werden kann. Zum Anderen werden Hühnereier ohne Kalkschale als Windeier bezeichnet, hier vergleichbar mit der fehlenden Einkapselung der Eikammern durch Follikelzellen in homozygot mutanten Fliegen. Daher wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausschließlich der funktionsbezogene Name *windei* verwendet, welcher inzwischen als Synonym für *CG12340* auf der Flybase-Internetseite fungiert.

### 3.4.5 Antikörperfärbungen an larvalen Speicheldrüsen Polytänchromosomen

Nachdem bereits bekannt war, dass Eggless an den Polytänchromosomen von *Drosophila*-Speicheldrüsen in vielen euchromatischen Banden und am vierten Chromosom lokalisiert (Seum et al, 2007; Tzeng et al, 2007), sollte im folgenden Versuch geklärt werden, ob auch eine Lokalisierung von Windei an diesem Gewebe beobachtet werden kann.

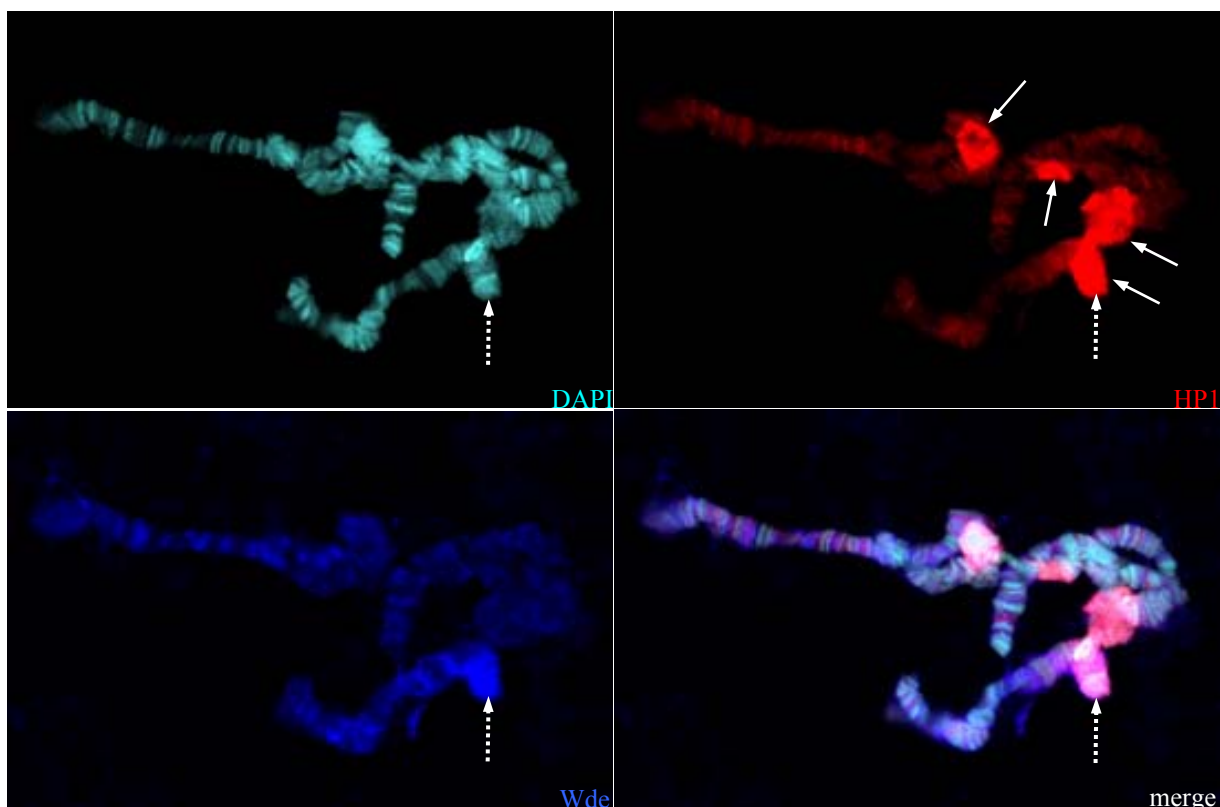
#### 3.4.5.1 Antikörperfärbungen an wildtypischen larvalen Speicheldrüsen Polytänchromosomen

Zunächst wurden wildtypische Speicheldrüsen aus L3-Larven präpariert, um Polytänchromosomen Quetschpräparate herzustellen. Generell wurde DAPI zur DNA-Färbung verwendet, um die Chromosomenarme und die heterochromatischen Banden sichtbar zu machen. HP1 ist ein geeigneter Marker, um das für Polytänchromosomen typische Chromozentrum hervorzuheben. Dabei färbt DAPI nicht nur deutlich das Chromozentrum, sondern auch eine Vielzahl von Banden an den Chromosomenarmen (Abbildung 3.4.5.1.1). Dagegen lokalisiert HP1 nur in wenigen Banden der Chromosomenarme (Abbildung 3.4.5.1.1, gestrichelte Pfeile), färbt aber intensiv das Chromozentrum an (Pfeile).



**Abbildung 3.4.5.1.1: HP1 lokalisiert am Chromozentrum von wildtypischen Polytänchromosomen, während DAPI das gesamte Heterochromatin hervorhebt.** DAPI ist in Türkis, HP1 in Rot abgebildet. DAPI markiert sowohl das Chromozentrum (Pfeile) wie auch eine Fülle von Banden an den Chromosomenarmen und somit das gesamte Heterochromatin. HP1 lokalisiert in einzelnen Banden der Chromosomenarme (gestrichelte Pfeile) und intensiv am Chromozentrum (Pfeile).

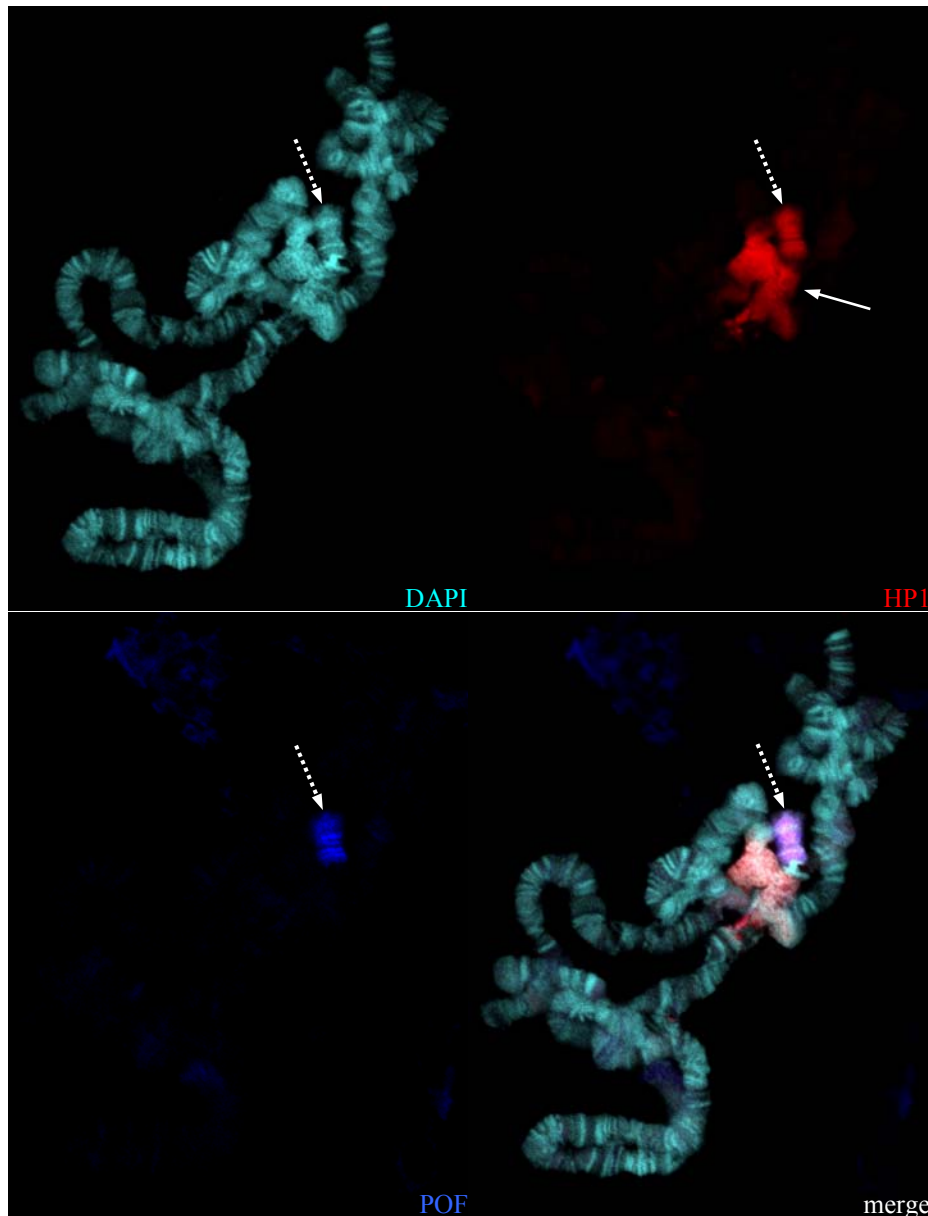
In einem weiteren wildtypischen Polytänchromosomen Quetschpräparat sollte nun die Lokalisierung des Wdei Proteins untersucht werden, da für Eggless bereits bekannt war, dass es am Chromozentrum lokalisiert, dort vor allem am vierten Chromosom, sowie an einigen euchromatischen Banden der Arme. Sofern davon ausgegangen wird, dass Wde ein wichtiger Cofaktor für die Funktionalität von Eggless ist, so wird erwartet, dass Wde eine ähnliche Lokalisierung aufweist. Wde zeigt deutlich eine Lokalisierung an einigen euchromatischen Bereichen der Chromosomenarme (Abbildung 3.4.5.1.2), jedoch keine vollständige Markierung des Chromozentrums. Vielmehr markiert die Färbung gegen das Protein intensiv einen Teil des Chromozentrums, welcher von der Morphologie her auf das kurze, vierte Chromosom hinweist (gestrichelte Pfeile).



**Abbildung 3.4.5.1.2: Wde colokalisiert mit HP1 in einem Teil des Chromozentrum, welcher das vierte Chromosom darstellen könnte.** DAPI ist in Türkis, HP1 in Rot und Wde in Blau abgebildet. DAPI markiert erneut das Chromozentrum und viele Banden an den Chromosomenarmen. Allerdings ist das Chromozentrum in dieser Präparation in mehrere Teile zerfallen, wie auch die HP1 Färbung zeigt (Pfeile). Wde lokalisiert in einigen Banden der größtenteils euchromatischen Chromosomenarme und sehr intensiv an einem Teil des Chromozentrum, welcher von der Morphologie her auf das vierte Chromosom hinweist (gestrichelte Pfeile).

Um festzustellen, ob es sich bei der intensiven Wde-Färbung des Chromozentrum-Abschnittes um das vierte Chromosom handelt, sollte erneut der POF-Antikörper dienen, welcher das Protein Painting Of Fourth, ein Chromosom Vier-spezifisches Protein, erkennt.

Dazu wurden zunächst Färbungen an Wildtyp-Polytänchromosomen durchgeführt. Während DAPI das gesamte Heterochromatin hervorhebt und HP1 das Chromozentrum (Pfeil), zeigt die POF-Färbung deutlich eine spezifische Färbung in gebänderter Form ausschließlich am vierten Chromosom, welches ebenso von HP1 und DAPI markiert wird (Abbildung 3.4.5.1.3, gestrichelte Pfeile).



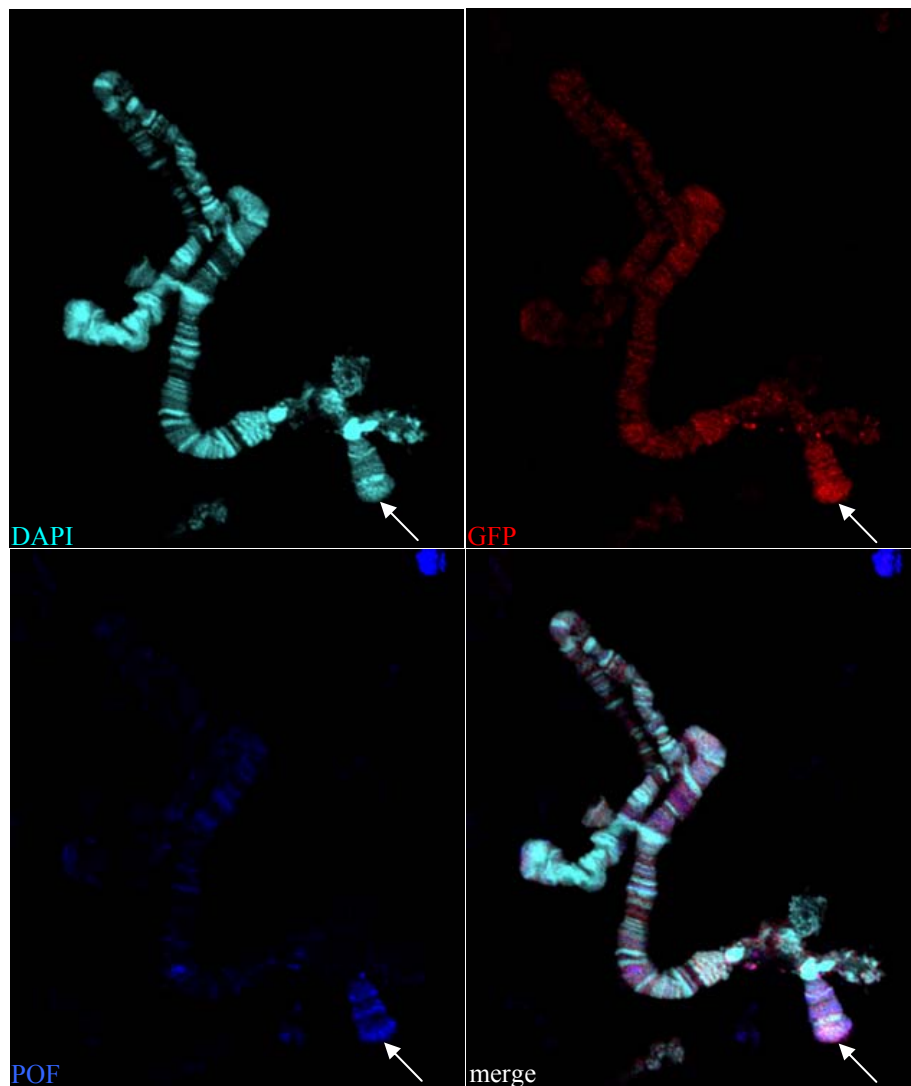
**Abbildung 3.4.5.1.3: POF markiert spezifisch einen Teil des Chromozentrums, welches das vierte Chromosom darstellt.** DAPI ist in Türkis, HP1 in Rot und POF in Blau abgebildet. DAPI markiert das Chromozentrum und viele Banden an den Armen. POF lokalisiert am vierten Chromosom und markiert damit einen Teil des Chromozentrums, in dem POF mit HP1 und DAPI colokalisiert (gestrichelte Pfeile), während HP1 das gesamte Chromozentrum färbt (Pfeil).

Der Teil des Chromozentrums, den POF spezifisch als das vierte Chromosom markiert, ähnelt morphologisch deutlich dem von Wde gefärbten Bereich aus Abbildung 3.4.5.1.2. Eine Cofärbung gegen die beiden Proteine auf wildtypischen Polytäanchrosomen-Quetschpräparaten ist aber auf Grund der bereits erwähnten Herstellung der Antikörper durch Immunisierung derselben Spezies nicht möglich.

Als Alternative können daher larvale Speicheldrüsen transgener Tiere dienen, welche das GFP-Wde-Fusionsprotein exprimieren.

#### 3.4.5.2 Antikörperfärbungen an transgenen larvalen Speicheldrüsen Polytäanchrosomen

In einem weiteren Versuch wurden Antikörperfärbungen gegen POF auf Polytäanchrosomen von Speicheldrüsen transgener Larven durchgeführt, welche das GFP-Wde Fusionsprotein mittels *daughterless*-Gal4-Treiber überexprimieren. Um das GFP-Fusionsprotein sichtbar zu machen, wurde das Präparat mit einem GFP Antikörper gegengefärbt. Dieser zeigt ein etwas diffuseres Färbergebnis, als der Wde Antikörper, erkennt aber auch einige Banden an den Chromosomenarmen und zeigt eine verstärkte Färbung am POF-markierten vierten Chromosom (Abbildung 3.4.5.2.1, Pfeil).



**Abbildung 3.4.5.2.1: Das GFP-Wde-Fusionsprotein lokalisiert am vierten Chromosom.** DAPI ist in Türkis, GFP in Rot und POF in Blau abgebildet. POF markiert deutlich das vierte Chromosom, welches außerdem eine verstärkte Färbung gegen GFP-Wde aufweist (Pfeil). Das GFP-Fusionsprotein lokalisiert zusätzlich an einigen Banden der Chromosomenarme.

### 3.7 Untersuchung der Bindung von Windei an Eggless

Die Säugetier-Homologe von Windei und Eggless binden aneinander, um gemeinsam die Trimethylierung von H3K9 zu vermitteln. Es konnte dabei gezeigt werden, dass SETDB1 an die coiled coil-Domäne von MCAF1 bindet (Ichimura et al, 2005).

Aus der Coüberexpression von *wde* und *eggless* in Abschnitt 3.4.3.2 geht hervor, dass beide Fusionsproteine eindeutig colokalisieren und aus den Abschnitten 3.4.4.1. und 3.4.4.2 ist ersichtlich, dass das Fehlen von Eggless oder Windei vergleichbare Oogenese-Defekte verursacht. Daher war es nahe liegend, eine Bindung auf Proteinebene zu überprüfen.

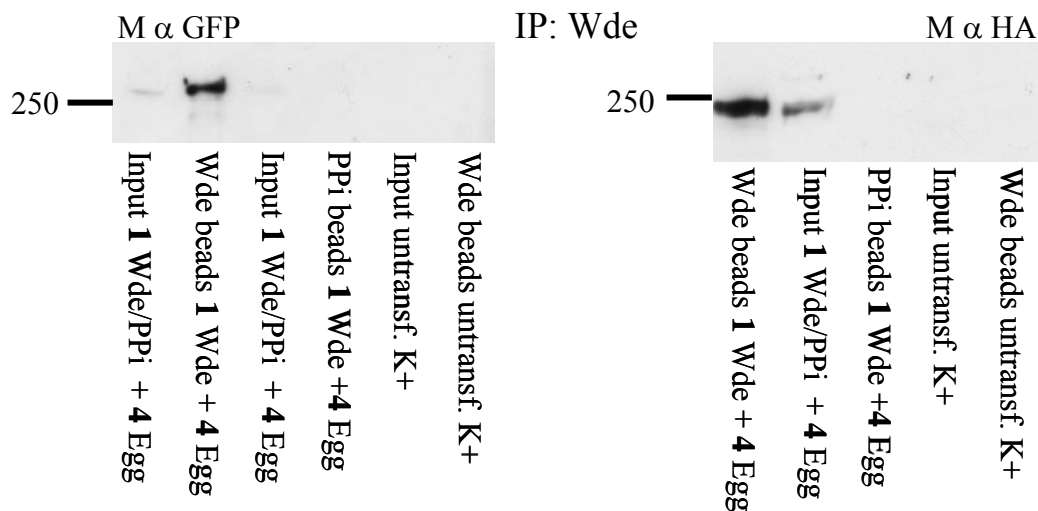
#### 3.7.1 Coimmunpräzipitation mit Wde und Eggless

Sofern Eggless und Windei aneinander binden bzw. in einem Komplex agieren, sollte es möglich sein, diese Interaktion mittels Coimmunpräzipitation nachzuweisen.

Dazu wurde ein GFP-Wde-Fusionsprotein unter der Kontrolle eines UAS-Promoters mittels Aktin5C-Gal4-Konstrukt in SII-Zellen überexprimiert, sowie simultan ein Eggless-HA-Fusionsprotein mittels internem Aktin-Promoter. Anschließend erfolgte die Coimmunpräzipitation mit den aus diesen Zellen hergestellten Lysaten wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben.

Tatsächlich konnte das Eggless-HA-Fusionsprotein auf dem Western Blot mittels HA-Antikörper nachgewiesen werden, nachdem der affinitätsgereinigte Wde-Antikörper für die Bindung an Protein-A-Agarose-beads verwendet worden war (Abbildung 3.7.1.1). Dies bedeutet, dass zunächst das Windei-GFP-Fusionsprotein, welches sich mittels GFP-Antikörper auf dem Western Blot nachweisen ließ, vom Windei-Antikörper erkannt wurde und über die Antikörperbindung an die beads aus dem Lysat „heruntergezogen“ werden konnte. Zusätzlich muss an Windei auch das Eggless-HA-Fusionsprotein gebunden haben, da sonst ein Nachweis mittels HA-Antikörper nicht möglich gewesen wäre. Auch sind die erhaltenen Banden spezifisch, da sie weder in der Spur auftauchen, in der das Windei-Präimmunserum (PPi) zur Bindung an die beads verwendet wurde, noch in Input und beads-Spuren der untransfizierten Kontrollzellen (mit Wasser transfiziert), welche ebenso mit dem Wde Antikörper und dem Präimmunserum behandelt wurden.





**Abbildung 3.7.1.1: Wde kann ein Egless-HA-Fusionsprotein coimmunpräzipitieren.** Die CoIP wurde auf Lysaten von Zellen durchgeführt, welche cotransfiziert waren mit einem *GFP-wde*-Konstrukt und einem *egg-HA*-Konstrukt. Nach Bindung des affinitätsgereinigten Wde Antikörpers an Protein-A-Agarose-beads kann auf dem Western Blot sowohl das GFP-Wde-Fusionsprotein wie auch das Egg-HA-Fusionsprotein im Input und an den Wde-beads nachgewiesen werden, nicht aber an den beads, welche mit dem Präimmenserum inkubiert waren oder in der untransfizierten Kontrolle. Die GFP-Bande in den Input-Spuren des linken Blots ist etwas schwach, jedoch ist diese Bande an den Wde-beads eindeutig zu erkennen.

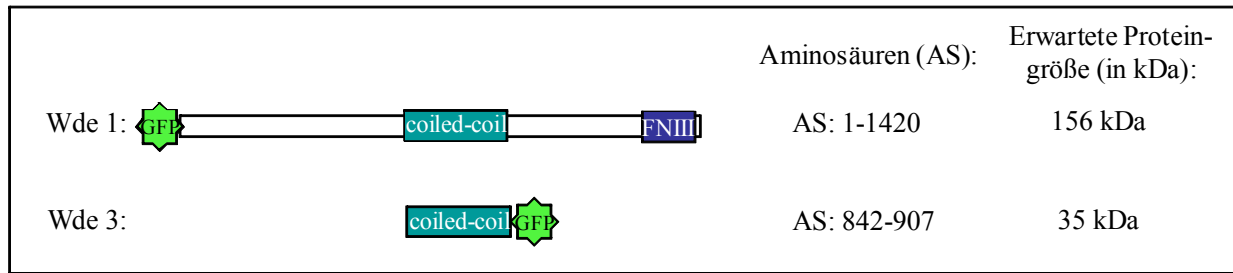
Erwähnenswert ist, dass die Banden der beiden Fusionsproteine deutlich größer sind, als erwartet würde. Für das GFP-Wde-Protein läge die erwartete Größe bei 183 kDa. Tatsächlich übersteigt sie sogar 250 kDa. Für Egless konnte bereits gezeigt werden, dass zusätzlich zu einer erwarteten 140 kDa-Bande auch eine spezifische 170 kDa-Bande auftritt (Clough et al., 2007), wobei sich hier für das HA-Fusionsprotein etwa 180 kDa ergeben sollten. Tatsächlich liegt die erhaltene Bande in diesem Bereich.

### 3.7.2 Untersuchung der Bindedomänen von Windei und Egless mittels Deletionskonstrukten

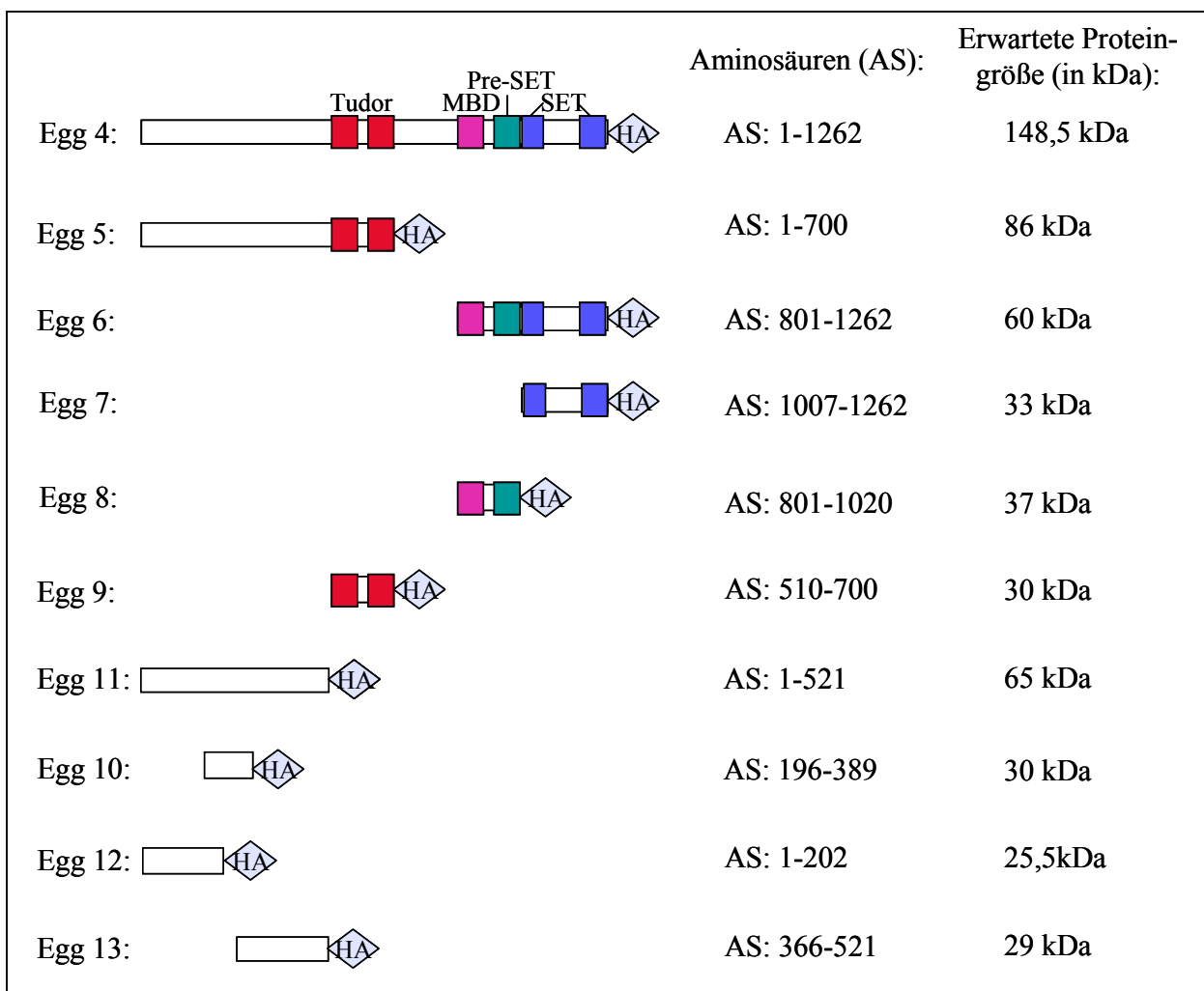
Wie bereits erwähnt, wurde für das Säugetier-Homolog von Windei bereits gezeigt, dass die konservierte coiled coil-Domäne die Bindung an Egless vermittelt. Daher sollten die folgenden Experimente verifizieren, ob dies auch in *Drosophila* zutreffend ist. Gleichzeitig sollte über die Co-Expression von Wde-GFP mit Egless-Deletionskonstrukten sowie anschließender Coimmunpräzipitation ermittelt werden, welcher Bereich von Egless an dieser Bindung beteiligt ist.

Dazu wurden verschiedene Deletionskonstrukte von *wde* und *eggless* hergestellt und jeweils in verschiedenen Kombinationen in SII-Zellen coüberexprimiert.

Die verwendeten Konstrukte sind den Abbildungen 3.7.2.1. und 3.7.3.2 zu entnehmen.



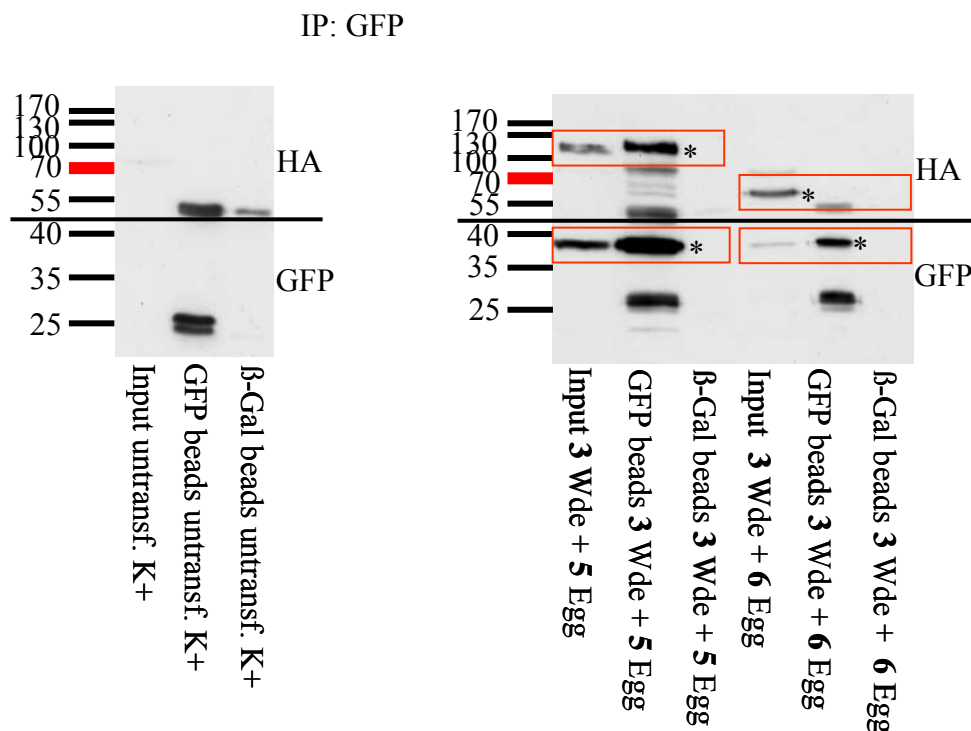
**Abbildung 3.7.2.1: Übersicht über die Wde-Deletionskonstrukte unter Angabe der kodierten Aminosäuren und der erwarteten Größen der GFP-Fusionsproteine**



**Abbildung 3.7.2.2: Übersicht über die Eggless-Deletionskonstrukte unter Angabe der kodierten Aminosäuren und der erwarteten Größen der HA-Fusionsproteine**

In einer ersten Coimmunpräzipitation (CoIP) wurde zunächst getestet, ob die coiled coil-Domäne von Wde, hier als Fusionsprotein mit GFP exprimiert, in der Lage ist, die N-terminale oder C-terminale Hälfte von Eggless zu präzipitieren.

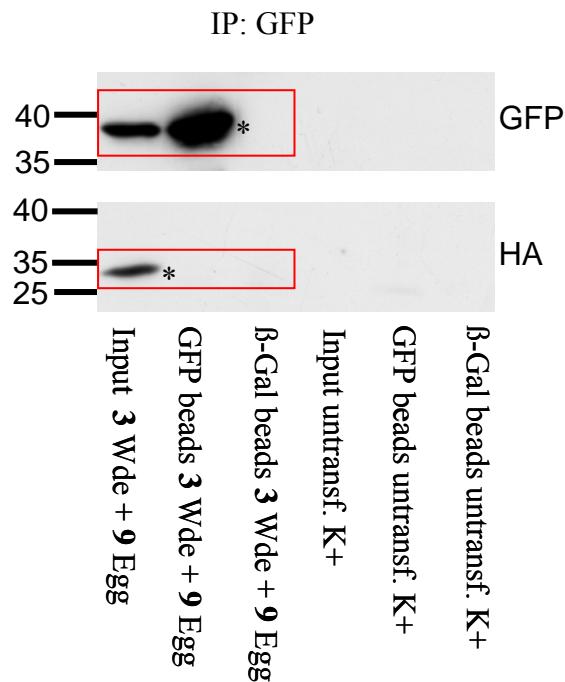
Tatsächlich kann die coiled coil Domäne (Wde 3), durch einen GFP-Antikörper an die Protein-A-Agarose-beads gebunden, das N-terminale Eggless-Konstrukt (Egg 5) coimmunpräzipitieren (Abbildung 3.7.2.3). Dabei sollen hier und in den folgenden Abbildungen Sternchen die spezifischen Banden der Fusionsproteine markieren.



**Abbildung 3.7.2.3: Die coiled coil-Domäne von Wde kann die N-terminale Hälfte von Eggless coimmunpräzipitieren.** Die CoIP wurde auf Lysaten von Zellen durchgeführt, welche cotransfiziert waren mit dem *wde-3-GFP*-Konstrukt (siehe Schema 3.7.2.1) und entweder dem *egg-5-HA*-Konstrukt oder dem *egg-6-HA*-Konstrukt (siehe Schema 3.7.2.2). Nach Bindung des GFP-Antikörpers an Protein-A-Agarose-beads kann auf dem rechten Western Blot sowohl das Wde-3-GFP-Fusionsprotein wie auch die Egg-5- und 6-HA-Fusionsproteine im Input der cotransfizierten Zellen nachgewiesen werden. Beide Blots wurden an der mit einer Linie markierten Stelle durchgeschnitten. Die unteren Hälften wurden mit einem GFP-Antikörper und die oberen Hälften mit HA-Antikörper gefärbt. Deutlich ist zu erkennen, dass an den GFP-beads der Lysate beider Gruppen cotransfizierter Zellen das Wde-3-GFP nachgewiesen werden kann, sowie im oberen Blot auch das Egg-5-HA-Fusionsprotein, nicht aber das egg-6-HA-Fusionsprotein. Die jeweiligen genannten Banden sind spezifisch, da sie weder an den Kontroll-beads auftauchen, noch in der untransfizierten Kontrolle auf dem linken Western Blot.

Da offensichtlich die C-terminale Hälfte von Eggless (Egg 6) nicht an der Bindung beteiligt ist, wurden keine CoIPs mit den beiden Konstrukten durchgeführt, welche diesen Bereich noch einmal jeweils halbieren (Egg 7,8). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass die coiledcoil Domäne von Windei an eine dieser Domänen des Eggless-Proteins bindet. Auch

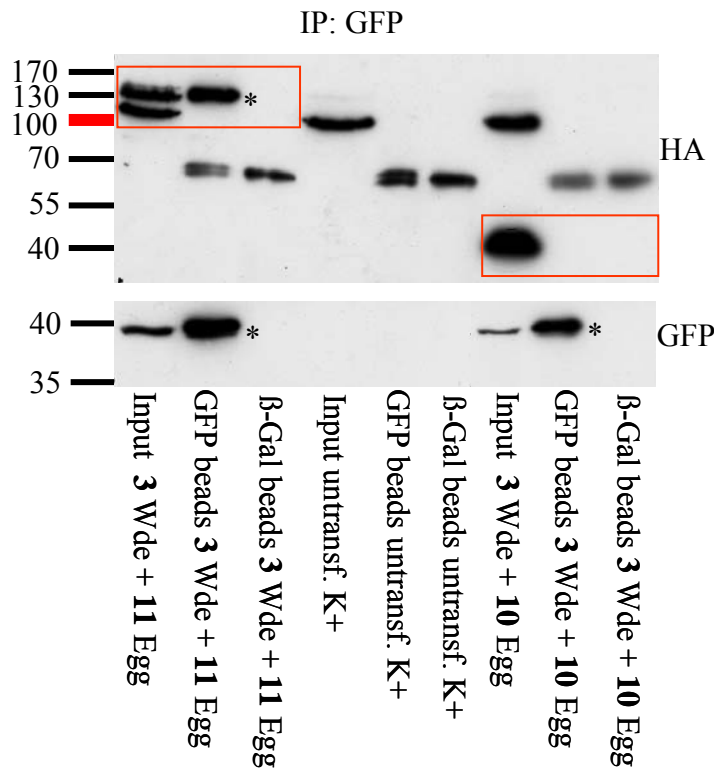
das Egg 9-HA-Fusionsprotein vermittelt nicht die Bindung von Eggless an Wde (Abbildung 3.7.2.4)



**Abbildung 3.7.2.4: Die coiled coil-Domäne von Wde kann das Egg-9-HA-Konstrukt nicht coimmunpräzipitieren.** Die CoIP wurde auf Lysaten von Zellen durchgeführt, welche cotransfiziert waren mit dem *wde-3-GFP*-Konstrukt und dem *egg-9-HA*-Konstrukt. Nach Bindung des GFP-Antikörpers an Protein-A-Agarose-beads kann auf dem unteren Western Blot im Zelllysat der transfizierten Zellen das Wde-3-GFP-Fusionsprotein im Input und an den GFP-beads nachgewiesen werden. Deutlich ist auf dem oberen Blot zu erkennen, dass das Egg-9-HA-Fusionsprotein nur im Input, nicht aber an GFP-beads des Zelllysates nachgewiesen werden kann und somit nicht coimmunpräzipitiert wurde. Die jeweiligen genannten Banden erscheinen weder an den Kontroll-beads, noch in der untransfizierten Kontrolle.

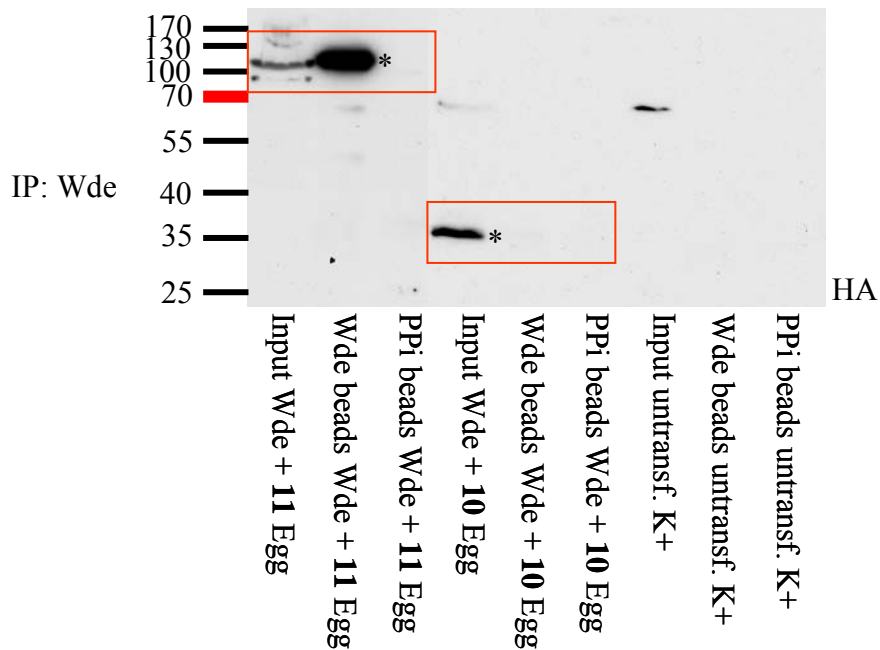
Stattdessen wurde in einem weiteren Versuch die Bindung der coiled coil Domäne an zwei Fusionsproteine getestet, welche „Untereinheiten“ (Egg 10,11) der N-terminalen Hälfte darstellen.

Dabei stellte sich heraus, dass die Bindung an die N-terminale Untereinheit (Egg 11) erfolgt (Abbildung 3.7.2.5, rote Markierung).



**Abbildung 3.7.2.5: Die coiledcoil-Domäne von Wde kann das Egg-11-HA-Konstrukt coimmunpräzipitieren.** Die CoIP wurde auf Lysaten von Zellen durchgeführt, welche cotransfiziert waren mit dem *wde-3-GFP*-Konstrukt und entweder dem *egg-10-HA*-Konstrukt oder dem *egg-11-HA*-Konstrukt. Nach Bindung des GFP-Antikörpers an Protein-A-Agarose-beads kann auf dem unteren Western Blot beider Zelllysate das Wde-3-GFP-Fusionsprotein im Input der cotransfizierten Zellen und an den GFP-beads nachgewiesen werden. Deutlich ist auf dem oberen Blot zu erkennen, dass an den GFP-beads des Zelllysates, welches mit dem *egg-11-HA*-Konstrukt transfiziert war, das entsprechende HA-Fusionsprotein nachweisbar ist. Dagegen ist das Egg-10-HA-Fusionsprotein nur im Input nachweisbar und wurde somit nicht coimmunpräzipitiert. Die jeweiligen genannten Banden sind spezifisch, da sie weder an den Kontroll-beads auftauchen, noch in der untransfizierten Kontrolle in den mittleren drei Spuren des Western Blots.

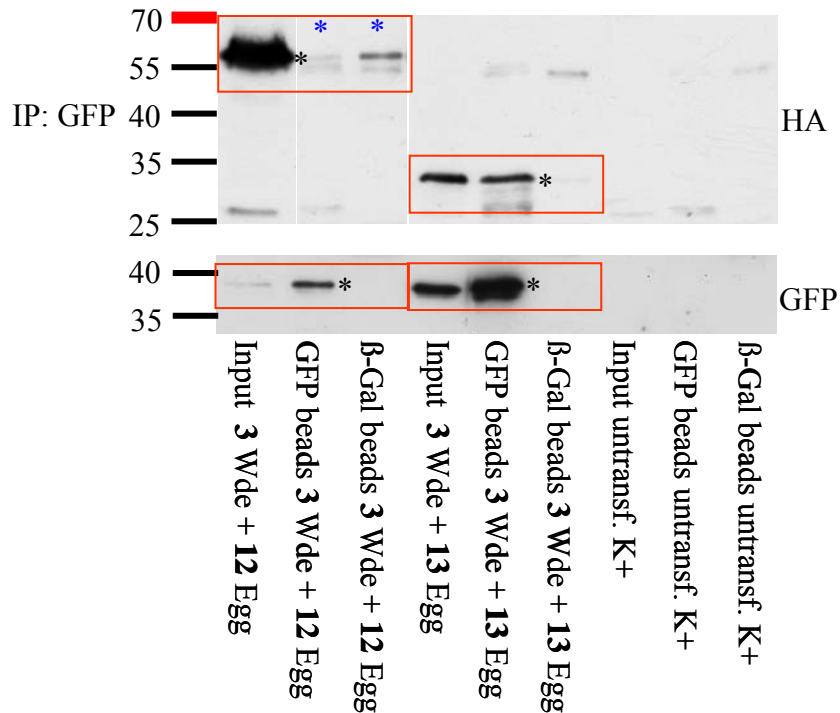
Um sicherzustellen, dass diese Bindung spezifisch ist, wurde zusätzlich eine CoIP auf Zelllysaten von Coüberexpressionen mit dem GFP-Windei Vollängen-Konstrukt (Wde 1) und Egg 11 und 10 durchgeführt. Hier wurde die CoIP über die Bindung des Windei-Antikörpers an die Protein-A-Agarose-beads vermittelt. Auch das Windei Vollängen-Protein bindet an das Eggless Deletionskonstrukt 11, nicht aber an Egg 10 (Abbildung 3.7.2.6, rote Markierungen).



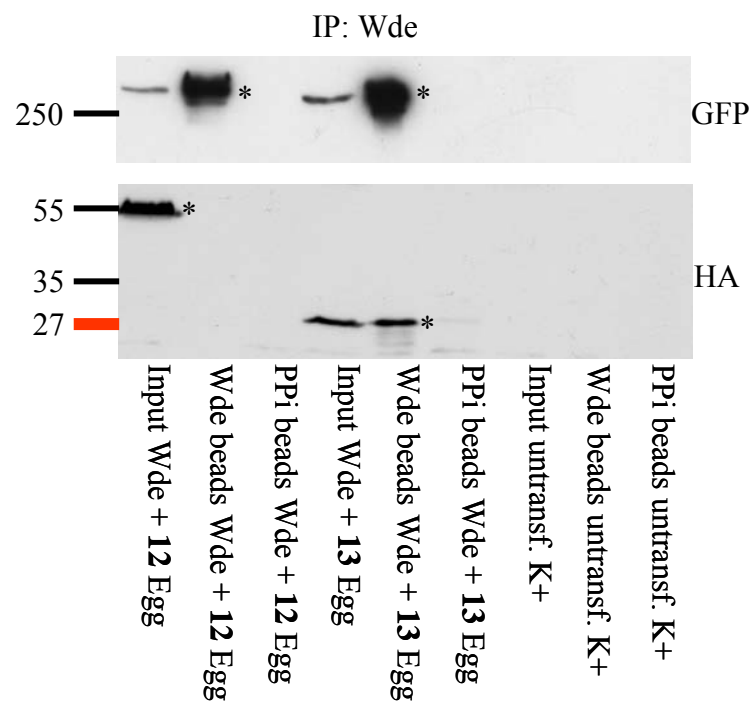
**Abbildung 3.7.2.6: Wde kann das Egg-11-HA-Konstrukt coimmunpräzipitieren.** Die CoIP wurde auf Lysaten von Zellen durchgeführt, welche cotransfiziert waren mit dem *wde-1-GFP*-Konstrukt und entweder dem *egg-10-HA*-Konstrukt oder dem *egg-11-HA*-Konstrukt. Nach Bindung des Wde-Antikörpers an Protein-A-Agarose-beads kann das Egg-11-HA-Fusionsprotein im Input und an den Wde-beads nachgewiesen werden, das Egg-10-HA-Fusionsprotein aber nur im Input und wurde somit nicht coimmunpräzipitiert. Die jeweiligen genannten Banden sind spezifisch, da sie weder an den Präimmun-Serum-beads auftauchen, noch in der untransfizierten Kontrolle in den rechten drei Spuren des Western Blots.

Der codierende Bereich von Egg 11 wurde in zwei weiteren Konstrukten nochmals unterteilt, in das weiter N-terminale Egg 12 und in das weiter C-terminale Egg 13.

Dabei stellte sich heraus, dass sowohl die Windei coiled coil-Domäne (Wde 3) (Abbildung 3.7.2.7), wie auch das Windei Volllängen-Protein (Wde 1) (Abbildung 3.7.2.8) an das Egg 13-Ha-Fusionsprotein binden, nicht jedoch an Egg 12 (Abbildungen 3.7.2.7 und 3.7.2.8).



**Abbildung 3.7.2.7: Die coiled coil-Domäne von Wde kann das Egg-13-HA-Konstrukt coimmunpräzipitieren.** Die CoIP wurde auf Lysaten von Zellen durchgeführt, welche cotransfiziert waren mit dem *wde-3-GFP*-Konstrukt und entweder dem *egg-12-HA*-Konstrukt oder dem *egg-13-HA*-Konstrukt. Nach Bindung des GFP-Antikörpers an Protein-A-Agarose-beads kann auf dem unteren Western Blot beider Zelllysate das Wde-3-GFP-Fusionsprotein im Input der cotransfizierten Zellen und an den GFP-beads nachgewiesen werden. Deutlich ist auf dem oberen Blot zu erkennen, dass an den GFP-beads des Zelllysates, welches mit dem *egg-13-HA*-Konstrukt transfiziert war, das entsprechende HA-Fusionsprotein nachweisbar ist. Dagegen ist das Egg-12-HA-Fusionsprotein nur im Input nachweisbar und wurde somit nicht coimmunpräzipitiert. Die jeweiligen genannten Banden sind spezifisch, da sie nicht in der untransfizierten Kontrolle in den rechten drei Spuren des Western Blots auftauchen. Zwar ist bei etwa 60 kDa auch eine schwache Bande an den Kontroll-beads in Spur 3 zu erkennen, diese dürfte aber eher unspezifisch sein, da die Bande im Input der Spur 1 erheblich stärker ist und die tatsächlich präzipitierten Proteine in der Regel an den beads konzentrierter auftreten. Die blauen Sternchen markieren zwei Spuren im oberen Blot, welche gespiegelt wurden, damit die Spuren gleichen Inhalts in der Grafik untereinander liegen.



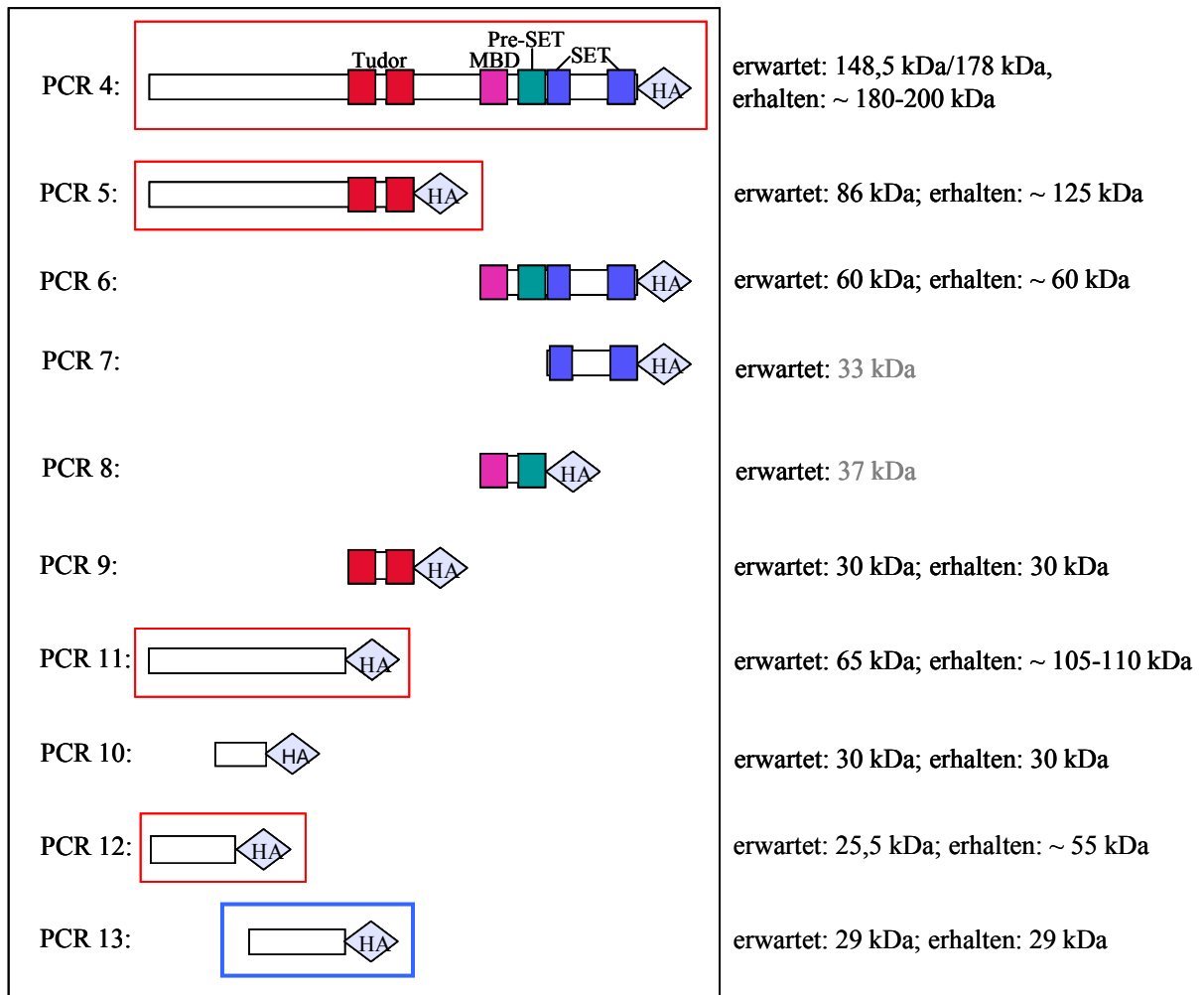
**Abbildung 3.7.2.8: Wde kann das Egg-13-HA-Fusionsprotein coimmunpräzipitieren.** Die CoIP wurde auf Lysaten von Zellen durchgeführt, welche cotransfiziert waren mit dem *GFP-wde-1*-Konstrukt und entweder dem *egg-12-HA*-Konstrukt oder dem *egg-13-HA*-Konstrukt. Nach Bindung des affinitätsgereinigten Wde Antikörpers an Protein-A-Agarose-beads kann auf dem oberen Western Blot das GFP-Wde-Volllängen-Fusionsprotein sowohl in den Inputs wie auch an den Wde-beads der transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Im unteren Blot sind die beiden HA-Fusionsproteine deutlich in den Inputs der transfizierten Zellen erkennbar, jedoch nur das Egg-13-HA-Fusionsprotein wurde über das Wde-Protein und den Wde-Antikörper auch an die entsprechenden beads gebunden. Die genannten banden sind spezifisch, da sie nicht an den Präimmun-Serum-beads auftauchen und auch nicht in einer der Spuren der untransfizierten Kontrolle.

Das Endresultat dieser Versuchsreihe ist somit, dass die Bindung von Windei an Eggless über einen maximal 155 Aminosäuren langen Bereich (AS 366-521) kurz hinter dem N-Terminus von Eggless vermittelt wird. Dieser Bereich kann sowohl vom Windei Volllängen-Protein wie auch von der coiled coil-Domäne alleine coimmunpräzipitiert werden.

Wie bereits in Abschnitt 3.7.1 erwähnt, ist die erhaltene Eggless-Volllängenbande deutlich höher als erwartet. Auf Grund der hohen Konservierung von Eggless und der bereits bekannten SUMOylierung des Homologs ist auch hier anzunehmen, dass die veränderte Bandengröße auf derartigen Modifikationen beruhen könnte. Ein weiterer Hinweis darauf ist die Tatsache, dass alle in diesem Abschnitt untersuchten Deletionskonstrukte, welche den N-terminalen Bereich einschließlich der Aminosäuren 1-202 codierten, nach Expression zu Banden führten, die deutlich um etwa 30-40 kDa erhöht waren (Schema 3.7.2.9, Rot



markierte Konstrukte). Alle übrigen Konstrukte zeigten Banden, die den Erwartungen genau entsprachen. Diese Modifikation des Eggless N-Terminus dürfte aber für die Bindung an Windei nicht von großer Bedeutung sein, das die coiled coil-Domäne an Egg 13 binden kann, welches den modifizierten Bereich nicht enthält.



**Schema 3.7.2.9: Diejenigen Eggless-Konstrukte, welche den N-terminalen Bereich, von Aminosäure 1-202, codieren, erzeugen erhöhte Proteinbanden.** Die Rot markierten Eggless-Konstrukte 4, 5, 11 und 12, welche alle in der Sequenz, die die ersten 202 Aminosäuren von Eggless codiert, übereinstimmen, erzeugen auf Proteingelen um 30-40 kDa erhöhte Banden, vermutlich bedingt durch posttranslationale Modifikationen. Die übrigen Konstrukte führen dagegen zu Proteinbanden, welche jeweils den Erwartungen entsprechen. Dasjenige Eggless-HA-Fusionsprotein, welches mit Windei interagiert, ist Blau markiert.

### 3.8 Untersuchung der Bindung von Windei an POF

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das *Drosophila* Eggless-Protein mit POF an den Polytäanchrosomen interagiert und dass diese Interaktion von Bedeutung für die HP1 Lokalisierung und somit für den Kondensierungsgrad des Chromatins des vierten Chromosoms ist (Seum et al, 2007; Tzeng et al, 2007).

Die Antikörperfärbungen an Wildtyp-Ovarien haben einen ersten Hinweis darauf geliefert, dass eine ähnliche Lokalisierung von Eggless/ Windei und POF auftritt. Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Interaktion von Windei mit dem vierten Chromosom und dort womöglich mit POF direkt oder über Eggless lieferten die Färbungen an Polytäanchrosomen.

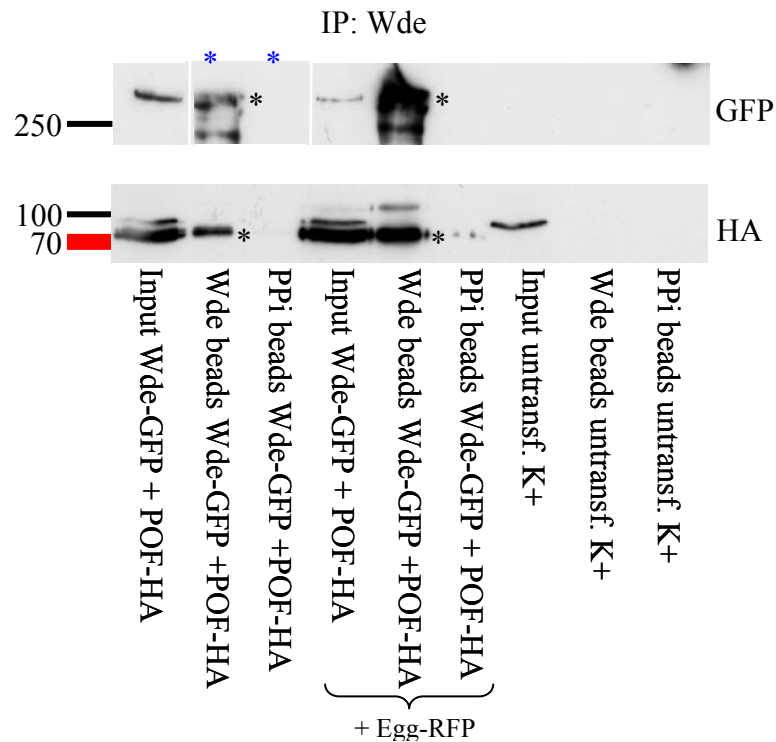
In diesem Abschnitt sollte nun über Coimmunpräzipitation überprüft werden, ob es eine Bindung von Windei an POF bzw. einen POF enthaltenden Protein-Komplex gibt.

#### 3.8.1 Coimmunpräzipitation mit Windei und POF

Im folgenden Experiment erfolgte zunächst eine Coüberexpression von GFP-Wdei und POF-HA jeweils unter dem Einfluss eines UAS-Promoter und exprimiert mittels Aktin5C-Gal4.

In einem zweiten Teil der Versuchs wurde zusätzlich auf die gleiche Weise ein Egg-RFP Konstrukt exprimiert, da von der Möglichkeit ausgegangen wurde, dass möglicherweise eine Bindung an POF nur indirekt über Eggless erfolgen kann, und daher eine ebensolche Überexpression dieses Proteins nötig ist.

Tatsächlich kann mit dem Windei Antikörper eine Coimmunpräzipitation von POF erfolgen (Abbildung 3.8.1.1).



**Abbildung 3.8.1.1: Wde kann ein POF-HA-Fusionsprotein coimmunpräzipitieren.** Die CoIP wurde auf Lysaten von Zellen durchgeführt, welche cotransfiziert waren mit einem *GFP-wde*-Konstrukt und einem *POF-HA*-Konstrukt. Nach Bindung des affinitätsgereinigten Wde Antikörpers an Protein-A-Agarose-beads kann auf dem Western Blot sowohl das GFP-Wde-Fusionsprotein wie auch das POF-HA-Fusionsprotein im Input und an den Wde-beads nachgewiesen werden, nicht aber an den beads, welche mit dem Präimmunsereum inkubiert waren oder in der untransfizierten Kontrolle. Im mittleren Teil des Blots waren die Zellen zusätzlich mit einem *eggless-RFP*-Konstrukt cotransfiziert worden, jedoch erfolgt die Bindung von POF an Wde hier in gleicher Weise wie im ersten Teil des Blots ohne das Egg-RFP-Fusionsprotein, welches über das Fluoreszieren des RFP in den Zellen beider Teilversuche nachweisbar war. Die blauen Sternchen markieren zwei Spuren im oberen Blot, welche gespiegelt wurden, damit die Spuren gleichen Inhalts in der Grafik untereinander liegen.

Dabei erscheinen die entsprechenden Banden ausschließlich in den Inputs der cotransfizierten Zellen, sowie an den beads, an welche eine Kopplung des Wde-Antikörpers erfolgte, nicht aber an den beads mit dem Präimmun-Serum oder in der untransfizierten Kontrolle. Allerdings scheint es für die Bindung von Wde an POF unerheblich zu sein, ob eine gleichzeitige Überexpression von Eggless erfolgte oder nicht.

## IV Diskussion

Die Methylierung von H3K9 spielt nicht nur eine große Rolle im Heterochromatin von perizentrischen und telomerischen Bereichen, sondern auch, zunehmend erforscht, in der transkriptionellen Reprimierung euchromatischer Gene. Dabei werden die verschiedenen Markierungen von diversen H3K9-spezifischen Methyltransferasen vermittelt. So erfolgt die H3K9-Trimethylierung von perizentrischem und telomerischem Chromatin hauptsächlich durch Methyltransferasen aus der Su(var)3-9-Familie (Aagaard et al., 1999; Rea et al., 2000; Peters et al., 2001; Schotta et al., 2002; Peters et al., 2003; Rice et al., 2003; Garcia-Cao et al., 2004). Dagegen wird die Methylierung von euchromatischem H3K9 durch die Enzyme G9a und SETDB1 katalysiert (Schultz et al., 2002; Tachibana et al., 2002, Yang et al., 2002; Ayyanathan et al., 2003; Tachibana et al., 2005), wobei hier G9a vorrangig zur Mono- und Dimethylierung von H3K9 führt (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003) und SETDB1 zur Trimethylierung (Wang et al., 2003). Für diese Funktion benötigt ESET/SETDB1 im Säuger die Assoziation mit dem Cofaktor mAM/MCAF1 (Wang et al., 2003). Das *Drosophila*-Homolog von SETDB1 ist ebenfalls in der Trimethylierung von H3K9 involviert (Clough et al., 2007; Yoon et al., 2008 ), jedoch konnte bisher nicht gezeigt werden, ob auch hier ein Cofaktor, womöglich ein *Drosophila*-mAM/MCAF1-Homolog, essenziell für die Eggless Funktion ist. Daher erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung des potenziellen mAM/MCAF1-Homologs in *Drosophila*, *CG12340 (wde)*, auch in Bezug auf eine Interaktion mit Eggless.

### 4.1 *CG12340 (Windei)* ist das *Drosophila*-Homolog von mAM/MCAF1 und lokalisiert in allen untersuchten Geweben ubiquitär und nukleär.

Das vorhergesagte *Drosophila melanogaster* Gen *CG12340* besteht aus den in FlyBase annotierten kodierenden Sequenzen. Dies hat die Sequenzierung des Vollängen-EST-Klons GH06075 des DGRC bestätigt. Die zugrunde liegende Sequenz des Offenen Leserasters (ORF) wurde für die Herstellung von *GFP-CG12340*-Vollängen-Konstrukten verwendet und zeigte auch in transgenen Fliegen sowie in den Rettungsexperimenten, dass das entstandene Fusionsprotein funktional ist. Das von *CG12340* kodierte Protein zeigt eine deutliche Konservierung der Proteindomänen, vor allem im Bereich der C-terminalen Fibronectin III-Domäne (Ichimura et al, 2005). Dabei sind die Bereiche außerhalb der Domänen weniger stark konserviert. Für die beiden konservierteren Motive konnte in den einzelnen Säuger-Orthologen bereits herausgestellt werden, dass diese einige Protein-Protein-Interaktionen

vermitteln. So bindet die coiled-coil-Domäne des humanen Homologs MCAF1 an SETDB1 (Ichimura et al, 2005), das Ortholog von dSETB1/Eggless, sowie an den Transkriptionsfaktor SP1 (Fujita et al., 2003). Die FNIII-Domäne des humanen Homologs dagegen bindet an MBD1 (Fujita et al., 2003), ein Protein, welches methylierte Promotoren erkennt und über MCAF1 das SETDB1-Enzym rekrutiert (Ichimura et al., 2005). Da diese Domänen auch in *Drosophila* konserviert sind, ist es denkbar, dass sie auch hier Protein-Protein-Interaktionen vermitteln.

Die Analyse der Lokalisierung des Wde-Proteins hat ergeben, dass dieses in den Kernen der untersuchten Gewebe lokalisiert. Dies war zutreffend für Färbungen an Embryonen, Ovarien, und larvalen Speicheldrüsen. Während der Mitose war das Protein im Zytoplasma verteilt.

Die nukleäre Lokalisierung ist ein Prärequisit für eine mögliche Funktion des Proteins in der transkriptionellen Regulation von Chromatin, wie sie für die Säugerhomologe in humanen Zellen und in der Maus gezeigt wurden. Zudem zeigte Wde eine verstärkte Lokalisierung in einzelnen embryonalen Geweben, wie dem ZNS, dem PNS bzw. deren Vorläuferzellen und in den Polzellen, den Keimzellen aus denen die nächste Generation hervorgeht. Das Wde-Signal in den Polzellen besitzt eine starke maternale Komponente, da es in zygotisch mutanten Embryonen trotz einer Reduktion der Wde-Lokalisierung in allen übrigen Zellen hier noch deutlich detektierbar war. Diese Zellen erfahren zum Einen eine transkriptionelle Repression der RNA Polymerase II vermittelten Transkription und zum Anderen eine Repression durch erhöhte H3K9-Methylierung (Blackwell, 2004; Schaner et al, 2003; Schaner und Kelly, 2006). Es ist daher denkbar, dass diese Methylierung, welche die der umliegenden somatischen Zellen deutlich übersteigt (Schaner et al, 2003), durch den Wde/Egg-Komplex vermittelt wird. Generell sind aber Aussagen über mögliche Phänotypen in diesen Geweben von *wde*-Mutanten in der Embryonal- und Larvenentwicklung durch den Verlust des zygotischen Proteinsignals und damit über eine mögliche Funktion von Wde bisher nicht möglich, da die maternale Komponente Phänotypen vermutlich überdeckt. Zygotisch mutante Individuen überlebten sogar bis ins Puppenstadium und bei Separation von den offensichtlich stärkeren heterozygoten Tieren kurzzeitig bis zum Adultstadium. Das Ausschalten der maternalen Komponente zeigte aber bereits so frühe Oogenese-Defekte (s.u.), dass eine Analyse der Embryonalentwicklung unmöglich war. Auch die Anwendung der MARCM-Technik zur Erzeugung mutanter Klone in wildtypischer Umgebung wäre auf Grund der maternalen Komponente nicht aussagekräftig.

4.2 Wde zeigt in den Ovarien von *Drosophila* eine subzelluläre, punktförmige Lokalisierung in den Nährzellen und der Oozyte, welche vermutlich die Assoziation mit dem Chromatin darstellen.

Die Lokalisierung des Wde-Proteins in wildtypischen Ovarien war in allen Zellen der Germarien nukleär, ebenso wie in den verschiedenen Zellen der Eikammern. Dabei konnte in den Nährzellen und gelegentlich in den Oozytenkernen einiger Eikammern sowohl in Wildtyp-Färbungen mit einem Wde-Antikörper, wie auch in Präparaten transgener Fliegen mit einem Gal4-induzierten GFP-CG12340-Fusionsprotein das Wde-Signal in Form vieler Punkte detektiert werden. Diese punktförmige Verteilung lokalisierte dabei zwischen den DAPI-dichteren Regionen der Nährzellkerne. Dies könnte auf eine Chromatin-Assoziation des Proteins hindeuten, wie sie auch für Speicheldrüsen-Polytänchromosomen-Präparate gezeigt werden konnte (s.u.). Die fehlende Colokalisierung mit DAPI-gefärbten Bereichen lässt den Schluss zu, dass es sich dabei um die Bindung an euchromtische Regionen handelt. Gelegentlich aufgetretene, zahlreiche Wde-Punkte im Oozytenkern lassen sich dagegen schwerer einem Bereich zuordnen, da durch die Anordnung der Chromosomen im kompakten Karyosom und die im Gegensatz zu den Nährzellen nicht erfolgte Polyploidisierung die Sichtbarmachung von Chromatin erschwert wird. Die Tatsache, dass eine punktförmige Detektion von Wde nicht in den Kernen aller Nährzellen einer Eikammer bzw. in allen Eikammern eines Präparates erfolgte, deutet darauf hin, dass diese Lokalisierung stadien- oder zellzyklusabhängig sein könnte. Die Nährzellen einer Eikammer durchlaufen nicht immer synchron die Endoreplikationsrunden, je nach Entfernung zur Oozyte auch unterschiedlich viele (Dej und Spradling, 1999). Dies wäre ein möglicher Grund für die unterschiedliche Verteilung des Proteins in verschiedenen Nährzellkernen.

Dagegen konnte in den Oozytenkernen durchgehend eine Lokalisierung von Wde in ein bis zwei großen, rundlichen Punkten detektiert werden. Diese trat bereits in frühen Eikammern auf und blieb auch in späten Oogenesestadien bestehen, wenn auch meist schwächer. Die Lokalisierung zeigte eine deutliche Ähnlichkeit zu bereits veröffentlichten Färbungen gegen dSETDB1/Eggless, dessen murine und humane Säugerhomologe als Bindungspartner von mAM und MCAF1 bestätigt wurden (Wang et al., 2003; Ichimura et al., 2005).

4.3 Windei und Eggless colokalisieren in Ovarien und assoziieren in einem Proteinkomplex, wobei die Bindung über die coiled-coil-Domäne von Wde und eine kurze Region von Egg vermittelt wird, welche keine bekannten Proteinmotive besitzt.

Da eine Cofärbung gegen Eggless und Windei nicht möglich war, weil uns ein veröffentlichter Eggless-Antikörper nicht zur Verfügung gestellt werden konnte, erfolgte die Untersuchung der Eggless-Lokalisation mit Hilfe transgener Fliegen, welche ein Egg-RFP-Fusionsprotein in Gal4-abhängiger Weise in Keimbahnzellen und somatischen Zellen exprimierten. Das Eggless-Signal lokalisierte dabei in den Zellen, in denen es exprimiert wurde in dem bereits publizierten Muster. Die zusätzliche Färbung mit dem Windei-Antikörper oder die gleichzeitige Gal4-abhängige Expression eines GFP-CG12340-Fusionsproteins zeigte deutlich, dass die Lokalisierung von Wde und Egg in den großen, rundlichen Punkten identisch war und die Proteine dort durchweg colokalisierten, ebenso wie in den angefärbten Nährzellen in großen Arealen der Kerne bzw. in den teilweise auftretenden vielen Punkten. Um festzustellen, ob die beiden Proteine zufällig colokalisierten oder aber analog zu den Säugerdaten eine Assoziation von Wde und Egg in einem Komplex erfolgt, wurden zunächst Coimmunpräzipitationen mit den Vollängen-Proteinen durchgeführt. Diese ergaben eine Assoziation der Proteine in einem Komplex, da eine Präzipitation von Wde und Egg über den Wde-Antikörper erfolgte. Aus Säugerdaten war bereits bekannt, dass die Bindung der Homolge von Wde und Egg über die coiled coil-Domäne des Wde-Homologs vermittelt wird (Ichimura et al, 2005). Um zu überprüfen, ob die Bindung der Proteine über diese Domäne in *Drosophila* konserviert ist und um herauszufinden, welche Domäne von Eggless an der Bindung beteiligt ist, wurden diverse *wde*- und *egg*-Deletionskonstrukte verwendet. Da durch die Säugerdaten bereits die coiled coil-Domäne von Wde als interagierender Bereich vorhergesagt war, beschränkten sich die Tests für Wde auf ein GFP-Fusionsprotein mit nur dieser Domäne und auf das Wde-Vollängen-Protein. Für Eggless wurden HA-Konstrukte verwendet, welche das Vollängen-Protein, die N- bzw. C-terminale Hälfte, sowie kleinere Bereiche von Eggless kodierten. Tatsächlich wurde auch in *Drosophila* die Bindung an Eggless über die coiled coil-Domäne vermittelt, zumindest ist diese ausreichend für die Präzipitation des Eggless-Vollängen-Proteins. Nachdem sich herausstellte, dass keine der bekannten Domänen von Eggless die Bindung an die coiled coil-Domäne von Wde vermittelt, wurde der präzipitierte, N-terminale Bereich in Konstrukte mit kleineren Bereichen aufgeteilt und so ergab sich, dass für die Bindung von Wde an Eggless die Wde coiled coil-Domäne und ein Bereich von Eggless ausreichend war, welcher die Aminosäuren 366-521 umspannt. Für diesen Bereich konnte keine gängige „Domänen-

Software“ ein Motiv erkennen. Dennoch resultierte dieses Experiment in der Gewissheit, dass die aus Säugerdaten bekannte Bindung von Wde an Eggless über die coiled coil-Domäne auch in *Drosophila* konserviert ist.

#### 4.4 Windei bindet an POF und könnte zusammen mit Egg die Transkription von Genen des vierten Chromosoms regulieren.

Nachdem geklärt werden konnte, dass eine *in vivo* Interaktion zwischen Eggless und Windei in *Drosophila* besteht, war es naheliegend, die Funktion des Komplexes näher zu untersuchen. Da für Eggless bereits bekannt war, dass es an vielen euchromatischen Regionen von Polytäanchrosomen der Speicheldrüsen lokalisiert und dort vor allem am vierten Chromosom, wo Egg mit POF colokalisiert (Seum et al., 2007; Tzeng et al., 2007), wurde in diesem Gewebe die Lokalisierung von Wde analysiert. Dabei ergab sich, dass Wde ebenfalls an vielen euchromatischen Banden der Chromosomenarme detektiert werden kann, nicht aber im konstitutiv heterochromatischen Chromozentrum, welches mit HP1 markiert wurde. Jedoch konnte eine deutliche Lokalisierung von Wde-Protein am vierten Chromosom von *Drosophila*, das durch POF markiert war, beobachtet werden. Die Untersuchung einer Colokalisierung von Wde und Egg an den Polytäanchrosomen war nicht möglich, da kein funktioneller Antikörper gegen Egg zur Verfügung stand und im Gegensatz zur GFP-Antikörperfärbung gegen das GFP-Wde-Fusionsprotein eine Anfärbung des Egg-RFP-Proteins wegen der Unspezifität des getesteten RFP-Antikörpers keine Resultate erzielte. Auf Grund der vergleichbaren Lokalisierung von Wde und von Egg, vor allem am vierten Chromosom, kann jedoch der Schluss gezogen werden, dass die Proteine ähnlich lokalisieren, weil sie auch hier in einem Komplex vorliegen könnten. Einen weiteren Hinweis für diese These lieferten die Resultate zur Bindung von Wde an POF. Nachdem beide Proteine an das vierte Chromosom binden, war es naheliegend zu testen, ob die Proteine in einem Komplex vorliegen. Tatsächlich konnte ein POF-HA-Fusionsprotein mittels Wde coimmunpräzipitiert werden. Dabei schien es für die Bindung unerheblich zu sein, ob auch ein *eggless-RFP*-Konstrukt cotransfiziert wurde. Dies bedeutet nicht automatisch, dass die Bindung von Wde und POF direkt ist, da es möglich ist, dass SII-Zellen auch endogenes Eggless exprimieren. Da allerdings kein Antikörper zur Verfügung stand, der spezifisch Eggless erkennt, kann dazu keine weitere Aussage getroffen werden. Dennoch zeigt dieser Versuch, dass Windei entweder an POF oder aber an einen POF beinhaltenden Proteinkomplex bindet, der möglicherweise auch Eggless enthält. Zukünftige Coimmunpräzipitations-Experimente mit weiteren *Wde*-Deletionskonstrukten könnten allerdings Aufschluss darüber geben. Würde die



Präzipitation über die coiled coil-Domäne von Wndei erfolgen, so könnte dies bedeuten, dass POF mit Eggless um die Bindung konkurriert. Dies könnte allerdings auch bedeuten, dass die Bindung von POF an Wndei über Eggless stattfindet, was die gleichzeitige Präzipitation von POF und Egg mittels Wde bestätigen würde. Dagegen würde die Präzipitation mit Wde-Deletions-Proteinen, welchen die coiled coil-Domäne fehlt, darauf hindeuten, dass die Bindung nicht über Eggless stattfindet. Denkbar wäre dieser Umstand, da aus Säugerdaten bekannt ist, dass eine Rekrutierung von SETDB1 über MCAF1 erfolgt (Ichimura et al., 2005), so dass auch eine Rekrutierung von Eggless an das vierte Chromosom über Wde möglich wäre.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in Bezug auf die Bindung von Egg und Wde an POF ist die Lokalisierung der beiden erstgenannten Proteine in den großen, kugelförmigen Punkten im Oozytenkern. Das vierte Chromosom nimmt allgemein eine Sonderstellung ein, wenn wie im Falle der Speicheldrüsen-Polytänchromosomen oder des Karyosoms der Oozyte eine Anordnung der Chromosomen im Chromozentrum erfolgt. Das als eher heterochromatisch geltende vierte Chromosom lokalisiert nicht wie perizentrisches Chromatin inmitten des Chromozentrums, sondern vielmehr in unmittelbarer Nachbarschaft dazu. Die kugelförmige Lokalisierung von Egg und Wde in einem maximal leicht mit HP1 markierten Bereich des Oozytenkerns, jedoch in unmittelbarer Nähe zu den deutlichen HP1-Strukturen des Karyosoms, sind ein wichtiger Hinweis auf die Möglichkeit, dass die Kugeln die vierten Chromosomen von *Drosophila* darstellen. Diese These könnte durch eine Colokalisierung der kugelförmigen Strukturen mit POF bewiesen werden, da POF auch hier die vierten Chromosomen binden sollte. Dies war jedoch nicht möglich, da der POF-Antikörper nur eine diffuse Färbung im Oozytenkern erzeugte. Er detektierte zwar hervorragend das vierte Chromosom in den Nährzellkernen und gab Signale in den Follikelkernen, jedoch konnte keine Lokalisierung im Oozytenkern mit verschiedenen Färbemethoden und Verdünnungen des Antikörpers festgestellt werden, da im Oozytenkern eine sehr starke Hintergrundfärbung auftrat. Um die POF-Lokalisierung am vierten Chromosom dennoch zu ermitteln, würde es sich anbieten, transgene Fliegen mit POF-RFP-Fusionsproteinen zu generieren. Ähnlich wie beim Egg-RFP-Fusionsprotein könnte die Gal4-abhängige Überexpression auch hier das POF-Signal deutlich sichtbar machen. Dabei könnte die Funktion der Bindung des Wde-Egg-Komplexes in der transkriptionellen Feinregulation der euchromatischen Genabschnitte in der heterochromatischen Umgebung des vierten Chromosoms liegen.

Da die Lokalisierung von Wde an den relativ großen POF-gefärbten Nährzellkern-Bereichen deutlich schwächer war, als die Wde-Strukturen im Oozytenkern, ist das vierte Chromosom in

den aktiv transkribierenden Nährzellen womöglich weniger stark reprimiert. Im Oozytenkern könnte der Komplex dagegen für die Rekrutierung von HP1 und damit für die Kondensierung des vierten Chromosoms notwendig sein, um dessen Stabilisierung in der arretierten Prophase der Meiose und eine normale Segregation dieser Chromosomen und damit die Stabilität des Genoms zu gewährleisten. Diese Theorie könnte Unterstützung durch die Erkenntnisse erfahren, dass das 4. Chromosom in Vorfahren von *Drosophila melanogaster* vermutlich einst Teil des X-Chromosoms war und zu einem eigenständigen Autosom wurde (Krivshenko, 1955, 1959; Larsson et al, 2001). Überzählige vierte Chromosomen neigen zudem zu einer Fehlpaarung mit dem X-Chromosom (Sandler, 1956), was auf verwandten Sequenzsignaturen dieser Chromosomen beruhen könnte. Möglicherweise dient die Heterochromatisierung des 4. Chromosoms daher der Kondensierung und dem Ausbleiben meiotischer Rekombination, um derartige Fehlpaarungen und damit Fehlsegregationen und Genominstabilität zu vermeiden. Die Markierung des 4. Chromosoms durch POF, welche als „Überrest“ eines X-chromosomalen Dosiskompensationssystems entstanden sein könnte, würde dann möglicherweise die Funktion erlangt haben, als Erkennungssignal für den Wde/Egg-Komplex zu dienen, um die Kondensierung des Chromosoms zu gewährleisten. Dennoch führt das Fehlen von POF nur zu einer leichten Reduktion des HP1-Signals am 4. Chromosom (Johansson et al, 2007), so dass die Erkennung und Reprimierung dieses Chromosoms offenbar auch in Abwesenheit von POF erfolgt.

Neben der Verhinderung von Fehlpaarungen könnte die Funktion der Heterochromatisierung des vierten Chromosoms auch in der Repression von Hypertranskription liegen, sofern dieses tatsächlich vom X-Chromosom abstammt (Larsson et al, 2004), und POF sowie der Wde/Egg-Komplex könnten für diesen reprimierenden Einfluss notwendig sein.

#### 4.5 Wde ist essenziell für die *in vivo* Funktion von Egg während der Oogenese.

Um die *in vivo* Funktion von *wde* näher zu analysieren, wurde zunächst eine *wde*-Nullmutante mittels Transdeletion hergestellt. Diese ist pupal letal, abgesehen von dem bereits weiter oben beschriebenen Phänomen, dass einzelne homozygot mutante Adulte erhalten werden konnten, wenn eine Separation von den Heterozygoten erfolgte. Obwohl der Verlust der gesamten genomischen Sequenz von *wde* erfolgt war und sowohl Antikörper-Färbungen wie auch Western Blot-Analyse ergaben, dass das Protein in Embryonen stark reduziert war, blieb dennoch ein Signal zurück, welches sich auf eine maternale Komponente zurückführen läßt. Ähnlich verhielt es sich mit den beiden P-Element-Insertionen, welche in das dritte Exon von *windei* inseriert hatten. Da zudem alle drei Linien und eine Defizienz, welche auch *CG12340*

deletiert, in verschiedenen Kombinationen transheterozygot pupal letal waren, können sie als Allele von *windei* angesehen werden. Letalitätstests zeigten jedoch, dass homozygot mutante Embryonen einer der P-Element-Linien, P{EPgy2}CG12340<sup>EY00884</sup>, nicht wie die Übrigen pupal letal, sondern embryonal letal waren und somit über eine zweite Mutation in ihrem Genom verfügten. Durch die Generierung von Keimbahnklonen wurde in allen drei mutanten und FRT-tragenden Allelen die maternale Komponente ausgeschaltet und in allen die gleichen Oogenese-Defekte beobachtet, auch in der Linie mit der zweiten Mutation. Daher können die drei Allele gleichermaßen als funktionelle Null-Allele bezeichnet werden.

Es stellte sich heraus, dass die Keimbahnklon-Defekte zudem identisch mit denen waren, welche in Keimbahnklonen eines *eggless* mutanten Allels und einer *wde/eggless*-Doppelmutante beobachtet werden konnten. Die Oogenese arretierte spätestens bis Eikammerstadium 9-10, dabei degenerierten die betroffenen Eikammern und zeigten apoptotische Merkmale, wie die Kondensierung der Kerne und eine vermehrte Detektion von *activated Drice*, einer Kaspase. Diese Beobachtungen, zusammen mit der Tatsache, dass innerhalb der Keimzellen von mutanten *wde*- oder *egg*-Klonen in Germarien die H3K9me3-Färbung extrem reduziert war, bestätigen die Überlegungen, dass Wde und Egg in einem Komplex agieren, in welchem Wde ein essenzieller Cofaktor von Egg ist. In den bisherigen Untersuchungen des Komplexes im Säuger galt mAM/MCAF1 zwar als notwendiger Cofaktor für die effiziente H3K9-Trimethylierung, jedoch stammten die Daten aus Zellkultur-Experimenten (Wang et al., 2003). Die hier gewonnenen Daten zeigen erstmals im Organismus, dass Wde nicht nur ein essenzieller Cofaktor für die Trimethylierung von H3K9 ist, sondern als Folge, ebenso wie Egg, unentbehrlich für das Überleben der Keimbahn ist. Bislang konnte noch nicht geklärt werden, ob Wde für die Rekrutierung von Egg an das Chromatin notwendig ist, da ein geeigneter Eggless-Antikörper nicht zur Verfügung stand, um dessen Lokalisierung in Wde-Keimbahnklonen zu untersuchen. Allerdings könnte die Notwendigkeit von Wde auch auf einer anderen Funktion beruhen:

Bisherige Studien der Kristallstruktur von einzelnen HMT mit SET-Domäne konnten zeigen, dass der Austausch jeweils einer entscheidenden Aminosäure die lokale Struktur derart verändern kann, dass ein Enzym, welches zuvor nur zur Monomethylierung fähig war, dadurch Di- oder Trimethylierung vornehmen kann. Der Lysin-Zugangskanal des Enzyms kann durch die Substitution die Fähigkeit erlangen, auch Mono- und Dimethyl-H3K9 als Substrat aufzunehmen und erneut zu methylieren (Xiao et al, 2003 a und b; Zhang et al, 2003). Es ist daher denkbar, dass die Bindung des Cofaktors Wde für den Trimethylierungsschritt von H3K9 durch Wde essenziell ist, weil diese Interaktion die

Geometrie des Enzyms dahingehend verändert, dass eine sterische Hemmung der Aufnahme von Dimethyl-H3K9 als Substrat aufgehoben wird.

Ein Vergleich der wenigen erhaltenen Ovarien homozygot mutanter *windei*- oder *eggless*-Weibchen zeigte ebenfalls identische Phänotypen. Die Ovarien waren rudimentär, bestanden nur aus Germarien, welche unfähig waren, Eikammern abzuknospen und eine erhöhte Zahl apoptotischer Zellen besaßen. Für *eggless* konnte bereits gezeigt werden, dass das Fehlen von Eikammern, die das Germarium verlassen können, auf der gestörten Proliferation der somatischen Follikel-Stammzellen beruht (Clough et al., 2007). Dadurch entstehen nicht ausreichend viele Follikelzellen, um die Keimzellzysten einzukapseln. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die gestörte Proliferation und die vermehrte Apoptose in den somatischen Stammzellen auf einem veränderten Methylierungsmuster, bedingt durch den Verlust der H3K9-Trimethylierung und damit der fehlenden Repression von Chromatin-Anteilen, beruhen. Eine ebenfalls gestörte Verpackung der Eikammern durch Verlust von Follikelzellen kann in *cut*-mutanten Ovarien festgestellt werden (Jackson und Blochlinger, 1997). Dabei ist ein mögliches Zusammenspiel zwischen dem Transkriptionsfaktor Cut und Windei nicht auszuschließen. Es konnte bereits eine genetische Interaktion festgestellt werden, wobei Windei in der Lage war, einen *cut*-vermittelten Flügel-Phänotyp zu verstärken (Krupp et al., 2005). Zukünftige Experimente könnten daher zeigen, ob eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen in Follikelzellen besteht.

Die Tatsache, dass die Keimbahnklon-Phänotypen milder erscheinen, indem die Eikammern abknospen können und erst später degenerieren, beruht darauf, dass die somatischen Stammzellen in aller Regel von der hitzeschock-vermittelten Rekombination nicht betroffen sind bzw. nicht betroffen sein müssen. Sofern diese Stammzellen intakt geblieben sind, ist eine gestörte Verpackung der Eikammern auch nicht zu erwarten. Zusammengefasst zeigen die Resultate die Unentbehrlichkeit sowohl von Egg, wie von Wde für das Überleben der Keimzellen und der somatischen Stammzellen in der Oogenese von *Drosophila*.

Jedoch lassen die beobachteten Phänotypen in der Keimbahn keine eindeutige Aussage darüber zu, ob diese durch den Verlust der H3K9me3-Markierung und damit eine mangelnde Reprimierung bestimmter euchromatischer Zielgene verursacht werden oder gar durch eine eventuelle Fehlregulation des gesamten vierten Chromosoms. Auch die Untersuchung der HP1- und der POF-Lokalisierung konnten dies nicht aufklären. Beide Proteine zeigen eine wildtypische Verteilung in *wde*- und/oder *egg*-mutanten Klonen. Allerdings war im Falle der HP1-Lokalisierung auch nicht zu erwarten, dass diese gänzlich fehlt, da bekanntermaßen das gesamte konstitutive Heterochromatin davon gebunden wird. Daher würde beispielsweise das

Fehlen der ohnehin schwächeren Färbung am vierten Chromosom oder an einzelnen euchromatischen Genen kaum detektiert werden können. Auch für die POF-Färbung würde keine große Veränderung erwartet, da dieses das vierte Chromosom über eine eigene Initiierungsstelle erkennt und von dieser aus das gesamte Chromosom bedeckt (Larsson et al, 2001). Es ist daher naheliegend, das POF für die Bindung nicht auf den Wde/Egg-Komplex angewiesen ist. Wie bereits diskutiert dient es eher selbst als Erkennungssignal für die Bindung weiterer Proteine an Chromosom 4.

Einen Aufschluss darüber, ob die Hauptfunktion des Egg-Wde-Proteinkomplexes in der Regulation bestimmter Gene oder eines ganzen Chromosoms liegt, könnte allerdings die Durchführung von Micro-Arrays liefern, indem sie einen Unterschied in der Genexpression zwischen wildtypischem und *wde*-mutantem Gewebe ermitteln würden. Dabei ist die Wahl des richtigen Gewebes durch den massiven Phänotyp eingeschränkt. Ovarien homozygot mutanter Weibchen können nicht sehr leicht in großer Anzahl erhalten werden und sind zudem rudimentär. Keimbahnklon-Ovarien dagegen besitzen hauptsächlich wildtypische Eikammern und ein intaktes somatisches Follikelepithel, wodurch ein verändertes Expressionsprofil überdeckt werden könnte. Die vermutlich sinnvollste Wahl wäre die Erzeugung großer Mengen von homozygot mutanten Weibchen, welche mittels GFP-CG12340-Fusionsprotein gerettet würden, aber lediglich über einen somatisch induzierbaren Promoter verfügen, so dass bei Verwendung eines *daughterless*-Gal4-Treibers, welcher maximal in einzelnen Follikelzellen treibt, der *wde*-mutante Ovarien-Phänotyp nachgeahmt werden könnte. Auf diese Weise ließen sich vermutlich ausreichend große Mengen rudimentärer Ovarien aus vitalen Weibchen isolieren, wie dies bereits ansatzweise in den Ovarien mittels *daughterless*-Gal4-geretteter Weibchen der Fall war. Hier war jedoch ein Promoter verwendet worden, welcher in Soma und Keimbahn induzierbar war, so dass die Oogenese teilweise weiter fortschreiten konnte, als in den Keimbahnklonen.

Eine weitere Möglichkeit der Detektion von Zielgenen des Komplexes bietet eine Zelllinie, welche von Niki et al., 2006 etabliert wurde. Diese besteht aus Keimbahnstammzellen von *Drosophila*-Germarien, welche *bam*-mutant waren, so dass eine große Anzahl von Stammzellen, die nicht differenzieren, in der Gegenwart von Dpp kultiviert werden konnten, ebenso wie somatische Follikelzellen in einer weiteren Kultur. Durch das Ausschalten von *wde* mittels der RNAi-Technik in diesen Zellen wäre auch hier die Analyse von Zielgenen durch Micro-Arrays möglich. Zudem wäre es interessant zu sehen, ob die mit *wde*-RNAi-Konstrukten behandelten, kultivierten Keimbahnstammzellen durch den Verlust bestimmter

H3K9me3-Markierungen apoptotisch werden oder durch die Hochregulierung von Genen womöglich differenzieren.

#### 4.6 Spielt SUMOylierung eine Rolle bei der Funktion des Wde/Egg-Komplexes?

In den letzten Jahren wurden stetig weitere Funktionen der SUMOylierung in der transkriptionellen Regulation bzw. Reprimierung von Genen gefunden. Unter anderem wurde gezeigt, dass das SUMO-Protein an der Repression von Chromatin beteiligt ist (Stielow et al, 2008) und Säugerhomologe das Eggless-Homolog SETDB1 modifizieren (Rosendorff et al, 2006). Zudem können SUMOylierte Transkriptionsfaktoren SETDB1 und HP1 zur Etablierung von kondensiertem Chromatin rekrutieren (Stielow et al, 2008).

In *Drosophila* beschreiben mehrere Veröffentlichungen eine starke Expression des SUMO-Proteins und einiger weiterer Komponenten des SUMOylierungsweges im ZNS, PNS und den Polzellen von Embryonen (Lehembre et al, 2000; Shigenobu et al, 2006; Hashiyama et al, 2008). Wie bereits erwähnt, ist auch Wde in diesen Geweben stark exprimiert und möglicherweise an der Etablierung von H3K9-Methylmarkierungen zur transkriptionellen Ruhigstellung dieser Zellen beteiligt. Es wäre daher in zukünftigen Experimenten sinnvoll, die mögliche Funktion des Wde/Egg-Komplexes unter Einbeziehung des SUMO-Proteins in diesen Geweben zu untersuchen. Jedoch bleibt die Schwierigkeit, dass die Funktionsanalyse durch maternale Protein-Komponenten erschwert wird.

Eine aktuelle Veröffentlichung zeigte erstmals auch die Verteilung des SUMO-Proteins in den Zellen der *Drosophila*-Keimbahn (Hashiyama et al, 2008). Allerdings wurde in dieser Expressions-Studie keine Verbindung der Funktion von SUMO mit dem Keimbahnchromatin hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in der weiblichen Keimbahn eine deutliche Überlappung von HP1-gefärbten Arealen der Nährzellen und vor allem des Karyosoms der Oozyte mit der Lokalisierung von SUMO festgestellt werden. Diese Colokalisierung von HP1 und SUMO konnte auch in den schwächer gefärbten, kugelförmigen Bereichen nahe des Karyosoms beobachtet werden, in welchen die GFP-Wde- bzw. Egg-RFP-Fusionsproteine akkumulieren. Zwar zeigen diese kürzlich gewonnenen Daten noch keine direkte Interaktion einer der genannten Komponenten mit SUMO-Molekülen an, dennoch ist es auffällig, dass das Protein vornehmlich in den Kernen und dort an reprimierten, heterochromatischen Bereichen zu finden ist. Zukünftige Experimente sollten daher auch Coimmunpräzipitationen von Wde bzw. Egg und SUMO beinhalten, um festzustellen, ob diese Proteine SUMOyliert werden oder ob der Komplex mit SUMO-Molekülen bzw. SUMOylierten Proteinen interagiert. Erste Hinweise auf derartige Interaktionen liefert die bereits erwähnte Studie von

Rosendorff et al, welche bereits 2006 zeigen konnte, dass das Eggless-Homolog SETDB1 selbst SUMOyliert wird und dadurch eine Verschiebung der Western Blot-Bande um etwa 40 kDa erfährt. Für das *Drosophila*-Homolog Eggless wurden bisher keine derartigen Interaktionen beschrieben. Dennoch wurden hier zwei Proteinbanden in Western Blots erhalten, einmal die vorhergesagte 140 kDa-Bande und eine weitere, etwa 170 kDa große Bande (Clough et al, 2007). Im Rahmen der Western Blot-Analyse und Coimmunpräzipitationen der *egg*-Deletionskonstrukte fiel auf, dass alle Konstrukte, inklusive des Volllängenkonstruktes, welche den N-terminalen Bereich von Aminosäure 1-202 kodierten, ebenfalls eine Erhöhung der erwarteten Bande um etwa 40 kDa aufwiesen. Auf Grund der hohen Konservierung der Eggless-Domänen zu seinen Homologen, sowie der weitestgehend konservierten Funktion liegt daher die Vermutung nahe, dass die Modifikation des N-Terminus von Eggless auf SUMOylierung beruht. Dieser Bereich besitzt zwar kein eindeutiges SUMO-Motiv, aber einige Lysinreste, welche versteckte SUMOylierungsstellen darstellen könnten. Dennoch scheint die Modifikation des N-Terminus von Eggless für die Bindung an Windei unerheblich zu sein, da der Bereich von Eggless, welcher für die Interaktion mit der Wde coiled coil-Domäne ausreichend ist, ebenso wie die coiled coil-Domäne unmodifiziert erscheint. Die entsprechenden Banden zeigen jeweils die erwarteten Größen. Allerdings wurden die beiden interagierenden Proteinbereiche in den Zellen überexprimiert und waren im Überschuss vorhanden. Möglich wäre, dass das Eggless- und das Windei-Wildtyp-Protein eine SUMOylierung *in situ* benötigen, um die richtige subzelluläre Lokalisierung zu erhalten, da für keines der beiden eine gängige Kernlokalisierungssequenz bekannt ist. Ebenso denkbar wäre eine durch SUMO verstärkte Bindung an das Chromatin.

Auch für das Windei-Homolog MCAF1 konnten Interaktionen mit SUMO-Molekülen nachgewiesen werden. Hier allerdings nicht über eine SUMOylierung des Proteins selbst, sondern über ein SIM-Motiv, welches den Bindungspartner MBD1 der SUMOylierung zuführt und damit die Bindung zwischen beiden Proteinen verstärkt (Uchimura et al, 2006). Für Windei und seine Homologe konnte bislang keine direkte SUMOylierung festgestellt werden, dennoch zeigt das Protein eine Erhöhung der Western Blot-Bande um etwa 100 kDa. Diese Verschiebung kann natürlich auf diversen Modifikationen beruhen, wie etwa Phosphorylierung oder Ubiquitinierung. Allerdings besitzt Windei zwei eindeutige SUMOylierungsmotive in den Aminosäuren 165-168 und 766-769, vorhergesagt durch die ELM-Domänensoftware (<http://elm.eu.org/>), so dass sich als zukünftiges Experiment die Mutagenese dieser Motive anbieten würde, um zu sehen, ob die Erhöhung der Bande im

Western Blot dann nicht mehr auftritt. Zudem könnten derartige Konstrukte, in SII-Zellen exprimiert, Aufschluss darüber geben, ob womöglich die Kernlokalisierung, welche für die Funktion unerlässlich ist, ausbleibt.

#### 4.7 Der Wde/Egg-Komplex könnte eine generelle Rolle in Stammzellen spielen.

Eine zukünftige Untersuchung des Wde-Egg-Komplexes sollte unter anderem darauf abzielen, ob dieser generell eine Rolle in verschiedenen Stammzellarten spielt. Als Hinweis darauf könnte verstanden werden, dass der Komplex sowohl für Keimbahnstammzellen wie für somatische Stammzellen notwendig ist. Zudem ist Wndei in diversen Geweben und deren Vorläuferzellen, wie Neuroblasten des Zentralnervensystems (ZNS), und in primordialen Keimzellen (Polzellen) stark exprimiert. Auch das konservierte, murine Eggless-Homolog ESET ist stark im ZNS exprimiert und dort bereits mit dem krankhaften Verlauf der neurodegenerativen Erkrankung Chorea Huntington in Verbindung gebracht worden (Ryu et al., 2006). Zusätzlich ist *wde* ursprünglich in einem Hefe-2-Hybrid-Screen als Interaktionspartner von Bazooka entdeckt worden (D. Egger-Adam, A. Wodarz; persönliche Mitteilung), welches eine tragende Rolle in der asymmetrischen Zellteilung von Neuroblasten spielt (Wodarz et al, 1999).

ESET ist zudem essenziell für die frühe Mausentwicklung und sein Funktionsverlust führt bereits 3,5-5,5 Tage nach der Befruchtung zur Letalität. Interessanterweise war es nicht möglich, *ESET*-mutante ES-Zellen aus Mäuse-Blastozysten in Kultur zu nehmen (Dodge et al, 2004), da das Fehlen dieser Methyltransferase zellletal ist. Das Fehlen des Wndei-Homologs *mAM* dagegen ist nicht zellletal, führte jedoch zu einer Anhäufung von H3K9me2 und der Unfähigkeit von ESET dieses in H3K9me3 zu überführen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Wndei ein essenzieller Cofaktor von Eggless im Organismus ist. Die mutanten Phänotypen waren nicht zu unterscheiden, so dass zumindest in *Drosophila* beide Proteine für die Funktion des Komplexes notwendig sind.

Die Tatsache, dass die Kultivierung *ESET*-mutanter ES-Zellen nicht möglich ist, deutet auf eine Funktion in der Chromatinregulierung dieser noch pluripotenten Zellen hin. Da SETDB1/*ESET*/*Eggless* vornehmlich euchromatische Bereiche methyliert und somit mehr zum fakultativen Heterochromatin beiträgt, könnte die Funktion der H3K9-Trimethylierung in Stammzellen auf der Repression von Differenzierungsgenen beruhen. Da aber die *ESET*-mutanten Zellen nicht spontan differenzieren, sondern sterben, könnte die Funktion auch in der Erhaltung der Genomstabilität liegen.



In der *Drosophila*-Keimbahn könnte diese Funktion neben der potenziellen Verhinderung von Fehlpaarungen oder Hyperaktivität des vierten Chromosoms auch die Erhaltung des kompakten Chromosomenzustandes während der Meiose beinhalten. Da hier die meiotische Prophase über viele Eikammerstadien hinweg anhält und die Chromosomen über der Meiosespindel gehalten werden, könnte eine Dekompaktierung zum Verlust von Chromosomen im Verlauf der anhaltenden Meiose und damit zur Apoptose führen. Dies würde auch erklären, warum in den Keimbahnklonen von *wde* und/oder *egg* die Apoptose teilweise schon in den Zysten und teilweise erst in Eikammern um Stadium 8 auftrat. Die Apoptose der Keimzellen ist nicht stadienspezifisch und wäre demnach viel mehr abhängig von der Genomstabilität im Verlauf der Meiose.

Wie bereits diskutiert, ist es naheliegend, auch eine Funktion des Wde/Egg-Komplexes in der H3K9-Methylierung und damit Ruhigstellung von primordialen Keimzellen, den Polzellen, zu vermuten. Dies impliziert zumindest die Expression von Wde in diesen Zellen und die relativ stabile Lokalisierung dort selbst in zygotisch mutanten Embryonen.

Generell ist die Chromatinregulierung auch in verschiedenen Stamm- oder Vorläuferzellen ein sehr komplexer Prozess. In diesem spielen eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen zusammen, um eine stadien- und gewebeabhängig angepasste Aktivierung oder Reprimierung des Chromatins zu gewährleisten.

## V Zusammenfassung

Die Repression der Genexpression spielt eine wichtige Rolle in vielen Entwicklungsstadien und wird häufig über die Methylierung von Histonen vermittelt. Die H3K9-Trimethylierung ist dabei von großer Bedeutung in der Reprimierung von Chromatin und der Bildung von Heterochromatin, unter anderem durch die Rekrutierung von Heterochromatin Protein 1, welches eine stärkere Kondensierung und damit die Unzugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie nach sich zieht. Zusätzlich zu konstitutivem Heterochromatin kann die H3K9-Methylierung stadien- oder zelltypabhängig auch die Repression euchromatischer Bereiche bewirken. Eine Methyltransferase, welche dazu in der Lage ist, derartige H3K9-Markierungen zu erzeugen, ist Eggless, das Ortholog des humanen SETDB1-Proteins. Eggless ist zugleich die einzige in *Drosophila* essenzielle H3K9 spezifische Methyltransferase.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Windei, das *Drosophila*-Ortholog von mAM/ MCAF1, ein essenzieller Bindungspartner von Eggless in vivo ist. Dabei ist Windei unerlässlich für die bisher untersuchten Funktionen von Eggless. Windei und Eggless colokalisieren präzise in den Keimzellen von Ovarien und assoziieren in einem Proteinkomplex, wobei die Bindung über die coiled-coil-Domäne von Wde und eine kurze Region von Egg vermittelt wird, welche keine bekannten Proteinmotive besitzt. Zudem ist Windei in euchromatischen Regionen von Polytänychromosomen der Speicheldrüsen angereichert und ebenso am vierten Chromosom. Windei bindet an das Painting Of Fourth (POF)-Protein, welches das gesamte vierte Chromosom markiert. Ähnliches wurde für Eggless gezeigt, so dass die Vermutung nahe liegt, dass Windei und Eggless einen Komplex mit POF eingehen und so für die transkriptionelle Regulation der euchromatischen Bereiche in der heterochromatischen Umgebung dieses Autosoms verantwortlich sind.

Nullmutationen in *windei* sind letal und können durch ein Transgen, welches ein GFP-Windei-Fusionsprotein kodiert gänzlich gerettet werden. Zudem zeigen Keimbahnklone, welche mutant für *windei* sind, eine reduzierte H3K9-Trimethylierung in den Keimzellen der Germarien. In mutanten Eikammern arretiert die Oogenese vor Stadium 9-10 und diese degenerieren unter Ausbildung apoptotischer Merkmale. Überlebende homozygot mutante Weibchen sind steril und besitzen ähnlich rudimentäre Ovarien wie *eggless* mutante Fliegen. Da auch die Keimbahnklon-Phänotypen von *windei* und *eggless* identisch sind, ist es sehr wahrscheinlich, dass Windei ein essenzieller Bindungspartner von Eggless in der Trimethylierung von H3K9 in Keimbahnzellen ist, und damit in der Etablierung des

keimbahnspezifischen Chromatin-Zustands. In Anlehnung an publizierte Daten der Winderi- und Egless-Homologen ist davon auszugehen, dass Winderi ein essenzieller Cofaktor für die Konversion von Dimethyl-H3K9 zu Trimethyl-H3K9 durch Egless ist, um die transkriptionelle Repression von Chromatin zu gewährleisten.

## VI Literatur

- Aagaard, L., G. Laible, et al. (1999). "Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31." Embo J **18**(7): 1923-38.
- Ashburner, M. (1989). "*Drosophila: A Laboratory Handbook*". Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- Ashburner, M., Golic, K.G., et al. (2005). "*Drosophila A Laboratory Handbook*". Cold Spring Harbor, New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ayyanathan, K., M. S. Lechner, et al. (2003). "Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation." Genes Dev **17**(15): 1855-69.
- Badenhorst, P., J. T. Finch, et al. (2002). "Tramtrack co-operates to prevent inappropriate neural development in *Drosophila*." Mech Dev **117**(1-2): 87-101.
- Barigozzi, C., S. Dolfini, et al. (1966). "In vitro study of the DNA replication patterns of somatic chromosomes of *Drosophila melanogaster*." Exp Cell Res **43**(1): 231-4.
- Barr, M. L., D. H. Carr, et al. (1962). "The XXXXY sex chromosome abnormality." Can Med Assoc J **87**: 891-901.
- Bean, C. J., C. E. Schaner, et al. (2004). "Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in *Caenorhabditis elegans*." Nat Genet **36**(1): 100-5.
- Bellen, H. J., R. W. Levis, et al. (2004). "The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes." Genetics **167**(2): 761-81.
- Belyaeva, E. S., I. F. Zhimulev, et al. (1998). "Su(UR)ES: a gene suppressing DNA underreplication in intercalary and pericentric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7532-7.
- Bhaskar, V., S. A. Valentine, et al. (2000). "A functional interaction between dorsal and components of the Smt3 conjugation machinery." J Biol Chem **275**(6): 4033-40.
- Blackwell, T. K. (2004). "Germ cells: finding programs of mass repression." Curr Biol **14**(6): R229-30.
- Boggs, B. A., P. Cheung, et al. (2002). "Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes." Nat Genet **30**(1): 73-6.
- Brand, A. H. and N. Perrimon (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes." Development **118**(2): 401-15.
- Brockdorff, N., A. Ashworth, et al. (1991). "Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome." Nature **351**(6324): 329-31.

- Brown, C. J., B. D. Hendrich, et al. (1992). "The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus." Cell **71**(3): 527-42.
- Campbell, R. E., O. Tour, et al. (2002). "A monomeric red fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7877-82.
- Chen, A., H. Mannen, et al. (1998). "Characterization of mouse ubiquitin-like SMT3A and SMT3B cDNAs and gene/pseudogenes." Biochem Mol Biol Int **46**(6): 1161-74.
- Chen, D. and D. McKearin (2003). "Dpp signaling silences bam transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells." Curr Biol **13**(20): 1786-91.
- Clough, E., W. Moon, et al. (2007). "Histone methylation is required for oogenesis in Drosophila." Development **134**(1): 157-65.
- Corley, L. S. and M. D. Lavine (2006). "A review of insect stem cell types." Semin Cell Dev Biol **17**(4): 510-7.
- de Cuevas, M. and A. C. Spradling (1998). "Morphogenesis of the Drosophila fusome and its implications for oocyte specification." Development **125**(15): 2781-9.
- Decotto, E. and A. C. Spradling (2005). "The Drosophila ovarian and testis stem cell niches: similar somatic stem cells and signals." Dev Cell **9**(4): 501-10.
- Dej, K. J. and A. C. Spradling (1999). "The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during Drosophila oogenesis." Development **126**(2): 293-303.
- Dernburg, A. F., J. W. Sedat, et al. (1996). "Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation." Cell **86**(1): 135-46.
- Dodge, J. E., Y. K. Kang, et al. (2004). "Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development." Mol Cell Biol **24**(6): 2478-86.
- Ebert, A., G. Schotta, et al. (2004). "Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in Drosophila." Genes Dev **18**(23): 2973-83.
- Eissenberg, J. C., T. C. James, et al. (1990). "Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in Drosophila melanogaster." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9923-7.
- Eskeland, R., A. Eberharter, et al. (2007). "HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors." Mol Cell Biol **27**(2): 453-65.
- Extavour, C. G. and M. Akam (2003). "Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation." Development **130**(24): 5869-84.
- Fischle, W., Y. Wang, et al. (2003). "Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains." Genes Dev **17**(15): 1870-81.

- Fischle, W., B. S. Tseng, et al. (2005). "Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation." Nature **438**(7071): 1116-22.
- Franke, A. and B. S. Baker (1999). "The rox1 and rox2 RNAs are essential components of the compensasome, which mediates dosage compensation in *Drosophila*." Mol Cell **4**(1): 117-22.
- Fujita, N., S. Watanabe, et al. (2003). "MCAF mediates MBD1-dependent transcriptional repression." Mol Cell Biol **23**(8): 2834-43.
- Garcia-Cao, M., R. O'Sullivan, et al. (2004). "Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases." Nat Genet **36**(1): 94-9.
- Gartler, S. M. and A. D. Riggs (1983). "Mammalian X-chromosome inactivation." Annu Rev Genet **17**: 155-90.
- Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior (2007). "Concepts in sumoylation: a decade on." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 947-56.
- Gill, G. (2004). "SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?" Genes Dev **18**(17): 2046-59.
- Gill, G. (2005). "Something about SUMO inhibits transcription." Curr Opin Genet Dev **15**(5): 536-41.
- Godt, D. and U. Tepass (1998). "*Drosophila* oocyte localization is mediated by differential cadherin-based adhesion." Nature **395**(6700): 387-91.
- Golic, K.G. and S. Lindquist (1989). "The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome." Cell. **59**(3):499-509.
- Gonzalez-Reyes, A. and D. St Johnston (1998). "The *Drosophila* AP axis is polarised by the cadherin-mediated positioning of the oocyte." Development **125**(18): 3635-44.
- Greil, F., I. van der Kraan, et al. (2003). "Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location." Genes Dev **17**(22): 2825-38.
- Grieder, N. C., M. de Cuevas, et al. (2000). "The fusome organizes the microtubule network during oocyte differentiation in *Drosophila*." Development **127**(19): 4253-64.
- Guan, K., K. Nayernia, et al. (2006). "Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis." Nature **440**(7088): 1199-203.
- Guo, D., M. Li, et al. (2004). "A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes." Nat Genet. **36**(8):837-41.
- Guo, M., L. Y. Jan, et al. (1996). "Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch." Neuron **17**(1): 27-41.

- Haigh, A. J., W. A. MacDonald, et al. (2005). "The generation of cloned *Drosophila melanogaster*." Genetics **169**(2): 1165-7.
- Haigh, A. J. and V. K. Lloyd (2006). "Loss of genomic imprinting in *Drosophila* clones." Genome **49**(8): 1043-6.
- Haigh, A. J. and V. K. Lloyd (2007). "Why clone flies? Using cloned *Drosophila* to monitor epigenetic defects." Fly (Austin) **1**(1): 6-12.
- Hanania, U., N. Furman-Matarasso, et al. (1999). "Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death." Plant J **19**(5): 533-41.
- Hari, K. L., K. R. Cook, et al. (2001). "The *Drosophila* Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family." Genes Dev **15**(11): 1334-48.
- Harte, P. J., W. Wu, et al. (1999). "Assignment of a novel bifurcated SET domain gene, SETDB1, to human chromosome band 1q21 by in situ hybridization and radiation hybrids." Cytogenet Cell Genet **84**(1-2): 83-6.
- Hashiyama, K., S. Shigenobu, et al. (2008). "Expression of genes involved in sumoylation in the *Drosophila* germline." Gene Expr Patterns.
- Heard, E., C. Rougeulle, et al. (2001). "Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation." Cell **107**(6): 727-38.
- Henderson, D. S. (2004). "The chromosomes of *Drosophila melanogaster*." Methods Mol Biol **247**: 1-43.
- Higashimoto, K., T. Urano, et al. (2003). "Loss of CpG methylation is strongly correlated with loss of histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome." Am J Hum Genet **73**(4): 948-56.
- Hochman, B. (1976). "The fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*". In: The Genetics and Biology of *Drosophila*, eds. Ashburner, M. & E. Novitski. London: Academic Press, pp. 903-928.
- Huang, H. W., S. C. Tsoi, et al. (1998). "Identification and characterization of the SMT3 cDNA and gene encoding ubiquitin-like protein from *Drosophila melanogaster*." Biochem Mol Biol Int **46**(4): 775-85.
- Huisinga, K. L., B. Brower-Toland, et al. (2006). "The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing." Chromosoma **115**(2): 110-22.
- Humpherys, D., K. Eggan, et al. (2001). "Epigenetic instability in ES cells and cloned mice." Science **293**(5527): 95-7.
- Ichimura, T., S. Watanabe, et al. (2005). "Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins." J Biol Chem **280**(14): 13928-35.

- Ivanovska, I., T. Khandan, et al. (2005). "A histone code in meiosis: the histone kinase, NHK-1, is required for proper chromosomal architecture in *Drosophila* oocytes." Genes Dev **19**(21): 2571-82.
- Jackson, S. M. and K. Blochlinger (1997). "cut interacts with Notch and protein kinase A to regulate egg chamber formation and to maintain germline cyst integrity during *Drosophila* oogenesis." Development **124**(18): 3663-72.
- James, T. C. and S. C. Elgin (1986). "Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene." Mol Cell Biol **6**(11): 3862-72.
- Joanis, V. and V. K. Lloyd (2002). "Genomic imprinting in *Drosophila* is maintained by the products of Suppressor of variegation and trithorax group, but not Polycomb group, genes." Mol Genet Genomics **268**(1): 103-12.
- Johansson, A. M., P. Stenberg, et al. (2007). "Painting of fourth and chromosome-wide regulation of the 4th chromosome in *Drosophila melanogaster*." Embo J **26**(9): 2307-16.
- Kato, M., Y. Kato, et al. (2007). "Functional domain analysis of human HP1 isoforms in *Drosophila*." Cell Struct Funct **32**(1): 57-67.
- Kelly, W. G., C. E. Schaner, et al. (2002). "X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*." Development **129**(2): 479-92.
- Kim, J. B., H. Zaehres, et al. (2008). "Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors." Nature **454**(7204): 646-50.
- King, R. C. (1970). "The meiotic behavior of the *Drosophila* oocyte." Int Rev Cytol **28**: 125-68.
- King, R. C., S. F. Riley, et al. (1981). "Giant polytene chromosomes from the ovaries of a *Drosophila* mutant." Science **212**(4493): 441-3.
- Kornberg, R. D. and Y. Lorch (1999). "Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome." Cell **98**(3): 285-94.
- Krauss, V. (2007). "Glimpses of evolution: heterochromatic histone H3K9 methyltransferases left its marks behind." Genetica.
- Krivshenko, J. (1959). "New Evidence for the Homology of the Short Euchromatic Elements of the X and Y Chromosomes of *Drosophila Busckii* with the Microchromosome of *Drosophila Melanogaster*." Genetics **44**(6): 1027-40.
- Krivshenko, J. D. (1955). "A CYTOGENETIC STUDY OF THE X CHROMOSOME OF *Drosophila Busckii* AND ITS RELATION TO PHYLOGENY." Proc Natl Acad Sci U S A **41**(12): 1071-9.
- Krupp, J. J., L. E. Yaich, et al. (2005). "Identification of genetic loci that interact with cut during *Drosophila* wing-margin development." Genetics **170**(4): 1775-95.



- Lancaster, O. M., C. F. Cullen, et al. (2007). "NHK-1 phosphorylates BAF to allow karyosome formation in the *Drosophila* oocyte nucleus." J Cell Biol **179**(5): 817-24.
- Lapenta, V., P. Chiurazzi, et al. (1997). "SMT3A, a human homologue of the *S. cerevisiae* SMT3 gene, maps to chromosome 21qter and defines a novel gene family." Genomics **40**(2): 362-6.
- Larsson, J., J. D. Chen, et al. (2001). "Painting of fourth, a chromosome-specific protein in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6273-8.
- Larsson, J., M. J. Svensson, et al. (2004). "Painting of fourth in genus *Drosophila* suggests autosome-specific gene regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(26): 9728-33.
- Le, H. D., K. M. Donaldson, et al. (2004). "A high proportion of genes involved in position effect variegation also affect chromosome inheritance." Chromosoma **112**(6): 269-76.
- Lehembre, F., P. Badenhorst, et al. (2000). "Covalent modification of the transcriptional repressor tramtrack by the ubiquitin-related protein Smt3 in *Drosophila* flies." Mol Cell Biol **20**(3): 1072-82.
- Li, E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." Nat Rev Genet **3**(9): 662-73.
- Liu, J. L., M. Buszczak, et al. (2006). "Nuclear bodies in the *Drosophila* germinal vesicle." Chromosome Res **14**(4): 465-75.
- Liu, L. P., J. Q. Ni, et al. (2005). "Sex-specific role of *Drosophila melanogaster* HP1 in regulating chromatin structure and gene transcription." Nat Genet **37**(12): 1361-6.
- Lloyd, V. K., D. A. Sinclair, et al. (1999). "Genomic imprinting and position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*." Genetics **151**(4): 1503-16.
- Loh, Y. H., W. Zhang, et al. (2007). "Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells." Genes Dev **21**(20): 2545-57.
- Luger, K. and T. J. Richmond (1998). "The histone tails of the nucleosome." Curr Opin Genet Dev **8**(2): 140-6.
- Maherali, N., R. Sridharan, et al. (2007). "Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution." Cell Stem Cell **1**(1): 55-70.
- Mal'ceva, N. I. and I. F. Zhimulev (1993). "Extent of polytene in the pericentric heterochromatin of polytene chromosomes of pseudonurse cells of otu (ovarian tumor) mutants of *Drosophila melanogaster*." Mol Gen Genet **240**(2): 273-6.
- Mannen, H., H. M. Tseng, et al. (1996). "Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene." Biochem Biophys Res Commun **222**(1): 178-80.
- Margolis, J. and A. Spradling (1995). "Identification and behavior of epithelial stem cells in the *Drosophila* ovary." Development **121**(11): 3797-807.

- McKearin, D. M. and A. C. Spradling (1990). "bag-of-marbles: a *Drosophila* gene required to initiate both male and female gametogenesis." Genes Dev **4**(12B): 2242-51.
- McLaren, A. (2003). "Primordial germ cells in the mouse." Dev Biol **262**(1): 1-15.
- Melchior, F. (2000). "SUMO--nonclassical ubiquitin." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 591-626.
- Meller, V. H. and B. P. Rattner (2002). "The roX genes encode redundant male-specific lethal transcripts required for targeting of the MSL complex." Embo J **21**(5): 1084-91.
- Mello, C. C., B. W. Draper, et al. (1992). "The pie-1 and mex-1 genes and maternal control of blastomere identity in early *C. elegans* embryos." Cell **70**(1): 163-76.
- Mello, C. C., C. Schubert, et al. (1996). "The PIE-1 protein and germline specification in *C. elegans* embryos." Nature **382**(6593): 710-2.
- Mellone, B. G., L. Ball, et al. (2003). "Centromere silencing and function in fission yeast is governed by the amino terminus of histone H3." Curr Biol **13**(20): 1748-57.
- Meluh, P. B. and D. Koshland (1995). "Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C." Mol Biol Cell **6**(7): 793-807.
- Minc, E., J. C. Courvalin, et al. (2000). "HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes." Cytogenet Cell Genet **90**(3-4): 279-84.
- Minty, A., X. Dumont, et al. (2000). "Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif." J Biol Chem **275**(46): 36316-23.
- Mis, J., S. S. Ner, et al. (2006). "Identification of three histone methyltransferases in *Drosophila*: dG9a is a suppressor of PEV and is required for gene silencing." Mol Genet Genomics **275**(6): 513-26.
- Morishima, A., M. M. Grumbach, et al. (1962). "Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 756-63.
- Muller, H. (1930) "Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*". J Genet. **22**, 299 - 334.
- Muller, H.J. (1940) in "The New Systematics", ed. Huxley, J. (Clarendon, Oxford), pp. 185-268.
- Naumann, K., A. Fischer, et al. (2005). "Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*." Embo J **24**(7): 1418-29.
- Niki, Y., T. Yamaguchi, et al. (2006). "Establishment of stable cell lines of *Drosophila* germline stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(44): 16325-30.

- Nystul, T. and A. Spradling (2007). "An epithelial niche in the Drosophila ovary undergoes long-range stem cell replacement." Cell Stem Cell **1**(3): 277-85.
- O'Carroll, D., H. Scherthan, et al. (2000). "Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression." Mol Cell Biol **20**(24): 9423-33.
- Ohinata, Y., Y. Seki, et al. (2006). "Germline recruitment in mice: a genetic program for epigenetic reprogramming." Ernst Schering Res Found Workshop(60): 143-74.
- Okita, K., T. Ichisaka, et al. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." Nature **448**(7151): 313-7.
- Page, S. L. and R. S. Hawley (2004). "The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 525-58.
- Parks, A. L., K. R. Cook, et al. (2004). "Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the Drosophila melanogaster genome." Nat Genet **36**(3): 288-92.
- Peters, A. H., D. O'Carroll, et al. (2001). "Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability." Cell **107**(3): 323-37.
- Peters, A. H., J. E. Mermoud, et al. (2002). "Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin." Nat Genet **30**(1): 77-80.
- Peters, A. H., S. Kubicek, et al. (2003). "Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin." Mol Cell **12**(6): 1577-89.
- Rea, S., F. Eisenhaber, et al. (2000). "Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases." Nature **406**(6796): 593-9.
- Reuter, G. and I. Wolff (1981). "Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in Drosophila melanogaster." Mol Gen Genet **182**(3): 516-9.
- Rice, J. C., S. D. Briggs, et al. (2003). "Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains." Mol Cell **12**(6): 1591-8.
- Rodriguez, M. S., C. Dargemont, et al. (2001). "SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting." J Biol Chem **276**(16): 12654-9.
- Rorth, P. (1996). "A modular misexpression screen in Drosophila detecting tissue-specific phenotypes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12418-22.
- Rosendorff, A., S. Sakakibara, et al. (2006). "NXP-2 association with SUMO-2 depends on lysines required for transcriptional repression." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(14): 5308-13.
- Ryu, H., J. Lee, et al. (2006). "ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19176-81.
- Sampath, S. C., I. Marazzi, et al. (2007). "Methylation of a histone mimic within the histone methyltransferase G9a regulates protein complex assembly." Mol Cell **27**(4): 596-608.

- Sandler, L. & E. Novitski (1956). Genetics **45**, 189-193
- Sandler, L. and P. Szauter (1978). "The effect of recombination-defective meiotic mutants on fourth-chromosome crossing over in *Drosophila melanogaster*." Genetics **90**(4): 699-712.
- Savare, J., N. Bonneaud, et al. (2005). "SUMO represses transcriptional activity of the *Drosophila* SoxNeuro and human Sox3 central nervous system-specific transcription factors." Mol Biol Cell **16**(6): 2660-9.
- Schaner, C. E., G. Deshpande, et al. (2003). "A conserved chromatin architecture marks and maintains the restricted germ cell lineage in worms and flies." Dev Cell **5**(5): 747-57.
- Schaner, C. E. and W. G. Kelly (2006). "Germline chromatin." WormBook: 1-14.
- Schotta, G., A. Ebert, et al. (2002). "Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing." Embo J **21**(5): 1121-31.
- Schultz, D. C., K. Ayyanathan, et al. (2002). "SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins." Genes Dev **16**(8): 919-32.
- Seki, Y., M. Yamaji, et al. (2007). "Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice." Development **134**(14): 2627-38.
- Seum, C., E. Reo, et al. (2007). "*Drosophila* SETDB1 is required for chromosome 4 silencing." PLoS Genet **3**(5): e76.
- Seum, C., S. Bontron, et al. (2007) b. "*Drosophila* G9a is a nonessential gene." Genetics **177**(3): 1955-7.
- Seydoux, G., C. C. Mello, et al. (1996). "Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*." Nature **382**(6593): 713-6.
- Seydoux, G. and M. A. Dunn (1997). "Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*." Development **124**(11): 2191-201.
- Seydoux, G. and R. E. Braun (2006). "Pathway to totipotency: lessons from germ cells." Cell **127**(5): 891-904.
- Shigenobu, S., Y. Kitadate, et al. (2006). "Molecular characterization of embryonic gonads by gene expression profiling in *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13728-33.
- Smith, E. R., A. Pannuti, et al. (2000). "The *drosophila* MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation." Mol Cell Biol **20**(1): 312-8.
- Smothers, J. F. and S. Henikoff (2001). "The hinge and chromo shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins." Mol Cell Biol **21**(7): 2555-69.

- Stabell, M., M. Bjorkmo, et al. (2006). "The Drosophila SET domain encoding gene dEset is essential for proper development." Hereditas **143**(2006): 177-88.
- Stabell, M., R. Eskeland, et al. (2006). "The Drosophila G9a gene encodes a multi-catalytic histone methyltransferase required for normal development." Nucleic Acids Res **34**(16): 4609-21.
- Stielow, B., A. Sapetschnig, et al. (2008). "SUMO-modified Sp3 represses transcription by provoking local heterochromatic gene silencing." EMBO Rep **9**(9): 899-906.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-5.
- Stuckenholz, C., Y. Kageyama, et al. (1999). "Guilt by association: non-coding RNAs, chromosome-specific proteins and dosage compensation in Drosophila." Trends Genet **15**(11): 454-8.
- Su, T. T., S. D. Campbell, et al. (1998). "The cell cycle program in germ cells of the Drosophila embryo." Dev Biol **196**(2): 160-70.
- Surani, M. A. (2001). "Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance." Nature **414**(6859): 122-8.
- Tachibana, M., M. Nozaki, et al. (2007). "Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression." Embo J **26**(14): 3346-59.
- Tachibana, M., K. Sugimoto, et al. (2001). "Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3." J Biol Chem **276**(27): 25309-17.
- Tachibana, M., K. Sugimoto, et al. (2002). "G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis." Genes Dev **16**(14): 1779-91.
- Tachibana, M., J. Ueda, et al. (2005). "Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9." Genes Dev **19**(7): 815-26.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-72.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-76.
- Talamillo, A., J. Sanchez, et al. (2008). "Smt3 is required for Drosophila melanogaster metamorphosis." Development **135**(9): 1659-68.
- Theurkauf, W. E., B. M. Alberts, et al. (1993). "A central role for microtubules in the differentiation of Drosophila oocytes." Development **118**(4): 1169-80.

- Tschiersch, B., A. Hofmann, et al. (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**(16): 3822-31.
- Tsuda, M., Y. Sasaoka, et al. (2003). "Conserved role of nanos proteins in germ cell development." Science **301**(5637): 1239-41.
- Tzeng, T. Y., C. H. Lee, et al. (2007). "Epigenetic regulation of the *Drosophila* chromosome 4 by the histone H3K9 methyltransferase dSETDB1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12691-6.
- Uchimura, Y., T. Ichimura, et al. (2006). "Involvement of SUMO modification in MBD1- and MCAF1-mediated heterochromatin formation." J Biol Chem **281**(32): 23180-90.
- Urata, Y., S. J. Parmelee, et al. (1995). "A three-dimensional structural dissection of *Drosophila* polytene chromosomes." J Cell Biol **131**(2): 279-95.
- Verschure, P. J., I. van der Kraan, et al. (2005). "In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation." Mol Cell Biol **25**(11): 4552-64.
- Vierstra, R. D. and J. Callis (1999). "Polypeptide tags, ubiquitous modifiers for plant protein regulation." Plant Mol Biol **41**(4): 435-42.
- Wakimoto, B. T. (1998). "Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*." Cell **93**(3): 321-4.
- Wang, H., W. An, et al. (2003). "mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression." Mol Cell **12**(2): 475-87.
- Wernig, M., A. Meissner, et al. (2007). "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state." Nature **448**(7151): 318-24.
- Whetstine, J. R., A. Nottke, et al. (2006). "Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases." Cell **125**(3): 467-81.
- Williamson, A. and R. Lehmann (1996). "Germ cell development in *Drosophila*." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 365-91.
- Wobus, A. M. and P. Loser (2008). "[Human embryonic stem cells within the context of international research activity]." Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz **51**(9): 994-1004.
- Wodarz, A., A. Ramrath, et al. (1999). "Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts". Nature **402**: 544-547
- Wustmann, G., J. Szidonya, et al. (1989). "The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*." Mol Gen Genet **217**(2-3): 520-7.
- Wylie, C. (1999). "Germ cells." Cell **96**(2): 165-74.

- Xiao, B., C. Jing, et al. (2003). "Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9." Nature **421**(6923): 652-6.
- Xiao, B., J. R. Wilson, et al. (2003). "SET domains and histone methylation." Curr Opin Struct Biol **13**(6): 699-705.
- Xie, T. and A. C. Spradling (1998). "decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the Drosophila ovary." Cell **94**(2): 251-60.
- Xie, T. and A. C. Spradling (2000). "A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary." Science **290**(5490): 328-30.
- Yabuta, Y., K. Kurimoto, et al. (2006). "Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling." Biol Reprod **75**(5): 705-16.
- Yamane, K., C. Toumazou, et al. (2006). "JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor." Cell **125**(3): 483-95.
- Yang, L., L. Xia, et al. (2002). "Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor." Oncogene **21**(1): 148-52.
- Yoon, J., K. S. Lee, et al. (2008). "dSETDB1 and SU(VAR)3-9 sequentially function during germline-stem cell differentiation in Drosophila melanogaster." PLoS ONE **3**(5): e2234.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-20.
- Zhang, X., Z. Yang, et al. (2003). "Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases." Mol Cell **12**(1): 177-85.
- Zhao, T., T. Heyduk, et al. (2000). "Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro." J Biol Chem **275**(36): 28332-8.
- Zheng, Y. G., J. Wu, et al. (2008). "Chemical regulation of epigenetic modifications: opportunities for new cancer therapy." Med Res Rev **28**(5): 645-87.

## Abkürzungsverzeichnis:

$\alpha$ -...	anti-...
AK	Antikörper
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	kodierende DNS
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
g	Gramm
h	Stunden
kB	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB-Medium	Luria Bertani Broth-Medium
m...	milli... ( $10^{-3}$ )
M	Molarität (mol/l)
min	Minuten
$\mu$ ...	mikro... ( $10^{-6}$ )
mRNA	messenger-RNA
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
U	Unit
UV-Licht	ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
V	Volt
$E_{260}$	Extinktion bei 260 nm



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Carmen Maike Koch  
Geburtsdatum: 18.01.1978  
Geburtsort: Mönchengladbach  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

---

1984 – 1988 Katholische Grundschule Mönchengladbach-Venn  
1989 – 1997 Gymnasium Am Geroweier, Mönchengladbach  
Juni 1997 Abitur

### Hochschulausbildung

---

04/1998 – 09/1998 Studium Anglistik/ Romanistik Sekundarstufe II an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
10/1998 – 02/2005 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
02-03/2004 Diplomprüfung  
04/2004 – 02/2005 Anfertigung der Diplomarbeit im Institut für Genetik, in der  
Arbeitsgruppe von Professor Andreas Wodarz

### Promotion

---

03/2005 - 01/2009 Promotion in der Abteilung Stammzellbiologie,  
Georg-August-Universität Göttingen in der Arbeitsgruppe von  
Professor Dr. Andreas Wodarz