

**"Das unbekannte Chromatin? – Analysen zur
epigenetischen Regulation in Keimbahnzellen von
Drosophila melanogaster"**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem

**Institut für Biologie
der Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von

Frau Sandy Mietzsch
geb.am 04.10.1978 in Wolfen

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Gunter Reuter
2. Prof. Dr. Peter Becker
3. Prof. Dr. Klaus Humbeck

Halle (Saale), den 12.12.2012

Abkürzungsverzeichnis

ac	Acetylierung
AEL	<i>after egg laying</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CB	Cystoblast
CC	<i>Cap cells, Cap- Zelle</i>
cDNA	doppelsträngige DNA- Kopie der mRNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CID	<i>centromere identifier</i>
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EMS	Ethylmethansulfonat
ESC	<i>escort stem cell</i>
EU	Euchromatin
<i>E(var)</i>	<i>Enhancer of Variegation</i>
E8.0	<i>embryonic day 8 of mouse development</i>
FC	<i>follicle cell</i>
for	<i>forward</i>
FSC	<i>follicle stem cell</i>
GAM	<i>goat anti mouse</i>
GAR	<i>goat anti rabbit</i>
GSC	<i>ovarian germ line stem cell</i>
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HET	Heterochromatin
H3K4	Lysin 4 von Histon H3
H3K9	Lysin 9 von Histon H3
H3K27	Lysin 27 von Histon H3
H3K36	Lysin 36 von Histon H3
IGS	<i>inner germarial sheath cells</i>
KMTase	Histonmethyltransferase
kb	Kilobasen
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
me	Methylierung
me1 (2, 3)	Mono- (Di-, Tri-) Methylierung
NC	<i>nurse cell, Nährzelle</i>
NP40	Nonidet P40
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate Buffered Saline + 0.2% Tween 20</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEV	Positioneffekt-Variegation

PGC	<i>primordial germ line stem cell</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
qPCR	quantitative PCR
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SET	<i>Su(var)3-9 / Enhancer of zeste / trithorax</i>
SGPs	<i>somatic gonadal precursors</i>
shmiRNA	<i>small hairpin microRNA</i>
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
SSC	<i>somatic stem cell</i>
<i>Su(var)</i>	<i>Suppressor of Variegation</i>
TF	<i>terminal filament cells</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	9
<i>Genetische Methoden</i>		
2.1	Anzucht und Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	9
2.2	Verwendete Stämme und Stabilisierungschromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>	9
2.3	P-Element vermittelte Keimbahntransformation von <i>Drosophila melanogaster</i>	10
2.4	Kreuzungsexperimente.....	11
<i>Molekularbiologische Methoden</i>		
2.5	Molekularbiologische Standardmethoden.....	13
2.5.1	Isolation genomischer DNA.....	13
2.5.2	<i>Single-Fly</i> DNA- Präparation.....	14
2.5.3	Isolation von RNA.....	14
2.6	Reverse Transkription.....	14
2.7	Inverse PCR und Sequenzierung von P-Element Insertionen.....	14
2.8	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	15
2.8.1	Verwendete Bakterienstämme und Vektoren.....	15
2.9	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	15
2.9.1	ChIP an adulten Fliegen.....	15
2.9.2	ChIP an Embryonen.....	16
2.9.3	Keimbahn-ChIP an Embryonen.....	17
<i>Immunzytologische Methoden</i>		
2.10	Fluoreszenz- <i>in situ</i> - Hybridisierung (FISH) an polytären Speichel- drüsenchromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>	18
2.10.1	Präparation der Speicheldrüsenchromosomen von <i>Drosophila melanogaster</i>	18
2.10.2	Fluoreszenz- <i>in situ</i> - Hybridisierung (FISH).....	18
2.11	Fluoreszenz- <i>in situ</i> - Hybridisierung (FISH) an Embryonen von <i>Drosophila melanogaster</i>	19
2.11.1	Präparation der Embryonen von <i>Drosophila melanogaster</i>	19
2.11.2	Fluoreszenz- <i>in situ</i> - Hybridisierung (FISH).....	19

2.12	Immunmarkierung von Embryonen.....	19
2.13	Immunmarkierung von Ovarien.....	20
2.13.1	Präparation von Ovarien	20
2.14	<i>SPURR</i> - Einbettung von Ovarien zur elektronenmikroskopischen Analyse	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Immunzytologische Analyse des Keimbahn- Chromatins.....	22
3.1.1	Das Chromatin der primordialen Keimbahnzellen zeigt eine apiko- basale Organisation.....	23
3.1.2	Histonmodifizierungen in primordialen Keimbahnzellen unterscheiden sich signifikant von denen der somatischen Blastodermzellen	26
3.1.3	In primordialen Keimbahnzellen werden keine Chromozentren gebildet.....	33
3.1.4	Der Chromatinaufbau ovarialer Keimbahnstammzellen (GSC) zeigt wenige Unterschiede zu dem der PGC	35
3.1.5	Die KMTasen SU(VAR)3-9 und dSETDB1 kontrollieren entwicklungspezifisch die H3K9 Methylierung in somatischen und Keimbahnzellen	41
3.1.6	Ecdyson- <i>Signaling</i> und Chromatindifferenzierung in der weiblichen Keimbahn von <i>Drosophila</i>	48
3.1.7	E(Z), HP1 und dSETDB1 sind essentiell für eine normale Keimbahnentwicklung.....	54
3.2	Genetische Analyse der Chromatinstruktur der weiblichen Keimbahn.....	65
3.2.1	Das <i>fs(1)K10</i> PEV- System.....	65
3.2.2	Genetische Analyse bekannter Chromatinfaktoren auf ihre Wirkung in der Keimbahn mit Hilfe des <i>K10</i> PEV- Systems.....	70
3.2.3	Untersuchungen zur möglichen Rolle von <i>Transvection</i> beim Gen- <i>Silencing</i> in der Keimbahn.....	78
3.3	ChIP- Analysen in primordialen Keimbahnzellen (PGC)	83
3.3.1	Etablierung eines Systems zur spezifischen Isolierung von Chromatin aus PGC	83
3.3.2	Analyse des Keimbahn- Chromatins aus PGC	86
4	Diskussion	89
4.1	Das Chromatin der PGC ist in der Rab1- Konfiguration angeordnet.....	89

4.2	Histonmodifizierungen und deren epigenetische Kontrolle in primordialis Keimbahnzellen (PGC)	91
4.2.1	Die H3K9 Methylierung wird in PGC durch SU(VAR)3-9 und dSETDB1 kontrolliert.....	92
4.2.2	Die Rolle von Ecdyson- <i>Signaling</i> in PGC.....	94
4.3	Das Chromatin in ovarialen Stammzellen (GSC) zeigt Unterschiede zu den PGC und wird anders kontrolliert	95
4.3.1	SU(VAR)3-9 und nicht dSETDB1 kontrolliert die H3K9 Dimethylierung in den GSC.....	97
4.3.2	Der Einfluss von Ecdyson- <i>Signaling</i> auf die Oogenese	99
4.4	E(Z), HP1 und dSETDB1 sind essentiell für die Keimbahnentwicklung in <i>Drosophila</i>	101
4.5	In der Keimbahn existieren viele verschiedene Wege zur Bildung epigenetisch inaktiver Chromatinstrukturen.....	103
4.5.1	Spielen <i>Transvection</i> - Prozesse eine Rolle im Gen- <i>Silencing</i> in der Keimbahn?.....	106
5	Zusammenfassung	109
6	Literaturverzeichnis	111
7	Anhang	
7.1	Transgene Linien	A1
7.2	Verwendete Primer	A1
7.3	<i>fs(1)K10</i> Insertionslinien.....	A3
7.4	Zählungen von <i>fs(1)K10</i> Insertionslinien mit starker Variegation	A8

1 Einleitung

Bereits im späten 19. Jahrhundert wurde erstmals bei tierischen Lebewesen eine Trennung in Soma und Keimbahn beschrieben. 1893 veröffentlichte August Weismann seine Keimplasma- Theorie, laut der die Vererbung allein durch Keimbahn-Zellen und nicht durch somatische Zellen erfolgt (Weismann 1893). Die genetische Information kann nicht von somatischen Zellen an Keimbahnzellen übertragen und von dort an die nächste Generation weitergegeben werden. Diese Zellen werden weder durch Umwelteinflüsse, noch durch morphologische Veränderungen, die während der Lebensdauer eines Organismus stattfinden, beeinflusst, was auch heute noch als sog. Weismann-Barriere bezeichnet wird.

Die Keimbahn stellt bei Tieren die Abfolge von Zellen dar, die, beginnend mit der befruchteten Eizelle (Zygote), im Laufe der Individualentwicklung zur Bildung der Keimdrüsen und Keimzellen (Eizellen und Spermien) führt. Kommt es zu Mutationen in der Keimbahn, so werden diese, im Gegensatz zu somatischen Mutationen, an die Nachkommen weitergegeben. Diese Mutationen spielen auch im Rahmen der Evolutionstheorie eine große Rolle.

Keimbahnzellen werden häufig während der Entwicklung deutlich von den somatischen Zellen abgegrenzt. Dieser Prozess ist in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Mus musculus* besonders gut untersucht (Hayashi et al., 2004; Cinalli et al., 2008; Rangan et al., 2008; Surani et al., 2008). Bei einigen Modellorganismen, wie *C. elegans*, *D. melanogaster* und *X. laevis* entwickeln sich die Keimbahnzellen im Keim- oder Polplasma, das einen Bereich im Zytoplasma darstellt, der bestimmte Faktoren für die Entwicklung der Keimzelllinie beinhaltet (Heasman 1984; Ikenishi 1998; Hubbard 2005; Seydoux und Braun 2006). Das Keimplasma ist auf einige wenige Zellen des Embryos beschränkt. Während der Entwicklung differenzieren sich diese Zellen zu primordialen Keimbahnstammzellen (PGC), die an die Stelle wandern, an der die Gonaden gebildet werden und formen so die Keimbahn des tierischen Organismus. Pflanzen hingegen besitzen keine präformierte Keimbahnzelllinie.

Im Detail wurde das Keimplasma bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* untersucht. Es befindet sich am posterioren Pol des Embryos und enthält spezifische Faktoren, durch die ein Mikroklima geschaffen wird, in dem sich die Vorläufer der primordialen Keimbahnstammzellen (PGC oder Polzellen) entwickeln können. Bei diesen spezifischen Faktoren handelt es sich um maternal geladene mRNA und Proteine unter anderem von Genen der posterioren Gruppe wie *oskar*, *nanos*, *tudor*, *vasa*, *valois*, *cappuccino*, *spire* und *mago nashi* (Boswell und Mahowald 1985; Lehmann und Nüsslein-Volhard 1986; Schüpbach und Wieschaus 1986; Manseau und Schüpbach 1989; Boswell et al., 1991). Mutationen in diesen Genen führen dazu, dass der Organismus keine Polzellen bilden kann oder diese in Apoptose gehen, was zur Sterilität in den Adulten und dem sog. *grandchildless*-Phänotyp führt. Andere Faktoren des Polplasmas sind RNAs der Gene *cyclinB*, *orb*, *germ cell less (gcl)*, *hsp83* und *Polar granule component (Pgc)* (Raff et al., 1990; Lantz et al., 1992; Jongens et al., 1994; Ding et al., 1993; Nakamura et al., 1996) sowie ribosomale RNA der Mitochondrien.

Von den Bestandteilen des Keimplasmas spielen *oskar*, *nanos* und *germcell-less (gcl)* eine besonders wichtige Rolle. *Oskar* wird benötigt, um andere Proteine und RNAs zu rekrutieren und so ein funktionelles Keimplasma zu bilden. *Nanos* verhindert, dass Mitose und eine somatische Differenzierung der Polzellen stattfindet, indem es die Translation maternaler RNAs unterdrückt, die NREs (*Nos response elements*) enthalten. Die Unterdrückung der Translation von Cyclin B mRNA ist für die mitotische *Quiescence* während der Wanderung unbedingt erforderlich (Asaoka-Taguchi et al., 1999). Der Verlust von Nanos führt zur Apoptose der PGC während ihrer Wanderung (Starz-Gaiano und Lehmann 2001; Hayashi et al., 2004). *Germcell-less*, wird für die Polzellbildung selbst benötigt (Lehmann und Nüsslein-Volhard 1991; Barker et al., 1992; Kobayashi et al., 1996; Lin und Spradling 1997).

Es konnte aber auch gezeigt werden, daß bei *Drosophila* epigenetische Prozesse an der sog. *Quiescence*, der transkriptionellen Stilllegung der Gene, in Keimbahnzellen beteiligt sind (Strome und Lehmann 2007; Rudolph et al., 2007).

Im Gegensatz zu *Drosophila* führt bei *C. elegans* ein Zusammenspiel von PIE-1 und der nichtkodierenden mRNA *Polar granule component (Pgc)* zur Blockierung der Phosphorylierung und somit der Deaktivierung der RNA-Polymerase II, was eine Herunterregulierung der Transkription in den primordialen Keimbahnzellen zur Folge hat (Seydoux und Dunn 1997; Asaoka-Taguchi et al., 1999; Blackwell 2004; Seydoux

und Braun 2006; Nakamura und Seydoux 2008). Dieser PIE-1 abhängige Prozeß scheint jedoch auf Nematoden beschränkt zu sein, da keine Orthologen von PIE-1 in anderen Organismen bekannt sind (Schaner und Kelly 2006).

Da die Keimzellen bei *Drosophila* am posterioren Pol gebildet werden, müssen sie im Laufe der weiteren Embryonalentwicklung in die unmittelbare Nähe der somatischen gonadalen Vorläuferzellen (SGPs) gebracht werden, um mit diesen die Gonaden zu bilden (Boyle und DiNardo 1995; Jaglarz und Howard 1995; Boyle et al., 1997; Moore et al., 1998). Die erste Phase der Migration ist passiv, da die ca. 50 Polzellen vom sich einstülpenden Mitteldarm umhüllt werden. Die aktive Wanderung erfolgt hingegen durch Anziehung und Abstoßung. So spielen die Gene *tre-1* (*trapped in endoderm-1*), das einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor kodiert und *rho1*, eine kleine GTPase, eine sehr wichtige Rolle bei der aktiven Wanderung durch die Darmwand des Mitteldarms ins Hämocoel (Kunwar et al., 2003, 2006). Die Expression von *wunen* und *wunen2*, die für Lipidphosphatasen kodieren, ist wichtig für die aktive Fortbewegung durch Abstoßung und das Überleben der PGC während der Wanderung (Sano et al., 2005). Durch die Aktivierung von *columbus* und *hedgehog* migrieren die PGC zu den mesodermalen Vorläufern der Gonaden und bilden später mit ihnen die Gonaden des Embryos (Kunwar et al., 2006). Durch die Verhinderung der *hid* mRNA Translation und der Beschränkung der *skl* Expression auf die Polzellen, reprimiert Nanos während der gesamten Wanderung die *hid/skl* abhängige Apoptose (Sato et al., 2007).

Selbst bei einer Injektion der primordialen Keimbahnzellen in den apikalen Pol sind diese in der Lage, korrekt zu wandern (Illmensee und Mahowald 1974).

Obwohl die Organismen in ihrer anatomischen Struktur mehr oder weniger stark voneinander abweichen, scheint sowohl die Art der Keimzellbildung, als auch die Wanderung der primordialen Keimbahnzellen konserviert zu sein (Kunwar et al., 2006). Beim Zebrafisch spielt die Signaltransduktion über die zwei CXCR4 (*CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4*) Transmembran-Rezeptorproteine, die von den PGC selbst exprimiert werden, und deren Ligand Sdf1 (*Stromal cell-derived factor 1*) eine wichtige Rolle bei der Migration der Keimbahnzellen (Doitsidou et al., 2002; Knaut et al., 2003). Auch bei Amphibien gibt es Anzeichen, dass ein CXCR4/Sdf1 System existiert. Die Wanderung zu den mesodermalen Vorläufern wird von Fibronectin unterstützt, das sich auf der extrazellulären Matrix befindet (Rais et al., 1981; Horvay et al., 2006; Takeuchi et al., 2010). Bei den Vögeln besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass das CXCR4/Sdf1 System genutzt wird. Die aus dem Epiblasten entstehenden primordialen

Keimbahnzellen wandern zum Keimstreif und nutzen dann die Blutgefäße, um zu den Gonaden zu gelangen (Stebler et al., 2004).

Die Säugetiere unterscheiden sich im Bezug auf die Bildung der Keimzellen stark von den eben genannten Organismen, da sie kein Keim- oder Polplasma bilden. Es gibt vielmehr Hinweise, dass die Spezifizierung der Keimzellen durch Induktion erfolgt. Bei der Maus erfolgt diese Induktion über einen BMP4 und 8 (*Bone Morphogenetic Protein 4 und 8*) und Smad1/5 abhängigen Weg, bei dem die Signale vom sich außerhalb des Embryos befindlichen Ektoderm die Expression von *fragilis* aktivieren (Hayashi et al., 2007). Diese Expression führt dazu, dass sich die Zellen zu primordialen Keimbahnzellen entwickeln und an der posterioren Seite der Genitalleiste akkumulieren. Neben *stella* wird auch *Blimp1*, ein genereller Repressor der Transkription exprimiert, der mit Prdm1 interagiert (Ancelin et al., 2006). Auch wenn sich die Bildung stark unterscheidet, ist die Migration dieser Zellen ähnlich den Amphibien. Neben dem CXCR4/Sdf1 System und Fibronectin spielt auch die Ausbildung von Filopodien bei der Wanderung eine große Rolle (Ara et al., 2003; Molyneaux et al., 2003). Die Analyse der Migration der PGC in verschiedenen Organismen konnte zeigen, dass diese Zellen mit Hilfe von Signalen, die die somatischen Zellen entlang ihres Weges abgeben, zu ihrem Bestimmungsort geleitet werden (Wylie 1999; Starz-Gaiano und Lehmann 2001).

Bei *Drosophila* bilden nach der Wanderung ca. 12 PGC zusammen mit den gonadalen Vorläuferzellen die Gonaden (Poirie et al., 1995). Die primordialen Keimbahnzellen teilen sich während der larvalen Entwicklung mehrmals, sodass sich bei den Weibchen in jedem Ovarium 60-110 PGC befinden (King 1970; Zhu und Xie 2003), die ihren potentiellen Stammzellcharakter bis zum Ende des 3. Larvenstadiums behalten. Von den 4 bis 7 PGC, die in jeder der 16 larvalen Ovariolen lokalisiert sind, entwickeln sich beim Übergang vom Larven- zum Puppenstadium 2 bis 3 zu adulten Keimbahnstammzellen (GSC). Dieser Prozess ist stark von der Interaktion mit benachbarten somatischen Zellen in den embryonalen bzw. larvalen Gonaden abhängig (Asaoka und Lin, 2004). Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen somatischen Zellen um Vorläufer der Nischenzellen im Germarium der adulten Weibchen, die sich ebenfalls im 3. Larvenstadium parallel zu den GSC differenzieren (Godt und Laski 1995; Song et al., 2002; Zhu und Xie 2003). Im Germarium spielen die Nischenzellen eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters der GSC

und auch deren Differenzierung (Xie und Spradling 1998, 2000; Gilboa und Lehmann 2004).

Obwohl die Bildung der Polzellen und deren Wanderung in *Drosophila* sehr gut untersucht sind, ist relativ wenig über die Chromatinstruktur und die Funktionen von Chromatin-Modifikatoren in diesen Zellen bekannt. Im Gegensatz dazu ist das Chromatin der Somazellen sehr gut untersucht. Chromatin, die Organisation der DNA in eukaryotischen Zellen, stellt einen Komplex aus DNA, RNA, Histonen und Nicht-Histon-Proteinen dar. Die N-terminalen Enden der evolutionär hochkonservierten Histone können posttranslational enzymatisch durch beispielsweise Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung modifiziert werden (Strahl und Allis 2000), wodurch die Bindung zwischen DNA und Histonen verstärkt oder geschwächt wird. Abhängig davon lassen sich die zwei Chromatinzustände unterscheiden, die Heitz bereits 1929 für den Interphasekern beschrieb (Heitz 1929). Man unterscheidet das stark kondensierte, transkriptionell inaktive Heterochromatin und das aufgelockerte, transkriptionell aktive Euchromatin. Das Heterochromatin, das sehr früh in der Embryonalentwicklung etabliert und in darauf folgenden Entwicklungsstadien aufrechterhalten wird (Rudolph et al., 2007), ist reich an mittel- und hochrepetitiven Sequenzen und macht ca. ein Drittel des *Drosophila*-Genoms aus (Hilliker et al., 1993). Welche molekularen Signalprozesse allerdings an der Initiation der Differenzierung von Eu- und Heterochromatin in der frühen Embryogenese beteiligt sind, ist weitestgehend unbekannt. Mit Hilfe des *In(1)w^{m4} Rearrangements*, bei dem das *white*-Gen in die Nähe des Heterochromatins gebracht und variabel inaktiviert wird, woraus ein Mosaik-Augenphänotyp (*white-mottled*; Muller 1930) resultiert, konnten einige wichtige Chromatin-Faktoren des Soma-Chromatins identifiziert werden. Dazu zählen beispielsweise die Heterochromatin-assoziierten Proteine SU(VAR)3-9 und SU(VAR)2-5 [HP1] sowie SU(VAR)3-3 [dLSD 1] und E(VAR)26B2 [LID] (Eissenberg et al., 1992; Tschiersch et al., 1994; Rudolph et al., 2007; Baisch 2010). Die Grundlage der Positionseffekt-Variegations (PEV)-Systeme ist die inhibierende Wirkung des Heterochromatins auf die Transkription benachbarter Gene. Die heterochromatische Inaktivierung von Genen stellt ein wesentliches Regulationsprinzip dar (Reuter und Spierer 1992).

Auch im Chromatin der Keimbahnzellen müssen koordinierte genetische und epigenetische regulatorische Programme ablaufen, über die in *Drosophila* im

Gegensatz zu *C. elegans* sehr wenig bekannt ist. In *C. elegans* werden in den frühen Keimbahnzellen (P-Linie) aktive Chromatinzustände, die durch H3K4me2 und H3K4me3 gekennzeichnet sind, gefunden, die mit denen der somatischen Nachbarzellen vergleichbar sind (Schaner et al., 2003). Erst ab dem 100 Zellstadium ist in den späteren Keimbahnzellen (Z-Linie), im Unterschied zu den benachbarten somatischen Zellen, eine Reduktion der aktiven Histonmodifizierungen H3K4me2 und H3K4me3 zu sehen (Schaner et al., 2003). Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung ist die DNA der Keimbahnzellen stärker kondensiert und zeichnet sich weiterhin durch eine Reduktion von H4K8ac und eine leichte Erhöhung von H3K27me3 aus (Schaner et al., 2003; Bender et al., 2004). Während in den frühen Keimbahnzellen (P-Linie) eine PIE-1 vermittelte Repression zur *Quiescence* führt, erfolgt in der späteren Entwicklung der Keimbahn ein Umschalten zu einem Chromatin-basierten Status (Mello et al., 1996; Seydoux et al., 1996; Seydoux und Dunn 1997; Schaner et al., 2003; Schaner und Kelly 2006).

In *Drosophila* wird zu jedem Zeitpunkt der PGC-Entwicklung, im Gegensatz zu *C. elegans*, verglichen mit den benachbarten somatischen Zellen, kein bzw. kaum H3K4me2 und H3K4me3 gefunden (Schaner et al., 2003; Rudolph et al., 2007, vorl. Arbeit). Im Rahmen der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit konnten immunzytologische Analysen zeigen, dass sich die PGC von *D. melanogaster*, genau wie in *C. elegans*, jedoch durch erhöhte Mengen an H3K27me3, und zusätzlich auch erhöhte Werte an H3K27me2 und H3K36me2 im Vergleich zu den benachbarten somatischen Zellen auszeichnen. Um den Prozess der Chromatinregulation in der Keimbahn besser analysieren zu können, wurde ein dem *In(1)w^{m4} Rearrangement* ähnliches PEV-System etabliert, bei dem das *fs(1)K10*-Gen als Markergen dem somatischen *white* -Gen äquivalent ist (Mietzsch et al., in prep.). Dabei wurde ein *fs(1)K10⁺*-Transgen zufallsgemäß in das Genom homozygoter *fs(1)K10*-Tiere integriert. Die *fs(1)K10*-Mutation führt in Weibchen homozygot zur Sterilität, da komplett dorsalisierte Eier gebildet werden, die nicht in der Lage sind, sich zu entwickeln (Wieschaus 1978; Wieschaus und Szabad 1979). Bei Männchen zeigt diese Mutation keinen Effekt. *Fs(1)K10* ist ein negativer Transkriptionsregulator des *gurken*-Gens, dessen Genprodukt für das Auslösen der Dorsalisierungskaskade auf der dorsalen Seite des *Drosophila*- Embryos verantwortlich ist (Forlani et al., 1993).

Generell handelt es sich bei Insekten-Eiern um relativ große und dotterreiche Eier, die präzise positionierte Faktoren für die Bildung der dorso-ventralen und antero-posterioren Achse beinhalten (Schwalm 1988). Während die Bildung der antero-posterioren Achse auf einem Konzentrationsgradienten von Bicoid (anterior) und Nanos (posterior) basiert, wird für die exakte Bildung der dorso-ventralen Achse das Gurken-Protein benötigt (Schübach und Roth 1994; González-Reyes et al., 1995). Die dorso-ventrale Polarität des Embryos bildet sich während der Oogenese im Ovarium aus, wenn der Oozytenkern von seiner zentralen zur anterioren asymmetrischen Position wandert. Um den Kern akkumuliert *gurken* mRNA und Protein, sodass sich ein Konzentrationsgefälle von dorsal nach ventral bildet (Neuman-Silberberg und Schübach 1993). *Gurken* wird dabei nur ungenügend vom Oozytenkern selbst exprimiert und genau wie *fs(1)K10* nach der Expression in den Nährzellen durch Ringkanäle als mRNA in den Embryo geschleust (Wieschaus und Szabad 1979; Saunders und Cohen 1999). Da das Gurken-Protein auch die Rezeptoren der Follikelzellen auf der ventralen Seite aktivieren, und somit die Dorsalisierung auslösen kann (Pai et al., 2000), führt eine Änderung des Gurken-Gradienten auch zu einer Verschiebung der dorso-ventralen Achse. *Fs(1)K10* wirkt als negativer Regulator, wodurch sein Fehlen zur verstärkten Expression von *gurken* und somit zu einer Ausbreitung des Gurken-Proteins auch zur ventralen Seite führt. Da es auch dort die EGF-Rezeptoren binden und aktivieren kann, wird die Dorsalisierungs-Signalkaskade, die über mehrere Zwischenstufen verläuft, auf beiden Seiten induziert (Pai et al., 2000; Shmueli et al., 2002). Das Ergebnis ist ein komplett dorsalisiertes Ei mit 2 fusionierten Eifilament-Paaren, das sich phänotypisch leicht von einem normalen Wildtyp-Ei unterscheiden lässt.

Verschiedene Aspekte der dorso-ventralen Achsenbildung sind sogar zwischen Insekten und Vertebraten hochkonserviert (Ferguson 1996; Lall und Patel 2001). Das neu etablierte Keimbahn-spezifische PEV-System basiert darauf, dass der Mutantenphänotyp der kompletten Dorsalisierung nur gerettet werden kann, wenn das *fs(1)K10*-Transgen in einem euchromatischen Bereich inseriert. Die Weibchen sind dann wieder in der Lage, Wildtyp-Eier zu produzieren. Erfolgt die Integration in einen Heterochromatin-ähnlichen Bereich, so findet keinerlei Rettung des Phänotyps statt. Inseriert das *fs(1)K10*-Transgen jedoch in die Nähe eines heterochromatischen Bereichs in der Keimbahn, so resultiert ein variegierender Phänotyp, der mit dem Mosaik-Augenphänotyp des *In(1)w^{m4} Rearrangements* vergleichbar ist, da sowohl Wildtyp- als

auch komplett dorsalisierte *K10*-Eier gelegt werden. Mit Hilfe dieses Systems können Funktionen bereits bekannter Chromatin-Faktoren im Soma auch auf dessen Funktion in der Keimbahn untersucht werden. Dabei zeigen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse erstmals eine Funktionen für E(Z), SU(VAR)3-9, HP1, dSETDB1 und andere Chromatin- Faktoren in der Modifikation des Keimbahn-Chromatins.

Obwohl die primordialen und die ovariellen Keimbahnstammzellen in *Drosophila* gut untersucht sind, fehlten bisher essentielle Methoden, wie die direkte genetische Analyse der Chromatinregulation und die molekulare Analyse des Keimbahn-Chromatins mittels ChIP. Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit Hilfe des keimbahnspezifischen *fs(1)K10*-PEV-Systems Erkenntnisse über den Aufbau und die Regulation des Keimbahn-Chromatins gewonnen werden. Des Weiteren sollte auf der Grundlage des UAS/GAL4-Systems aus Hefe eine Methode etabliert werden, mit der es möglich ist, spezifisch Keimbahn-Chromatin zu isolieren und anschließend mittels ChIP molekular zu analysieren. Eine immunzytologische Analyse der PGC und GSC im Wildtyp, den Null-Allelen *Su(var)3-9⁰⁶* und *egg¹⁴⁷³* sowie der *taiman*-Mutante (Tschiersch et al., 1994; Clough et al., 2007; Lein 2011) diene ebenfalls der besseren Charakterisierung dieser Stammzellen. Eine weitere Möglichkeit, den essentiellen Charakter von somatischen Chromatinfaktoren, wie SU(VAR)3-9, SUV4-20, HP1 oder dSETDB1 (Tschiersch et al., 1994; Schotta et al., 2002; Eissenberg et al., 1992; Clough et al., 2007) auch in der Keimbahn zu beweisen und ihre genaue Wirkungsweise näher zu bestimmen, stellt ein *Knockdown* mittels RNAi (TRiP consortium, Boston, USA) dar, der durch spezifische *nanos*GAL4-Treiber nur in Keimbahnzellen induziert wurde. Mit Hilfe all dieser Methoden konnten intensive Analysen des Chromatins der Keimbahnstammzellen erfolgen und neue Erkenntnisse zu epigenetischen Kontrollmechanismen in diesen Zellen gewonnen werden.

2 Material und Methoden

Genetische Methoden

2.1. Anzucht und Haltung von *Drosophila melanogaster*

Die Anzucht und Haltung der Fliegen erfolgte auf einem Standardmedium (1 % Agar, 2,5 % Rosinen, 3 % Grieß, 5 % Hefe, 0,1 % Nipagin) in Glasröhrchen bzw. 0,5l Glasflaschen. Stämme wurden bei einer Temperatur von 18°C gehalten, Kreuzungen entwickelten sich bei 25°C. Zur Sammlung von Embryonen (für Transformationsexperimente, RNA-Extraktion und Immunmarkierung) wurden Ablegeröhrchen und austauschbare Ablegeschalen mit Nährmedium (22g/l Agar; 100g/l Zucker und Aktivkohle) benutzt.

Zur Analyse der Eiproduktion einzelner Weibchen wurden speziell angefertigte Ablegeapparaturen, bestehend aus 19 aneinander geklebten Plastikröhren, verwendet. Die Legeapparaturen wurden bei 25°C inkubiert und die tägliche Eiproduktion jedes Weibchens für einen Zeitraum von 10 Tagen erfasst. Zur Stimulierung der Eiablage dienten Männchen, die zu den Weibchen gesetzt wurden sowie eine kleine Menge Hefe.

2.2 Verwendete Stämme und Stabilisierungschromosomen von *Drosophila melanogaster*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme und Stabilisierungschromosomen sind in Lindsley und Zimm (1992) detailliert beschrieben. Sie sind in Tabelle 2.1a und 2.1.b aufgeführt.

Tabelle 2.1a Verwendete Stabilisierungschromosomen von *Drosophila melanogaster*

Balancer	Mutation	Phänotyp	Chromosom
<i>SM6a</i>	<i>Cy, Curly</i>	gelockte Flügel (<i>Cy</i>)	2
<i>SM6b</i>	<i>Cy, Curly</i>	gelockte Flügel (<i>Cy</i>),	2
	<i>Roi, Rough eye</i>	rauhe Augen (<i>Roi</i>)	
<i>TM3</i>	<i>Sb, Stubble</i>	verkürzte Scutellarborsten (<i>Sb</i>),	3
	<i>Ser, Serrate</i>	eingeschnittene Flügel (<i>Ser</i>)	
<i>TM6C</i>	<i>cu, curled</i>	gerollte Flügel (<i>cu</i>)	3
	<i>Sb, Stubble</i>	verkürzte Scutellarborsten (<i>Sb</i>)	

Tabelle 2.1b Verwendete Mutationen von *Drosophila melanogaster*

Allel	Mutation	Referenz
<i>fs(1)K10</i> ¹	<i>nonsense</i> Mutation (Stopp an Position 1320)	Wieschaus 1978; vorl. Arbeit
<i>Su(var)3-9</i> ⁰⁶	große Insertion am Beginn des 3. Exons	Tschiersch et al., 1994; Krauss 1995
<i>Su(var)2-5</i> ⁰⁵	<i>frameshift</i> Mutation durch Deletion von 2 Nukleotiden an Position 339-340	Eissenberg et al., 1992
<i>Suv4-20</i> ^{BG00814}	P-Element Insertion	<i>Drosophila gene disruption project</i> (Flybase); Schotta et al., 2002
<i>Su(var)3-1</i> ⁰²	<i>nonsense</i> Mutation (verfrühter Stopp im C-terminalen Teil d. Prot.)	Ebert et al., 2004
<i>E(z)</i> ¹⁵ (<i>pco</i> ^{NU808})	<i>loss of function</i> , hypomorph	Shearn et al., 1978
<i>Su(var)2-1</i> ⁰¹	<i>nonsense</i> Mutation (Stopp an Position 1044)	Reuter et al., 1982; Walther pers. Mitteilung
<i>Su(var)3-3</i> ⁰⁹	Aminosäureaustausch G→R an Position 1259	Rudolph et al., 2007
<i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁸	Deletion durch Remobilisierung eines P- Elementes	Baisch 2010
<i>Df(2L)tai2</i>	Deletion durch Remobilisierung eines P- Elementes	Lein 2011
<i>P{PZ}piwi</i> ⁰⁶⁸⁴³	P-Element Insertion	Lin und Spradling 1997
<i>egg</i> ¹⁴⁷³	interne 856bp Deletion ohne Leserahmenschiebung	Clough et al., 2007
<i>Df(3R)kuk15</i>	Deletion durch Remobilisierung eines P- Elementes	Brandt et al., 2006

2.3 P-Element vermittelte Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster*

Zur Erzeugung transgener *Drosophila melanogaster*-Stämme werden DNA- Sequenzen mit flankierenden P-Element-*repeats* (P-Vektoren) genutzt, die mit Hilfe einer Transposase in das Fliegen-genom integriert werden (Rubin und Spradling, 1982). Die Injektion der P-Vektoren erfolgt gemeinsam mit einer Transposasequelle (Turbo-Plasmid, p π 25.1-Derivat; Robertson et al., 1988) im präblastodermalen Stadium der Embryonalentwicklung in den posterioren Teil in einen *Drosophila*-Stamm, der eine Mutation für den entsprechenden Selektionsmarker des Transformationsvektors trägt. Die Selektion auf transgene Tiere erfolgt, indem die überlebenden Tiere mit dem zur Injektion verwendeten Stamm gekreuzt werden. Transgene prägen den Selektionsmarker aus. Im Rahmen dieser Arbeit diente das *vermillion*-Gen als Marker. Für die Etablierung eines transgenen Stammes und die genetische Lokalisierung des Insertionsortes wurden Kreuzungen mit Stabilisierungschromosomen für das zweite und dritte Chromosomenpaar (v^1/v^1 ; *SM6a* / *Sco*; *ry*⁵⁰⁶/*ry*⁵⁰⁶ bzw. v^1/v^1 ; +/+; *ry*⁵⁰⁶/*TM3*, *ry*^{RK} *Sb*¹ *Ser*¹) durchgeführt. Aufgrund der Aufspaltungen der jeweiligen *Balancer* in Verbindung mit der braunen Augenfarbe in der F2- Generation (werden zusammen vererbt oder segregieren auseinander) konnten die Chromosomen, auf denen die Transgene inserierten, bestimmt werden. Tritt bei beiden Kreuzungen in der F1-Generation der braune Augenphänotyp nur bei Weibchen auf, liegt ein geschlechtsgebundener Erbgang vor, das heißt die Integration ist in das X-Chromosom erfolgt. Können anhand der *Balancer*- Kreuzungen das 2. und 3. Chromosom ausgeschlossen werden und anhand der nicht geschlechtsspezifisch ausgeprägten Augenfarbe auch das X- Chromosom, so ist eine Integration in das 4. Chromosom

erfolgt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Konstrukte sind in Abbildung 2.1a und 2.1b schematisch dargestellt.

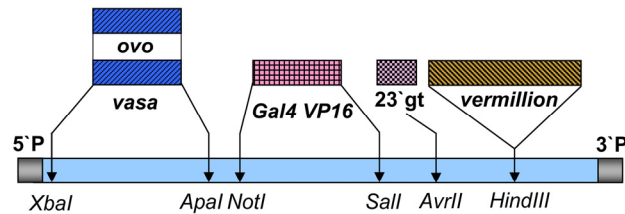


Abb.2.1a. Allgemeiner schematischer Aufbau der injizierten Promotor-Konstrukte.

Die Abbildung zeigt den allgemeinen Aufbau der Konstrukte, die zur Transformation von *Drosophila melanogaster* verwendet wurden. Die 1,5kb Fragmente der Promotoren von *vasa* und *ovo* wurden über *XbaI* und *ApaI* kloniert. *Gal4 VP16* wurde über *NotI* und *Sall* gerichtet in die Polylinkersequenz des pGS-Vektorsystems (Schotta et al., 2000) kloniert. Als Selektionsmarker wurde das *vermillion*-Gen genutzt. Nach erfolgter Sequenzierung wurden die Konstrukte transformiert.

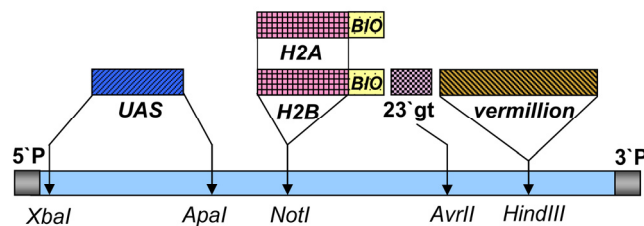


Abb.2.1b. Allgemeiner schematischer Aufbau der injizierten Gen-Konstrukte.

Die Abbildung zeigt den allgemeinen Aufbau der Konstrukte, die zur Transformation von *Drosophila melanogaster* verwendet wurden. Die kodierende Regionen der Histone H2A und H2B wurden über *NotI* in die Polylinkersequenz des pGS-Vektorsystems (Schotta et al., 2000) kloniert. Mittels PCR wurde nachträglich der Biotin-Tag (BIO), der zur Aufreinigung des Keimbahn-Chromatins genutzt wurde, eingebracht. Als Selektionsmarker diente das *vermillion*-Gen. Nach erfolgter Sequenzierung wurden die Konstrukte transformiert.

2.4 Kreuzungsexperimente

Um den Einfluss verschiedener Deletionen und Chromatin-Faktoren aus dem Soma auf die Keimbahn genetisch zu überprüfen, wurde das *fs(1)K10*-Variegationssystem genutzt. Es mussten zunächst die entsprechenden Mutanten in einen *fs(1)K10* defizienten genetischen Hintergrund gebracht werden. Dazu wurden bereits in früheren Arbeiten etablierte *fs(1)K10* defiziente *Balancer*- Stämme für das 2. und 3. Chromosom (*C1B/fs(1)K10^w;SM6b/Sco;+/+* bzw. *C1B/fs(1)K10^w;+/+;TM3/PrDr*) genutzt. Die Männchen, die die Mutation im Chromatin-Modifikator balanciert tragen (*w^{m4h}/Y;Modifikator^{Mut}/SM6b;+/+* bzw. *w^{m4h}/Y;+/+;TM3/Modifikator^{Mut}*) wurden mit Jungfrauen des balancierten *fs(1)K10*-Stammes (*C1B/fs(1)K10^w;SM6b/Sco;+/+* bzw.

Tabelle 2.2 Etablierte stabile Linien der Chromatin- Modifikatoren, die die Mutation balanciert im defizienten *fs(1)K10*- Hintergrund tragen

Modifikator	Genotyp der Linien im <i>fs(1)K10</i>⁻ -Hintergrund
SU(VAR)3-9	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; +/+; <i>Su(var)3-9</i> ⁰⁶ /TM3
HP1	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; <i>Su(var)2-5</i> ⁰⁵ /SM6b; +/+ <i>fs(1)K10/CIB</i> ; <i>Su(var)2-5</i> ⁰⁵ <i>Sco</i> /SM6b; +/+
SUV4-20	<i>Suv4-20</i> ^{BG00814} , <i>fs(1)K10/CIB</i> ; +/+; +/+
JIL-1	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; +/+; <i>Su(var)3-1</i> ⁰² /TM3
E(Z)	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; +/+; <i>E(z)</i> ¹⁵ (<i>pco</i> ^{NU808}) /TM3
SU(VAR)2-1	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; <i>Su(var)2-1</i> ⁰¹ /SM6b; +/+ <i>fs(1)K10/CIB</i> ; <i>Su(var)2-1</i> ⁰¹ <i>Sco</i> /SM6b; +/+
dLSD1	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; +/+; <i>Su(var)3-3</i> ⁰⁹ /TM3 <i>fs(1)K10/CIB</i> ; +/+; <i>Su(var)3-3</i> ¹⁰ /TM3 <i>fs(1)K10/CIB</i> ; +/+; <i>Su(var)3-3</i> ¹² /TM3
LID	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; <i>lid</i> ¹⁰⁴²⁴⁻⁸ /SM6b; +/+
TAIMAN	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; <i>Df(2L)tai2</i> /SM6b; +/+
Piwi	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; <i>P{PZ}piwi</i> ⁰⁶⁸⁴³ /SM6b; +/+
dSETDB1	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; <i>egg</i> ¹⁴⁷³ /SM6b; +/+ <i>fs(1)K10/CIB</i> ; <i>egg</i> ¹⁴⁷³ <i>Sco</i> /SM6b; +/+
SU(VAR)3-8	<i>fs(1)K10/CIB</i> ; +/+; <i>Su(var)3-8</i> ⁰¹ /TM3 <i>fs(1)K10/CIB</i> ; +/+; <i>Su(var)3-8</i> ⁰² /TM3

CIB/fs(1)K10^w; +/+; TM3/PrDr) gekreuzt Nach anschließender Rückkreuzung der entstehenden Männchen mit Jungfrauen des balancierten *fs(1)K10*-Stammes (*CIB/fs(1)K10*^w; SM6b/Sco; +/+ bzw. *CIB/fs(1)K10*^w; +/+; TM3/PrDr) konnten stabile Linien etabliert werden, die die Mutation des Chromatin- Modifikators balanciert im defizienten *fs(1)K10*- Hintergrund tragen (*fs(1)K10*^w/*CIB*; *Modifikator*^{Mut}/SM6b; +/+ bzw. *fs(1)K10*^w/*CIB*; +/+ ; *Modifikator*^{Mut}/TM3). Die so etablierten Linien sind in Tabelle 2.2 nochmals aufgeführt. Im Rahmen der Arbeit wurde jedoch nur ein Teil der Linien verwendet. Um den Einfluss der Chromatin-Modifikatoren auf die Keimbahn zu testen, wurden diese gegen Jungfrauen gekreuzt, die das *fs(1)K10*-Gen transgen nahe heterochromatischen Regionen enthalten, was zu einem variegierenden Ei-Phänotyp führt. Diese Weibchen legen sowohl Wildtyp- als auch *K10*- Eier. Das Kreuzungsschema wird am Beispiel der *taiman*-Mutation und der Linie 124 dargestellt, die das *fs(1)K10*- Transgen auf dem 2. Chromosom enthält.



$fs(1)K10^- w^- / fs(1)K10^- w^- ; P\{fs(1)K10^+ w^+\}124/SM6a$ X $fs(1)K10^- w^- / Y ; Df(2L)tai2/SM6b$

Aus dieser Kreuzung wurden 38 Kontrollweibchen ($fs(1)K10^- w^- / fs(1)K10^- w^- ; P\{fs(1)K10^+ w^+\}124/SM6b; +/+$) sowie 38 Testweibchen ($fs(1)K10^- w^- / fs(1)K10^- w^- ; P\{fs(1)K10^+ w^+\}124/Df(2L)tai2; +/+$) isoliert, und die Eiproduktion für jedes einzelne Weibchen über 10 aufeinander folgende Tage erfasst.

Molekularbiologische Methoden

2.5 Molekularbiologische Standardmethoden

Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly 1979) bzw. mit Hilfe des Plasmid-Minipräparations-Kits (Fermentas GmbH) isoliert. Großpräparationen erfolgten mittels des Plasmid-Midipräparations-Kits (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Für Restriktionen und Ligationen wurden Enzyme der Firma Fermentas GmbH genutzt. Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem Nucleobond-Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben durchgeführt. Agarose-Gelelektrophorese, Behandlung mit Alkalischer Phosphatase, *A-tailing*, Ligation und die Transformation von *E. coli* erfolgten nach Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989). Für PCR-Reaktionen wurden Taq-Polymerase bzw. Pfu-Polymerase (Promega) verwendet. Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte mit dem pGEMT *Cloning Kit* (Promega). Die Sequenzierung wurde mit dem „ABI PRISM[®] Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit – Version 2.0“ (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Vergleich von Sequenzhomologien diente das Programm GCG-Wisconsin Package Version 10.3-UNIX und die Datenbank des Berkeley *Drosophila* Genomprojektes (BDGP) (Rubin 1996).

2.5.1 Isolation genomischer DNA

Die Präparation genomischer DNA erfolgte nach der „*Quick Fly Genomic DNA Prep*“-Methode von E. Jay Rehm (Berkeley *Drosophila* Genome Project, BDGP).

2.5.2 *Single-Fly* DNA-Präparation

Die Isolation geringer Mengen genomischer DNA aus adulten Fliegen wurde in Anlehnung an die *single fly prep* Methode von Gloor und Engels 1992 durchgeführt.

2.5.3. Isolation von RNA

100 adulte Fliegen wurden in 1ml TRIzol[®] (Invitrogen) homogenisiert und bei RT 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde die Probe 5 min kräftig geschüttelt und danach 30 min bei RT zentrifugiert. Die Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 700µl Isopropanol und einer 10 minütigen Inkubationszeit bei RT 30min bei 15000rpm gefällt. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 70% igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 50µl DEPC Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Ultraspec 3100, Amersham).

2.6 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mit der M-MLV Reversen Transkriptase (Promega) in einem Trioblock oder T- Gradienten (Biometra). Auf ein Gesamtvolumen von 14µl wurden 2ng RNA (DNase behandelt), 1µl Primer (*Random Hexamer Primer*, Promega) und x µl DEPC Wasser pipettiert und der Ansatz 10 min bei 70°C inkubiert. Nachdem die Proben 1 min auf Eis abgekühlt wurden, erfolgte die Zugabe von 4µl 5x Reaktionspuffer (Promega), 1µl dNTP (10mM) und 1µl Reverse Transkriptase (200 U/ µl, Promega). Der Ansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Die entstandene cDNA diente als *template* für nachfolgende PCR- Analysen.

2.7 Inverse PCR und Sequenzierung von P-Element Insertionen

Die Inverse PCR ist eine Methode zur Amplifizierung flankierender DNA-Sequenzen ausgehend von einer bekannten Sequenz, bei der im Gegensatz zur normalen PCR die Primer nicht aufeinander zugerichtet sind, sondern deren Richtung in die unbekanntem umgebenen Bereiche zielt. Sie wurde zur Bestimmung des Insertionsortes von *P*-Elementen eingesetzt und erfolgte in Anlehnung an die Methode von Huang et al. (2000) mit folgenden Änderungen: Die PCR-Reaktion am Ligationsansatz erfolgte zunächst mit den *P*- Element-Primern 5`Pfor1 und 5`Prev1 (siehe Anhang). Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurden 5µl der ersten PCR als *template* für eine zweite geschachtelte (*nested*) PCR mit den Primern 5`Pfor2 und 5`Prev2 (siehe Anhang)

verwendet. Nach der Gelelektion erfolgte die Sequenzierung mit 5'Prev2, der vom P-Element in Richtung der angrenzenden genomischen DNA orientiert ist. Durch einen Datenbankvergleich der an das P-Element angrenzenden DNA-Bereiche mit der Gesamtsequenz konnten die entsprechenden Insertionsstellen identifiziert werden.

2.8 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.8.1 Verwendete Bakterienstämme und Vektoren

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurde der *E.coli*-Stamm DH5 α (Invitrogen; *F- Φ 80dlacZ Δ M15 Δ [lacZYA-argF] U169 recA1 endA1 hsdR17[rk-, mk+] phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1*) verwendet.

Die für Klonierungen verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3 Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Verwendung	Referenz
pGEM [®] -T	Klonierung von PCR- Produkten	Promega
pGS	Transformationsvektor für <i>Drosophila</i>	Schotta et al., 2000

2.9 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

2.9.1 ChIP an adulten Fliegen

200 adulte Fliegen wurden in Stickstoff schockgefroren und die Köpfe von den Körpern durch verschiedenmaschige Siebe getrennt. Danach wurden die Köpfe mit frisch hergestelltem 1,8% Formaldehyd in 1ml X-linking-Puffer (50 mM HEPES [pH 8.0]; 1 mM EDTA [pH 8.0]; 0,5 mM EGTA [pH 8.0]; 100 mM NaCl) plus 0,2% Triton X-100 versetzt und 20 min bei RT auf dem Drehrad bei höchster Geschwindigkeit inkubiert, um die Proteine fest mit der DNA zu verbinden (*cross-linking*). Die Reaktion wurde nach Zugabe von 100 μ l 1,25 M Glycin für 5 min bei 4°C gestoppt, der Reaktionsansatz zum Waschen bei 4°C mit 1ml ChIP wash A (10 mM HEPES [pH 7.6]; 10 mM EDTA [pH 8.0]; 0,5 mM EGTA [pH 8.0]; 0,25% Triton X100) inkubiert und danach mit 1ml ChIP wash B (10 mM HEPES [pH 7.6]; 1 mM EDTA [pH 8.0]; 0,5 mM EGTA [pH 8.0]; 0,01% Triton X100; 100mM NaCl) auf dem Drehrad gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und die Köpfe mit Hilfe eines Spachtels in 5ml TEN140 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0]; 1 mM EDTA; 140 mM NaCl) plus 1 mM PMSF überführt. Die Lösung wurde sonifiziert (Bioruptor[™]; Diagenode) und das fragmentierte Chromatin anschließend nacheinander mit 50 μ l 10% SDS, 250 μ l 2% DOC und 500 μ l

10% Triton X100 versetzt, wobei die Ansätze zwischen der Zugabe je 2 min bei 4°C auf dem Drehrad gemäßigt rotierten. Anschließend folgten weitere 10 min Inkubation und eine anschließende Zentrifugation zum Pelletieren der Zelltrümmer. Von der Lösung wurden 800 µl als Input (ca. 13% vom Gesamtchromatin) entnommen und bis zum nächsten Tag bei 4°C gelagert. Das restliche Volumen wurde in drei gleiche Teile aufgeteilt. Davon war ein Teil die *no antibody control*, die anderen beiden dienten der Immunopräzipitation mit 2 Protein-spezifischen Antikörpern, von denen je 5 µg zu der Probe gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurden die an den Antikörper gebundenen Protein-DNA-Stücke mit 50µl Protein-G-Sepharose-Beads (50% Lösung in RIPA-PMSF) präzipitiert. Danach wurden die *Beads* 5 mal mit je 1ml RIPA-PMSF (140 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]; 1 mM EDTA [pH 8.0]; 1% Triton X100; 0,1% SDS; 0,1%DOC), einmal mit LiCl ChIP Puffer (250 mM LiCl; 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]; 1 mM EDTA [pH 8.0]; 0,5% NP40; 0,5% DOC) und letztendlich zweimal mit 1ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl [pH8.0]; 0,1 mM EDTA [pH8.0]) gewaschen und am Ende in 100µl TE-Puffer resuspendiert. Der Input wurde ab dem folgenden Schritt mit dem achtfachen Volumen mitbehandelt. Die *Beads* wurden mit 1µl RNaseA (10mg/ml, Marligen) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 7,5µl 10% SDS und 3,8µl Proteinase K (20mg/ml, Fermentas GmbH) und die Proben inkubierten über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurden die Proben für mind. 6 h bei 65°C inkubiert, um die DNA-Protein Vernetzungen zu lösen (*reverses cross-linking*). Nachfolgend wurden die Proben mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Machery-Nagel) laut Herstellerangaben gereinigt. Die anschließenden qPCR-Analysen erfolgten in Anlehnung an Dellino et al. (2004).

2.9.2 ChIP an Embryonen

Für die ChIP- Analyse an Embryonen wurde das unter Punkt 2.9.1 beschriebene ChIP-Protokoll mit folgenden Erweiterungen und Änderungen verwendet: Es wurden 200mg Embryonen in 10ml frisch hergestelltem *X-linking*-Puffer (50 mM HEPES [pH 8.0]; 1 mM EDTA [pH 8.0]; 0,5 mM EGTA [pH 8.0]; 100 mM NaCl) mit 1,8% Formaldehyd in Gegenwart von 30ml n-Heptan 20min bei RT auf dem Drehrad bei höchster Geschwindigkeit inkubiert, um die Proteine fest mit der DNA zu verbinden (*cross-linking*). Danach wurden die Embryonen abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach der Zugabe von 50ml eiskalter Stopp-Lösung (1,25M Glycin, 10% TritonX-100 in

1x PBS) wurde die Reaktion gestoppt und es folgten mehrere Waschstschritte bei 4°C mit 2ml *ChIP wash A* (10 mM HEPES [pH 7.6]; 10 mM EDTA [pH 8.0]; 0,5 mM EGTA [pH 8.0]; 0,25% Triton X100) und 2ml *ChIP wash B* (10 mM HEPES [pH 7.6]; 1 mM EDTA [pH 8.0]; 0,5 mM EGTA [pH 8.0]; 0,01% Triton X100; 100mM NaCl) auf dem Drehrad. Der Überstand wurde abgenommen und die Embryonen mit Hilfe eines Spatels in 5ml TEN140 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0]; 1 mM EDTA [pH8.0]; 140 mM NaCl) plus 1 mM PMSF überführt. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie unter 2.9.1 beschrieben.

2.9.3 Keimbahn-ChIP an Embryonen

Für die Keimbahn-ChIP- Analysen wurden die unter Punkt 2.9.1 und 2.9.2 beschriebenen ChIP-Protokolle mit folgenden Erweiterungen und Änderungen verwendet: Es wurde 1g Embryonen in 10ml frisch hergestelltem *X-linking*-Puffer (50 mM HEPES [pH 8.0]; 1 mM EDTA [pH 8.0]; 0,5 mM EGTA [pH 8.0]; 100 mM NaCl) mit 1,8% Formaldehyd in Gegenwart von 30ml n-Heptan bei RT auf dem Drehrad bei höchster Geschwindigkeit inkubiert. Die folgenden Schritte bis zum Waschen der Protein-G-Sepharose-*Beads* in LiCl ChIP Puffer erfolgten wie unter 2.9.1 bzw. 2.9.2 beschrieben.

Da das Material einer zweiten, sich direkt anschließenden ChIP unterzogen wurde, um das Soma- und Keimbahn-Chromatin zu trennen, erfolgte die weitere Bearbeitung in Anlehnung an Tag 2 des Protokolls von Gendrel et al. (2002) und Lawrence et al. (2004) mit folgenden Modifikationen: Die Immunkomplexe wurden 3 mal mit je 250µl Elutionspuffer (1% SDS; 0,1M NaHCO₃) bei 37°C eluiert und die *Beads* anschließend bei 6000rpm 30sec abzentrifugiert. Die Elutionen wurden vereinigt und 1:1 mit *ChIP Dilution Buffer* (1,1% TritonX-100; 1,2mM EDTA [pH8.0]; 16,7mM Tris-HCl [pH 8.0]; 167mM NaCl) verdünnt.

Zur Trennung des Soma- und Keimbahnchromatins wurde der Dynal^(R) kilobaseBINDERTM Kit der Firma Invitrogen verwendet. Die Beladung der *Beads* erfolgte lt. Herstellerangaben. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT auf dem Drehrad erfolgte die Separierung mittels eines Magneten und 10mal Waschen mit je 250 µl *ChIP Dilution Buffer* (1,1% TritonX-100; 1,2mM EDTA [pH8.0]; 16,7mM Tris-HCl [pH 8.0]; 167mM NaCl). Zuletzt wurde nochmals mit 40 µl dest. Wasser gewaschen und die *Beads* in 100µl TE-Puffer mit 1µl RNaseA (10mg/ml)

aufgenommen. Nachfolgend wurden die Proben wie unter Punkt 2.9.1 beschrieben weiter behandelt.

Immunzytologische Methoden

2.10 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) an polytären Speicheldrüsen-Chromosomen von *Drosophila melanogaster*

2.10.1 Präparation der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*

Die Präparation von Speicheldrüsen aus Larven des 3. Stadiums erfolgte in Anlehnung an die Methode von Ashburner (Laboratory Manual, 1989). Die Speicheldrüsen wurden in 0,7% NaCl-Lösung auf einem silikonisierten Objektträger präpariert und anschließend in 45% Essigsäure 3 min fixiert. Die fixierten Drüsen wurden dann unter leichtem Druck zwischen Deckglas und Objektträger vorsichtig gequetscht und die Chromosomen gespreitet. Nach dem Schockgefrieren der Präparate in flüssigem Stickstoff und der Absprengung des Deckglases inkubierten diese für 10 min in 96% Ethanol und trockneten anschließend bei Raumtemperatur. Die Präparate lagerten bis zur weiteren Verwendung bei 4°C.

2.10.2 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die präparierten Speicheldrüsen wurden in 2 x SSC für 1h im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Präparate für 1.30 min in Denaturierungspuffer (2 x SSC; 70 mM NaOH) getaucht und sofort danach in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90%) bei -20 °C für je 5 min inkubiert. Die per PCR hergestellte und mit DIG markierte Sonde (in Hybridisierungspuffer [6% Lachsspermien-DNA; 7% 3M Natriumacetat; 70% Ethanol (96%)]) wurde zur Hybridisierung auf die Präparate gegeben und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 2 x SSC bei 42°C wurden die Präparate für 30 min in einer feuchten Kammer bei 37°C mit Blocking-Lösung (4 x SSC; 0,1% TritonX-100; 5% Milchpulver) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit Antikörperlösung (1: 100 anti-DIG-Fluorescein bzw. anti-DIG-Rhodamin[Roche]) 1h bei 37°C gefärbt. Nach dreimaligem Waschen in 4 x SSC + 0,1% TritonX-100 bei 42°C wurden die Präparate für 5 min in einer DAPI - Lösung (1:3000) gefärbt. Nach erneutem Waschen in 0,2 x SSC wurden die Präparate in *Citifluor – mounting* (Agar Scientific) eingedeckelt und im Anschluss mit Nagellack versiegelt und bei 4°C

gelagert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss).

2.11 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) an Embryonen von *Drosophila melanogaster*

2.11.1 Präparation der Embryonen von *Drosophila melanogaster*

Für die FISH-Analyse von *Drosophila*-Embryonen wurde die Methode nach Rothwell und Sullivan (2000) wie folgt modifiziert: Die gesammelten Embryonen wurden nach der Dechorionisierung in Waschpuffer (0,7% NaCl, 0,05% Triton X-100) bei 100°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen auf Eis gestellt und durch Zugabe von kaltem Waschpuffer auf RT abgekühlt. Die Embryonen wurden nun durch Zugabe von Heptan und Methanol durch kräftiges Schütteln devitellinisiert und in frischem Methanol aufgenommen. Anschließend erfolgte die Rehydrierung durch Entfernung des Methanols und vorsichtige Zugabe von PBTA. Dann folgten 3 Waschschrte in PBTA (1x PBS, 0.2% Triton X-100, 0,02% Natriumazid, 1% BSA) und eine Inkubation für 15 min bei RT auf dem Drehrad.

2.11.2 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Die rehydrierten Embryonen wurden 15 min bei 70°C in Hybridisierungslösung erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Sonde zugegeben und wie unter Punkt 2.10.2 beschrieben weiter verfahren.

2.12 Immunmarkierung von Embryonen

Für die Immunmarkierung wurden die *Drosophila*-Embryonen wie unter Punkt 2.11.1 beschrieben, behandelt. Der primäre Antikörper wurde auf einem Drehrad über Nacht bei 4°C in PBTA mit den Embryonen inkubiert. Nach drei Waschschrten mit PBTA wurde der sekundäre Antikörper zugegeben und es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 2h. Nach wiederum drei Waschschrten mit PBTA wurde die DNA-Färbung mit einem DAPI-PBS-Glycerol-Gemisch (20µg/ml DAPI; 1:1 PBS : Glycerol) durchgeführt, die Embryonen auf Objektträgern eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Färbung wurde mit entsprechenden Einstellungen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss) ausgewertet.

2.13 Immunmarkierung von Ovarien

2.13.1 Präparation von Ovarien

Die Präparation der Ovarien aus adulten Weibchen von *Drosophila melanogaster* erfolgte in Anlehnung an die Methode von Ashburner (Laboratory Manual, 1989). Die Ovarien wurden in 1x PBS präpariert, aufgerissen und in einem Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Nach Zugabe von 250µl 5% Paraformaldehyd (in PBS) wurden die Ovarien 30min auf einem Drehrad bei RT inkubiert. Durch dreimaliges Spülen mit PBTA wurde das Paraformaldehyd entfernt und nach Zugabe von 250µl Methanol erfolgte eine Dehydrierung der Präparate. Nach 30sec wurde erneut mit PBTA gespült und die Ovarien anschließend 1 Stunde in 600µl PBTA auf dem Drehrad bei RT rehydriert. Die Färbung erfolgte analog zu den Embryonen wie unter Punkt 2.12 beschrieben. Vor dem Eindeckeln wurden die Ovariolen mit Wolfram-Nadeln vereinzelt. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss).

Tab. 2.4: Verwendete primäre Antikörper für die immunzytologischen Analysen und ChIP

Antikörper	Hersteller	Verdünnung für Zytologie
polyklonal H3K4me1	Sigma-Aldrich®	1:100- 1:200
polyklonal H3K4me2	Abcam	1:100- 1:200
polyklonal H3K4me3	Upstate®	1:100- 1:200
polyklonal H3K9 acetyl	Abcam	1:100- 1:200
polyklonal H3K9me1	Upstate®	1:100- 1:200
monoklonal H3K9me2	Abcam	1:100- 1:200
monoklonal H3K9me3	Diagenode	1:100- 1:200
polyklonal H3K27me1	Upstate®	1:100- 1:200
polyklonal H3K27me2	Upstate®	1:100- 1:200
monoklonal H3K27me3	Abcam	1:100- 1:200
polyklonal H3K36me1	Abcam	1:100- 1:200
polyklonal H3K36me2	Upstate®	1:100- 1:200
polyklonal H3K36me3	Upstate®	1:100- 1:200
monoklonal BIOTIN	Sigma-Aldrich®	1:100- 1:200
polyklonal VASA d260	Santa Cruz Biotechnology®	1:100- 1:200
monoklonal C(3)G	S. Hawley	1:400- 1:500
polyklonal CID	S. Henikoff	1:20- 1:50
monoklonal DIG	Roche	1:20- 1:25

Tab. 2.5: Verwendete sekundäre Antikörper für die immunzytologischen Analysen

Antikörper	Hersteller	Verdünnung für Zytologie
Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit	Invitrogen™	1:100- 1:200
Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse	Invitrogen™	1:100- 1:200
Alexa Fluor® 555 goat anti-rabbit	Invitrogen™	1:100- 1:200
Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse	Invitrogen™	1:100- 1:200

2.14 *SPURR*-Einbettung von Ovarien zur elektronenmikroskopischen Analyse

Diese Methode erfolgte in Anlehnung an A. R. Spurr (1969) und wurde wie folgt modifiziert: Nach der Präparation wurden die Ovarien 2 h in einer Fixierlösung (3% Glutaraldehyd in 0,1M Natriumcacodylatpuffer [pH 7.2]) bei RT auf langsamster Stufe geschüttelt und anschließend 6x für 10 min mit Natriumcacodylatpuffer gewaschen. Es folgte eine einstündige Behandlung mit 1% Osmiumtetroxid (in Natriumcacodylatpuffer) und ein dreimaliges Waschen für 10 min in dest. Wasser. Die Präparate wurden dann jeweils 1 h mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (10%, 30%, 70%) behandelt, 1 h in einem 70%igen Ethanol-Uranylacetat (1%)-Gemisch gelagert und über Nacht in reinem 70%igem Ethanol bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Ethanolreihe fortgesetzt (70%, 90%, 2 x 100%) für jeweils 30 min bei RT. Daraufhin konnte die Infiltration mit Epoxidharz (nach Spurr) stattfinden, wobei *SPURR* zunächst für 4 h in einem Verhältnis von 1:3 (*SPURR*:Ethanol) zugegeben wurde. Danach erfolgte die Inkubation für 4 h in einem 1:1 *SPURR*-Ethanol-Gemisch und die Lagerung über Nacht in 3:1 *SPURR*-Ethanol. Am folgenden Tag wurden die Proben 8 h in reinem *SPURR* gelagert und über Nacht in *SPURR* inkubiert. Die Einbettung erfolgte in Silikonformen mit reinem *SPURR*. Das Auspolymerisieren der Proben fand für 24 h bei 70°C statt. Mit Hilfe eines Diamantmessers wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Die Auswertung erfolgte an einem Transmissions- Elektronenmikroskop (EM 900, Carl Zeiss).

3 Ergebnisse

3.1 Immunzytologische Analyse des Keimbahn-Chromatins

Die frühe Embryonalentwicklung von *Drosophila* lässt sich in Mitosezyklen und Stadien unterteilen. Die ersten 14 Teilungen sind dabei sehr schnell und erfolgen innerhalb von 180 Minuten. Zunächst finden nur Kernteilungen ohne Bildung von Zellen statt, sodass ein synzytiales Blastoderm entsteht. Bereits im Ovarium ist eine Differenzierung des posterioren Pols durch eine VASA-Färbung erkennbar. VASA ist keimbahnspezifisch und wird sehr früh zygotisch exprimiert. Das Protein wird maternal geladen und ist ein wichtiger Bestandteil des Polplasmas (Schübach und Wieschaus 1986; Rongo und Lehmann 1996). Das Polplasma bietet durch seine Zusammensetzung aus verschiedenen maternal geladenen mRNAs, wie beispielsweise *staußen* und *nanos* ein spezifisches Mikroklima für die Entwicklung der primordialen Keimbahnzellen

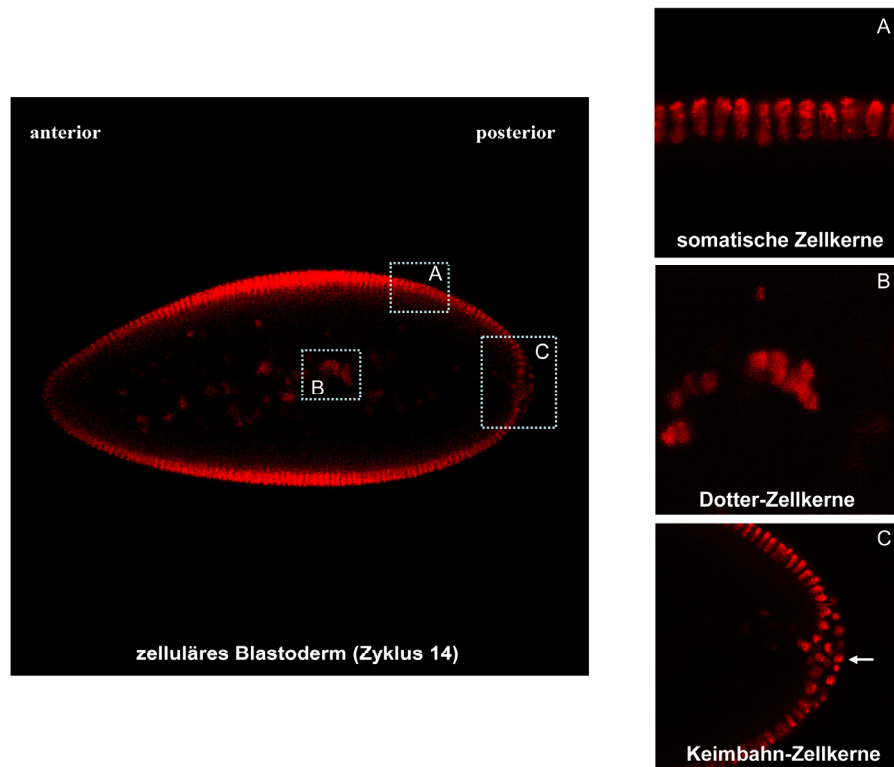


Abb.3.1. Das zelluläre Blastoderm-Stadium. Die Furchungsteilungen bei *Drosophila* sind synzytial. Nach dem Mitosezyklus 14 können drei verschiedene Zellkerne unterschieden werden. **A.** somatische Blastodermzellkerne **B.** Dotterkerne (*yolk nuclei*) **C.** Primordiale Keimbahnzellen (rot- DNA (DAPI)-Färbung).

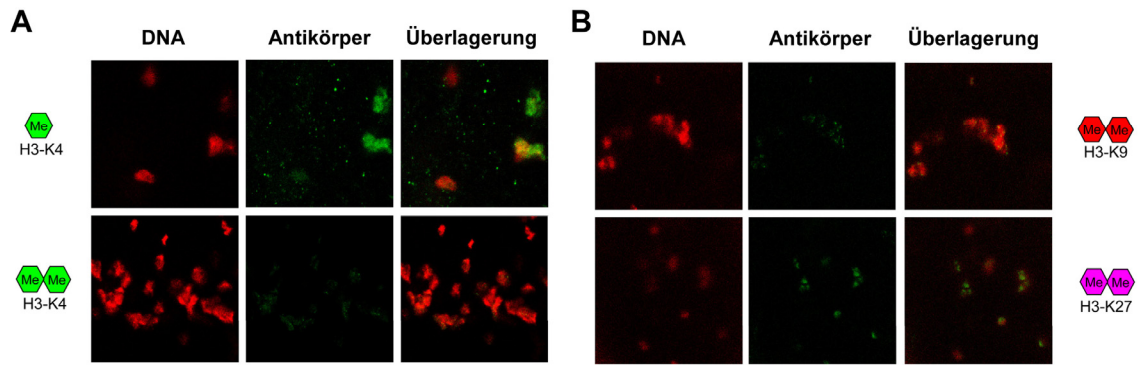


Abb.3.2. Die Dotterzellkerne des zellulären Blastoderm-Stadiums zeigen keine Chromatindifferenzierung. Die Dotterzellkerne (*yolk nuclei*) im Inneren des Embryos differenzieren sich nicht. Es ist keine eindeutige Differenzierung des Chromatins erkennbar. **A.** Die euchromatische Modifizierung H3K4me1 zeigt in einigen Kernen eine starke Färbung, H3K4me2 ist dagegen kaum detektierbar. **B.** Die Färbung der heterochromatischen H3K9 Dimethylierung ist ebenfalls kaum sichtbar. H3K27me2 zeigt eine schwache punktuelle Färbung (rot- DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper).

(PGC), die ab dem Kernteilungszyklus 10 von den somatischen Kernen unterschieden werden können. Im Mitosezyklus 14, in dem das zelluläre Blastoderm gebildet ist, lassen sich drei Arten von Zellkernen unterscheiden (Abb. 3.1). Die somatischen Zellkerne zeigen eine längliche Struktur, die sich im Laufe der Zyklen 10 bis 14 ausbildet (Abb. 3.3). Es lässt sich eine deutliche Trennung von Eu- und Heterochromatin, die sog. Rabl-Konfiguration, erkennen. Während ab dem Mitosezyklus 8 die meisten somatischen Zellkerne an die Oberfläche des Embryos wandern, verbleiben die Dotter-Zellkerne (*yolk nuclei*) im Inneren des Embryos und differenzieren sich nicht (Abb. 3.2). Ab dem Zyklus 10 kann man am posterioren Pol erstmals primordiale Keimbahnzellkerne (PGC) erkennen, die sich im speziellen Mikroklima des Polplasmas unabhängig von den übrigen somatischen Kernen teilen und zu einem früheren Zeitpunkt zellularisieren als die somatischen Kerne. Im Laufe der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Keimbahn-Zellkerne ebenfalls die Rabl-Konfiguration des Chromatins ausprägen, obwohl sie im Gegensatz zu den Blastodermkernen kugelförmig sind (Abb. 3.3A).

3.1.1 Das Chromatin der primordialen Keimbahnzellen zeigt eine apiko- basale Organisation

Da der Chromatin-Aufbau in den Keimbahnzellen von *Drosophila* bisher nicht näher untersucht worden ist, sollte zunächst eine immunzytologische Charakterisierung erfolgen. Es wurden Zellkerne von Embryonen des Mitosezyklus 14 (Entwicklungs-

stadium 5) mit DAPI angefärbt, um näheres über die Struktur des Keimbahn-Chromatins zu erfahren. Es zeigte sich, dass auch in primordialen Keimbahnzellen eine apiko- basale Chromatindifferenzierung nachweisbar ist (Abb. 3.3A). In beiden Zelltypen ist die sog. Rabl-Konformation (Foe et al., 1993) erkennbar (Abb. 3.3A), die sich in den Mitosezyklen 10 bis 14 ausbildet (Abb. 3.3B). Die stark kondensierten Bereiche sind dabei apikal gelegen, die aufgelockerten euchromatischen Bereiche basal. Somit ist eine Elongation der Kerne, die nur in den somatischen Kernen zwischen dem Mitosezyklus 10 und 14 induziert wird, keine Voraussetzung für die Ausbildung der Rabl- Konfiguration (Abb. 3.3B). Durch Antikörperfärbungen gegen die heterochromatische Histonmodifizierung H3K9me2 bzw. das zentromerspezifische CID- Protein und FISH- Analysen mit subtelomerischen Sonden konnte dieses anhand der DNA-Färbung erhaltene Ergebnis nochmals untermauert werden (Abb.3.4). Die in der DNA- Färbung stark kondensiert erscheinenden, apikal lokalisierten Bereiche können durch die H3K9me2 Antikörperfärbung eindeutig dem Heterochromatin zugeordnet werden. Dies korreliert mit den Positionen der apikal gelegenen Zentromere (Färbung gegen das CID-Protein) und der basal lokalisierten Telomerbereiche (FISH

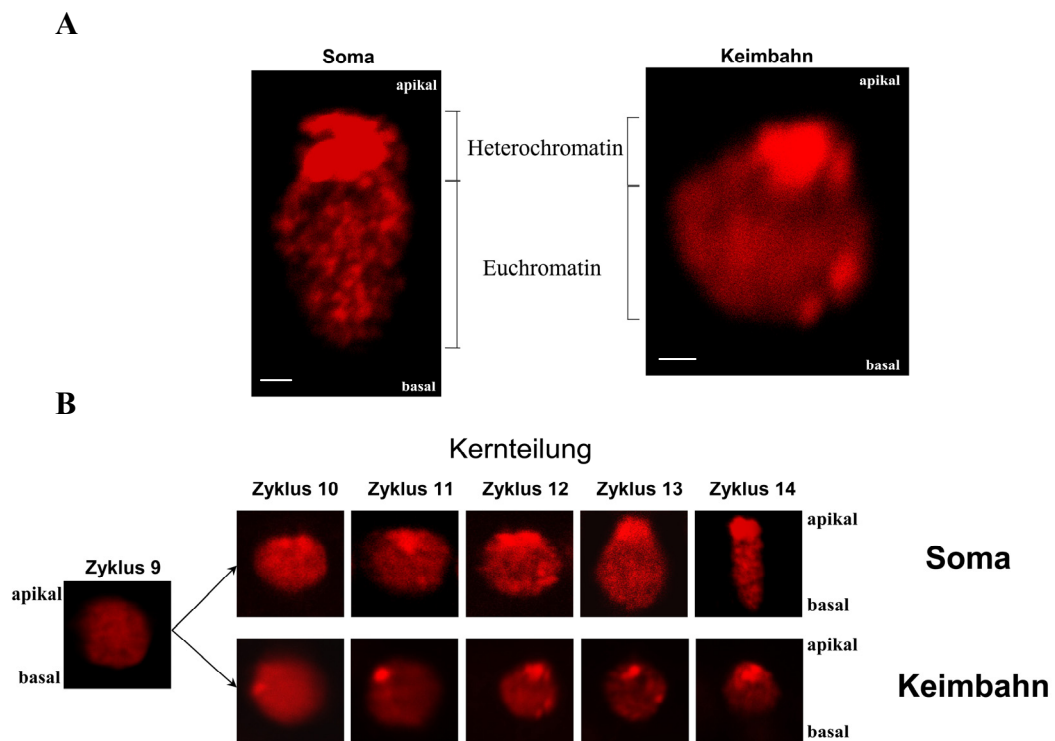


Abb.3.3. Das Chromatin somatischer Zellen und primordialer Keimbahnzellen ist in der Rabl-Konfiguration organisiert. DNA(DAPI) –Färbung (rot) beider Zelltypen im Mitosezyklus 14. **A.** Vergleich zwischen somatischen Zellen und primordialen Keimbahnzellen. Die intensive DAPI- Färbung markiert Heterochromatin. **B.** DAPI- intensiv gefärbtes Heterochromatin zwischen den Mitosezyklen 10 und 14 während der Ausbildung der Rabl- Konformation (Messbalken 1µm).

mit einer *Invader4*- Sonde). Bei der Färbung gegen das CID-Protein können signifikante Unterschiede zwischen den somatischen Zellen und den Keimbahnzellen nachgewiesen werden. Während bei den somatischen Zellkernen alle Zentromere in einem Fokus sind, werden in den Keimbahnzellen vier getrennte Foci (entsprechend der 4 Chromosomen von *Drosophila*) gefunden (Abb. 3.4). In den elongierten somatischen Zellen wird offensichtlich schon in den Blastodermkernen ein Chromozentrum ausgebildet. Untersuchungen der *kugelkern*- Mutante [*Df(3R)kuk15*, Brandt et al., 2006], bei der keine Elongation der Blastodermkerne erfolgt, zeigen allerdings ebenfalls getrennte Foci bei einer Antikörperfärbung gegen das CID- Protein (Abb. 3.5). Somit könnte auch die globuläre Zellkernform Ursache für die getrennten Foci sein.

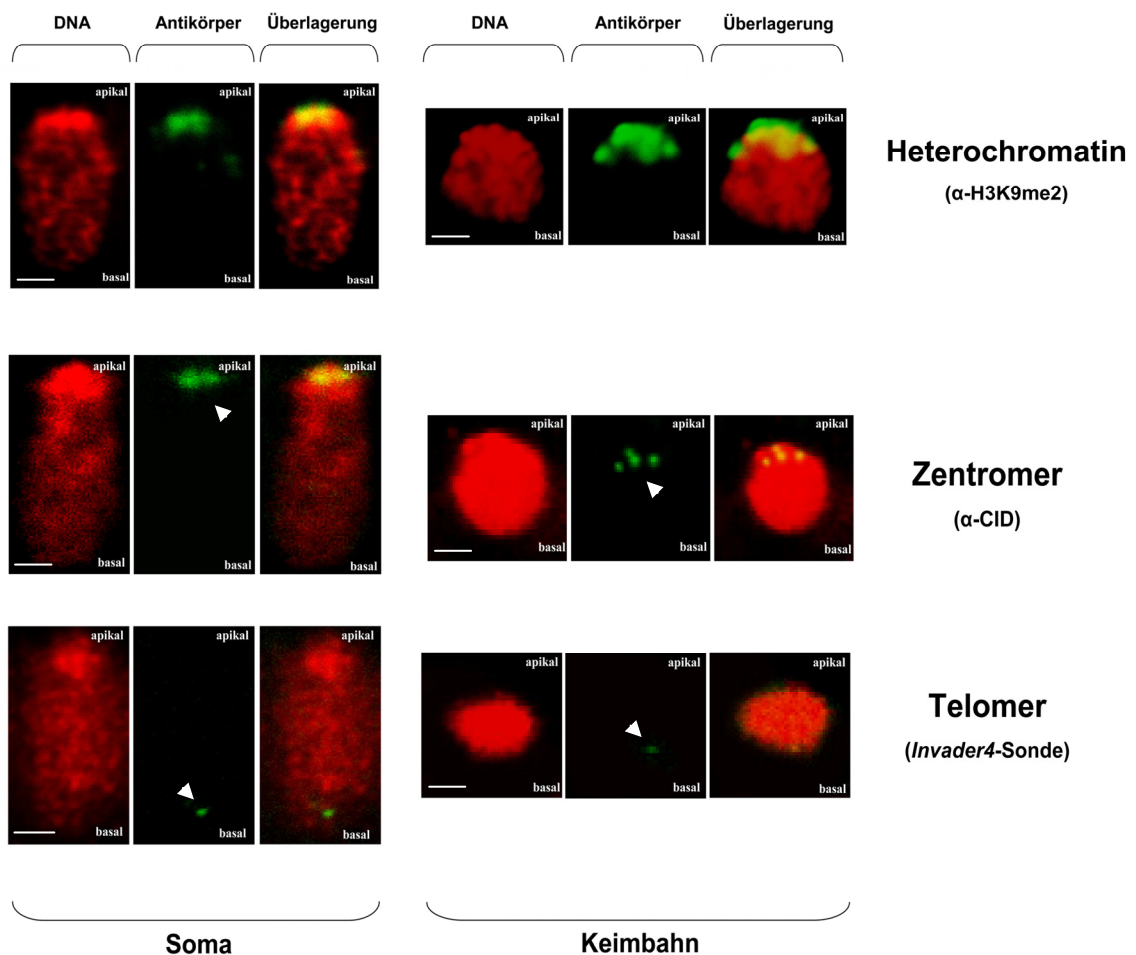


Abb.3.4. Nachweis der Rab1-Konfiguration in Soma- und Keimbahnzellen mittels Antikörperfärbung. DNA (DAPI) –(rot) und Antikörperfärbung (grün) beider Zelltypen im Mitosezyklus 14. Die intensive DAPI- Färbung korreliert in Soma und Keimbahn mit der heterochromatischen H3K9me2 Modifizierung. Die apikale Färbung gegen das CID- (*centromere identifier*) Protein zeigt im Gegensatz zum Soma in den PGC vier distinkte Punkte. Basal werden die Telomere in beiden Zelltypen durch eine *Invader4*- Sonde detektiert (Messbalken 2µm).

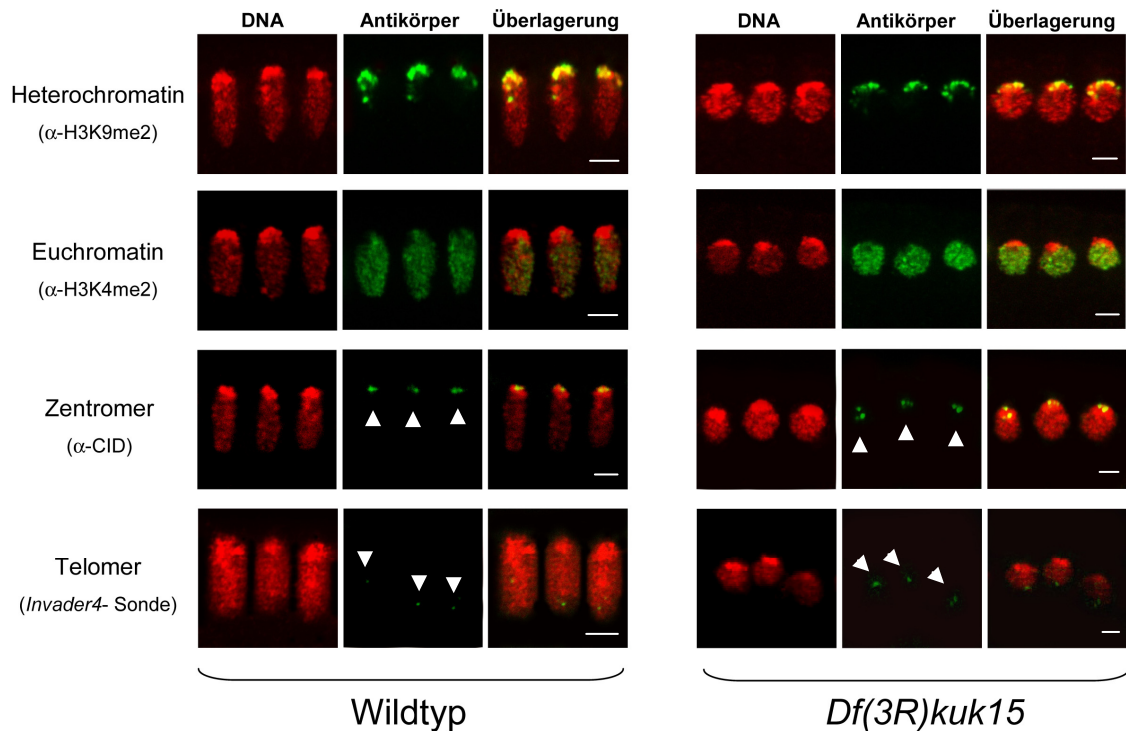


Abb.3.5. Die Kernelongation ist für die Ausbildung der Rabl- Konfiguration nicht notwendig. Dargestellt sind Blastodermzellen von Embryonen im Mitosezyklus 14. In der *kugelnkern-* Mutante [*Df(3R)kuk15*] wird auch die im Wildtyp gefundene Rabl- Konformation ausgebildet, obwohl keine Kernelongation stattfindet. Die apikale Färbung gegen das CID- (*centromere identifier*) Protein zeigt allerdings in der Mutante mehrere distinkte Punkte (DNA (DAPI) -rot; Antikörper bzw. FISH-Sondegrün; Messbalken 3µm).

3.1.2 Histonmodifizierungen in primordialen Keimbahnzellen unterscheiden sich signifikant von denen der somatischen Blastodermzellen

Nach der Analyse der generellen Topologie des Interphase-Chromatins in primordialen Keimbahnzellen (PGC) erfolgte die genauere immunzytologische Untersuchung verschiedenener eu- und heterochromatischer Histonmodifikationen. Bis auf H3K4me2 und H3K4me3, die nur sehr schwach oder gar nicht gefunden werden, sind alle Modifizierungen auch im Chromatin der PGC nachweisbar (Abb.3.6 - 3.11). Diese schwachen bzw. nicht vorhandenen Färbungen für H3K4me2 und H3K4me3 in den primordialen Keimbahnzellen (Abb. 3.6) korrelieren mit der sog. transkriptionellen *Quiescence* der PGC. Beide Modifizierungen werden in *Drosophila* mit transkriptioneller Aktivität in Verbindung gebracht (Rudolph et al., 2007; Kouzarides 2002; Gerber und Shilatifard 2003; Hampsey und Reinberg 2003). Im Gegensatz zu H3K4me2 und H3K4me3 ist H3K4me1 in gleichem Maße in somatischen und Keimbahnzellen sowohl im Eu- als auch im Heterochromatin zu sehen (Abb. 3.6).

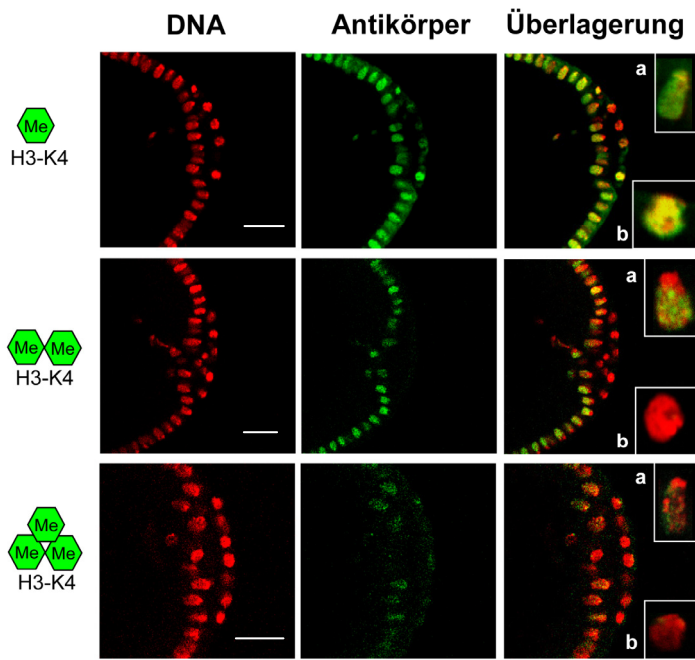


Abb.3.6. H3K4 Methylierung in somatischen und Keimbahnzellen. DNA (DAPI) –(rot) und Antikörperfärbung (grün) im Mitosezyklus 14. H3K4me1 wird in Soma und Keimbahn im Eu- und Heterochromatin etabliert. H3K4me2 und H3K4me3 zeigen in den Blastodermzellen eine euchromatische Verteilung und sind in den PGC kaum detektierbar (a. vergrößerte Blastodermzelle, b. vergrößerte PGC; Messbalken 20 µm).

Generell wird die Monomethylierung der untersuchten Histon-Modifizierungen H3K4, H3K9, H3K27 und H3K36 in somatischen und Keimbahnzellen in beiden Chromatinzuständen detektiert (Abb. 3.6, 3.8, 3.9, 3.11). Dies spricht für eine doppelte Indizierung des Heterochromatins. H3K4me2 und H3K4me3 sind in Zyklus 14 Embryonen in den somatischen Zellen im gesamten basalen euchromatischen Bereich zu finden (Abb. 3.6). Wie Abbildung 3.7 zeigt, kann in den PGC H3K4me3 nur an distinkten Stellen (Pfeilspitzen) detektiert werden, die wahrscheinlich transkriptionsaktive Bereiche in der DNA repräsentieren. Dies ist ein Hinweis, dass

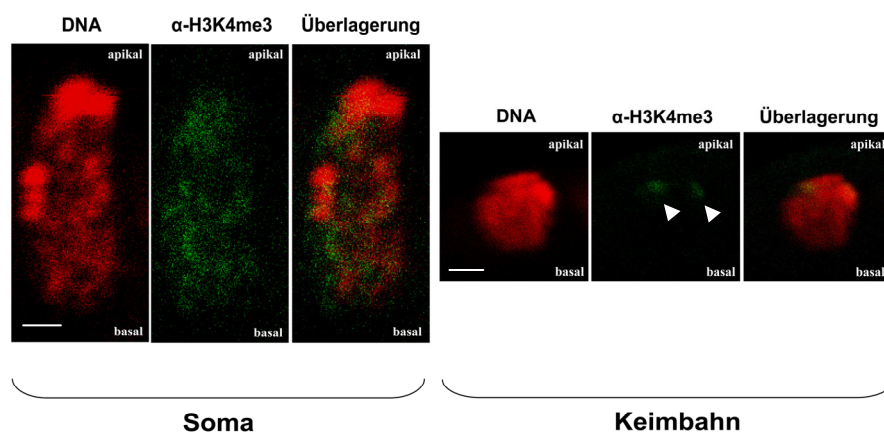


Abb.3.7. Unterschiede in der H3K4 Trimethylierung in somatischen und Keimbahnzellen im Mitosezyklus 14. Vergrößerte Blastoderm- und primordiale Keimbahnzelle. In den Blastodermzellen zeigt H3K4me3 eine euchromatische Verteilung. In den PGC sind nur zwei distinkte Punkte (Pfeilspitzen) detektierbar (rot- DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 2µm).

keine absolute transkriptionelle Inaktivität vorliegt. Des Weiteren ist in den somatischen Zellen der Embryonen des Mitosezyklus 14 auch ein Unterschied in der Quantität der verschiedenen H3K4 Methylierungsstufen zu erkennen (Abb. 3.6). Die intensivste Färbung wird bei H3K4me1 detektiert, welche auch in den PGC eine signifikante Färbung zeigte. Die schwächste Färbung wird für H3K4me3 gefunden.

Neben der H3K4 Methylierung stellt H3K36 eine weitere euchromatische Histon-Modifikation dar, die ebenfalls untersucht wurde (Abb. 3.8). H3K36me2 und H3K36me3 werden, ähnlich der H3K4 Methylierung, nur im Euchromatin gefunden. Dagegen kann H3K36me1 in beiden Chromatinzuständen detektiert werden (Abb. 3.8). Im Gegensatz zu den H3K4 Methylierungen werden jedoch alle H3K36 Methylierungen in Blastodermzellen und PGC nachgewiesen (Abb. 3.8). In den PGC wird sogar eine signifikant stärkere Färbung für H3K36me2 gefunden. In den Blastodermzellen sind keine Unterschiede im Ausmaß der Färbung für alle 3 Methylierungsstufen von H3K36 zu erkennen (Abb. 3.8).

Neben H3K36me2 zeigen auch H3K27me2 und H3K27me3 in den Polzellen eine intensivere Färbung (Abb. 3.9). In Abbildung 3.10 ist am Beispiel von H3K27me3 jedoch erkennbar, dass sich in beiden Zelltypen nicht die Verteilung der Modifizierungen unterscheidet, sondern nur die Quantität.

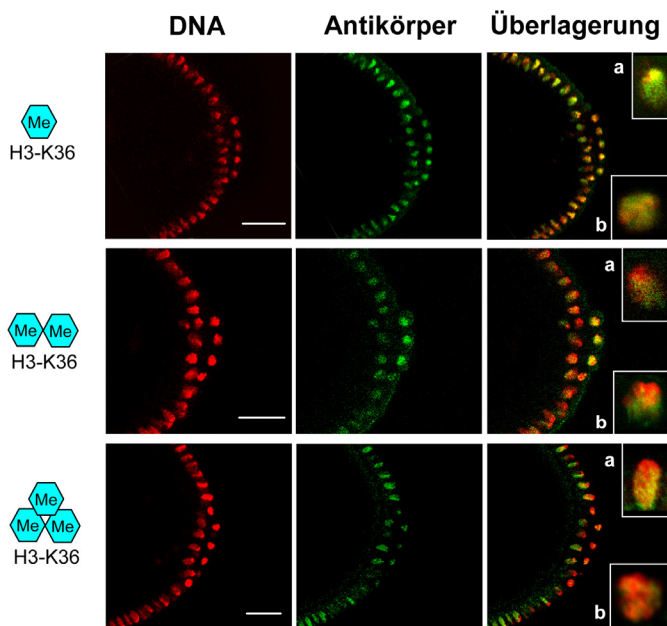


Abb.3.8. H3K36 Methylierungen in somatischen und Keimbahnzellen. DNA (DAPI) –(rot) und Antikörperfärbung (grün) im Mitosezyklus 14. Die Etablierung von H3K36me1 erfolgt in Soma und Keimbahn in beiden Chromatinzuständen. H3K36me2 und H3K36me3 sind in Blastodermzellen und PGC nur im Euchromatin detektierbar. Eine signifikantere Färbung der PGC zeigt die Dimethylierung (a. vergrößerte Blastodermzelle, b. vergrößerte PGC; Messbalken 20 µm)

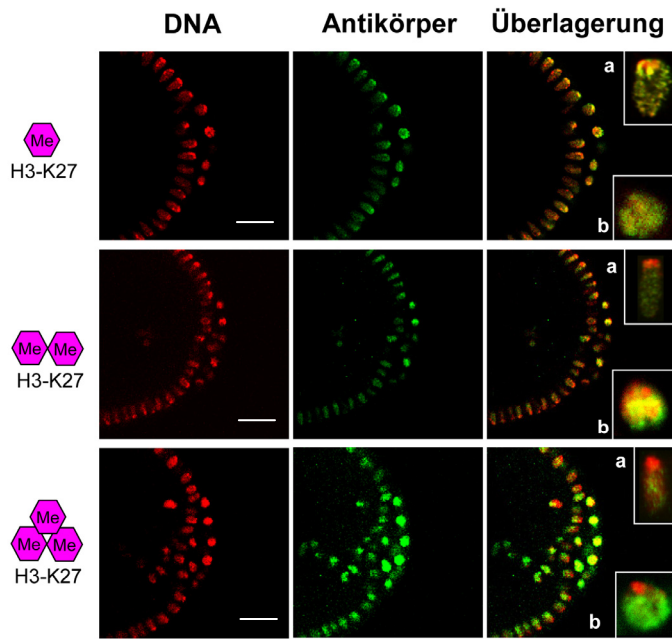


Abb.3.9. H3K27 Methylierungen in somatischen und Keimbahnzellen. DNA (DAPI) – (rot) und Antikörperfärbung (grün) im Mitosezyklus 14. H3K27me1 wird in Soma und Keimbahn gleichermaßen in Eu- und Heterochromatin gefunden. H3K27me2 und H3K27me3 zeigen eine euchromatische Verteilung. In den PGC ist für H3K27me2 und H3K27me3 eine stärkere Färbung detektierbar als im Soma (a. vergrößerte Blastodermzelle, b. vergrößerte PGC; Messbalken 20 μ m).

Die ebenfalls untersuchte H3K9 Di- und Trimethylierung zeigt eine erwartungsgemäße Färbung im apikalen heterochromatischen Bereich, wobei keinerlei Unterschiede zwischen Soma- und Keimbahnzellen zu sehen sind (Abb. 3.11). H3K9me1 ist wiederum in beiden Chromatinzuständen detektierbar. Eine besondere Stellung nimmt H3K9me3 ein. Obwohl im Zyklus 14 keine Unterschiede in der Färbeintensität zwischen Soma und Keimbahn gefunden werden (Abb. 3.11), zeigt sich eine zeitlich versetzte Etablierung von H3K9me3 in beiden Zelltypen (Abb. 3.12). Im Mitosezyklus

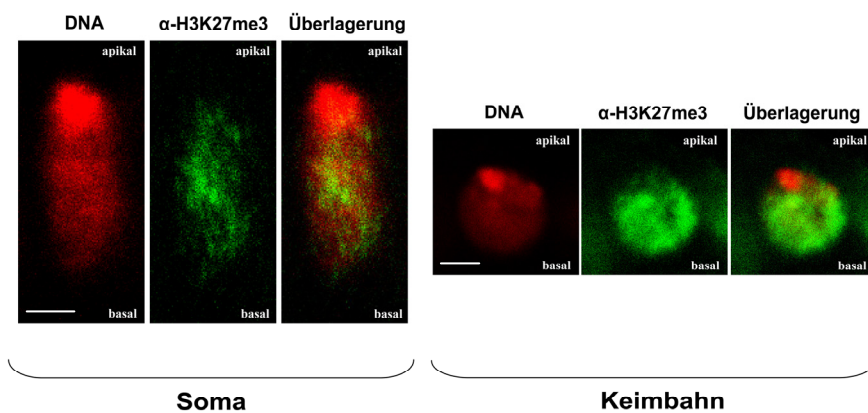


Abb.3.10: Verteilung der H3K27 Trimethylierung in somatischen und Keimbahnzellen im Mitosezyklus 14. Vergrößerte Blastoderm- und primordiale Keimbahnzelle. Die H3K27 Trimethylierung ist zwar in stärkerem Maße in den primordialen Keimbahnzellen etabliert, zeigt aber dennoch keine Unterschiede in der Verteilung (rot- DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 2 μ m).

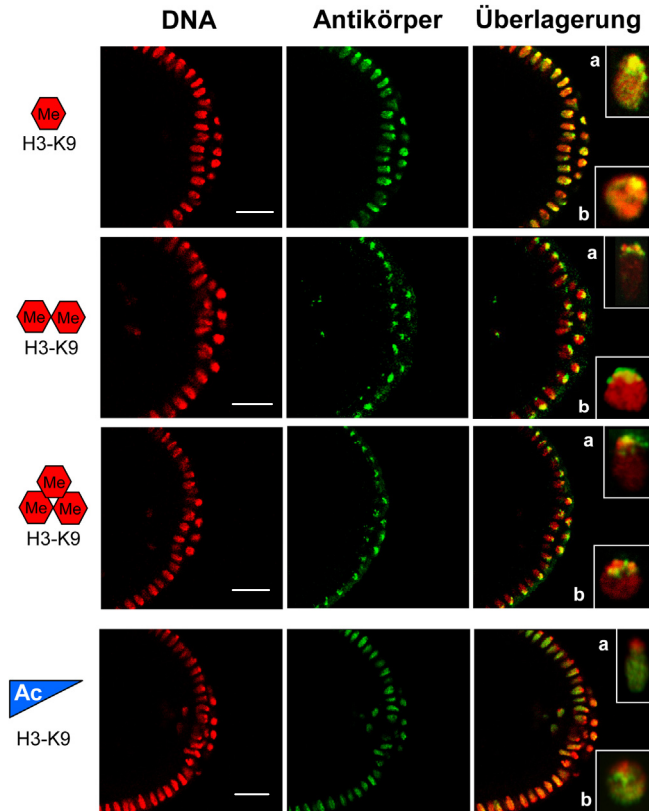


Abb.3.11. H3K9 Modifikationen in somatischen und Keimbahnzellen. DNA (DAPI) –(rot) und Antikörperfärbung (grün) im Mitosezyklus 14. H3K9me1 ist im Eu- und Heterochromatin detektierbar. Die Etablierung von H3K9me2 und H3K9me3 erfolgt ausschliesslich in den heterochromatischen Bereichen. H3K9ac zeigt eine eindeutige euchromatische Verteilung. Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen Soma und Keimbahn (a. vergrößerte Blastodermzelle, b. vergrößerte PGC; Messbalken 20 μ m).

11 ist H3K9me3 erstmals in den primordialen Keimbahnzellen detektierbar, jedoch erst 2 Zyklen später auch in den somatischen Blastodermzellen.

Neben der Heterochromatin- assoziierten H3K9 Di- und Trimethylierung kann auch eine Acetylierung von H3K9 als euchromatische Modifikation vorliegen. Beide Modifizierungen schließen sich jedoch aus. Daher zeigt sich die Acetylierung in den

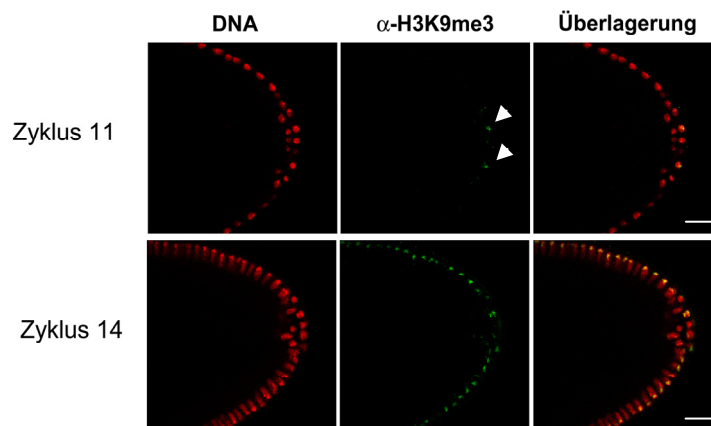


Abb.3.12. Zeitlich versetzte Etablierung von H3K9me3 in somatischen und Keimbahnzellen am posterioren Pol. Diese Modifikation wird bereits in Mitosezyklus 11 ausschliesslich in den primordialen Keimbahn-Stammzellen detektiert (Pfeilspitzen). Erst ab Mitosezyklus 13 ist H3K9me3 auch in den heterochromatischen Bereichen der somatischen Zellen zu sehen (rot- DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 20 μ m).

somatischen Blastodermzellen im Gegensatz zu H3K9me2 und H3K9me3 nur in den euchromatischen Bereichen. Des Weiteren können bei der Acetylierung keine Unterschiede zwischen Soma und Keimbahn detektiert werden (Abb. 3.11).

Zusammenfassend zeigen sich signifikante Unterschiede im Chromatinaufbau zwischen den somatischen Blastodermzellen und primordialen Keimbahnstammzellen: (1) eine intensivere Färbung für H3K27me2 und me3 sowie H3K36me2 in den PGC, (2) eine zeitlich versetzte Etablierung von H3K9me3 in Soma und Keimbahn, (3) das Fehlen von H3K4me2 und die sehr schwache Färbung für H3K4me3 in den PGC. Obwohl die PGC weitestgehend transkriptionell inaktiv sind, zeigen sie aber dennoch verschiedene euchromatische Histonmodifikationen in gleichem oder im Falle von H3K36me2 stärkerem Maße als die transkriptionell aktiven somatischen Blastodermzellen. Die Ergebnisse der Färbungen sind in Tabelle 3.1 nochmals zusammengefasst.

Eine schematische Darstellung der Ergebnisse für die immunzytologischen Färbungen an Wildtyp-Embryonen ist in Abbildung 3.13 gezeigt. Neben der Analyse der Histonmodifizierungen im Zyklus 14 erfolgte auch eine genauere Untersuchung zum Zeitpunkt der Etablierung der jeweiligen Modifikationen (Abb. 3.13A). Dabei ist eine deutliche Korrelation zwischen dem Beginn der Bildung der Rab1-Konfiguration ab Mitosezyklus 10 und dem Auftreten von trimethylierten Histonen zu sehen (Abb. 3.13B). Während H3K27me1, H3K36me1 und H3K36me2 vom ersten Zyklus an detektiert werden können, werden die Trimethylierungen erst ab Zyklus 10/ 11 (H3K36me3 und H3K4me3) bzw. Zyklus 13 (H3K9me3 und H3K27me3) nachgewiesen. H3K4me2 und H3K4me3 können wie alle Methylierungsstufen von H3K9 erst ab Zyklus 11 mittels Antikörperfärbung sichtbar gemacht werden, wobei die bereits erwähnte Differenz in der Etablierung von H3K9me3 in Soma und Keimbahn besonders bemerkenswert ist (Abb. 3.13).

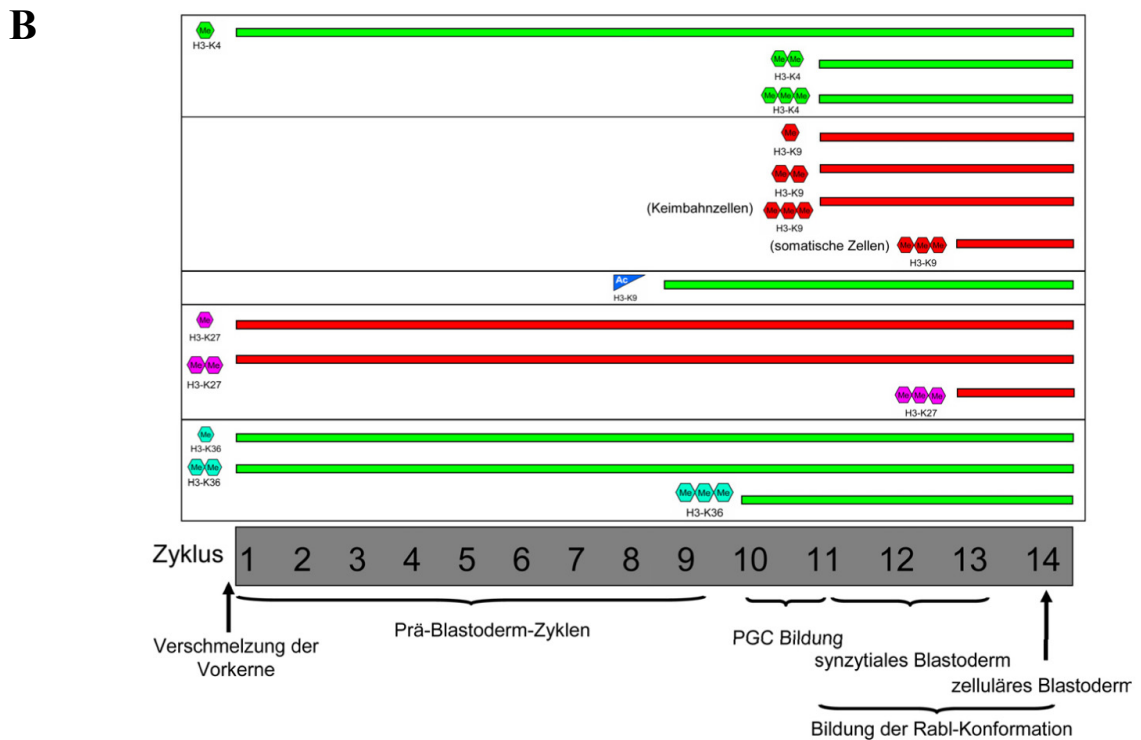
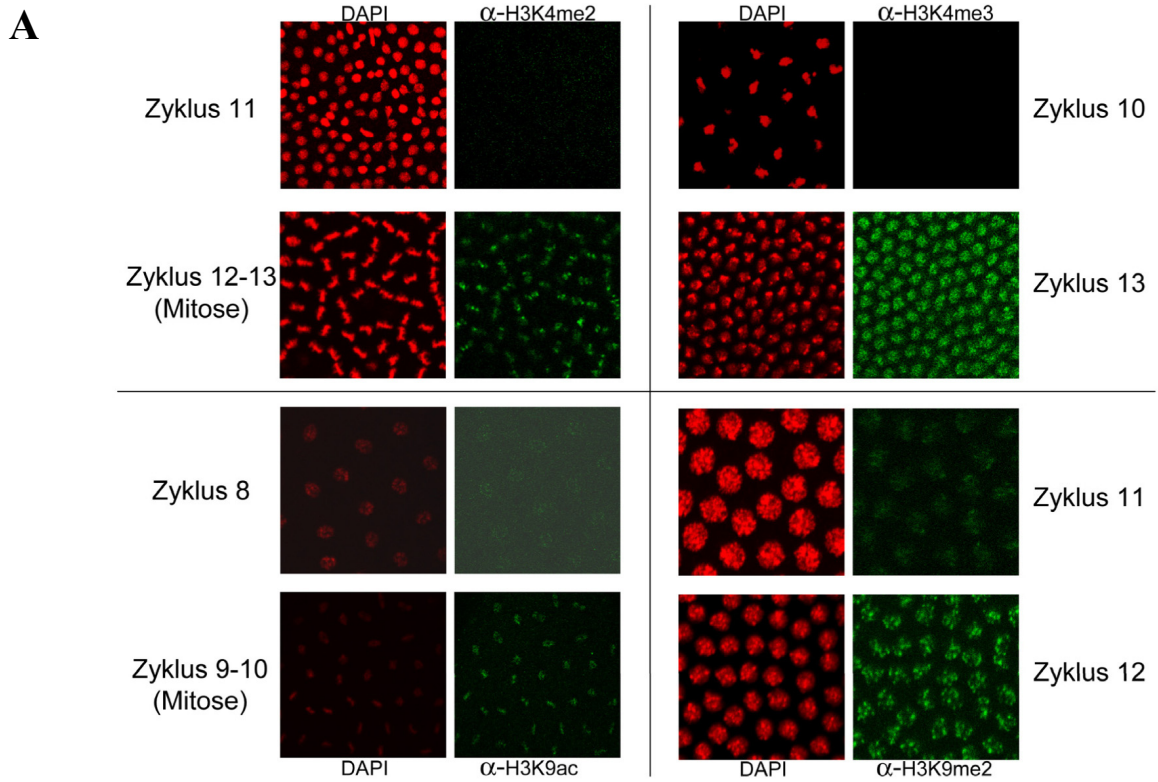


Abb.3.13. Chromatin- Modifikationen in der frühen Embryogenese von *Drosophila*. **A.** Antikörperfärbungen von somatischen Kernen in verschiedenen Zyklen während der frühen Embryogenese. H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac und H3K9me2 sind zu unterschiedlichen Zeiten erstmals nachweisbar. **B.** Schema der Histonmodifizierungen und deren Etablierung während der ersten 14 Entwicklungszyklen von *Drosophila* (rot- DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; roter Balken heterochromatische Modifizierung, grüner Balken euchromatische Histonmodifizierung).

3.1.3. In primordial Keimbahnzellen werden keine Chromozentren gebildet

Während der Gastrulation, die nach dem Mitosezyklus 14 beginnt, erfolgt die Invagination, die die primordialen Keimbahnzellen mit den somatischen Zellen der posterioren Mitteldarmanlage passiv ins Körperinnere bringt. Von dort transmigrieren sie aktiv das Darmepithel und wandern ins benachbarte Mesoderm, wo sie mit den somatischen gonadalen Vorläuferzellen (SGPs) die Gonaden bilden. Mit Hilfe des nur in Keimbahnzellen exprimierten und im Zytoplasma lokalisierten VASA-Proteins lassen sie sich auch während der Wanderung verfolgen und von somatischen Zellen differenzieren (Abb. 3.14).

Im Unterschied zu den somatischen Blastodermzellen werden in den Polzellen (PGC) keine Chromozentren gebildet, wie eine Färbung gegen das CID-Protein im Mitosezyklus 14 nachweist (Abb. 3.4). Bei einer Antikörperfärbung gegen H3K9me2 in den Gonaden von späten Embryonen im Entwicklungsstadium 14 zeigte bereits die DNA-Färbung eine Trennung der Homologenpaare in den Keimbahnzellen (Abb. 3.15). In der Färbung gegen die heterochromatische Histonmodifikation H3K9me2 sind vier separate Spots erkennbar. Dies entspricht der Zahl der Homologenpaare und zeigt, dass

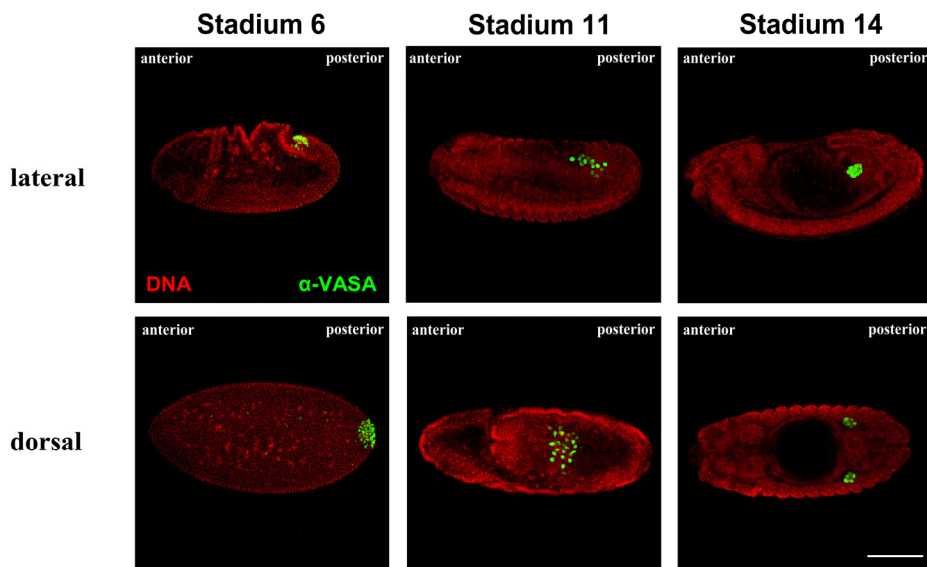


Abb.3.14. Wanderung der primordialen Keimbahnzellen nach Mitosezyklus 14 (Entwicklungsstadium 5). Antikörperfärbung (grün) gegen das keimbahnspezifische VASA- Protein zur Verfolgung der Wanderung der PGC während der Gastrulation. Laterale und dorsale Ansicht des Embryos in Stadium 6, 11 und 14 (rot-DNA; grün-VASA; Messbalken 100 μ m).

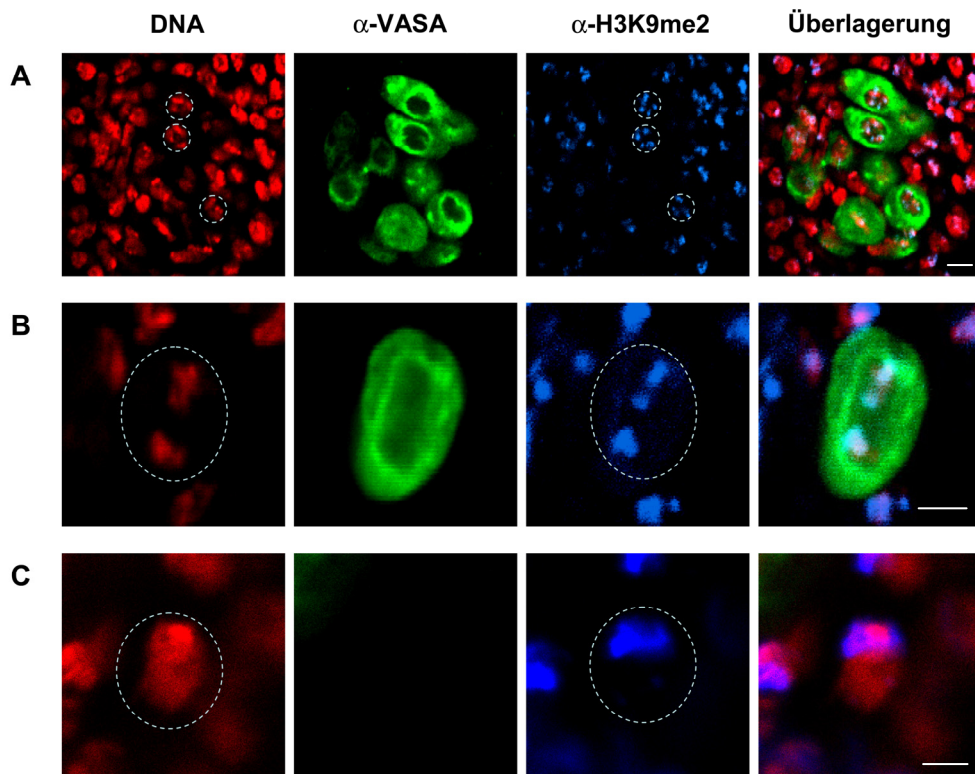


Abb.3.15. In den Keimbahnzellen der Gonaden werden keine Chromozentren gebildet. Gonaden (A), bzw. vergrößerte Keimbahnzelle (B) und vergrößerte somatische Zelle (C) von Embryonen im Entwicklungsstadium 14. Antikörperfärbung gegen das keimbahnspezifische VASA-Protein (grün) zur Unterscheidung von somatischen und Keimbahnzellen. **A.** Sowohl die DNA (DAPI)-Färbung (rot) als auch die H3K9me2 Färbung (blau) zeigt 4 separate Spots. **B.** Vergrößerte Aufnahme einer Keimbahnzelle. **C.** Vergrößerung einer somatischen Zelle ohne VASA-Färbung und ohne Separierung der Chromosomen (Messbalken 2,5 μ m).

auch in PGC die Paarung der vier Chromosomenpaare von *Drosophila* auftritt (Abb. 3.15A und B). Benachbarte somatische Zellen, die kein VASA-Protein exprimieren, differenzieren Chromozentren, was sowohl in der DNA- als auch in der Antikörperfärbung erkennbar ist (Abb. 3.15C). Die Separierung der Homologenpaare in den Keimbahnzellen konnte bei einer weiteren Analyse der ebenfalls heterochromatischen Modifizierung H3K27me3 nicht beobachtet werden, da hierbei nicht die Chromozentren, sondern die Chromosomenarme gefärbt waren (Abb. 3.16). Aufgrund der nicht ausreichenden Auflösung lassen sich jedoch keine einzelnen Arme unterscheiden. In den PGC ist jedoch eine intensivere H3K27me3 Färbung zu erkennen, die in den umliegenden somatischen Zellen etwas schwächer ist (Abb. 3.16B und C). In den somatischen Zellen können zahlreiche, über das gesamte Genom verteilte Foci detektiert werden (Abb. 3.16C).

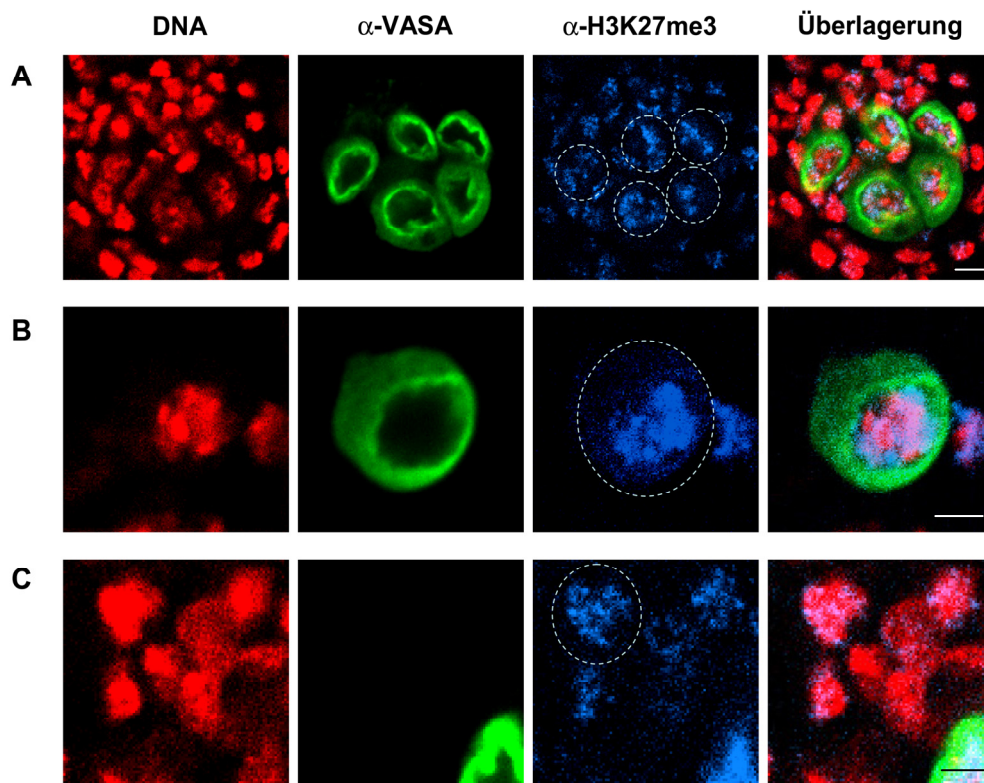


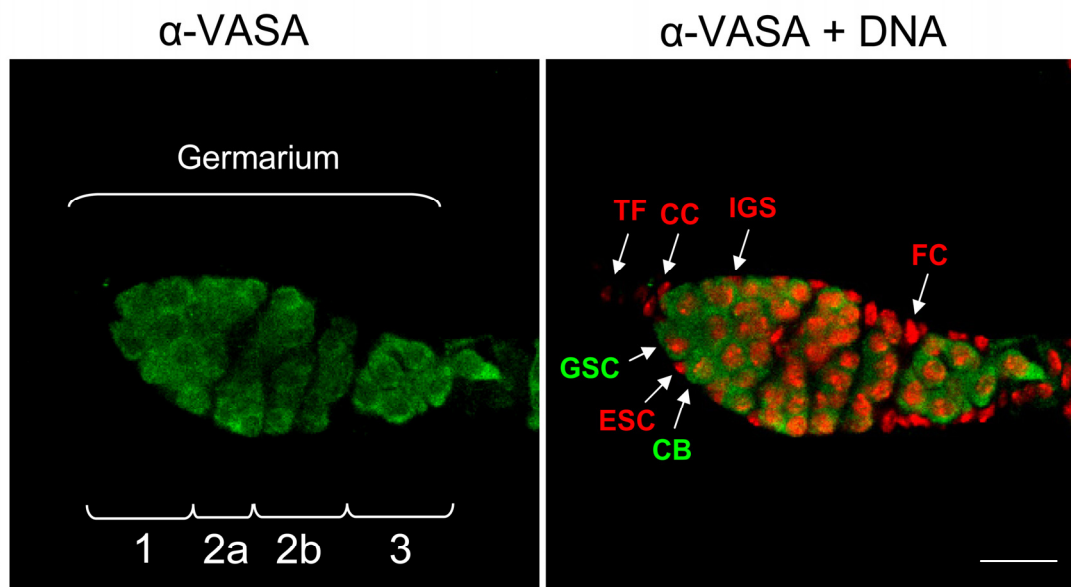
Abb.3.16. H3K27me3 in den Gonaden später Embryonen. Embryonen im Entwicklungsstadium 14. Keimbahnspezifische VASA- Färbung (grün) zur Unterscheidung von somatischen und Keimbahnzellen. **A.** Gonade. **B.** Vergrösserte Aufnahme einer Keimbahnzelle. **C.** Vergrößerung einer somatischen Zelle ohne VASA-Färbung. Stärkere Färbung von H3K27me3 in den PGC (Messbalken 2,5µm).

3.1.4 Der Chromatinaufbau ovarialer Keimbahnstammzellen (GSC) zeigt wenige Unterschiede zu dem der PGC

Bei *Drosophila* bilden nach der Wanderung ca. 12 PGC zusammen mit den gonadalen Vorläuferzellen die weiblichen embryonalen Gonaden, die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Die Wanderung dieser Zellen lässt sich mit Hilfe eines Antikörpers gegen das keimbahnspezifische VASA-Proteins gut verfolgen. Während der larvalen Entwicklung teilen sich die primordialen Keimbahnzellen mehrmals, sodass sich in jedem Ovarium 60-110 PGC befinden (King 1970; Zhu und Xie 2003), die ihren potentiellen Stammzellcharakter bis zum Ende des 3. Larvenstadiums behalten. Von den 4 bis 7 PGC, die in jeder der 16 larvalen Ovariolen lokalisiert sind, entwickeln sich beim Übergang vom Larven- zum Puppenstadium 2 bis 3 zu ovarialen Keimbahnstammzellen (GSC).

Jedes *Drosophila*-Weibchen besitzt paarig angeordnete Ovarien, die aus jeweils 12- 16 Ovariolen bestehen. Am apikalen Bereich jeder Ovariolen befindet sich das Germarium, in dem die ovariolen Keimbahnstammzellen (GSC) in ihrer Nische lokalisiert sind und welches sich in verschiedene Abschnitte (1, 2a, 2b, 3, Abb. 3.17) einteilen lässt (King 1970). Am meisten apikal liegen die 8-10 Terminalfilamentzellen (TF), die dicht gepackt sind und an ihrem basalen Ende mit den 5-7 *Cap*-Zellen (CC oder CpC) in Verbindung stehen.

A



B

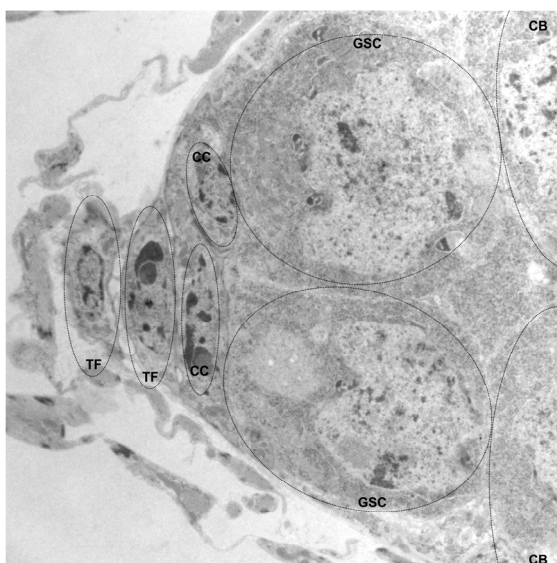


Abb.3.17. Die adulten Keimbahnstammzellen (GSC) und ihre Nische. Germarium mit den adulten Keimbahnstammzellen (GSC). **A.** Immunzytologische Aufnahme eines Germariums. Einteilung in verschiedene Abschnitte (1, 2a, 2b, 3). Antikörperfärbung gegen das Keimbahn-spezifische VASA-Protein (grün), DNA-Färbung mit DAPI (rot).
rechtes Bild: grüne Schrift – Keimbahnzellen (GSC, CB- Cystoblasten); rote Schrift - somatische Zellen (TF- Terminalfilamentzellen, CC- *Cap*- Zellen, IGS- *inner germarial sheath cells*, ESC-*escort stem cells*, FC- Follikelzellen; Messbalken 15 μ m). **B.** Elektronenmikroskopische Aufnahme der GSC.

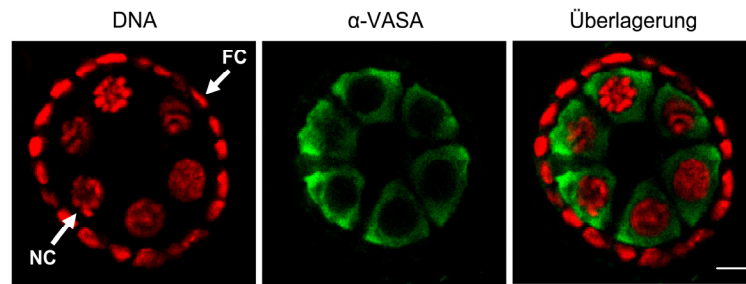


Abb.3.18. Frühe Eikammer in einem Wildtyp-Ovarium. Antikörperfärbung (grün) gegen das keimbahnspezifische VASA- Protein. Zwei verschiedene Zelltypen sind erkennbar: somatische Follikelzellen (FC) ohne VASA-Färbung und Nährzellen mit VASA- Färbung. Die Eizelle (nicht im Bild) zeigt auch VASA- Färbung. rot- DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 5µm.

Die GSC teilen sich kontinuierlich. Während eine Stammzelle in der Nische verbleibt und den Stammzellcharakter beibehält, differenziert sich die zweite Zelle zum Cystoblasten (CB). Dieser teilt sich noch viermal synchron wobei infolge einer unvollständigen Zytokinese letztlich eine 16 Zell-Zyste gebildet wird (King 1970). Nachdem diese von Follikelzellen (FC) eingeschlossen wurde, verlässt sie als eigenständige Eikammer das Germarium (Abb. 3.18). Im Rahmen dieser Arbeit sollte das wie bei den PGC nur ungenügend epigenetisch charakterisierte Chromatin der GSC mittels Antikörperfärbungen gegen verschiedene Histonmodifizierungen näher untersucht und mit dem Chromatinaufbau der PGC, die die Vorläufer der GSC dar-

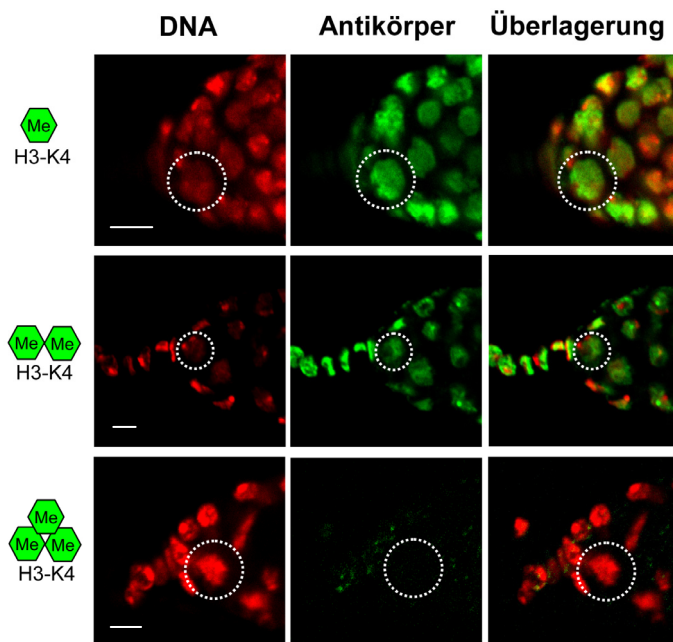


Abb.3.19. H3K4 Methylierungen im Germarium der Ovarien adulter *Drosophila*-Weibchen. H3K4me1 und H3K4me2 färben nur die euchromatischen Bereiche der Kerne. Es gibt keine Unterschiede zwischen somatischen Zellen (Terminalfilamentzellen und *Cap*-Zellen) und den Keimbahnzellen (GSC und Cystoblasten). H3K4me3 ist vom Germarium gänzlich ausgeschlossen und wird erst in späteren Eikammern detektierbar. Die GSC sind eingekreist. rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 5µm.

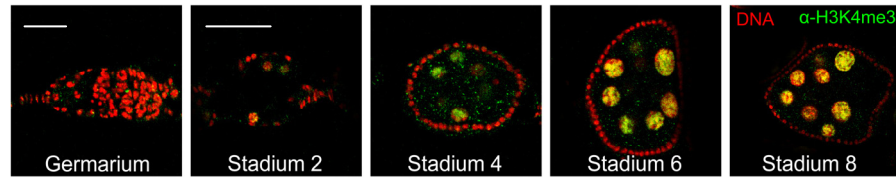


Abb.3.20. Etablierung der H3K4 Trimethylierung während der Oogenese im Ovarium adulter *Drosophila* Weibchen. H3K4me3 ist vom Germarium in somatischen Zellen und Keimbahnzellen ausgeschlossen. Erste Antikörperdetektionen sind ab der zweiten Eikammer (Stadium 2) möglich. Auch in späteren Eikammern (Stadium 4-8) ist eine fast vollständige Beschränkung auf die transkriptionell sehr aktiven Nährzellen detektierbar (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 20 μm).

stellen, verglichen werden. In den Germarien können keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Histonmodifizierungen zwischen Soma (Terminalfilamentzellen, *Cap*-Zellen) und Keimbahn (GSC, Cystoblasten) detektiert werden. Die in den PGC in der frühen Embryogenese für H3K4me2, H3K4me3 (nicht bzw. kaum in PGC), H3K27me2, H3K27me3 und H3K36me2 (erhöht in PGC) nachgewiesenen Unterschiede sind in den GSC nicht mehr vorhanden. Es konnten auch keine globalen epigenetischen Unterschiede zwischen den undifferenzierten, pluripotenten adulten Keimbahnstammzellen (GSC) und den differenzierten, aus den GSC durch Teilung hervorgegangenen Cystoblasten im Bezug auf die untersuchten Modifizierungen detektiert werden (Abb. 3.19 – 3.23).

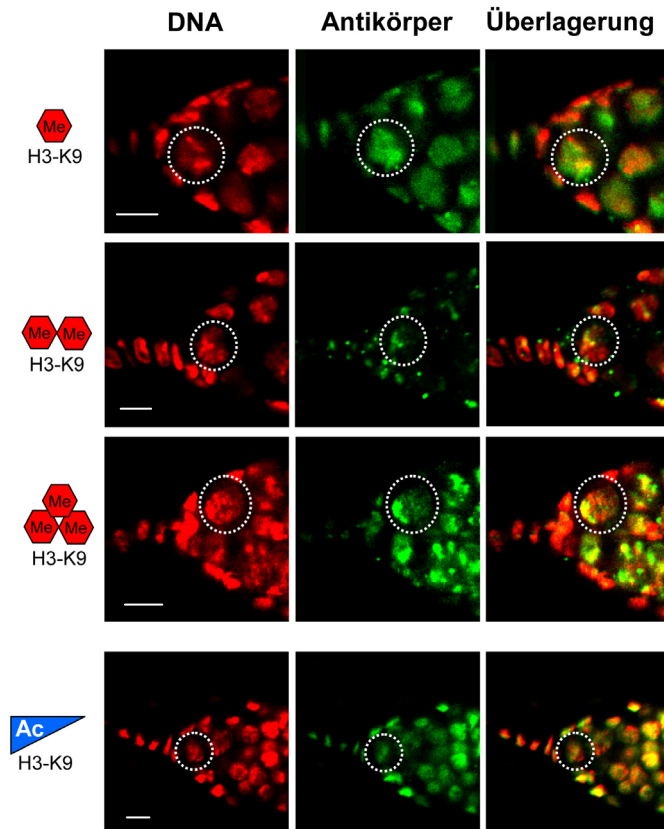


Abb.3.21. H3K9 Modifizierungen im Germarium der Ovarien adulter *Drosophila*-Weibchen. H3K9me1 und H3K9ac sind uniform im Kern detektierbar, H3K9me2 und H3K9me3 färben heterochromatische Bereiche. Zwischen somatischen (Terminalfilament- und *Cap*-Zellen) und Keimbahnzellen (GSC und Cystoblasten) werden keine Unterschiede gefunden. Die GSC sind eingekreist. rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün-Antikörper; Messbalken 5 μm .

Für H3K4me2 läßt sich ein signifikanter Unterschied zwischen PGC und GSC erkennen. Diese Histonmodifizierung ist in den GSC abundant (Abb. 3.19) während H3K4me2 in den PGC früher Embryonen aufgrund der transkriptionellen *Quiescence* vollständig fehlte (Abb. 3.6). H3K4me3 wird in Germarien weder in den somatischen noch in den Keimbahnzellen gefunden und ist erst in späteren Eikammern vorwiegend in den transkriptionell sehr aktiven Nährzellen detektierbar (Abb. 3.20).

Sowohl H3K9ac als auch H3K9me1 sind uniform im Kern der GSC im Wildtyp-Germarium detektierbar (Abb. 3.21). H3K9me2 zeigt hingegen nur eine distinkte Färbung heterochromatischer Bereiche der Kerne, die auch eine intensivere DAPI-Färbung aufweisen. Für H3K9me3 ist diese distinkte Färbung ebenfalls nachweisbar. Allerdings scheinen auch die euchromatischen Bereiche H3K9me3 Färbung zu zeigen (Abb. 3.21).

Die mit einer Inaktivierung von aktiven Genen in Verbindung stehende H3K27 Methylierung zeigt in allen 3 Methylierungsstufen eine homogenere Verteilung über den gesamten Kern der adulten pluripotenten Keimbahnstammzellen (Abb. 3.22). Zwischen den verschiedenen H3K27 Methylierungsstufen in den GSC sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

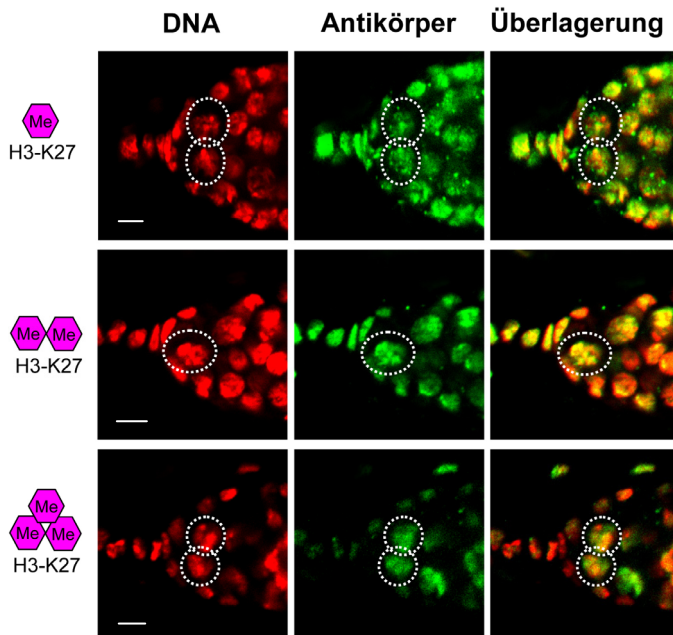


Abb.3.22. H3K27 Methylierungen im Germarium der Ovarien adulter *Drosophila*-Weibchen. H3K27me1, H3K27me2 und H3K27me3 sind vorrangig in den euchromatischen Bereichen der Kerne detektierbar. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen somatischen Zellen (Terminalfilamentzellen und *Cap*-Zellen) und den Keimbahnzellen (GSC und Cystoblasten) nachweisbar. Die GSC sind eingekreist. rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün-Antikörper; Messbalken 5µm.

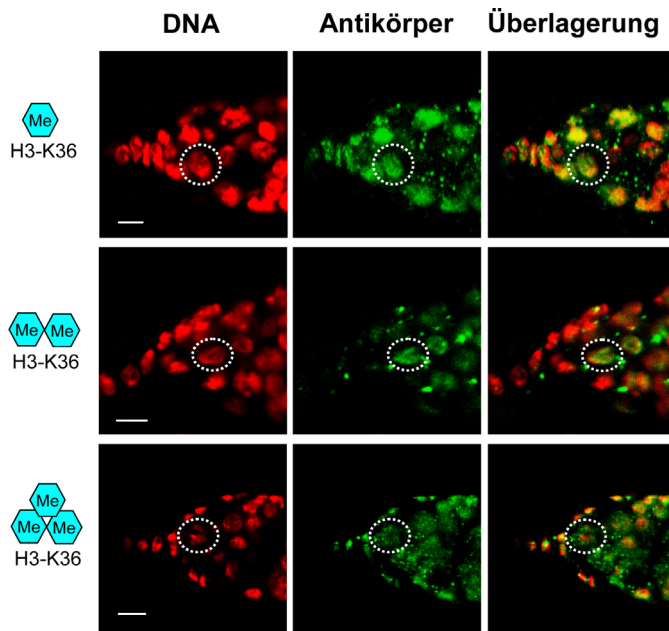


Abb.3.23. H3K36 Methylierungen im Germarium der Ovarien adulter *Drosophila*-Weibchen. H3K36me1, H3K36me2 und H3K36me3 sind in verschiedener Stärke im Germarium detektierbar. Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen somatischen Zellen (Terminalfilamentzellen und *Cap*-Zellen) und den Keimbahnzellen (GSC und Cystoblasten). Die GSC sind eingekreist. rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün-Antikörper; Messbalken 5 μ m.

Auch die euchromatischen Modifizierungen H3K36me1, H3K36me2 und H3K36me3 sind in den GSC in unterschiedlicher Quantität detektierbar (Abb. 3.23). Das stärkste Antikörpersignal wird für die Monomethylierung gefunden, die über den gesamten Kern verteilt ist. Etwas schwächer, aber ebenfalls im gesamten GSC-Kern detektierbar ist die H3K36 Dimethylierung. Sehr punktuell und diffus ist die Antikörperfärbung für H3K36me3 (Abb. 3.23).

Aufgrund der umfassenden Analysen an PGC und der sich im Laufe der Entwicklung daraus differenzierenden GSC lassen sich im Bezug auf die untersuchten Histonmodifizierungen Gemeinsamkeiten und Unterschiede im Chromatinaufbau feststellen. Das Chromatin beider Keimbahnstammzellen ist ähnlich, aber keinesfalls identisch. Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse zeigt Tabelle 3.1.

Nach der Analyse verschiedener Histonmodifizierungen in primordialen und adulten Keimbahnstammzellen sollte in einem weiteren Schritt geklärt werden, welche der bekannten Chromatinfaktoren diese Modifizierungen in der Keimbahn kontrollieren. Weiterhin wurde untersucht, welche Auswirkungen bei einem Verlust dieser Funktionen für die weitere Entwicklung der Keimbahn resultieren. Es wurden die bereits bekannten somatischen Chromatinfaktoren SU(VAR)3-9, dSETDB1 (*eggless*), TAIMAN, HP1 und E(Z) im Bezug auf ihre Funktion in der Keimbahn analysiert. Neben hypomorphen [*Df(2L)tai2*] und Null-Allelen [*Su(var)3-9⁰⁶*, *egg¹⁴⁷³* {dSETDB1}] wurden in einem UAS/GAL4-basierten System (TRiP consortium, Boston) mittels

RNAi spezifisch die Gene, die für dSETDB1 [*eggless*], HP1 [*Su(var)2-5*] und E(Z) [*E(z)*] kodieren, in der Keimbahn herunterreguliert.

Tabelle 3.1. Histonmodifizierungen in primordialen und ovariellen Keimbahnstammzellen im Vergleich zu somatischen Zellen

Histon-Modifizierung		frühe Embryogenese		Ovarien adulter Weibchen	
		Blastodermzelle	PGC	GSC	Cystoblast
H3K4me1	EU	+	+	+	+
H3K4me2	EU	+	-	+	+
H3K4me3	EU	+	-	-	-
H3K9me1	HET	+	+	+	+
H3K9me2	HET	+	+	+	+
H3K9me3	HET	+	+	+	+
H3K9 acetyl	EU	+	+	+	+
H3K27me1	HET	+	+	+	+
H3K27me2	HET	+	++	+	+
H3K27me3	HET	+	++	+	+
H3K36me1	EU	+	+	+	+
H3K36me2	EU	+	++	+	+
H3K36me3	EU	+	+	+	+

		Soma	Keimbahn	Keimbahn	Soma
--	--	------	----------	----------	------

EU- Euchromatin; HET- Heterochromatin

- keine Färbung ; + normale Färbung ; ++ starke Färbung; rote Schrift - Unterschiede

3.1.5 Die KMTasen SU(VAR)3-9 und dSETDB1 kontrollieren entwicklungsspezifisch die H3K9 Methylierung in somatischen und Keimbahnzellen

Die Lysine der N- terminalen Enden der Histone können mono-, di- oder trimethyliert werden (Santos- Rosa et al., 2002; Peters et al., 2003). Eine Kombination der verschiedenen Modifizierungen etabliert entweder eu- oder heterochromatische Chromatinzustände (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003; Schotta et al., 2004; Ebert et al., 2004). Die Methylierung am Lysin 4 kennzeichnet euchromatische Chromatinzustände, das Heterochromatin und Gen- *Silencing* ist mit H3K9 Methylierungen verbunden (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001). Diese Methylierungen werden von Histon-Methyltransferasen (KMTasen) vermittelt, die in der Lage sind, Methylgruppen von SAM (Donor) spezifisch auf die Lysine der Histone zu übertragen. In *Drosophila* sind vor allem SU(VAR)3-9 und dSETDB1 als H3K9-spezifische Methyltransferasen gut charakterisiert. Für beide konnte eine eindeutige Funktion in polytären Chromosomen der larvalen Speicheldrüsen nachgewiesen

werden. Dabei vermittelt SU(VAR)3-9 die Di- und Trimethylierung im Chromozentrum (Schotta et al., 2002; Ebert et al., 2004; Ebert et al., 2006), während dSETDB1 H3K9me1 und H3K9me2 in einigen euchromatischen Banden und H3K9me2 im 4. Chromosom katalysiert (Seum et al., 2007; Tzeng et al., 2007). Weiterhin ist dSETDB1 essentiell für Transgen-*Silencing* im 4. Chromosom (Seum et al., 2007). Beide Proteine besitzen eine SET-Domäne, die nach den 3 *Drosophila*-Genen (S*u(var)3-9*, E*(z)* und t*riThorax*) benannt ist (Tschiersch et al., 1994), bei denen diese Domäne erstmals beschrieben wurde. Dabei besitzt aber die SET-Domäne von dSETDB1 eine Besonderheit, da sie wie beim menschlichen homologen SETDB1 zweigeteilt und gabelförmig angeordnet ist, was bei *Drosophila* einzigartig ist (Clough et al., 2006). Obwohl die Funktionen beider H3K9-spezifischen Methyltransferasen in den polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila* gut charakterisiert sind, ist nichts über ihre Funktionen in frühen Embryonalstadien und in der Keimbahn bekannt. Daher wurden zunächst Embryonen der Nullallele *Su(var)3-9⁰⁶* und *egg¹⁴⁷³* (dSETDB1) im Mitosezyklus 14 im Bezug auf die H3K9 Methylierungen vergleichend untersucht. Als Referenz diente der Wildtyp. Das Allel *Su(var)3-9⁰⁶* ist homozygot lebensfähig, sodass

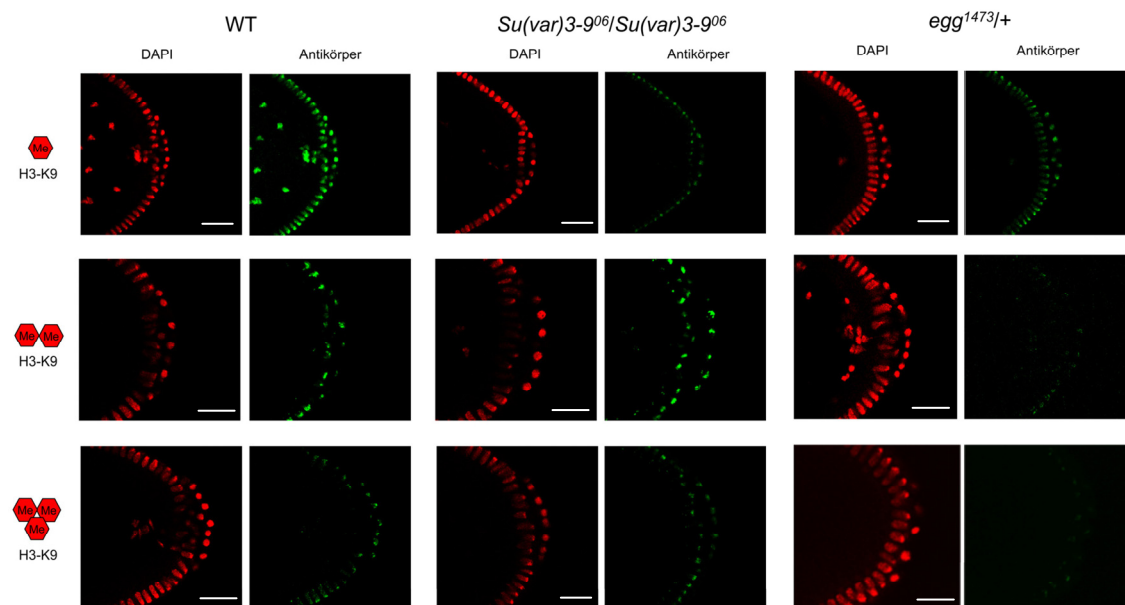


Abb.3.24. dSETDB1 vermittelt die H3K9 Di- und Trimethylierung in der frühen Embryogenese von *Drosophila*. Die homozygoten *Su(var)3-9⁰⁶* Embryonen zeigen eine starke Reduktion von H3K9me1, jedoch keine Unterschiede bei H3K9me2 und H3K9me3 verglichen mit dem Wildtyp. In Embryonen heterozygoter *egg¹⁴⁷³/+* Weibchen ist hingegen eine geringe Reduktion von H3K9me1 und eine sehr starke Reduktion von H3K9me2 und H3K9me3 nachweisbar (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün-Antikörper; Messbalken 20 μ m).

die untersuchten Embryonen alle homozygot waren. Die verwendete dSETDB1-Mutation egg^{1473} ist semiletal, da homozygote Weibchen nicht in der Lage sind, Eier zu produzieren (Pohl 2010). Es wurden daher Embryonen gefärbt, die aus einer Kreuzung von heterozygoten Tieren hervorgegangen sind, wobei 3 Kombinationen möglich sind: heterozygote Embryonen ($egg^{1473}/+$), homozygote Embryonen (egg^{1473}/egg^{1473}) und Embryonen, die die Mutation nicht mehr tragen ($+/+$). Da keine embryonalen Marker existieren, die eine Unterscheidung der Genotypen sehr früher Embryonen ermöglichen, und auch keine Unterschiede in der Färbung erkennbar waren, lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob die abgebildeten Embryonen die egg^{1473} -Mutation homo- oder heterozygot trugen (Abb. 3.24). Unabhängig davon zeigten alle egg^{1473} Embryonen in somatischen Blastodermzellen und den PGC eine schwache Reduktion für H3K9me1. H3K9me2 und H3K9me3 waren hingegen kaum detektierbar und zeigten im Bezug auf den Wildtyp eine sehr starke Reduktion, sodass auf eine wichtige Rolle von dSETDB1 in der frühen Embryonalentwicklung im Bezug auf diese Histonmodifizierungen geschlossen werden kann (Abb.3.24). Reziproke Kreuzungen, bei denen die egg^{1473} -Mutation heterozygot sowohl maternal als auch paternal gegen den Wildtyp gekreuzt

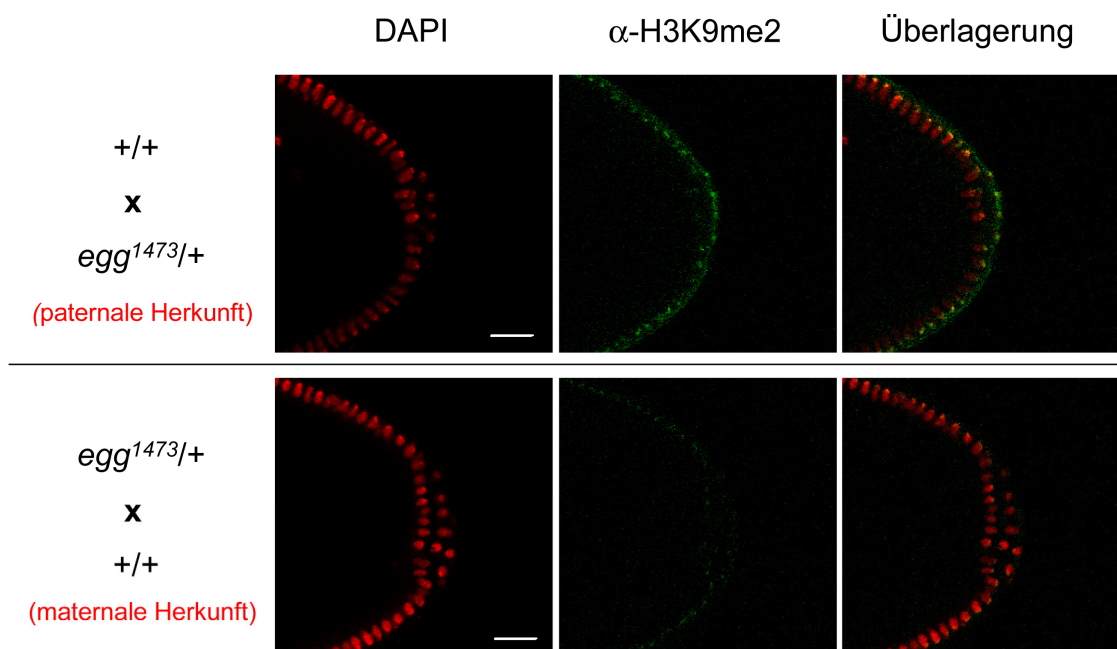


Abb. 3.25. dSETDB1 ist eine maternale Komponente. Reziproke Kreuzungen der heterozygoten egg^{1473} - Mutation ($egg^{1473}/+$) gegen den Wildtyp ($+/+$). Nur bei maternalen Herkunft der egg^{1473} - Mutation ist eine Reduktion von H3K9me2 in frühen Embryonen detektierbar (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün-Antikörper; Messbalken 20 μ m).

wurde, zeigten, dass dSETDB1 eine mütterliche Komponente ist. Nur bei maternaler Herkunft der Mutation ist eine Reduktion von H3K9me2 im Mitosezyklus 14 detektierbar, nicht jedoch wenn die *egg*¹⁴⁷³- Mutation paternalen Ursprungs ist (Abb. 3.25).

Die Embryonen homozygoter *Su(var)3-9*⁰⁶-Weibchen zeigten hingegen im Vergleich zum Wildtyp nur eine starke Reduktion von H3K9me1. Für H3K9me2 und H3K9me3 wurden keine Unterschiede zum Wildtyp gefunden. Auch bei dieser Mutante sind wie bei *egg*¹⁴⁷³ keine Unterschiede zwischen somatischen Blastodermzellen und primordialen Keimbahnstammzellen feststellbar (Abb. 3.24). Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass SU(VAR)3-9 in der frühen Embryogenese nur die Reaktion von unmodifiziertem H3K9 zu H3K9me1 katalysiert. In larvalem und adultem Gewebe wird jedoch die Reaktion von H3K9me1 zu H3K9me2 und in geringem Umfang von H3K9me2 zu H3K9me3 katalysiert (Schotta et al., 2002; Ebert et al., 2004). Daher stellte sich die Frage nach der Regulation der enzymatischen Spezifität von SU(VAR)3-9 während der Entwicklung von *Drosophila*. Wahrscheinlich erfolgt die Umschaltung der Spezifität nach der Gastrulation im frühen ersten Larvenstadium, da auch in Embryonen des Stadiums 14 am Ende der Gastrulation im Bezug auf H3K9me2 gleiche Effekte wie in Embryonen des Mitosezyklus 14 nachweisbar sind (Abb. 3.26).

Da gleichartige Veränderungen der H3K9 Methylierungen in beiden Mutanten auch in den PGC detektiert wurden, sollte der Einfluss der Mutationen auf die weitere Keimbahnentwicklung untersucht werden. Schon phänotypisch unterscheiden sich die Ovarien der Mutanten stark voneinander (Abb.3.27). Die Ovarien der homozygoten *Su(var)3-9*⁰⁶-Weibchen zeigen weder in Größe noch in der Anzahl der Ovariolen Unterschiede zum Wildtyp- Ovarium. Jedoch ist bereits in der heterozygoten *egg*¹⁴⁷³ Mutante erkennbar, dass die Ovarien kleiner sind und die Anzahl der Ovariolen reduziert ist. Diese Weibchen sind fertil, da die Entwicklung innerhalb der Ovariolen normal verläuft. Die homozygoten *egg*¹⁴⁷³- Mutantenweibchen sind hingegen steril, da die Ovarien nicht nur in ihrer Größe sehr stark reduziert sind, sondern auch keine Entwicklung innerhalb der Ovarien stattfindet (Pohl 2010). Grund hierfür sind die fehlenden adulten Stammzellen und die völlig fehlende Struktur eines Germariums.

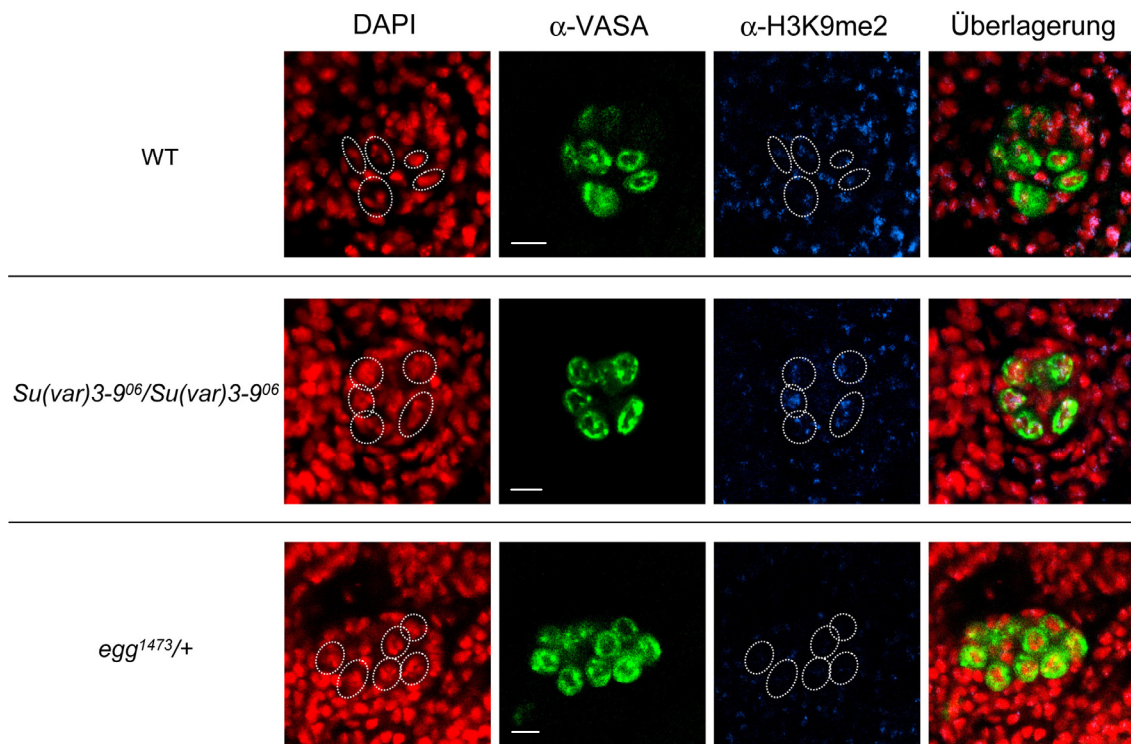


Abb. 3.26. dSETDB1 vermittelt die H3K9 Dimethylierung in den PGC bis zum Ende der Embryogenese. Gonaden von Embryonen im Entwicklungsstadium 14 am Ende der Gastrulation. Nur die Embryonen von heterozygoten *egg*¹⁴⁷³- Mutantenweibchen zeigen eine starke Reduktion von H3K9me2 in PGC und benachbarten somatischen Zellen verglichen mit dem Wildtyp. Die Embryonen von homozygoten *Su(var)3-906*- Weibchen zeigen im Bezug auf H3K9me2 keinen Unterschied zum Wildtyp. Die PGC sind eingekreist (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün, blau- Antikörper; Messbalken 5 µm).

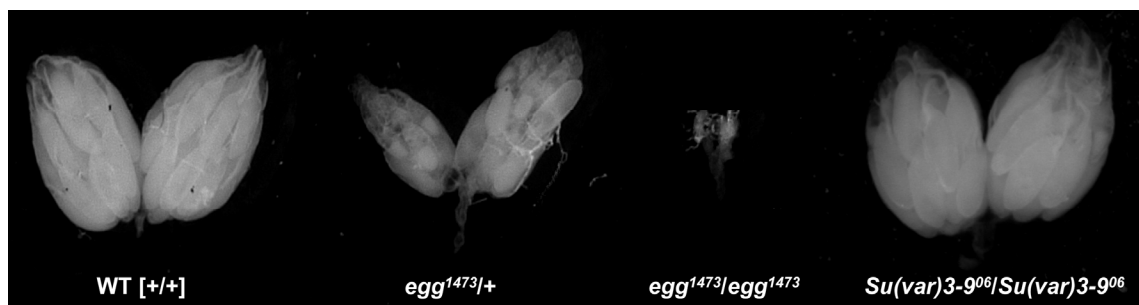


Abb.3.27. Phänotypische Effekte der Allele *egg*¹⁴⁷³ und *Su(var)3-906* auf die Ovarienentwicklung im adulten Weibchen. Bereits im heterozygoten Zustand des *egg*¹⁴⁷³ Allels (*egg*¹⁴⁷³/+) zeigt sich eine phänotypische Reduktion der Größe der Ovarien, die Weibchen sind fertil. Homozygote *egg*¹⁴⁷³- Weibchen (*egg*¹⁴⁷³/*egg*¹⁴⁷³) sind jedoch steril und besitzen stark rudimentäre Ovarien . Die *Su(var)3-906* Mutation hat keinen Einfluß auf die Größe der Ovarien und die Anzahl der Ovariolen. Die Weibchen sind fertil.

Für vergleichende Analysen der H3K9 Methylierungen in GSC konnten nur heterozygote *egg*¹⁴⁷³- Mutanten untersucht werden. Bei der Analyse wird deutlich, dass im Vergleich zur frühen Embryonalentwicklung eine Umschaltung in der Spezifität bei beiden Proteinen in der Keimbahn stattgefunden haben muss. In den ovariellen Stammzellen (GSC) im Germarium zeigt sich bei den homozygoten *Su(var)3-9*⁰⁶- und den heterozygoten *egg*¹⁴⁷³- Mutantenweibchen für H3K9me1 und H3K9me3 kein Unterschied zum Wildtyp (Abb.3.28). Yoon et al. (2008) konnten mit einer anderen dSETDB1- Mutante (*dsetdb1*^{G19561}), die auch homozygot in der Lage ist, GSC zu bilden, zeigen, dass H3K9me3 in den Germarien tatsächlich durch dSETDB1 katalysiert wird. Aus den Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass H3K9me1 durch mindestens eine weitere H3K9 spezifische Methyltransferase in den Ovarien adulter Weibchen kontrolliert wird. Für die KMTase dG9a wurde jedoch gezeigt, dass in den Mutantentieren H3K9me1 unverändert ist (Lee et al., 2010).

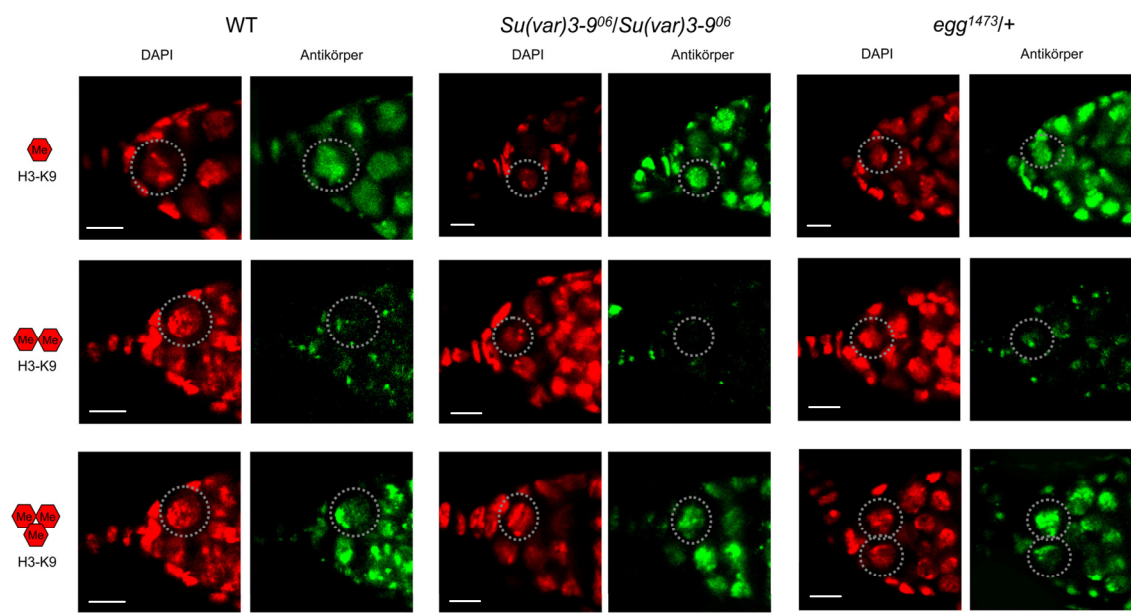


Abb.3.28. SU(VAR)3-9 und nicht dSETDB1 vermittelt die H3K9 Dimethylierung in den GSC von *Drosophila*. In den adulten Stammzellen der Ovarien homozygoter *Su(var)3-9*⁰⁶ Weibchen zeigt sich verglichen mit dem Wildtyp keine Reduktion von H3K9me1 und H3K9me3. H3K9me2 ist hingegen nicht mehr detektierbar. In den Ovarien homozygoter *egg*¹⁴⁷³ Weibchen werden keine GSC gebildet, daher wurden heterozygote Weibchen genutzt. Verglichen mit dem Wildtyp zeigen die GSC der heterozygoten *egg*¹⁴⁷³ Weibchen keine Reduktion für H3K9me1, H3K9me2 und H3K9me3. Die GSC sind eingekreist (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 5 µm).

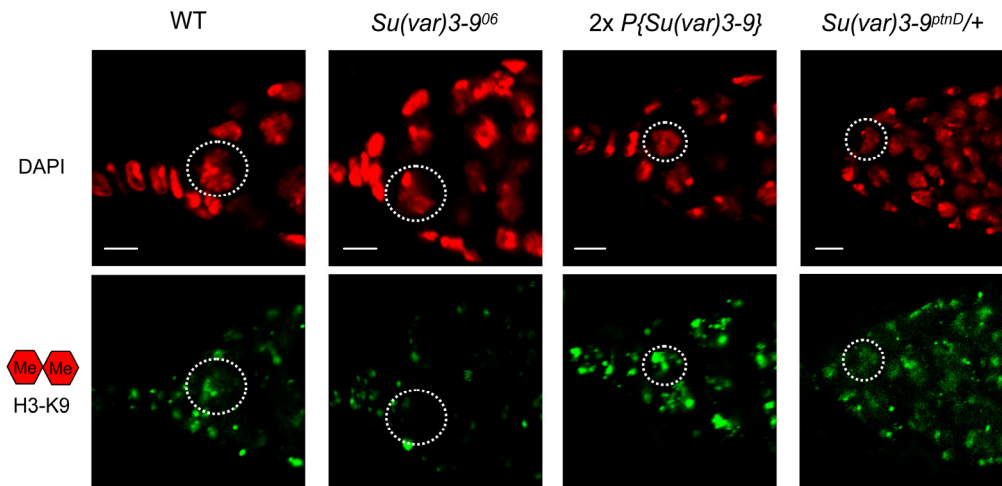


Abb.3.29. SU(VAR)3-9 vermittelt die H3K9 Dimethylierung in den GSC von *Drosophila*. In den GSC homozygoter *Su(var)3-9⁰⁶* Weibchen ist, verglichen mit dem Wildtyp, kein H3K9me2 mehr detektierbar. In der homozygoten Überexpressionslinie *2x P{Su(var)3-9}* zeigt sich eine Verstärkung für H3K9me2. In den GSC heterozygoter Weibchen des *gain-of-function* Allels *Su(var)3-9^{ptmD}* scheint H3K9me2 über den ganzen Kern verteilt zu sein und ist nicht wie beim Wildtyp auf distinkte Regionen begrenzt. Die GSC sind eingekreist (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 5 μ m).

DSETDB1 scheint nur H3K9me3 in den GSC zu katalysieren (Yoon et al., 2008), da auch H3K9me2 im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist. Jedoch handelt es sich bei den untersuchten Ovarien um die heterozygoter Weibchen, da die homozygote Mutante aufgrund der sehr stark reduzierten Ovarien und fehlender GSC nicht analysierbar war. Es zeigt sich aber eindeutig, dass SU(VAR)3-9 in den GSC H3K9me2 katalysiert, da diese Modifikation in den GSC der homozygoten *Su(var)3-9⁰⁶* Mutante völlig fehlt. Es scheint allerdings ein Unterschied zu den somatischen Terminalfilament- Zellen zu bestehen, da diese H3K9me2 noch aufweisen. Um die Funktion von SU(VAR)3-9 im Bezug auf H3K9me2 in den GSC näher zu untersuchen, wurden neben der homozygoten Nullmutante *Su(var)3-9⁰⁶* auch eine Überexpressionslinie (*2x P{Su(var)3-9}*) und das dominant negative Allel *Su(var)3-9^{ptmD}* untersucht (Abb.3.29). Verglichen mit dem Wildtyp zeigt das Nullallel *Su(var)3-9⁰⁶* eine sehr starke Reduktion für H3K9me2 während in der Überexpressionslinie (*2x P{Su(var)3-9}*) eine Erhöhung dieser Histonmodifikation detektierbar ist. Die *Su(var)3-9^{ptmD}*- Mutation führt zu dominanter weiblicher Sterilität und in den Mutantentieren wird eine verstärkte Kondensation des perizentrischen Heterochromatins gefunden (Kuhfittig et al., 2001). An polytären Speicheldrüsenchromosomen der Larven von *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass H3K9me2 und H3K9me3 stark erhöht und ektopisch verteilt sind (Ebert et al., 2004). Auch in den GSC von *Su(var)3-9^{ptmD}*- Weibchen wird eine ektopische Verteilung von H3K9me2 gefunden (Abb. 3.29). Während beim Wildtyp eine Färbung distinkter Bereiche im Kern zu sehen ist, erscheint die Färbung bei der *Su(var)3-9^{ptmD}*-

Mutante diffus im Kern verteilt. Eine Färbung von H3K9me3 in den GSC der *Su(var)3-9^{ptmD}*-Mutante muss noch durchgeführt werden. Zusammenfassend läßt sich eine entwicklungsabhängige Aktivität und Spezifität der H3K9 spezifischen KMTasen SU(VAR)3-9 und dSETDB1 erkennen (Abb. 4.1).

3.1.6 Ecdyson- *Signaling* und Chromatindifferenzierung in der weiblichen Keimbahn von *Drosophila*

Wie bereits im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, erfolgt die Differenzierung in Eu- und Heterochromatin während der frühen Embryogenese von *Drosophila*. Obwohl einige der Kontrollfaktoren, die in der frühen Embryonalentwicklung an der Bildung eu- und heterochromatischer Bereiche beteiligt sind, bereits identifiziert werden konnten, sind die molekularen Signale, die diese Differenzierung initiieren, bisher unbekannt. Eine Rolle von Ecdyson- *Signaling* konnte durch Analysen von *taiman*- Mutationen nachgewiesen werden. Die 5 existierenden Insertionsmutanten und die interne semiletale Deletionsmutante [*Df(2L)tai2*] des EcR-Koaktivators manifestieren einen dominanten Suppressoreffekt auf die *white*-Variegation in *In(1)w^{m4}*- Tieren (Apelt 2005, Lein 2011).

TAIMAN ist das *Drosophila*- Homologe des Säugerproteins SRC-3 (*Steroid Receptor Coactivator 3*) und verstärkt als Coaktivator im Ecdyson-Rezeptorkomplex dessen transkriptionelle Aktivität (Anzick et al., 1997). In *taiman*- Mutanten wird das Migrationsverhalten der *Border*- Zellen, die eine essentielle Funktion beim Aufbau der Mikropyle haben, in den Ovarien signifikant beeinflusst (Bai et al., 2000). Wird Ecdyson in adulte Weibchen injiziert, so wird eine frühere Wanderung induziert, das Fehlen von Ecdyson führt zur verspäteten Migration dieser Zellen (Bai et al., 2000). Mit Hilfe von Semidünnschnitten eingebetteter Ovarien der Wildtypweibchen und der internen semiletalen Deletionsmutante [*Df(2L)tai2*] konnte gezeigt werden, dass die Wanderung der *Border*-Zellen in dieser Mutante beeinflusst ist, da weniger Zellen migrieren (Bär 2008). Dies zeigt, dass es sich bei dem dabei untersuchten *taiman*- Allel [*Df(2L)tai2*] um eine hypomorphe Mutante handelt, was durch RT-PCR-Analysen bestätigt werden konnte (Bär 2008).

Mit Hilfe eines gegen das TAIMAN-Protein generierten Antikörpers konnte es als euchromatisches Protein charakterisiert werden, das in Interbanden polytäner Speicheldrüsenchromosomen bindet (Lein 2011).

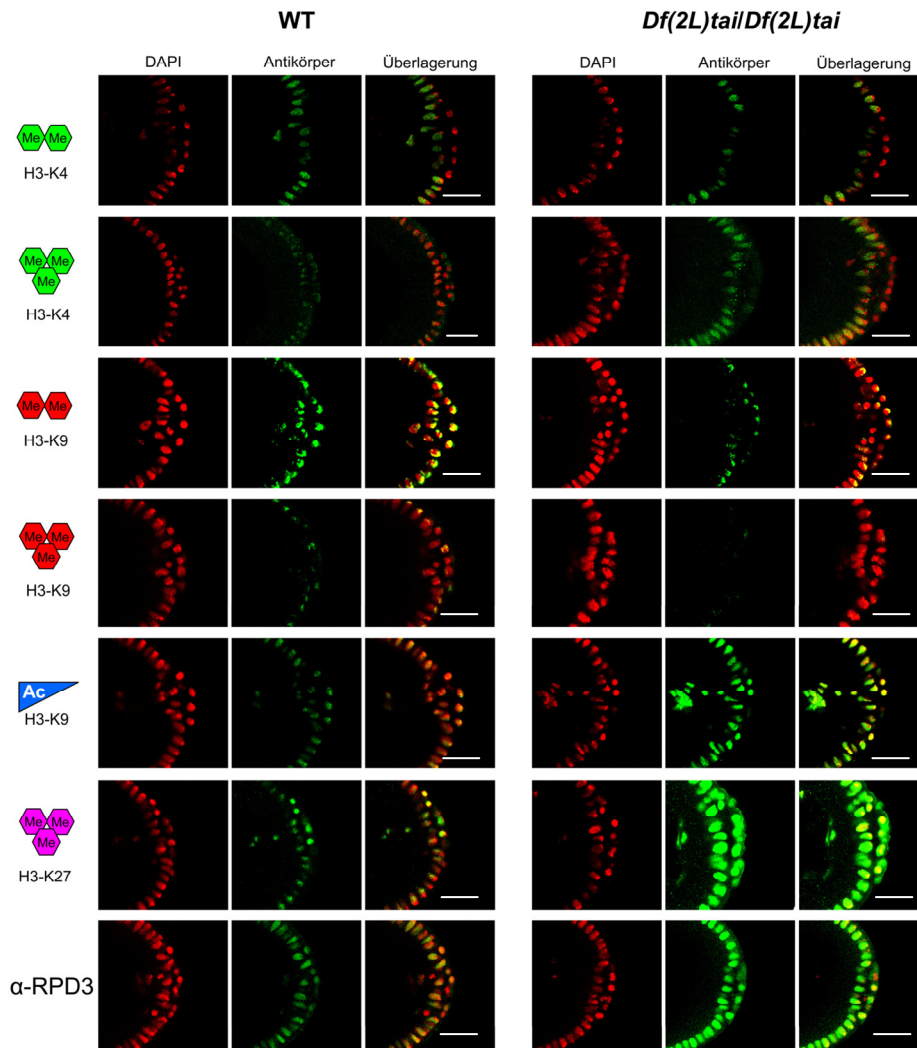


Abb.3.30. Die Defizienz im *taiman*-Gen führt zu massiven Veränderungen im Chromatin der primordialen Keimbahnstammzellen. Globale Veränderungen am Chromatin der somatischen Blastodermzellen und der PGC in Embryonen der *taiman*- Mutante *Df(2L)tai2*. Die Veränderungen betreffen euchromatische Modifizierungen (H3K9ac) und heterochromatische Modifizierungen (H3K9me2 und H3K9me3). Die H3K4 Methylierungen sind in den primordialen Keimbahnstammzellen nicht verändert. Die stärkste Veränderung zeigen H3K27me3 und RPD3 (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 20 μ m).

Bereits in früheren Arbeiten wurden globale Veränderungen von Histonmodifizierungen an larvalen polytären Speicheldrüsenchromosomen der hypomorphen Deletionsmutante *Df(2L)tai2* detektiert. Neben einer Reduktion von H3K9me2 sind sowohl H3K27me3 als auch H3K9ac erhöht (C. Apelt pers. Mitteilung). Neuere Arbeiten beweisen einen Einfluss von TAIMAN auf die Keimbahn von *Drosophila*, da in den untersuchten Mutanten die Anzahl der adulten Keimbahnstammzellen (GSC) erhöht war (König et al., 2011). Da es bisher keine weiteren Analysen zur Funktion von TAIMAN in der Keimbahnentwicklung gibt, wurde die Deletionsmutante *Df(2L)tai2* hinsichtlich dieses Aspektes näher untersucht. Dabei wurden Embryonen homozygoter Defizienz-Weibchen [*Df(2L)tai2/ Df(2L)tai2*] analysiert. In der frühen Embryogenese

zeigen sich im Vergleich zum Wildtyp globale Chromatinveränderungen in der *Df(2L)tai2*-Mutante (Abb. 3.30). Diese Veränderungen betreffen eu- und heterochromatische Modifikationen. Besonders starke Erhöhungen zeigen H3K27me3 und H3K9ac. Auch die Histon-Deacetylase RPD3 (HDAC1) ist verstärkt detektierbar. Eine signifikante Erhöhung wird auch für H3K4me3 gefunden. Diese Verstärkung betrifft jedoch nur die somatischen Blastodermzellen und, im Gegensatz zu allen anderen veränderten Modifikationen, nicht die primordialen Keimbahnstammzellen (PGC). Eine deutliche Reduktion ist bei den heterochromatischen Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K9me3 detektierbar. Westernblot-Analysen bestätigen die gefundenen Veränderungen im embryonalen Chromatin (Lein 2011).

In weiteren Analysen wurden die Ovarien der adulten homozygoten *Df(2L)tai2* Weibchen untersucht. Phänotypisch erscheinen die Ovarien dieser Weibchen etwas kleiner als beim Wildtyp, jedoch ist die Anzahl der Ovariolen kaum reduziert (Abb. 3.31). Die *taiman*- Weibchen zeigen den sog. *grandchildless*-Phänotyp, da die von ihnen produzierten Eier sich nicht bzw kaum zu Adulten entwickeln. Des Weiteren werden nicht in allen Ovariolen Eier produziert. Häufig wird in den Ovariolen, die keine Eier entwickeln, eine Dekondensierung des Eizellkern-Chromatins beobachtet, das im Wildtyp immer als sehr stark kondensiertes Karyosom vorliegt (Abb. 3.32).

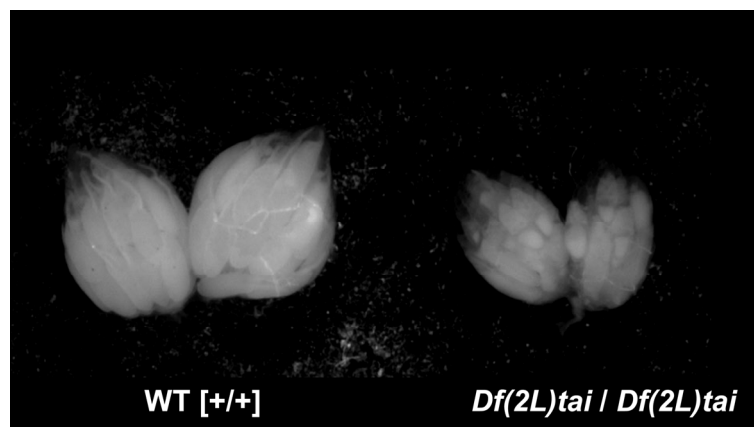


Abb.3.31. Phänotypischer Effekt der Defizienz *Df(2L)tai2* auf die Ovarienentwicklung adulter Weibchen. Die Ovarien der homozygoten *taiman*-Defizienz –Weibchen erscheinen etwas kleiner als die des Wildtyps. Die Weibchen der *taiman*-Defizienz sind in der Lage, Eier zu produzieren, die sich aber nicht bis zum Adulten entwickeln. (*grandchildless*-Phänotyp). Die Entwicklung verläuft nicht in allen Ovariolen normal.

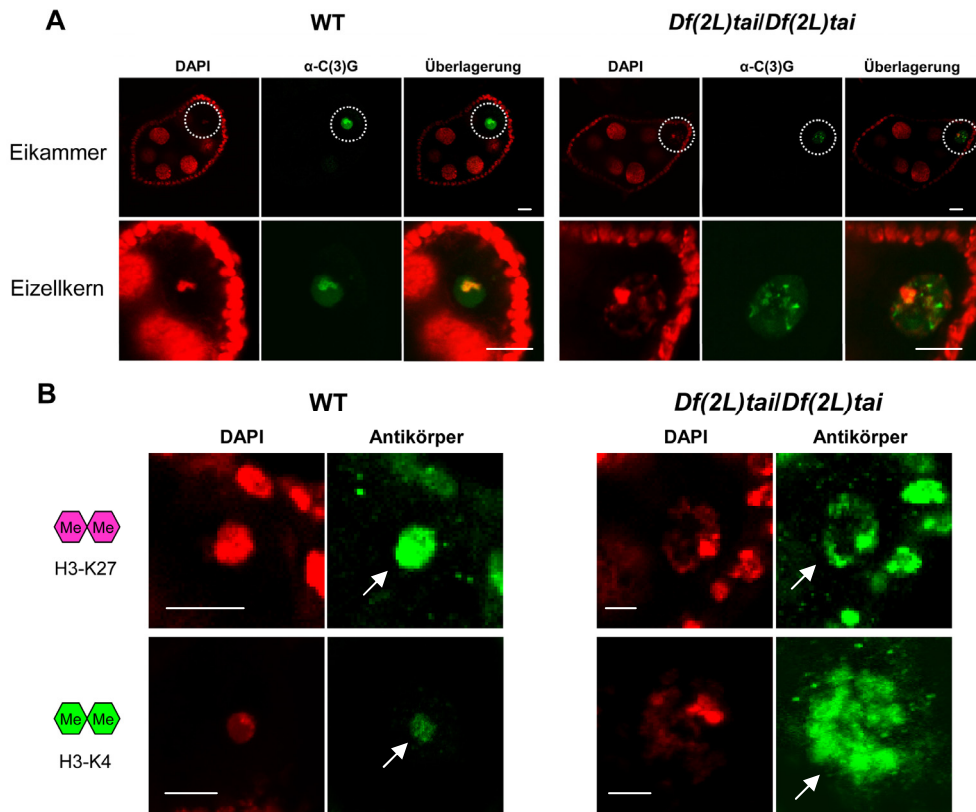


Abb.3.32. Einfluss der Defizienz *Df(2L)tail2* auf die Chromatinstruktur des Eizellkerns. **A.** In den Eikammern einiger Ovariolen homozygoter *Df(2L)tail2*- Weibchen ist der Eizellkern im Vergleich zum stark kondensierten Karyosom des Wildtyps dekondensiert. Die Färbung gegen C(3)G (grün) zeigt den Eizellkern. Der Eizellkern ist eingekreist. **B.** Färbungen gegen H3K27me2 und H3K4me2 (grün) zeigen große Unterschiede im Eizellkern beim Wildtyp und der *tai2*-Mutante. Ein Pfeil markiert den Eizellkern. (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 10 μm [A] bzw. 5 μm [B]).

Eine Färbung gegen das C(3)G- Protein, das am Aufbau des transversalen Filamentes des synaptonemalen Komplexes beteiligt ist, (Page und Hawley 2001) kann in späteren Eikammern nur im Eizellkern nachgewiesen werden. Diese Färbung diente als Nachweis, dass es sich bei den dekondensierten Kernen tatsächlich um Eizellkerne handelt (Abb. 3.32A). Abbildung 3.32B zeigt, dass die Dekondensierung des Oozytenkerns auch mit Veränderungen von Histonmodifizierungen einhergeht. Bei einer Färbung gegen H3K27me2 lässt sich im Karyosom von Wildtyp-Eizellen eine sehr starke Färbung des gesamten Kerns beobachten. Beim dekondensierten Eizellkern der *tai2*- Mutante [*Df(2L)tail2*] scheinen nur distinkte Bereiche stärker gefärbt zu sein, die auch bei der DAPI-Färbung verdichtet erscheinen. Im Gegensatz dazu ist ein erhöhtes Niveau von H3K4me2 zu sehen, das eine euchromatische Histonmodifikation darstellt. Im stark kondensierten Oozytenkern ist im Wildtyp nur eine schwache Färbung für H3K4me2 detektierbar, die sich im dekondensierten Kern von *Df(2L)tail2* homozygoten Weibchen um ein Vielfaches verstärkt und über den ganzen Kern verteilt ist. Die Färbung zeigt, dass die Kernstruktur mit der beobachteten Veränderung in den

eu- und heterochromatischen Modifikationen korreliert. In diesen Ovariolen entwickeln sich keine Eier, was vermuten lässt, dass die starke Kondensierung des Oozytenkerns essentiell ist. Eine Dekondensierung resultiert in der verringerten Eiproduktion der Weibchen. Da nicht alle Ovariolen betroffen waren, sollte geklärt werden, ob Veränderungen im Chromatin der adulten Stammzellen (GSC) für die Dekondensierung des Oozytenkerns verantwortlich sein könnten (Abb. 3.33). Dazu wurden die Histon-Modifizierungen in GSC untersucht, die bereits in den PGC in *Df(2L)tai2* Embryonen analysiert wurden (Abb. 3.33). Es konnten 2 Arten von GSC in den *taiman*-Mutanten

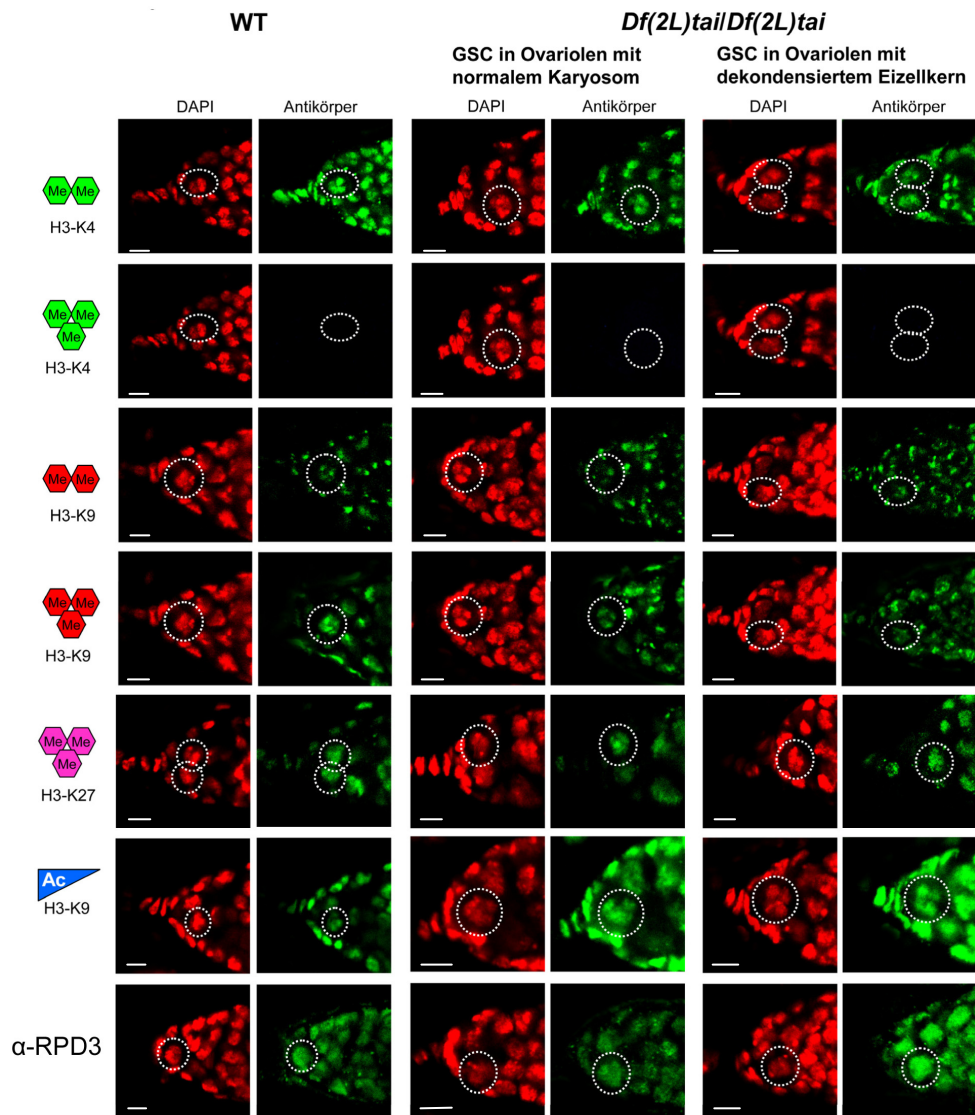


Abb.3.33. Die Defizienz im *taiman*-Gen zeigt kaum Einfluss auf die Chromatinstruktur ovarialer Keimbahnstammzellen in den Ovarien adulter *Drosophila* Weibchen. Die *taiman*- Mutation führt kaum zu Veränderungen im Chromatin der adulten Keimbahnstammzellen (GSC). Aufgrund der Dekondensierung des Karyosoms in einigen Ovariolen desselben Ovariums wurden die GSC beider Ovariolentypen (Ovariolen mit Karyosom und Ovariolen mit dekondensiertem Eizellkern) aufgenommen. Nur H3K9ac, RPD3 [HDAC1] und H3K9me3 zeigen Unterschiede zum Wildtyp. Nur für RPD3 wird ein Unterschied bei den GSC der verschiedenen Ovariolentypen detektiert. Die GSC sind eingekreist (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper; Messbalken 5 μ m).

[*Df(2L)tai2*] gefunden werden, die untereinander und mit dem Wildtyp verglichen wurden. Da sich an der Spitze jeder Ovariole 2-3 GSC befinden, wurden sowohl GSC normaler Ovariolen als auch GSC von Ovariolen mit dekondensiertem Eizellkern untersucht. Dabei zeigte sich nur bei der Histondeacetylase RPD3 in den GSC ein Unterschied zwischen den beiden Ovariolentypen (Abb. 3.33). Im Gegensatz zu den primordialen Keimbahnstammzellen (PGC), die globale Veränderungen im Chromatin zeigen und mehrere eu- und heterochromatische Histonmodifizierungen signifikant verändert sind, weisen die ovariolen Stammzellen (GSC) keine solch massiven Veränderungen im Bezug auf die untersuchten Modifizierungen auf. H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 und H3K27me3 zeigen keinen Unterschied zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu ist H3K9me3 wie in den PGC des frühen Embryos reduziert. Verglichen mit dem Wildtyp ist in den GSC der *taiman*-Mutante [*Df(2L)tai2*] wie in der frühen Embryogenese eine Erhöhung von H3K9ac detektierbar. Nur bei RPD3 ist jedoch eine Differenz zwischen den beiden Ovariolentypen (kondensiertes Karyosom oder dekondensierter Eizellkern) in der *taiman*-Mutante [*Df(2L)tai2*] detektierbar. Ausschließlich in den Ovariolen mit dekondensiertem Oozytenkern ist eine verstärkte Färbung für RPD3 nachweisbar. Da dieser einzige Unterschied zwischen den GSC der beiden Ovariolentypen der *taiman*-Mutante [*Df(2L)tai2*] allein aber nicht ursächlich für die Dekondensierung des Eizellkerns sein kann, sind weitere Untersuchungen anderer Histon-Modifizierungen und weiterer Chromatinproteine erforderlich.

Zusammenfassend hat die *taiman*-Mutation [*Df(2L)tai2*] einen sehr starken Einfluss auf die Chromatindifferenzierung in der frühen Embryogenese auch in den PGC, da massive globale Veränderungen (Reduktion von H3K9me2 und H3K9me3, Erhöhung von H3K4me3 [nicht in PGC], H3K9ac, H3K27me3 und RPD3) detektiert werden konnten. Diese massiven Chromatinveränderungen sind in den ovariolen Keimbahnstammzellen nicht so stark nachweisbar (H3K4me3, H3K9me2 und H3K27me3 unverändert; H3K9me3, H3K9ac und RPD3 gleiche Veränderung wie in PGC).

3.1.7 E(Z), HP1 und dSETDB1 sind essentiell für eine normale Keimbahnentwicklung

Die Entdeckung, dass doppelsträngige RNAs (dsRNA) zum *Knockdown* verschiedener Gene genutzt werden können (Fire et al., 1998), ist Grundlage vieler heute existierender RNAi-basierter Methoden in verschiedenen Organismen. Voll nutzbar wurden die RNAi-basierten Methoden allerdings erst nach Totalsequenzierung der Genome. In *Drosophila* ist es möglich, RNAi-Konstrukte kontrolliert in einem UAS/GAL4-basierten Expressionssystem zu nutzen und somit die Funktionen verschiedener Gene zell- und gewebespezifisch aufzuklären (Brand und Perrimon 1993). Es konnte bereits gezeigt werden, dass transgene RNAi-Linien in allen somatischen Geweben einen effektiven RNAi-*Knockdown* induzieren können (Dietzl et al., 2007). Für einen effektiven Keimbahn-*Knockdown* sind diese UAS-RNAi-Konstrukte jedoch nicht geeignet. Aus diesem Grund entwickelte das TRiP-Consortium aus Boston (<http://www.flyrnai.org/>) UAS-RNAi-Konstrukte (VALIUM-Vektoren; Ni et al., 2008; Ni et al., 2009), die auch in der weiblichen Keimbahn einen effektiven RNAi-*Knockdown* mittels shmiRNAs induzieren. Basierend auf dem phiC31 System (Groth et al., 2004) erfolgte die spezifische Integration der RNAi-Transgene in vorher auf gute Expression getestete attP *landing sites*, sodass ein Positionseffekt ausgeschlossen werden konnte (Markstein et al., 2008). Der große Vorteil dieser Methode ist, dass neben der spezifischen Expression in verschiedenen Zellen und Geweben auch GAL4-Linien mit verschiedenen Expressionsstärken und die Coexpression mit UAS-*Dicer2* (Dietzl et al., 2007) den RNAi *Knockdown* verstärken oder schwächen können und variierende Phänotypen erzeugen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden RNAi-Linien für unterschiedliche Chromatinfaktoren wie HP1, SUV4-20, E(Z) und RPD3 genutzt, um mit Hilfe verschiedener *nanos*- und *vasa*GAL4-Treiber einen Keimbahn-spezifischen *Knockdown* zu erreichen und die Funktion der entsprechenden Gene in der Keimbahn zu analysieren. Als Positivkontrolle für die Effektivität der Treiber und RNAi-Linien dienten *vasa*-RNAi-Linien, da kommerziell ein sehr guter Antikörper gegen das VASA-Protein erhältlich ist. Zunächst wurde mit Hilfe der Positiv-Kontrolle und eines Keimbahn-spezifischen *nanos*GAL4-Treibers in reziproken Kreuzungen untersucht, ob die maternale oder paternale Herkunft des Treibers eine Rolle spielt (Abb. 3.34). Wie erwartet zeigte sich, dass es einen effektiven *vasa Knockdown* nur bei maternaler Herkunft des Treibers gibt,

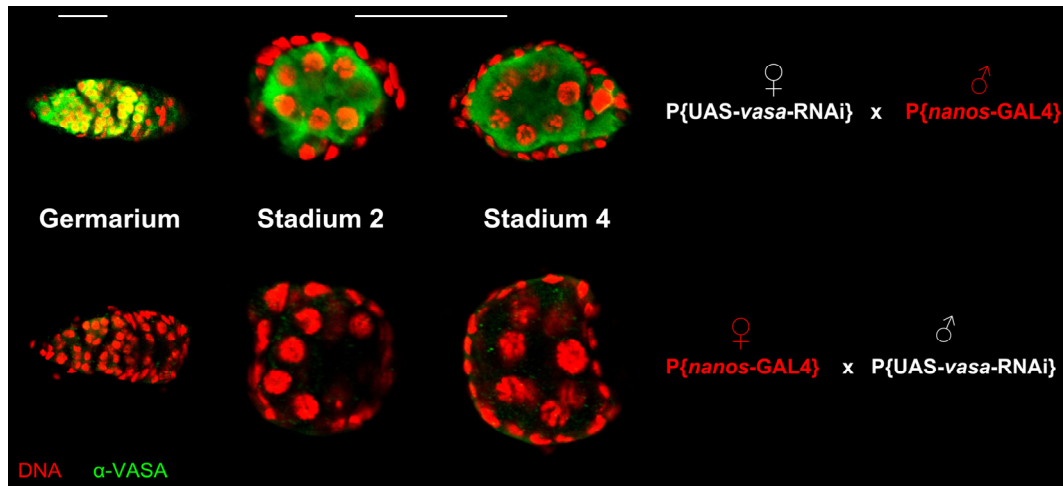


Abb.3.34. Effektiver RNAi Knockdown in der Keimbahn mittels *nanos*GAL4 Treiber. Spezifischer *vasa* RNAi Knockdown in der Keimbahn in einem UAS/GAL4-basierten System (TRiP Consortium, Boston) mit einem *nanos*GAL4- Treiber. Die Färbung gegen das VASA Protein zeigt einen effektiven RNAi Knockdown nur bei maternaler Vererbung des Treibers. Bei paternaler Herkunft ist der *vasa* RNAi Knockdown ineffektiv und das Protein ist in Ovarien adulter F1-Weibchen noch immer detektierbar (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- VASA-Antikörper; Messbalken 30 µm).

da *nanos* in den Ovarien der Weibchen sehr stark exprimiert und in den Embryo geladen wird. Somit wird auch der *nanos*GAL4 Treiber bei einer maternalen Kreuzung in großer Menge in den Embryo geladen, was den effektiveren *Knockdown* erklärt. In den untersuchten Ovarien der F1-Weibchen ($P\{UAS-Dcr2\}/+;P\{nanosGAL4\}/+;P\{UAS-vasa\ RNAi\}/+$) wird bei einer Kreuzung des *nanos*GAL4-Treibers mit paternaler Herkunft eine VASA-Färbung gefunden, die dem Wildtyp entspricht. Wird der Treiber jedoch maternal vererbt, so zeigen die Ovarien der F1-Weibchen keine VASA-Färbung mehr, was den effektiven *Knockdown* für *vasa* zeigt.

Die F1-Weibchen ($P\{UAS-Dcr2\}/+;P\{nanosGAL4\}/+;P\{UAS-vasa\ RNAi\}/+$) sind in der Lage Embryonen zu produzieren, die sich jedoch nicht entwickeln. Dabei unterscheiden sich die beiden verwendeten *vasa*- RNAi- Linien im Bezug auf den Entwicklungsarrest, der entweder sehr früh in der Embryogenese (vor Zyklus 10) oder in der Gastrulation erfolgt (Tab. 3.2). Während in der *vasa*- RNAi-Linie HMS00373 97% der Embryonen, die die F2-Generation darstellen, in der frühen Embryogenese sterben, überleben in der Linie HMS00431 24,9% der Embryonen bis zur Gastrulation (Tab. 3.2). In keinem der Embryonen ist eine VASA-Färbung detektierbar, was zeigt, dass sie nicht in der Lage sind, funktionelles Keimplasma und somit primordiale Keimbahnstammzellen (PGC) zu bilden (Abb. 3.36). Im Gegensatz dazu wird in den Embryonen der F1- Generation die Keimbahn zunächst normal gebildet, was an der keimbahnspezifischen VASA-Färbung der PGC erkennbar ist (Abb. 3.35). In den sich

daraus entwickelnden adulten Weibchen ist in den Ovarien keine VASA- Färbung nachweisbar (Abb. 3.34). Ursache für die sich zunächst normal entwickelnde Keimbahn könnte die transkriptionelle *Quiescence* der PGC in der frühen Embryogenese sein.

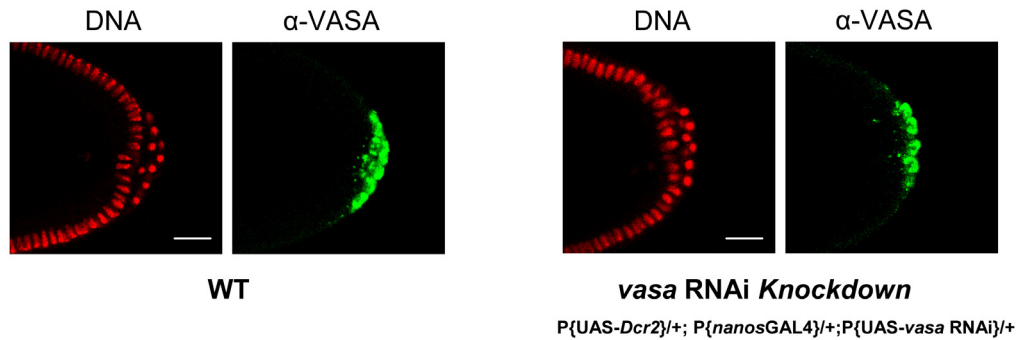


Abb.3.35. Der spezifische RNAi Knockdown von *vasa* führt nicht zum Verlust der Keimbahn in Embryonen der F1- Generation. Posteriorer Pol von Embryonen im Mitosezyklus 14. Durch eine Kreuzung von $P\{UAS-Dcr2\}; P\{nanosGAL4\}$ mit $P\{UAS-vasa RNAi\}$ kommt es in der F1- Generation nicht zum Verlust der PGC am posterioren Pol, wie eine Färbung mit dem keimbahnspezifischen VASA-Antikörper zeigt (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- VASA-Antikörper; Messbalken 20 μm).

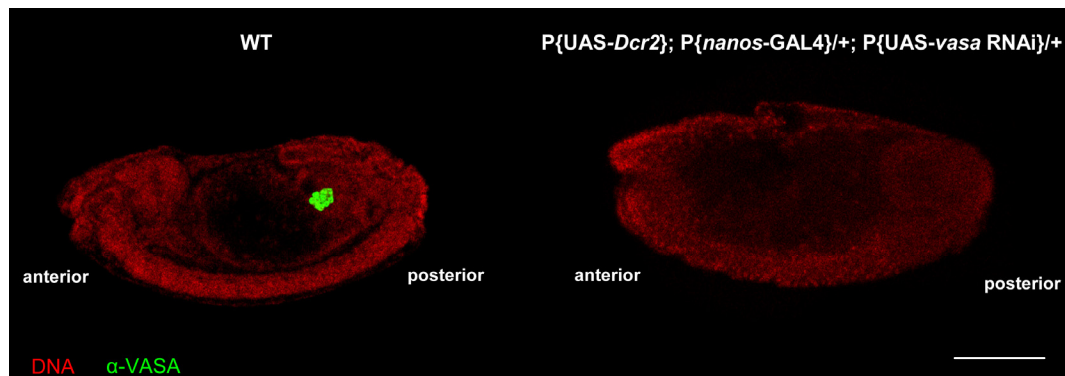


Abb.3.36. Der spezifische RNAi Knockdown von *vasa* führt zum Verlust der Keimbahn in der F2- Generation. VASA-Färbung von Embryonen am Ende der Gastrulation. Im Entwicklungsstadium 14 sind die Gonaden gebildet (WT). Nach der Kreuzung von $P\{UAS-Dcr2\}; P\{nanosGAL4\}$ mit $P\{UAS-vasa RNAi\}$ produzieren die Weibchen der F1- Generation Embryonen, die keine PGC mehr bilden (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- VASA-Antikörper; Messbalken 100 μm).

Tab.3.2. Der spezifische RNAi Knockdown von *vasa* führt zum Entwicklungsarrest der Embryonen in der F2-Generation.

	Arrest während Furchung (<i>cleavage</i>)	Arrest während Gastrulation
$P\{UAS-Dcr2\}; P\{nanos-GAL4\}/+; P\{UAS-vasa RNAi\}/+$ (HMS00373)	97% (322/332 Embryonen)	3% (10/332 Embryonen)
$P\{UAS-Dcr2\}; P\{nanos-GAL4\}/+; P\{UAS-vasa RNAi\}/+$ (HMS00431)	75,1% (443/590 Embryonen)	24,9% (147/590 Embryonen)

Neben *nanos* ist auch *vasa* ein Keimbahn- spezifisch exprimiertes Gen. Im Rahmen der Arbeit wurden unter einem anderen Aspekt *vasaGAL4*-Fliegenlinien hergestellt, bei denen das *vasaGAL4*- Transgen an verschiedenen Stellen im Genom integriert ist. Für Testkreuzungen mit der UAS-*vasa* RNAi wurde die X- chromosomale *vasaGAL4*- Linie $P\{vasaGAL4\}\#2$, die Linie $P\{vasaGAL4\}\#9$ im 2. Chromosom und die Linie $P\{vasaGAL4\}\#10$ im 3. Chromosom genutzt. Um die Menge an Treiber zu erhöhen, und somit den RNAi *Knockdown* noch zu verstärken, wurden in einer weiteren Kreuzung die $P\{vasaGAL4\}$ Transgene des 2. und 3. Chromosoms kombiniert (Abb. 3.37). Anhand der VASA- Färbung der Ovarien der F1- Weibchen läßt sich erkennen, dass der *Knockdown* offensichtlich nicht effektiv genug funktioniert, da eine Wildtyp-

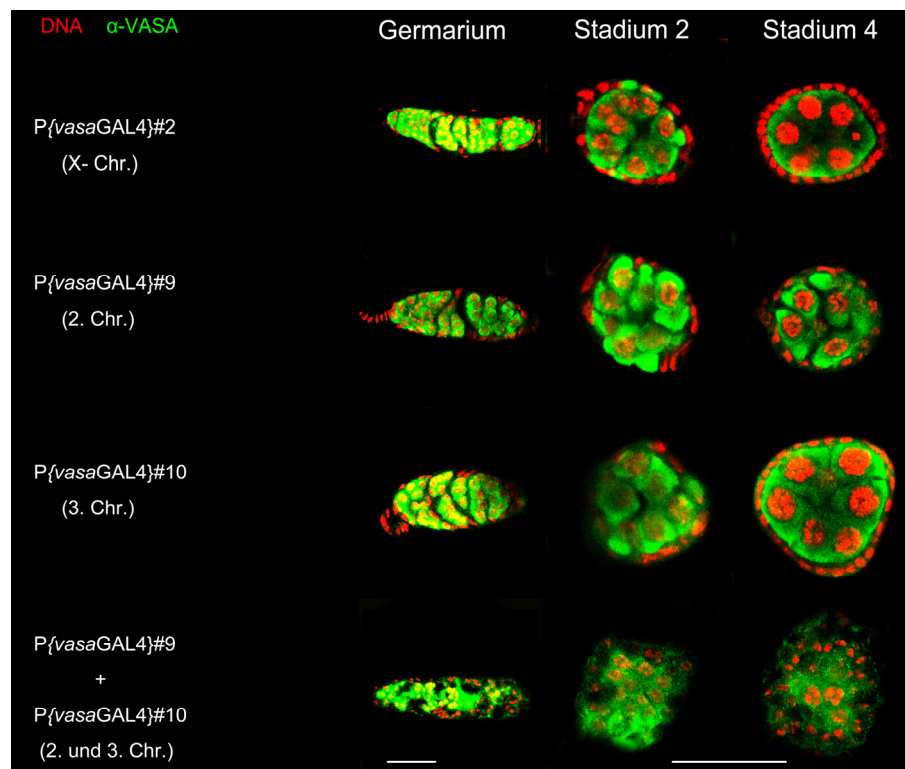


Abb.3.37. Partieller RNAi *Knockdown* mit verschiedenen *vasaGAL4* Treibern. Testung keimbahnspezifischer *vasaGAL4*- Fliegenlinien mit Integration des $P\{vasaGAL4\}$ -Transgens an verschiedenen Stellen und auf verschiedenen Chromosomen im Genom. Der Treiber wurde maternal gegen die $P\{UAS-vasa$ RNAi}- Linie gekreuzt. Eine Erhöhung der Treiber- Dosis wurde durch die Kombination der Linie 9 (2. Chromosom) und Linie 10 (3. Chromosom) erreicht. Der *Knockdown* mit *vasaGAL4*- Treibern ist ineffektiv, da in den Ovarien der F1-Weibchen noch immer VASA-Protein detektierbar ist (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- VASA-Antikörper; Messbalken 30 μ m).

ähnliche Verteilung detektiert werden kann. Nur bei der Kombination der *vasa*GAL4-Transgene des 2. und 3. Chromosoms kann man eine schwache Reduktion der VASA-Färbung im Vergleich zum Wildtyp sehen. Eine weitere Möglichkeit, den RNAi *Knockdown* mittels *vasa*GAL4- Treiber zu verbessern, ist die Co-Expression von UAS-*Dicer2* (Dietzl et al., 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die weiteren Analysen aufgrund der besseren Ergebnisse beim *vasa* RNAi *Knockdown* sowohl der *nanos*GAL4- Treiber als auch der *nanos*GAL4- Treiber mit co-exprimiertem UAS-*Dicer2* verwendet. Mit Hilfe dieser Treiber wurden verschiedene, aus dem Soma bereits bekannte, und teilweise gut charakterisierte Chromatin- Faktoren wie SUV4-20, HP1, dSETDB1, E(Z) und die Komponente der RNAi- Maschinerie *piwi* in Keimbahnzellen spezifisch mittels RNAi herunterreguliert (Abb. 3.38). Als Kontrolle wurde der Wildtyp und die UAS- RNAi- Linie ohne Treiber genutzt. Ein signifikant stärkerer RNAi-*Knockdown* wurde bei Coexpression von UAS-*Dicer2* (Dietzl et al. 2007) nachgewiesen (Abb. 3.38). In Genotypen mit dem *nanos*GAL4- Treiber sind die Ovarien des *eggless* [dSETDB1], *E(z)*, *Su(var)2-5* [HP1] und *piwi* *Knockdowns* ($P\{nanosGAL4\}/+$; $P\{UAS-TRiP\}RNAi/+)$ zwar reduziert, die Weibchen aber fertil. In Genotypen mit *nanos*GAL4 und *Dicer2* ($P\{UAS-Dcr2\}/+$; $P\{nanosGAL4\}/+$; $P\{UAS-TRiP\}RNAi/+)$ sind die Ovarien stark reduziert und die Weibchen vollständig steril. Die wenigen Embryonen, die gebildet werden, entwickeln sich nicht. Einen ähnlichen Effekt zeigt die *Rpd3*-RNAi- Linie HMS00607, bei der nur die Weibchen mit *nanos*GAL4 und UAS-*Dcr2* stark reduzierte Ovarien aufweisen. Die RNAi- Linien für *Suv4-20*, *Rpd3* (HMS00164), *taiman* und *Su(var)3-1* [JIL-1] zeigen hingegen weder mit *nanos*GAL4 allein noch mit *nanos*GAL4 und UAS- *Dicer2* eine Reduktion der Ovarien (Abb. 3.38). Um die Frage klären zu können, ob SUV4-20, TAIMAN und JIL-1 nicht essentiell für die Keimbahnentwicklung sind oder der RNAi *Knockdown* ineffektiv war, müssten weitere RNAi-Linien dieser Regulatoren untersucht werden, die inzwischen beim TRiP Consortium für *Suv4-20* und *taiman* erhältlich sind.



Abb.3.38. Spezifischer RNAi Knockdown verschiedener bekannter Chromatin-Faktoren in der Keimbahn von *Drosophila*. Dargestellt sind die Ovarien der Wildtypkontrolle, der RNAi-Linien ohne Treiber und die Ovarien der Weibchen der F1-Generation aus der Kreuzung von $P\{nanosGAL4\}$ bzw. $P\{UAS-Dcr2\};P\{nanosGAL4\}$ und $P\{UAS-TRiP\ RNAi\}$. Als Positivkontrolle für einen effektiven RNAi Knockdown dient die $P\{UAS-vasa\ RNAi\}$ -Linien. Es wurden Chromatin-Faktoren aus dem Soma auf ihre Funktion in der Keimbahn getestet. Die Treiber waren immer maternalen Herkunfts, die RNAi-Linien paternalen Ursprungs. Nur bei einer Kreuzung von $P\{UAS-Dcr2\};P\{nanosGAL4\}$ mit $P\{UAS-vasa\ RNAi\}$, $P\{UAS-Su(var)2-5\ RNAi\}$, $P\{UAS-egg\ RNAi\}$, $P\{UAS-E(z)\ RNAi\}$ und $P\{UAS-piwi\ RNAi\}$ waren die adulten Weibchen der F1-Generation vollständig steril (roter Stern).

Die Weibchen der RNAi- Linien *E(z)*, *eggless* [dSETDB1] und *Su(var)2-5* [HP1] mit *nanosGAL4* und Dicer2 (*P{UAS-Dcr2}/+; P{nanosGAL4}/+; P{UAS-TRiP RNAi}/+*), die komplett steril waren, wurden immunzytologisch untersucht.

Zunächst wurde in PGC von *P{UAS- Dcr2}/+; P{nanosGAL4}/+; P{UAS-E(z) RNAi}/+* Embryonen im Mitosezyklus 14 die H3K27 Methylierung untersucht. In diesen Embryonen wurde im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied in der H3K27 Mono- Di- und Trimethylierung detektiert (Abb. 3.39). Auch scheint der *E(z)* *Knockdown* auf die Bildung der Gonaden später Embryonen keinen Einfluss zu besitzen, wie eine VASA-Färbung zeigt (Abb. 3.40). Die Gonaden zeigen keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Eine Färbung der Gonaden mit H3K27me1, H3K27me2 und H3K27me3 muss noch erfolgen.

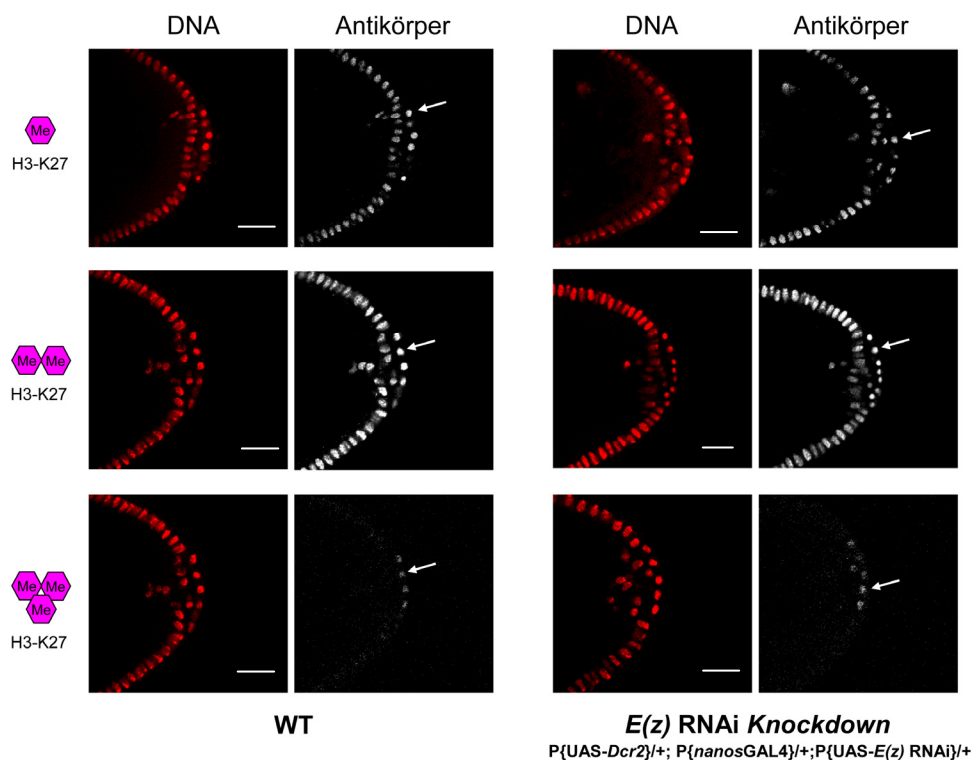


Abb.3.39. In den PGC der Embryonen des Mitosezyklus 14 ist der spezifische RNAi *Knockdown* von *E(z)* anhand der H3K27 Methylierung nicht nachweisbar. Verglichen mit dem Wildtyp, bei dem H3K27me1, H3K27me2 und H3K27me3 in den PGC (Pfeil) sichtbar ist, zeigt der *E(z)* *Knockdown* keine Unterschiede bei den H3K27 Methylierungen (rot-DNA (DAPI)-Färbung, weiß- Antikörper; Messbalken 20 μ m).

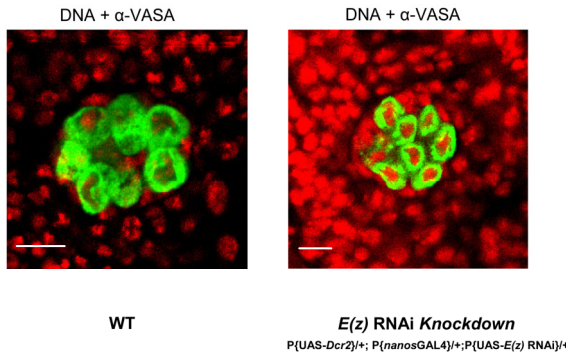


Abb.3.40. Der spezifische RNAi *Knockdown* von *E(z)* in der Keimbahn hat keinen Einfluss auf die Entwicklung der Gonaden in späten Embryonen. Antikörperfärbung gegen das keimbahnspezifische VASA- führt bis zum Ende der Embryogenese nicht zum Verlust der PGC (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- VASA-Antikörper; Messbalken 5 µm).

Im Gegensatz zu den PGC werden in den Ovarien adulter $P\{UAS-Dcr2\}/+; P\{nanosGAL4\}/+; P\{UAS-E(z) RNAi\}/+$ Weibchen signifikante Entwicklungsdefekte nachgewiesen. Die Gonaden der Weibchen sind stark reduziert und es können zwei Typen von Ovarien unterschieden werden (Abb. 3.41). Die Ovarien des Typs A zeigen noch eine mehr oder weniger gute Entwicklung bis zur Bildung früher Eikammern. Es werden nur wenige Eier gebildet, die sich nicht weiter entwickeln. Die VASA-Färbung zeigt, dass diese Ovarien zwar reduziert sind, die Keimbahnidentität aber weitestgehend

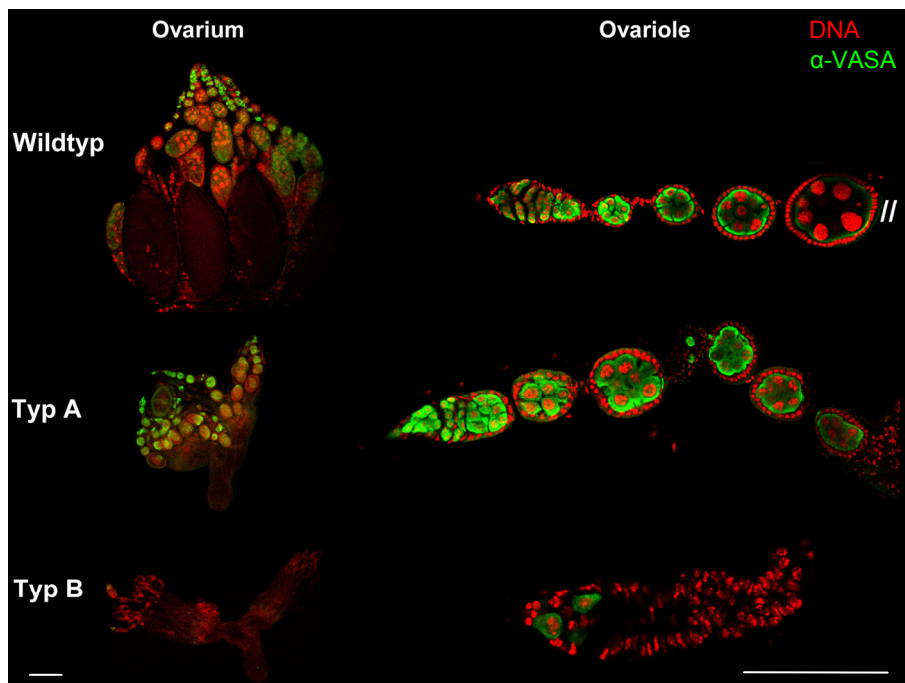


Abb.3.41. Der spezifische RNAi *Knockdown* von *E(z)* in der Keimbahn führt zu sterilen Weibchen mit sehr stark reduzierten Ovarien. $P\{UAS-Dcr2\}/+; P\{nanosGAL4\}/+; P\{UAS-E(z) RNAi\}/+$ Weibchen haben im Vergleich zum Wildtyp stark reduzierte Ovarien. Dabei können die Ovarientypen A und B unterschieden werden. Beim Typ A erfolgt die Entwicklung nur bis zu einem frühen Stadium. Die VASA- Färbung zeigt, dass die Keimbahnidentität bis zur Entwicklung von frühen Eikammern erhalten geblieben ist. Die Weibchen sind komplett steril. Beim Typ B ist keine Entwicklung in den Ovariolen detektierbar. Eine VASA-Färbung zeigt, dass die Keimbahnidentität fast vollständig verloren ist (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- VASA- Antikörper; Messbalken 150µm).

erhalten geblieben ist (Abb. 3.41 Typ A). Die Typ B- Ovarien beim *E(z) Knockdown* zeigen keinerlei Entwicklung innerhalb der Ovariolen. Immunzytologisch kann das VASA- Protein nur sehr schwach detektiert werden. Dies deutet auf einen fast vollständigen Verlust der Keimbahnidentität hin (Abb. 3.41 Typ B). Bei diesem Ovarientyp konnten keine GSC detektiert werden, sodass die Analyse der H3K27 Methylierungen nur in den GSC der Ovarien des Typs A durchgeführt wurde.

Die Färbungen zeigen, dass der *E(z) Knockdown* in den Keimbahnzellen sehr effektiv und spezifisch ist. Nur die GSC und Cystoblasten in den Germarien zeigen einen vollständigen oder nahezu vollständigen Verlust der H3K27 Methylierungen, nicht jedoch die Terminalfilament- und *Cap*- Zellen, die somatischen Ursprungs sind (Abb. 3.42). Aufgrund der Ergebnisse des RNAi *Knockdowns* kann E(Z) eine große Rolle in der Keimbahnentwicklung zugeschrieben werden.

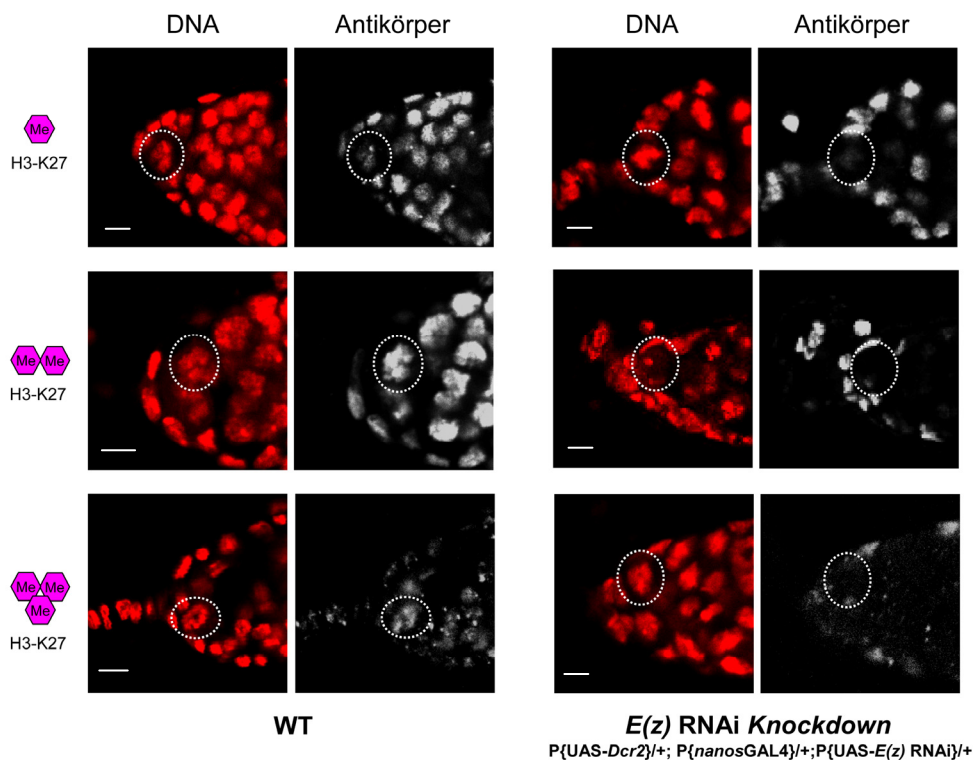


Abb.3.42. Der RNAi *Knockdown* von *E(z)* in der Keimbahn führt zur Reduktion der H3K27 Methylierung in GSC. Im Wildtyp sind H3K27me1, H3K27me2 und H3K27me3 in den GSC nachweisbar. In den Ovarien der *P{UAS-Dcr2}/+; P{nanosGAL4}/+; P{UAS-E(z) RNAi}/+* Weibchen ist keine der H3K27 Methylierungen in den Keimbahnzellen (GSC, Cystoblasten) detektierbar. Die somatischen Zellen im Germarium (unter anderem Terminalfilamentzellen, *Cap*-Zellen) zeigen dasselbe Färbemuster wie der Wildtyp. Die GSC sind eingekreist (rot-DNA (DAPI)-Färbung, weiß- Antikörper; Messbalken 5 µm).

Der Einfluß von dSETDB1 und HP1 auf H3K9me2 und H3K9me3 in den PGC wurde ebenfalls immunzytologisch näher charakterisiert. Dabei konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und dSETDB1 bzw. HP1 *Knockdown* ($P\{UAS-Dcr2\}/+$;

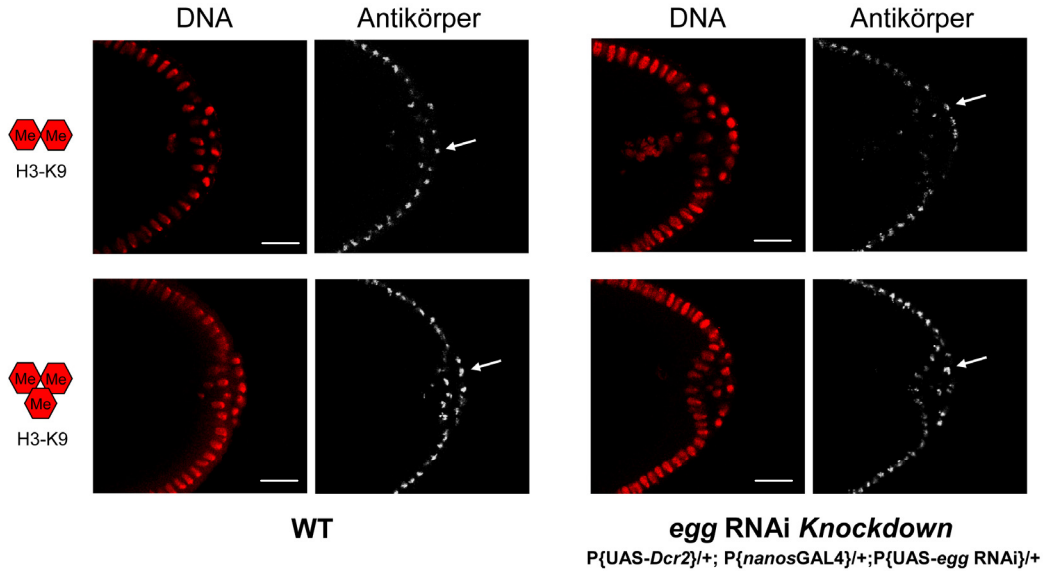


Abb.3.43. Der spezifische RNAi *Knockdown* von *eggless* [dSETDB1] in der Keimbahn ist anhand der H3K9 Methylierung in PGC der Embryonen des Mitosezyklus 14 nicht nachweisbar. Es kann kein Unterschied von H3K9me2 und H3K9me3 in den PGC zwischen Wildtyp und $P\{UAS-Dcr2\}/+$; $P\{nanosGAL4\}/+$; $P\{UAS-egg\ RNAi\}/+$ Embryonen detektiert werden (rot-DNA (DAPI)-Färbung, weiß-Antikörper; Messbalken 20 μ m).

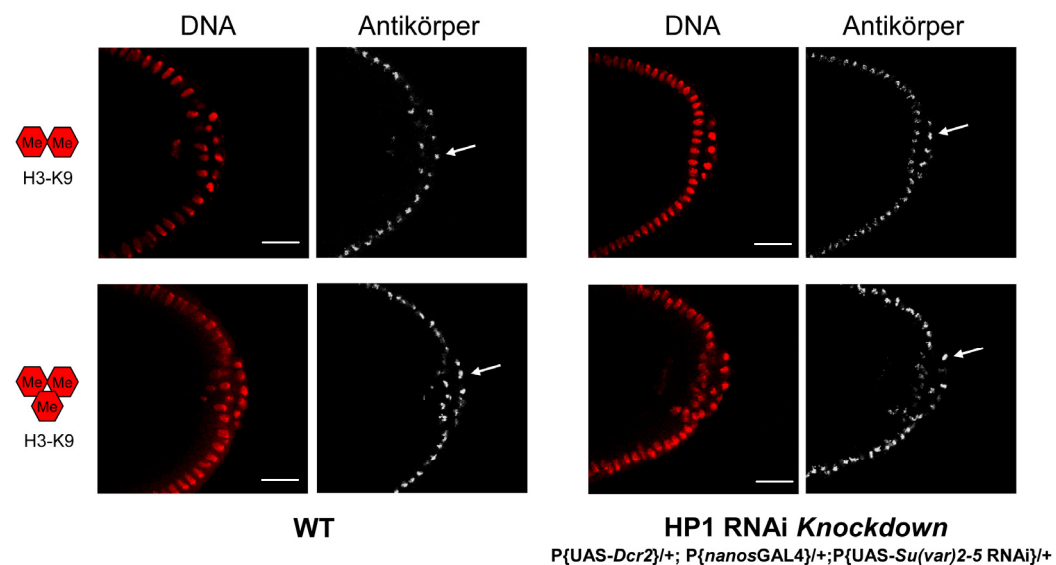


Abb.3.44. In $P\{UAS-Dcr2\}/+$; $P\{nanosGAL4\}/+$; $P\{UAS-Su(var)2-5\ RNAi\}/+$ Embryonen wird keine Reduktion der H3K9 Methylierung gefunden. Der *Su(var)2-5* [HP1] *Knockdown* zeigt bei H3K9me2 und H3K9me3 in den PGC der Embryonen im Mitosezyklus 14 keinen Unterschied zum Wildtyp (rot-DNA (DAPI)-Färbung, weiß-Antikörper; Messbalken 20 μ m).

$P\{nanosGAL4\}/+;P\{UAS-egg\ RNAi\}/+$, Abb. 3.43 und $P\{UAS-Dcr2\}/+;P\{nanosGAL4\}/+;P\{UAS-Su(var)2-5\ RNAi\}/+$, Abb. 3.44). Es muss noch untersucht werden, ob ein Einfluss der beiden Faktoren auf die Bildung der embryonalen Gonaden besteht.

In den $P\{UAS-Dcr2\}/+; P\{nanosGAL4\}/+;P\{UAS-egg\ RNAi\}/+$ Weibchen und den $Su(var)2-5$ [HP1] *Knockdown*- Weibchen werden wiederum rudimentäre Ovarien gefunden. Die VASA- Färbung zeigt, dass in den stark reduzierten Ovarien keine bzw. fast keine Entwicklung stattfindet und die Keimbahnidentität in den Ovariolen fast vollständig verloren ist (Abb. 3.45B und C). Des Weiteren wurden in diesen Ovarien keine GSC gefunden, sodass eine Analyse von H3K9me2 und H3K9me3 in diesen Zellen nicht erfolgen konnte. Die Ausbildung der Typ 1 (keine VASA- Färbung) und Typ 2 (schwache VASA- Färbung) Ovariolen in den Ovarien des HP1 und dSETDB1 *Knockdowns* könnte durch eine mosaikartige Expression des *nanosGAL4*- Treibers verursacht werden (J. Szabad pers. Mitteilung).

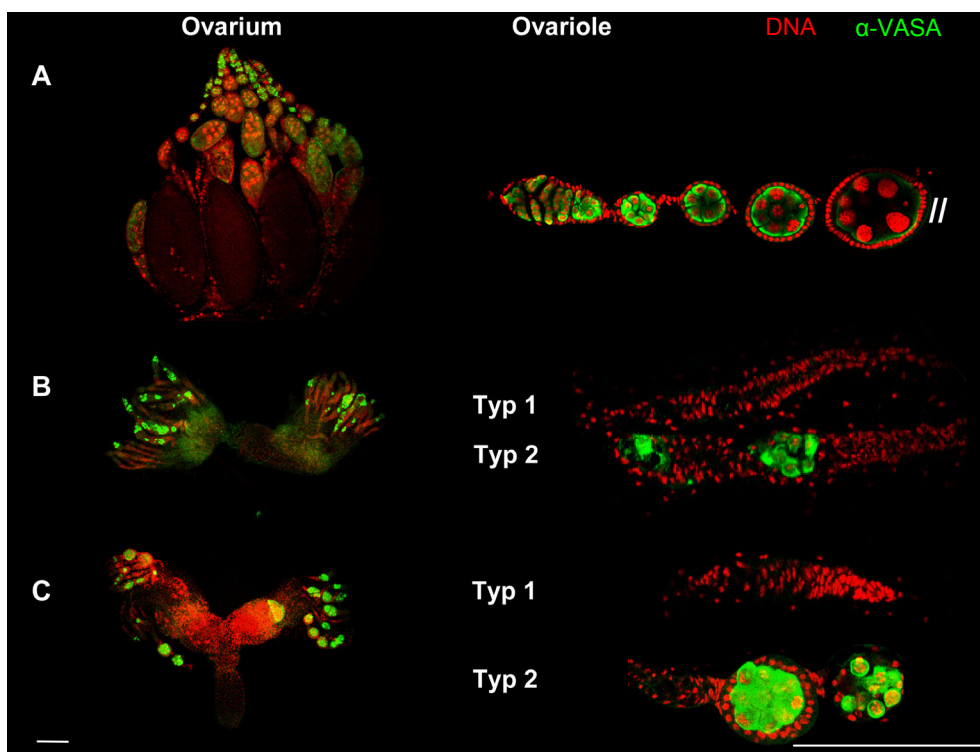


Abb.3.45. Der RNAi *Knockdown* von *eggless* (dSETDB1) und *Su(var)2-5* (HP1) in der Keimbahn führt zu sterilen Weibchen mit sehr stark reduzierten Ovarien. Die $P\{UAS-Dcr2\}/+;P\{nanosGAL4\}/+;P\{UAS-TRiP\ RNAi\}/+$ Weibchen haben sehr stark reduzierte Ovarien im Vergleich zum Wildtyp. Die VASA- Färbung zeigt einen fast vollständigen Verlust der Keimbahnidentität. **A.** Wildtyp- Ovarium. **B.** **HP1- RNAi *Knockdown*.** Sehr stark reduzierte Ovarien in $P\{UAS-Dcr2\}/+; P\{nanosGAL4\}/+; P\{UAS-Su(var)2-5\ RNAi\}/+$ Weibchen. Keine Entwicklung in den Ovariolen. Die Weibchen sind vollständig steril. **C.** **dSETDB1- RNAi *Knockdown*.** Sehr stark reduzierte Ovarien in $P\{UAS-Dcr2\}/+; P\{nanosGAL4\}/+; P\{UAS-egg\ RNAi\}/+$ Weibchen. Die Weibchen sind ebenfalls vollständig steril (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- VASA- Antikörper; Messbalken 150µm).

Zusammenfassend ist es gelungen, mit Hilfe der RNAi- Linien des TRiP Consortiums aus Boston einen effektiven *Knockdown* verschiedener im Soma identifizierter Chromatin- Faktoren spezifisch in der Keimbahn zu zeigen. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass E(Z), dSETDB1 und HP1 eine grosse Rolle bei der Keimbahnentwicklung spielen.

3.2 Genetische Analyse der Chromatinstruktur der weiblichen Keimbahn

Für die Identifizierung und molekulare Analyse von Faktoren, die Heterochromatin und Gen- *Silencing* in *Drosophila* kontrollieren, stellen Suppressor- und Enhancermutationen von PEV wichtige Hilfsmittel dar. Mit Hilfe dieser Mutanten konnten zentrale epigenetische Regulatoren wie SU(VAR)3-9, HP1 und SU(VAR)3-7 gefunden werden. Die funktionelle Bedeutung für heterochromatisches Gen- *Silencing* ist im *In(1)w^{m4} Rearrangement* direkt phänotypisch am Ausmaß der *white* Variegation erkennbar.

Da epigenetische Prozesse zellerblich sind, sollte im Rahmen der Arbeit geklärt werden, inwieweit epigenetische Veränderungen innerhalb der Keimbahn auch auf die nächste Generation „vererbt“ werden. Über solche Prozesse in den Keimbahnzellen ist allerdings auch in *Drosophila* bisher wenig bekannt. Um die Chromatinregulation in der Keimbahn genetisch analysieren zu können, wurde ein dem *In(1)w^{m4} Rearrangement* ähnliches PEV-System etabliert, bei dem das *fs(1)K10*- Gen als keimbahnspezifisches Markergen variabel epigenetisch inaktiviert werden kann (Wieschaus 1978, 1980, Mietzsch et al. in prep.).

3.2.1 Das *fs(1)K10* PEV- System

Der erste Schritt in der Ausbildung der Segmentierung des Embryos ist die Definition der dorso- ventralen und antero- posterioren Achse während der Oogenese (Nüsslein-Volhard 1979). Für die exakte Bildung der dorso- ventralen Achse in der Oogenese wird das Gurken-Protein benötigt, das für das Auslösen der Dorsalisierungskaskade durch Bindung der Torpedo-Rezeptoren (*Drosophila* Homologes des EGF-Rezeptors) auf der dorsalen Seite der sich entwickelnden Eizelle verantwortlich ist. *Fs(1)K10* stellt einen negativen Transkriptionsregulator des *gurken*-Gens dar. Bei Verlust

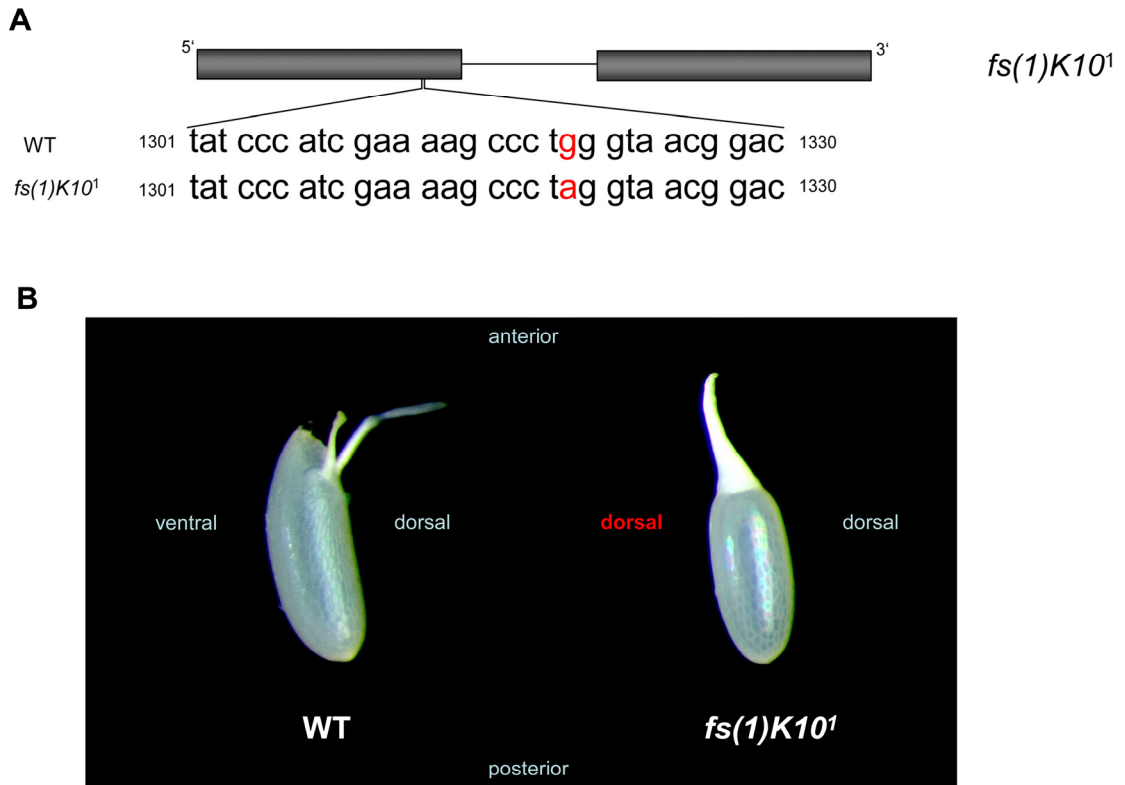


Abb.3.46. *fs(1)K10* als Markergen für PEV-Analysen in der Keimbahn. **A.** Bei der *loss-of-function* Mutation *fs(1)K10^l* handelt es sich um einen Basenaustausch an Stelle 1320 im ersten Exon des Gens, der zu einem *nonsense*-Codon und somit zum verfrühten Translationsstopp führt. **B.** Die Mutation führt zu einer kompletten Dorsalisierung des Embryos. Der Wildtypembryo besitzt am anterioren Pol zwei freie Eifilamente. In der Mutante entstehen aufgrund der kompletten Dorsalisierung zwei Paare von Eifilamenten, die miteinander verwachsen sind.

von FS(1)K10 kommt es zur vollständigen Dorsalisierung des Eies (Abb. 3.46B) und maximal 10% der Embryonen erreichen die Gastrulation (Abb. 3.47). Homozygote *fs(1)K10^l* - Weibchen sind daher steril. Phänotypisch sind *K10^l* - Embryonen leicht von Wildtyp- Embryonen zu unterscheiden, da sie im Vergleich zum Wildtyp durch die

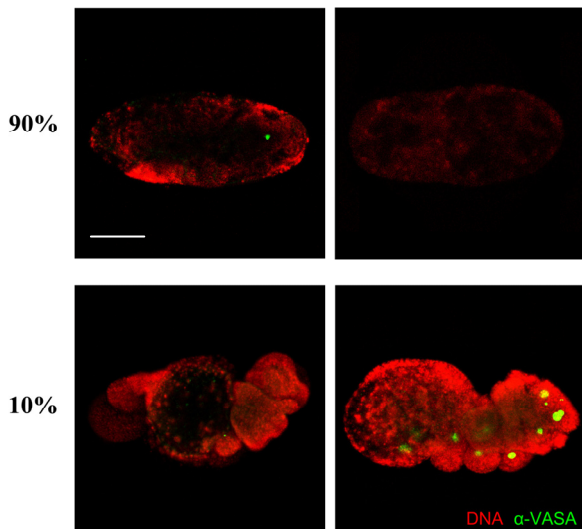


Abb.3.47. Frühe Entwicklung der Embryonen von homozygoten, *fs(1)K10^l*-Weibchen. Antikörperfärbung (grün) gegen das keimbahnspezifische VASA- Protein. 90% der gebildeten Embryonen sterben sehr früh in der Entwicklung. 10% entwickeln sich bis zur Gastrulation, in der Defekte auftreten. PGC (grün) werden entweder nicht gebildet oder gebildet aber nicht internalisiert (rot- DNA (DAPI)-Färbung, grün- VASA; Messbalken 100 μ m).

komplette Dorsalisierung rund erscheinen und am anterioren Pol zwei Eifilamentpaare besitzen, die miteinander verschmolzen sind (Abb. 3.46B).

Im Rahmen der Arbeit konnte zunächst durch Sequenzanalysen gezeigt werden, dass es sich bei der *fs(1)K10^l* Mutation (Wieschaus 1978, 1980) um einen EMS- induzierten Basenaustausch von Guanin zu Adenin an Position 1320 handelt. Dies führt zu einem verfrühten Translationsstopp (TGG → TAG) und einem kompletten Funktionsverlust (Abb. 3.46A). Der Verlust von K10 führt zur kompletten Dorsalisierung der Eizelle, zu Defekten in der Embryogenese und Sterilität der homozygoten *fs(1)K10^l* Weibchen (Abb. 3.46B).

Das *fs(1)K10* PEV- System basiert auf einer zufälligen Integration eines *fs(1)K10⁺* - Transgens in das Genom homozygoter *fs(1)K10^l* - Weibchen (Abb. 3.48). Je nach Insertionsort kann die Sterilität komplett oder nur partiell gerettet werden (Abb. 3.48).

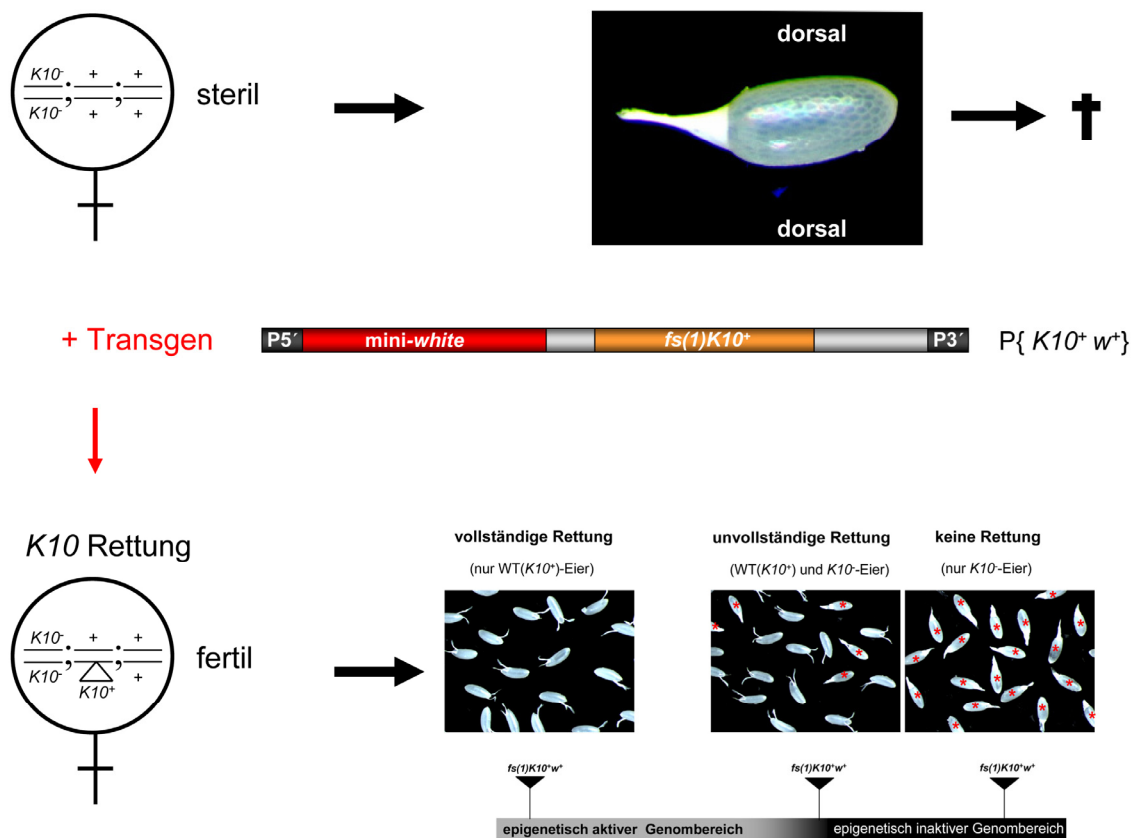


Abb.3.48. Rettung des *fs(1)K10^l* Phänotyps durch ein *K10*-Transgen in Abhängigkeit vom Insertionsort. Homozygote *fs(1)K10^l* Weibchen sind steril. Die vollständig dorsalisierten Embryonen sterben früh. In Abhängigkeit vom Insertionsort kann ein *fs(1)K10*- Transgen den Phänotyp der weiblichen Sterilität retten. Insetiert das Transgen in einen epigenetisch inaktiven Genombereich, findet keine Rettung statt. Liegt das Transgen in einem epigenetisch aktiven Genombereich, erfolgt eine vollständige Rettung. Ist das Transgen in der Nähe eines epigenetisch inaktiven Bereichs inseriert, so kann sich dieser inaktive Chromatinstatus auch teilweise über das Transgen ausbreiten und es entsteht ein variiertes Phänotyp. Diese Weibchen legen sowohl Wildtyp- als auch *K10*-Eier (roter Stern = *K10*-Ei).

Bei einer Integration in einen epigenetisch inaktiven Genombereich wird ein *Silencing* des Transgens beobachtet und keine Rettung des Mutantenphänotyps gefunden. Erfolgt eine Insertion in einen Genombereich, der keinem *Silencing* unterliegt, wird der Mutantenphänotyp vollständig gerettet. Interessant sind jedoch die Linien, die in unmittelbare Nähe von epigenetisch inaktiven Genombereichen inserieren, da hier ein partielles *Silencing* des Transgens beobachtet wird. Diese sogenannten Mosaikweibchen zeigen eine Variegation im Eiphenotyp und produzieren zwei Arten von Eier: Wildtyp-Eier und *K10*-Eier. Durch das Einkreuzen von bereits bekannten Chromatin-Faktoren des Somas kann nun genetisch gezeigt werden, ob diese eine gleichartige Funktion im Keimbahn-Chromatin besitzen.

Durch die Remobilisierung X-chromosomaler *fs(1)K10⁺*-Insertionen wurde eine Kollektion von 178 transgenen Fliegenlinien etabliert. Anknüpfend an Vorarbeiten (Schulze 2003) konnten im Rahmen der Arbeit fast alle Insertionsorte der *K10*-Transgene mittels Inverser PCR und FISH-Analysen bestimmt werden, so dass bei 175 von 178 *K10*-Linien die exakte Position im Genom bekannt ist (Abb. 3.49). Davon sind 9 Transgene im X-Chromosom, 72 Linien im 2. Chromosom und bei 97 Linien erfolgte eine Insertion in das 3. Chromosom. Es wurde keine transgene Linie im 4. Chromosom isoliert. Obwohl das 2. und 3. Chromosom viele *fs(1)K10⁺*-Insertionen tragen, erfolgte keine Insertion in perizentrisches Heterochromatin oder in repetitive Sequenzen der Telomere (Abb. 3.49). Solche Insertionen konnten im *K10*-System erwartungsgemäß nicht isoliert werden, da *P*-Element-Insertionen nur sehr selten in heterochromatischen Sequenzen gefunden werden (Ryder et al., 2004).

Auf molekularer Ebene konnten 114 intragenische, 54 intergenische und 4 Transposon-Insertionen (*1360*, *gypsy*, *3S18*) detektiert werden. Von den 114 intragenischen *K10*-Transgenen wurden 11 im 5'UTR-Bereich, 50 in Exon- und 53 in Intronbereichen gefunden. In Abhängigkeit vom Insertionsort wurden in den Linien unterschiedliche *K10*-Variegationen detektiert. 12,6% (21 Linien) zeigen dabei eine Variegation von über 1%. Bei 23,4% der isolierten Linien (39 Linien) auf dem 2. und 3. Chromosom werden mit sehr geringer Frequenz *K10*-Eier gefunden, die eventuell auf spontane mitotische Rekombination zurückzuführen sind. Das *Silencing* von *K10* wird klonal initiiert. Da keine partiell dorsalisierten Eier gefunden werden, kann das *K10*-*Silencing* mit dem *Spreading* eines benachbarten inaktiven Chromatinzustandes erklärt werden. Der größte Teil der Linien (102 Linien, 61,1%) zeigt eine vollständige Rettung und ist somit in epigenetisch aktive Genombereiche inseriert. Um die *K10*-Transgen-Insertion

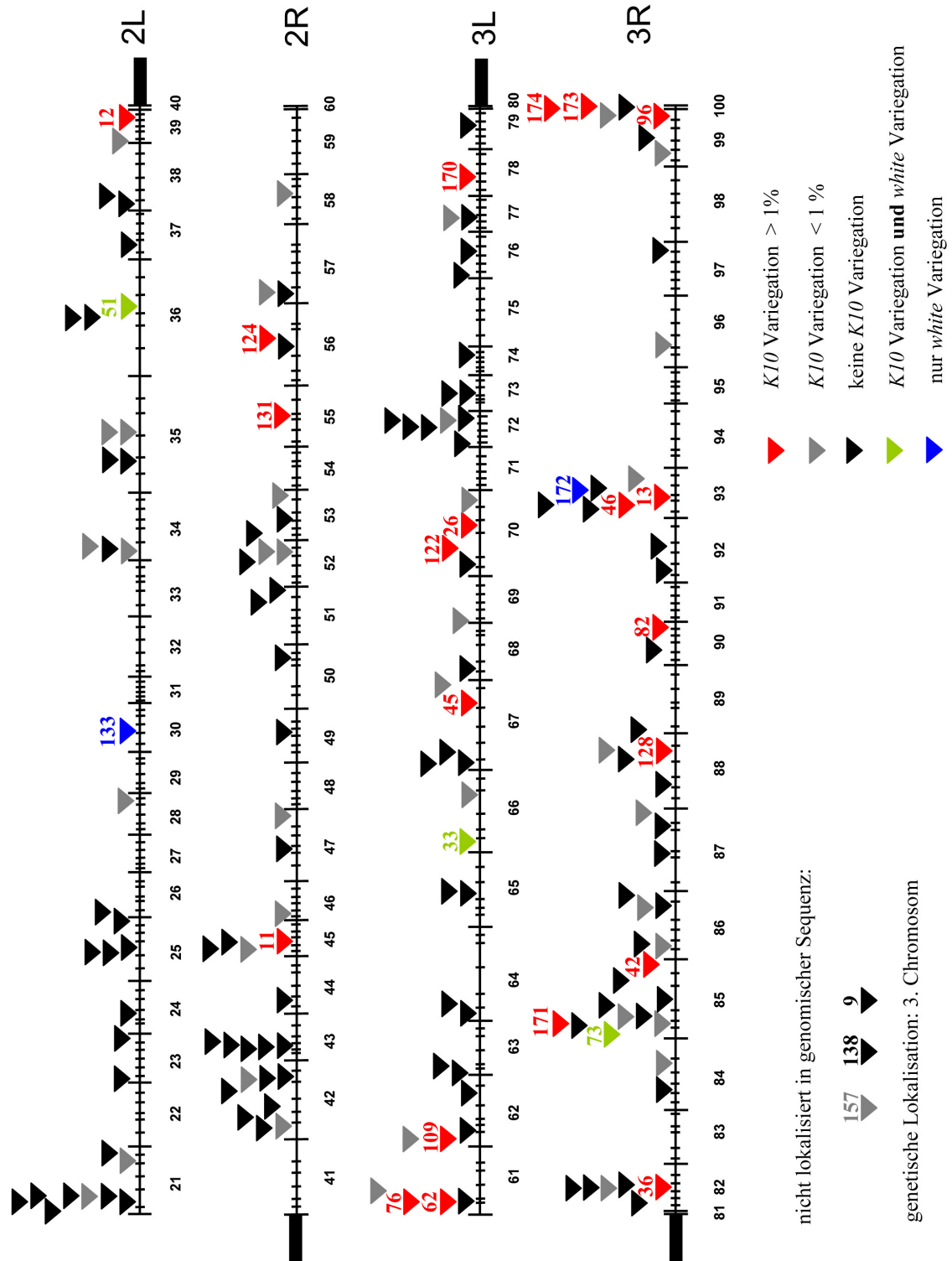


Abb.3.49. Insertionsorte der *fs(1)K10* Transgene im 2. und 3. Chromosom. Zytologische Karte der Chromosomen. Die Dreiecke repräsentieren die Insertionsorte der Transgene. Die Transgene zeigen eine vollständige (schwarz) oder partielle Rettung (rot, grau, grün) des *fs(1)K10*¹-Mutantenphänotyps in Abhängigkeit vom Insertionsort. Blaue Dreiecke stellen transgene Fliegenlinien dar, die eine Variegation für *white* im Auge zeigen. Bei den 3 nicht in die Karte eingezeichneten Linien (157, 138, 9) muss der Insertionsort in der genomischen Sequenz noch bestimmt werden. Die Insertionsorte verteilen sich über nahezu das gesamte 2. und 3. Chromosom, es finden sich aber Regionen mit häufigen Insertionen (21B) und ohne Insertion (41).

in den Fliegen sichtbar zu machen, wurde das *white*- Gen als Markergen genutzt. Insgesamt zeigen 1,8% der Linien (3 Linien) eine Variegation für das *white*- Gen (somatisches Gen- *Silencing*), als auch ein Keimbahn- spezifisches *Silencing* des *fs(1)K10*- Transgens. Hier scheint sowohl im Soma als auch in der Keimbahn ein benachbarter epigenetisch inaktiver Genombereich das Transgen partiell zu inaktivieren. Weitere 2 Linien (1,2%) zeigen nur eine Variegation für das *white*- Gen. Hier unterscheiden sich die Chromatin- Zustände zwischen Soma und Keimbahn, da in den Keimbahnzellen eine vollständige Rettung des *K10*- Phänotyps erfolgte und kein *Silencing* detektiert werden konnte.

Von den 21 *K10*- Linien, die eine *K10*- Variegation über 1% zeigen, wurden 10 Linien mit Variegationen von 29,2 bis 96% ausgewählt, deren Insertionsorte im 2. und 3. Chromosom in der genomischen Sequenz bestimmt sind. Bei diesen Linien erfolgte die Analyse der Wirkung von Mutationen, die Chromatin- Regulatoren betreffen. In diesen Untersuchungen sollte geprüft werden, ob diese Faktoren und die von ihnen kontrollierten epigenetischen Prozesse auch in der Keimbahn eine Rolle spielen.

3.2.2 Genetische Analyse bekannter Chromatinfunktionen auf ihre Wirkung in der Keimbahn mit Hilfe des *K10*- PEV- Systems

Um die bereits aus dem Soma bekannten Chromatin- Faktoren SU(VAR)3-9, SU(VAR)2-5 [HP1], SUV4-20, SU(VAR)3-1 [JIL-1], E(Z), SU(VAR)3-3, LID, TAIMAN und *eggless* [dSETDB1] im *K10*- PEV testen zu können, wurden diese zunächst in einen *K10*- Mutantenhintergrund gekreuzt. Weiterhin wurde auch *piwi* als Komponente der RNAi- Maschinerie untersucht. Insgesamt wurden Mutanten für 11 verschiedene Chromatin- Regulatoren auf ihre modifizierende Wirkung in den 10 *K10*- Variegationslinien $P\{fs(1)K10^+w^+\}$ 11, 12, 45, 46, 82, 124, 128, 131, 171 und 174 untersucht (Abb. 3.50 – 3.55; 7.2 – 7.8). Dabei wurden die *K10*- Transgene grundsätzlich aus dem Weibchen ($K10/K10$; $P\{K10^w^+\}/+$) und die Mutationen für die Chromatinfaktoren aus dem Männchen ($K10/Y$; $Su/+$) gekreuzt. In der F1- Generation wurde die Eiablage (WT- Eier : *K10*- Eier) jeweils von 38 Kontroll- ($K10/K10$; $P\{K10^w^+\}/+$) und 38 Testweibchen ($K10/K10$; $P\{K10^w^+\}/Su$) über 10 Tage für jedes individuelle Weibchen bestimmt. Zur Quantifizierung der *K10*- Variegation wurde neben der Frequenz der *K10*- Eier auch die Frequenz der Mosaikweibchen bestimmt. Diese Weibchen produzieren sowohl WT- als auch *K10*- Eier.

Die Analyse der Effekte der Faktoren in den unterschiedlichen *K10*- Linien zeigt, dass die im somatischen Gen- *Silencing* isolierten Chromatinregulatoren auch eine Rolle im Keimbahn- Chromatin spielen. Allerdings scheint es mehrere verschiedene molekulare Reaktionswege von Gen- *Silencing* in der Keimbahn zu geben, da in jeder *K10*- Linie eine unterschiedliche Anzahl der Regulatoren einen Effekt zeigt. Des Weiteren konnten nach der Art der Wirkung der Effektoren drei verschiedene Wirkungsmodi unterschieden werden: (1) der reguläre Modus, bei dem nur der Testgenotyp, der die *Su(var)*- Mutation trägt, supprimiert ist, nicht aber die Kontrolle, (2) der parentale Modus, bei dem beide Genotypen [Kontrollgenotyp ohne *Su(var)* und Testgenotyp mit *Su(var)*] einen Suppressor- Effekt zeigen und (3) der unerwartet aufgetretene alternative Modus, der im Soma nie beobachtet wurde. Hier ist nur der Kontrollgenotyp ohne *Su(var)*- Mutation supprimiert. Der Genotyp mit der *Su(var)*- Mutation zeigt hingegen in einigen Fällen eine Erhöhung über die Kontrolle hinaus. Da reziproke Kreuzungen gleiche Resultate erbrachten, können paternale oder maternale Effekte der Mutationen als Ursache für die drei Wirkungsmodi ausgeschlossen werden (Abb. 3.53; 7.3-7.4).

In der *K10*- Linie 11 (*K10*- Variegation 38%), die auf dem 2. Chromosom im 5'UTR-Bereich des an Apoptose- Prozessen beteiligten *Rep2*- Gens (*DNA fragmentation factor-related protein 2*, *Drep2*; Inohara und Nunez 1999) inseriert ist, zeigt nur *E(z)*¹⁵ den regulären Modus (Abb. 3.50). Die *Suv4-20*^{BG00814} Mutation ist der einzige untersuchte Modifikator, der auf das Ausmaß der *K10*- Variegation an dieser Stelle im Keimbahn- Chromatin offensichtlich keinen Einfluß hat. Sowohl das *Su(var)3-1*⁰²- Allel [JIL-1] als auch *Su(var)2-1*⁰¹ zeigen einen alternativen Wirkungsmodus auf die *K10*- Variegation (Abb. 3.50). *Su(var)3-9*⁰⁶, *Su(var)2-5*⁰⁵ [HP1], *Su(var)3-3*⁰⁹, *Df(2L)tai2*, *eggless*¹⁴⁷³ [dSETDB1] und *piwi* zeigen den parentalen Modus, bei dem beide Genotypen supprimiert sind. An der Insertionsstelle der Linie 11 gibt es offensichtlich einen SUV4-20 unabhängigen Reaktionsweg der Etablierung eines inaktiven Chromatinzustandes (Abb. 3.50). Das Gen- *Silencing* steht an dieser Stelle im Keimbahngenom unter Kontrolle von SU(VAR)3-9, SU(VAR)2-5 [HP1], SU(VAR)3-1 [JIL-1], E(Z), SU(VAR)2-1, SU(VAR)3-3, LID, TAIMAN, dSETDB1 und Piwi.

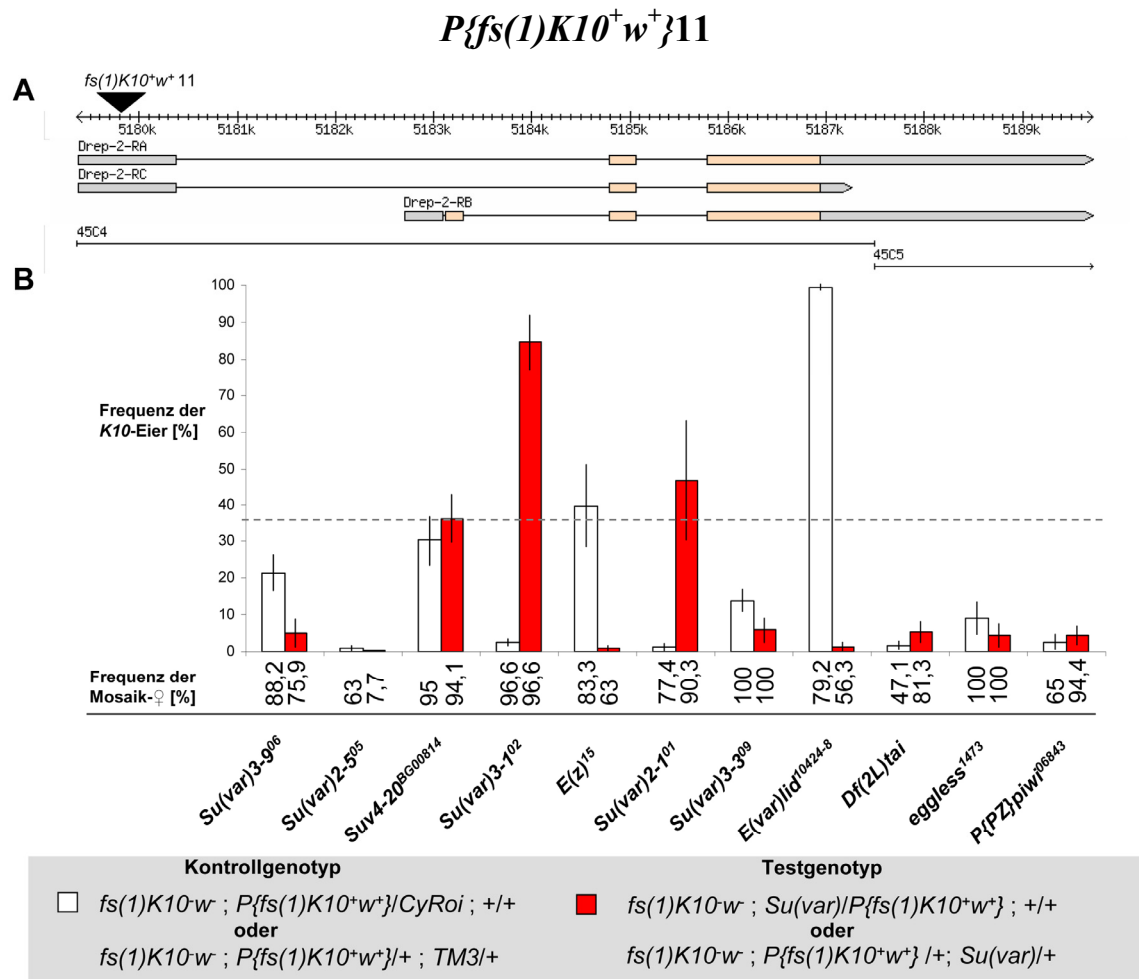


Abb.3.50. Einfluß von Chromatinfaktoren auf *K10* Silencing in der Keimbahn bei der Insertionslinie $P\{fs(1)K10^+w^+\}11$. Ergebnisse nach Einkreuzung der Mutationen (♂) in die Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}11$. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1- Generation wurde über 10 Tage verfolgt. **A.** Genomischer Insertionsort der Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}11$ in Region 45C4. **B.** Alle getesteten Mutationen, außer *Suv4-20^{BG00814}* zeigen einen Effekt auf die *K10*- Variegation der Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}11$. Die Frequenz an Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der $P\{fs(1)K10^+w^+\}11$ Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*-Eiern (Kontrolle).

Die Variegation der Linie 12, bei der eine Insertion in den Intronbereich des Gens *Df31* (*Decondensation factor 31*; Crevel und Cotterill 1995) erfolgte, beträgt 29,2% (Abb. 3.51). Nur an diesem Insertionsort manifestieren *Su(var)3-906*, *Suv4-20^{BG00814}* und *E(z)15* einen alternativen Modus. *E(var)lid10424-8* zeigt den regulären Modus. Bei *Su(var)3-309*, *egg¹⁴⁷³* und *piwi* ist in beiden Genotypen eine Erhöhung über die Kontrolle hinaus nachweisbar. Das Gen- *Silencing* steht an der Insertionsstelle der Linie 12 unter Kontrolle von SU(VAR)3-9, SUV4-20, E(Z) und LID (Abb. 3.51). Eine Beeinflussung der Genomstruktur durch Piwi, SU(VAR)3-3 und dSETDB1 kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

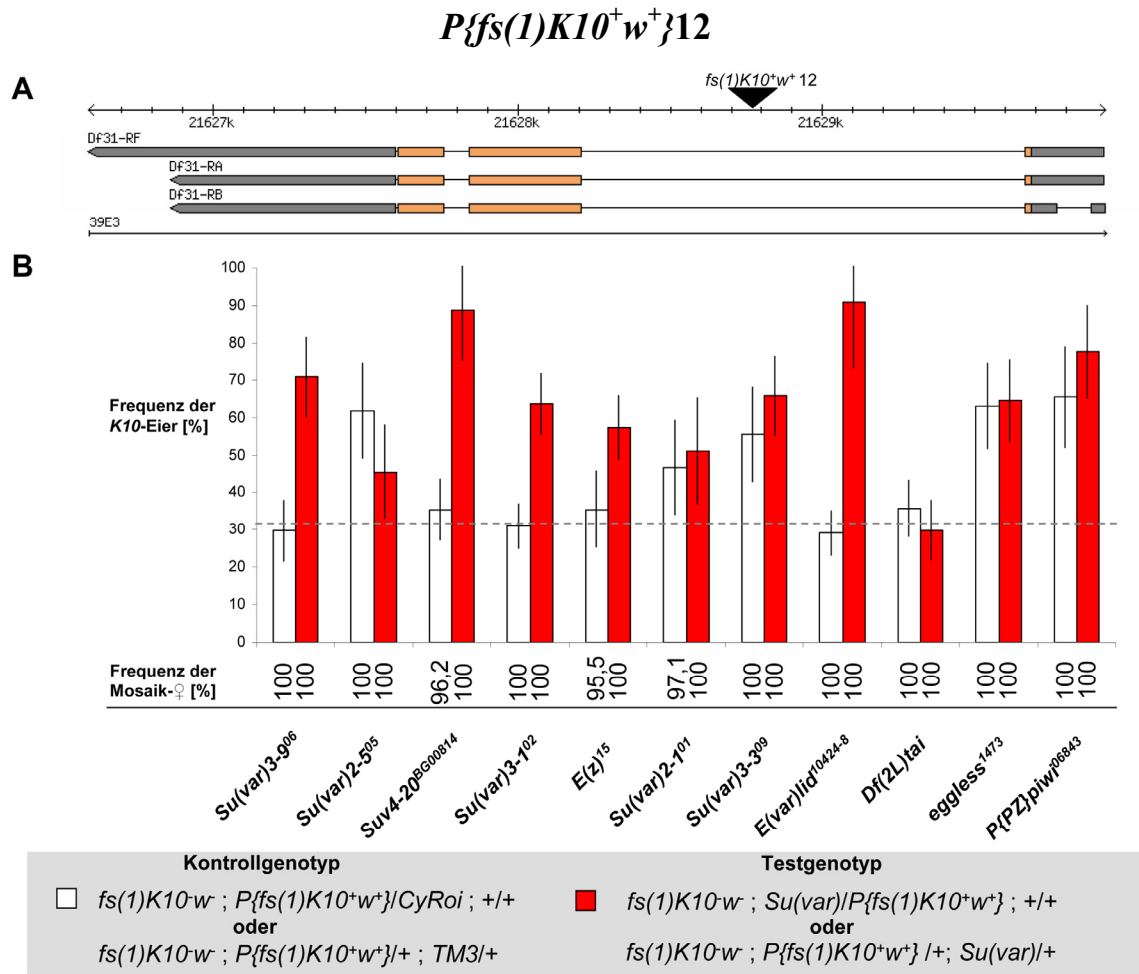


Abb. 3.51. Analyse des Gen-*Silencings* in der Keimbahn am Insertionsort des *fs(1)K10-* Transgens 12. Die Mutationen der Chromatinfaktoren sind paternaler Herkunft, das untersuchte *fs(1)K10-* Transgen 12 maternalen Ursprungs. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen wurde über 10 Tage verfolgt. **A.** Genomischer Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}12* in Region 39E3. **B.** Nur *Su(var)3-9⁰⁶*, *Suv4-20^{BG00814}*, *Su(var)3-1⁰²*, *E(z)¹⁵*, *E(var)lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸*, *Su(var)3-3⁰⁹*, *egg¹⁴⁷³* und *piwi* zeigen einen Effekt auf die *K10-* Variegation der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}12*. Die Anzahl der Weibchen, die sowohl *K10-* als auch WT- Eier legten (Mosaikweibchen), ist als Frequenz der Mosaikweibchen unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der *P{fs(1)K10⁺w⁺}12* Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10-* Eiern (Kontrolle).

Bei der Linie 46, deren *K10-* Variegation ca. 60% beträgt, erfolgte die *K10-* Transgen-Insertion in die 5'UTR des Gens *Mvl* (*Malvolio*), das für einen transmembranen Metall-Ionen-Transporter kodiert (Orgad et al., 1998; Southon et al., 2008). *E(z)¹⁵* zeigt genau wie *Suv4-20^{BG00814}* und *Su(var)3-3⁰⁹* den regulären Modus (Abb. 3.52). An dieser Stelle wird weder für *Su(var)3-9⁰⁶* noch *Su(var)3-1⁰²* [JIL-1] ein signifikanter Effekt nachgewiesen. *Su(var)2-1⁰¹* zeigt wiederum den alternativen Modus. *Su(var)2-5⁰⁵* [HP1], *E(var)lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸*, *Df(2L)tai2*, *eggless¹⁴⁷³* [dSETDB1] und *piwi* prägen erneut den

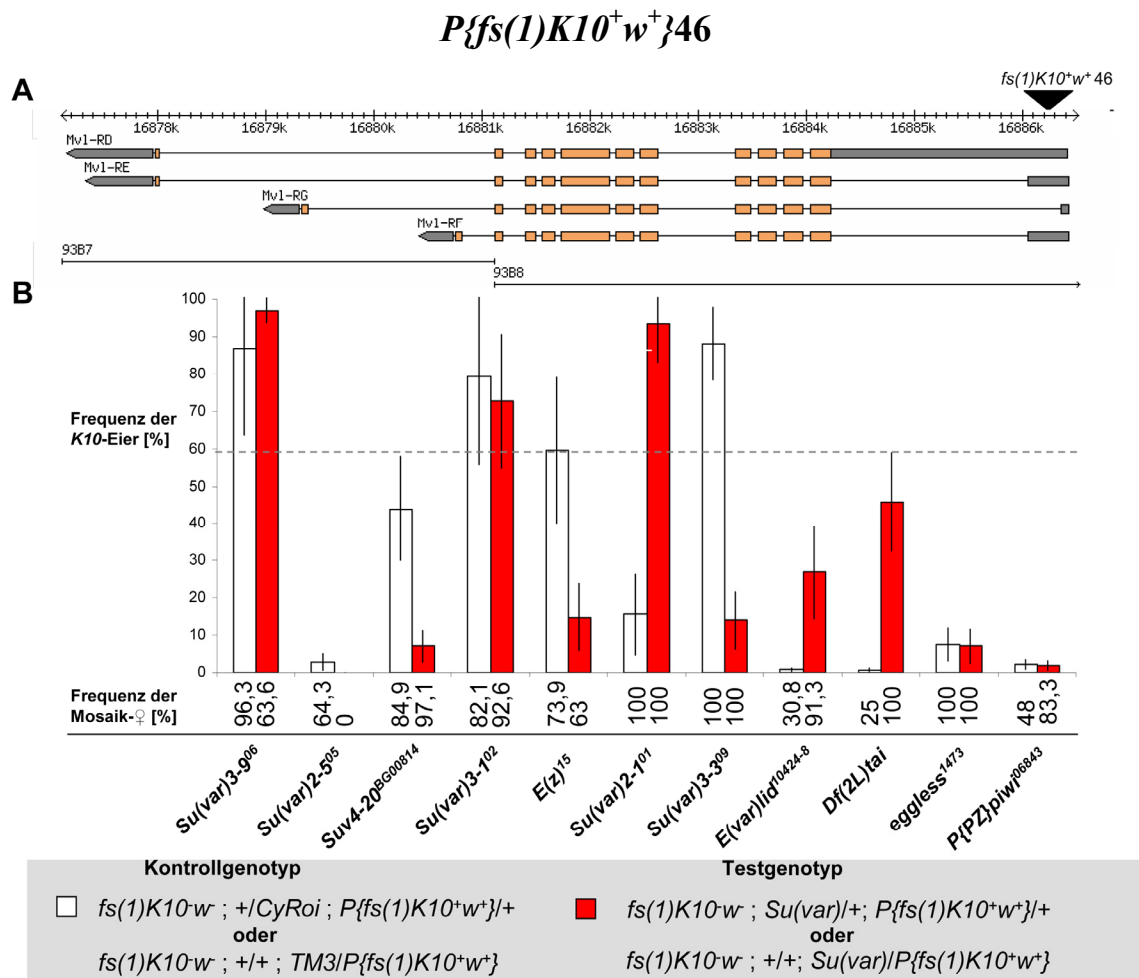


Abb.3.52. Analyse der Bildung epigenetisch inaktiver Chromatinstrukturen in der Keimbahn am Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}46*. Das *fs(1)K10-* Transgen 46 ist maternalen Ursprungs, die Mutationen der Chromatinregulatoren paternalen Herkunft. Für jede Mutation wurde die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen über 10 Tage verfolgt. **A.** Genomischer Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}46* in Region 93B8. **B.** Am Insertionsort der Linie 46 sind bis auf *Su(var)3-9⁰⁶* und *Su(var)3-1⁰²* alle getesteten Faktoren am Gen- *Silencing* beteiligt. Unter dem Diagramm ist die Frequenz der Mosaikweibchen (legen *K10-* und WT- Eier) dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der *P{fs(1)K10⁺w⁺}46* Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10-* Eiern (Kontrolle).

parentalen Modus aus. An dieser Stelle steht das *Silencing* in der Keimbahn offensichtlich nicht unter Kontrolle von *SU(VAR)3-9* und *SU(VAR)3-1* [JIL-1], sondern wird durch *SU(VAR)2-5* [HP1], *SUV4-20*, *E(Z)*, *SU(VAR)2-1*, *SU(VAR)3-3*, *LID*, *TAIMAN*, *dSETDB1* und *Piwi* bestimmt (Abb. 3.52).

Um zu klären, ob der parentale Modus, der bei *SU(VAR)2-5* [HP1] in der *K10-* Linie 46 auftritt, von der elterlichen Herkunft der *Su(var)-* Mutation abhängig ist, wurden reziproke Kreuzungen durchgeführt (Abb. 3.53A). Zwischen den reziproken Kreuzungen wurden keine Unterschiede gefunden. Der Effekt ist somit unabhängig vom Geschlecht der Eltern. Im genetischen Hintergrund des *CyRoi- Balancer-* Chromosoms,

das in der Kontrolle enthalten ist, könnte sich aber theoretisch auch ein *Su(var)* für *K10* Silencing befinden. Dagegen spricht, dass bei bestimmten Suppressorgenotypen, wie z.B. *Su(var)2-5⁰⁵*, *Su(var)2-1⁰¹*, *piwi* und *Df(2L)tai2* in den *K10*- Linien 12, 81, 131 und 171, die *CyRoi* Kontrolltiere keine Reduktion der *K10*- Variegation aufweisen. Des Weiteren wurden bei einer Kreuzung mit einem *Scutoid (Sco)*- Chromosom (*fs(1)K10^w/Y*; *Su(var)2-5⁰⁵/Sco*) ebenfalls eine Suppression der *K10*- Variegation im *Sco*- Genotyp gefunden (Abb. 3.53 B). Somit kann ein Suppressor im *CyRoi*- Chromosom sicher ausgeschlossen werden. Es kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass sich im *Sco*- Chromosom ein Suppressor befindet, da bei einer Kreuzung von *fs(1)K10^w/Y*; *Su(var)2-1⁰¹ Sco/+* Männchen in den *Sco* F1- Kontrolltieren keine Reduktion der *K10*- Frequenz auftritt (Abb. 3.58 B).

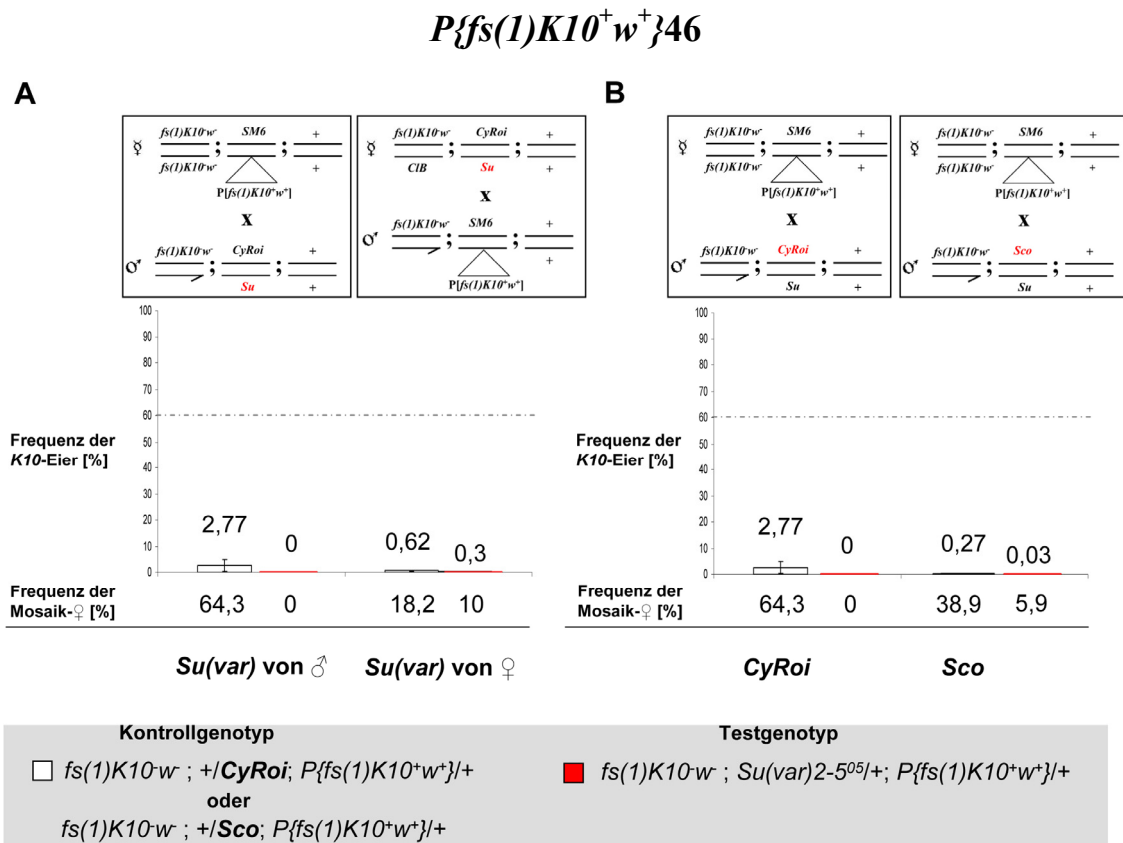


Abb.3.53. Der parentale Modus von *Su(var)2-5⁰⁵* ist unabhängig von der Herkunft der *Su(var)*- Mutation und unabhängig vom *CyRoi*- Chromosom. Dargestellt sind die Ergebnisse nach einer Einkreuzung von *Su(var)2-5⁰⁵* in die Linie *P{fs(1)K10^w}46*. **A.** Reziproke Kreuzungen zeigen keinen Unterschied in der Frequenz der *K10*- Eier. **B.** Auch das *CyRoi*- Balancer- Chromosom hat keinen Einfluss auf die Suppression des Kontrollphänotyps, da auch mit einem *Scutoid (Sco)*- Chromosom derselbe suppressierte Phänotyp ausgeprägt wird.

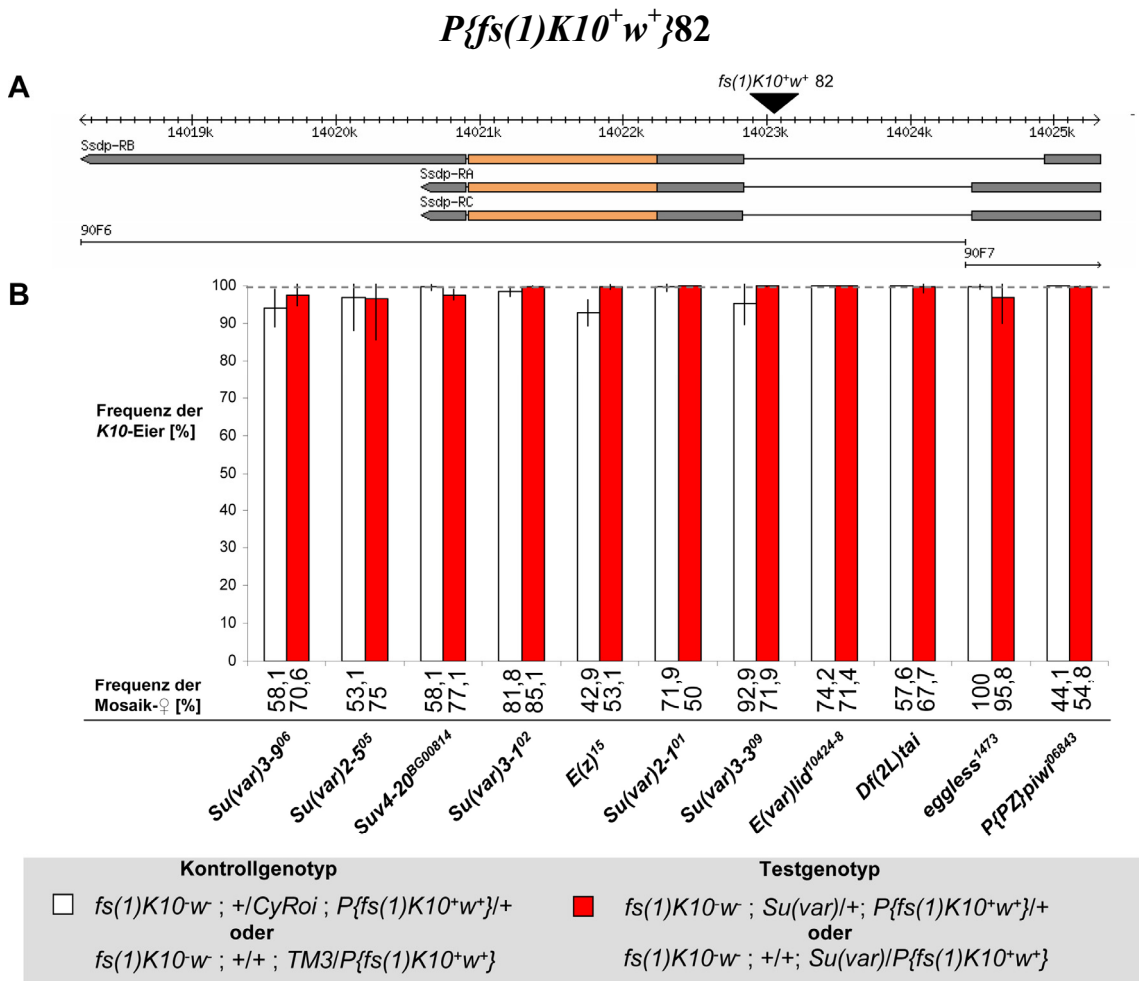


Abb.3.54. Analyse des Gen- Silencings in der Keimbahn mit Hilfe des *K10*- PEV am Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}82*. Ergebnisse nach Einkreuzung der Chromatinfaktoren (♂) in die *K10*- Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}82*. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen wurde über 10 Tage verfolgt. **A.** Genomischer Insertionsort des *fs(1)K10*- Transgens 82 in Region 90F6. **B.** Keiner der getesteten Faktoren ist am Insertionsort der Linie 82 am Gen- Silencing beteiligt. Die Frequenz der Mosaikweibchen spiegelt die Weibchen wider, die sowohl *K10*- als auch WT- Eier legten. Die gestrichelte Linie markiert die in der *P{fs(1)K10⁺w⁺}82* Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*- Eiern (Kontrolle).

Bei der *K10*-Linie 82, die eine *K10*- Variegation von 96% aufweist, ist das Transgen in den Intronbereich des Gens *Ssdp* (*Sequence-specific single-stranded DNA-binding protein*) inseriert. Das *Ssdp*- Protein ist Bestandteil eines Chip/Ap Transkriptionsregulations- Komplexes (van Meyel et al., 2003). An diesem Insertionsort zeigt keiner der untersuchten Modifikatoren einen signifikanten Einfluss auf die *K10*-Variegation. (Abb. 3.54B). Obwohl kein Einfluß der Mutationen auf die *K10*-Variegation gefunden wird, zeigen sich Unterschiede in der Anzahl der Mosaikweibchen (Abb. 3.54B). Ähnliche Effekte wurden auch bei den *K10*- Linien 131 und 174 (Abb. 7.6 und 7.8) beobachtet. Offensichtlich ist das Gen- Silencing in der Linie 82 unabhängig von allen untersuchten Faktoren und wird von einem neuen, noch unbekanntem Reaktionsweg kontrolliert.

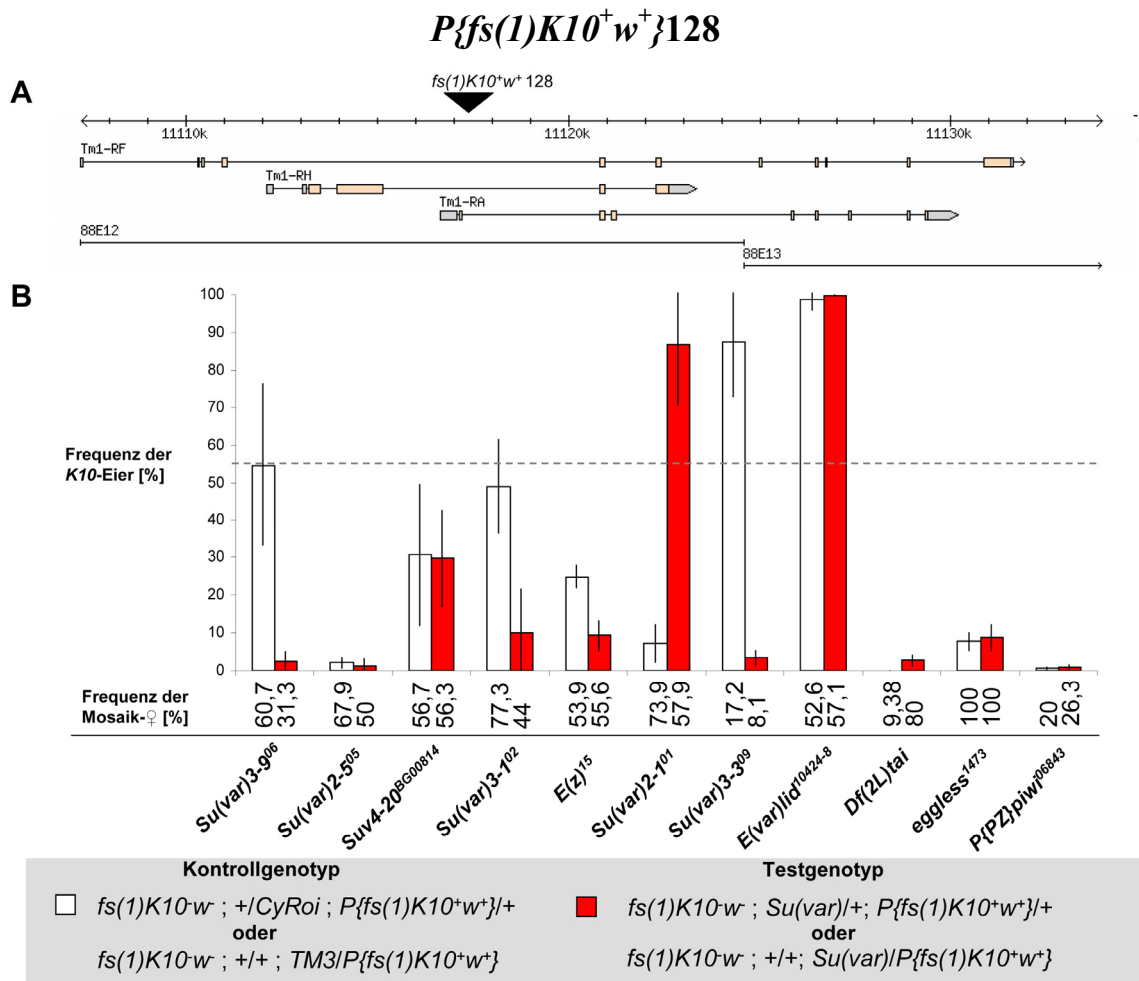


Abb.3.55. Einfluß von Chromatinfaktoren auf *K10* Silencing in der Keimbahn bei der Insertionslinie *P{fs(1)K10⁺w⁺}128*. Das *K10*- Transgen 128 ist maternalen Ursprungs, die Mutationen der Chromatinfaktoren paternalen Herkunft. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen wurde über 10 Tage verfolgt. **A.** Genomischer Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}128* in Region 88E12. **B.** Bis auf *Suv4-20^{BG00814}* haben alle getesteten Mutationen einen Einfluß auf das *K10* Silencing der Linie 128. Sie sind somit am Aufbau epigenetisch inaktiver Strukturen am Insertionsort der Linie 128 beteiligt. Unter dem Diagramm ist die Anzahl der Weibchen dargestellt, die sowohl WT- als auch *K10*- Eier legten (Mosaikweibchen). Die gestrichelte Linie markiert die in der *P{fs(1)K10⁺w⁺}128* Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*- Eiern (Kontrolle).

Bei der Linie 128 (55% *K10*- Variegation) ist das *P{fs(1)K10⁺w⁺}* Transgen in den Intronbereich des Gens *Tm1* (*Tropomyosin1*) inseriert. *Tm1* ist ein Bestandteil des Polplasmas in frühen Embryonen (Erdelyi et al., 1995). Auch bei dieser Linie lässt sich ein anderer molekularer Reaktionsweg von Gen- *Silencing* vermuten, da *Suv4-20^{BG00814}* keinen Effekt zeigt und bei *E(var)lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸* beide Genotypen erhöht sind (Abb. 3.55). Der reguläre Modus tritt bei *Su(var)3-9⁰⁶*, *Su(var)3-1⁰²* [JIL-1] und *Su(var)3-3⁰⁹* auf. Die Faktoren SU(VAR)2-5 [HP1], E(Z), TAIMAN [*Df(2L)tai2*], *eggless* [dSETDB1] und *piwi* zeigen den parental Modus, da sowohl der Kontrollgenotyp [ohne *Su(var)*] als auch der Genotyp mit *Su(var)*- Mutation supprimiert sind. Wie in den beiden *K10*- Linien 11 und 46 zeigt *Su(var)2-1⁰¹* wiederum den alternativen Modus. An dieser Stelle

im Keimbahn-Chromatin gibt es einen von SU(VAR)3-9, SU(VAR)2-5 [HP1], SU(VAR)3-1 [JIL-1], E(Z), SU(VAR)2-1, SU(VAR)3-3, E(VAR)LID, TAIMAN, dSETDB1 und Piwi abhängigen Reaktionsweg. SUV4-20 hat offensichtlich hier keine Funktion.

Zusammenfassend konnte mit Hilfe des *K10*-PEV- Systems erstmals genetisch gezeigt werden, dass die im Soma identifizierten und intensiv analysierten Chromatin- Faktoren SU(VAR)3-9, SU(VAR)2-5 [HP1], SUV4-20, SU(VAR)3-1 [JIL-1], E(Z), SU(VAR)2-1, SU(VAR)3-3, E(VAR)LID, TAIMAN, dSETDB1 und Piwi auch an der Kontrolle von *Silencing*- Prozessen in der Keimbahn beteiligt sind. Dabei zeigen sich aber in Abhängigkeit des Insertionsortes der *K10*- Transgene Unterschiede in der Kontrolle der *Silencing*- Prozesse (Abb. 7.10).

3.2.3 Untersuchung zur möglichen Rolle von *Transvection* beim Gen-*Silencing* in der Keimbahn

Abschließend wurden Experimente durchgeführt, mit deren Hilfe geprüft werden sollte, ob paarungsabhängige Prozesse (*Transvection*) bei den parentalen und alternativen Effekten der *Su(var)*- Mutationen auf *K10*- Variegation in den Nachkommenweibchen eine Rolle spielen. Zunächst konnten durch gezielte Kreuzungsanalysen maternale und paternale Effekte ausgeschlossen werden (vgl. Abschnitt 3.2.2). Eine mögliche Erklärung der Suppressorwirkung im Kontrollgenotyp, der die *Su(var)*- Mutation nicht enthält, könnten *Transvection*- Prozesse sein, die im Soma von *Drosophila* bereits umfassend analysiert wurden (Gemkov et al., 1998; Pirrotta 1999; Duncan 2002). Diese Paarungs- abhängige Expression von Mutantenphänotypen wurde erstmals von Lewis (1954) am Bithorax- Komplex (BX- C) beschrieben und *Transvection* genannt. Inzwischen wurde *Transvection* auch am *yellow*-, *decapentaplegic*- und *eyes absent*- Locus nachgewiesen. Molekular beruhen diese Effekte auf einer Paarungs- abhängigen Wirkung von *Enhancer*- Elementen auf Promotoren in *trans* im homologen Chromosom (Kaufman et al., 1973). In einigen Fällen wurde eine Beteiligung des Zeste- Proteins bei *Transvection*- Prozessen nachgewiesen. Generell wird postuliert, dass DNA- bindende Proteine das Paaren der homologen Chromosomen durch Selbst-Aggregation unterstützen (Chen et al., 1992). Im Fall des parentalen Modus im *K10*- PEV wäre es möglich, dass in den diploiden parentalen Stammzellen die *Su(var)*- Mutation auf beiden homologen Chromosomen die Chromatinstruktur am Insertionsort des $P\{s(1)K10^+w^+\}$ Transgens beeinflusst. In den Keimbahnzellen der F1- Tiere paart die

Region, die das *K10*- Transgen trägt, mit der homologen, parental modifizierten Region. Durch *Transvection*- Prozesse könnte die „offenere“ Chromatinstruktur auch im Kontrollgenotyp auf die homologe Region übertragen werden, die das *K10*- Transgen enthält. Das Ergebnis wäre sowohl ein supprimierter Kontroll- [ohne *Su(var)*] als auch ein supprimierter Testgenotyp [mit *Su(var)*] (Abb. 3.56). Auch der alternative Modus könnte über *Transvection*- ähnliche Mechanismen erklärt werden. Würde eine analoge Situation in somatischen Zellen auftreten, wäre es nicht möglich, die Mutation zu isolieren, weil die Nachkommen des Suppressor- Ausnahmetieres einen *Su(var)* zeigen, die Mutation aber nicht vorhanden ist. Ein alternativer Modus der *Su(var)*- Wirkung trat im *K10*- PEV immer mit *Su(var)2-I⁰¹* und an einigen *K10*-Insertionsstellen auch bei *Df(2L)tai2*, *E(var)lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸*, *eggless¹⁴⁷³* [dSETDB1] und *piwi* auf (Abb. 3.50-3.55; 7.2; 7.5-7.8).

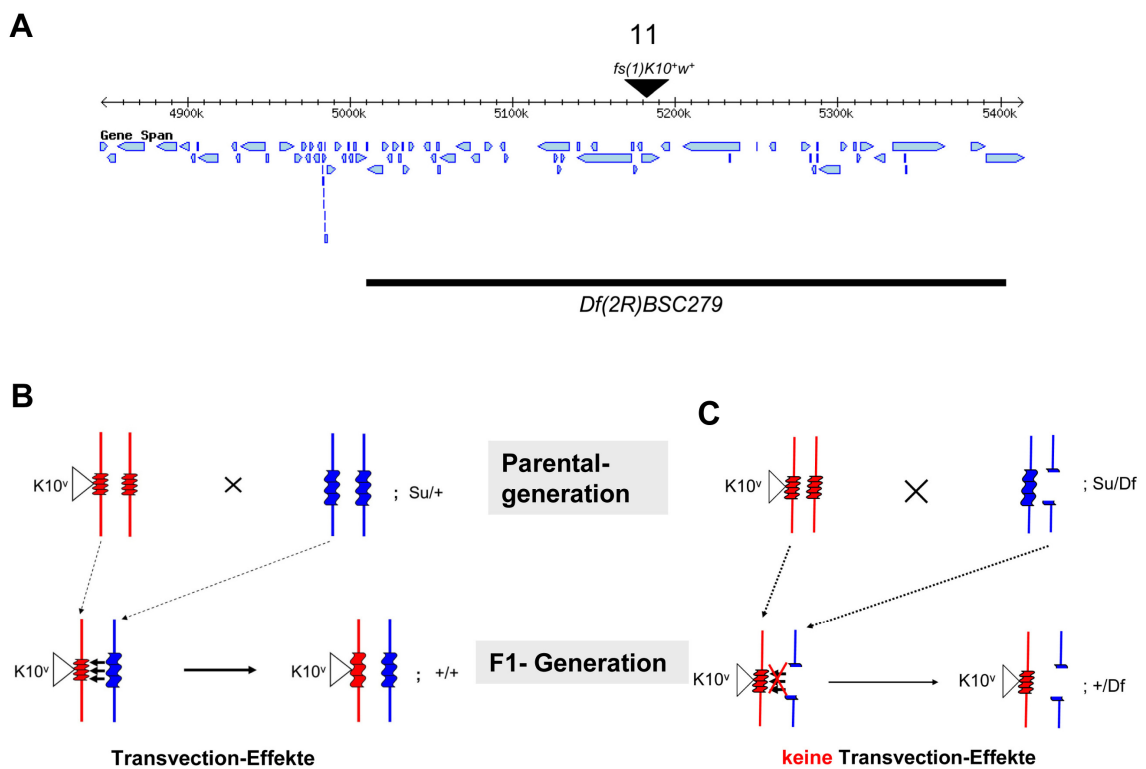


Abb.3.56. Transvection als möglicher Mechanismus des parental und alternativen Modus. *Transvection* bezeichnet die Übertragung von Chromatinzuständen von einem Chromosom auf ein homologes Chromosom. **A.** Genomische Region um die Insertionsstelle der Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}11$. Die genutzte Deletion $Df(2R)BSC279$ (schwarzer Balken) deletiert die homologe Region. **B.** In der Parentalgeneration ist der Bereich der *K10*-Insertion in einem epigenetisch inaktiven Zustand. Der homologe Bereich ist im Suppressor-Hintergrund des Vaters in einem offenen Chromatinzustand. In der F1-Generation kommen beide Chromosomen zusammen und der offene Chromatinzustand wird durch *Transvection*-Effekte und ohne Anwesenheit des *Su(var)*s auf die homologe Region mit der *K10*-Insertion übertragen. **C.** Ist die homologe Region deletiert, können die *Transvection*-Effekte nicht stattfinden und die Region der *K10*- Insertion bleibt in dem epigenetisch inaktiven Zustand.

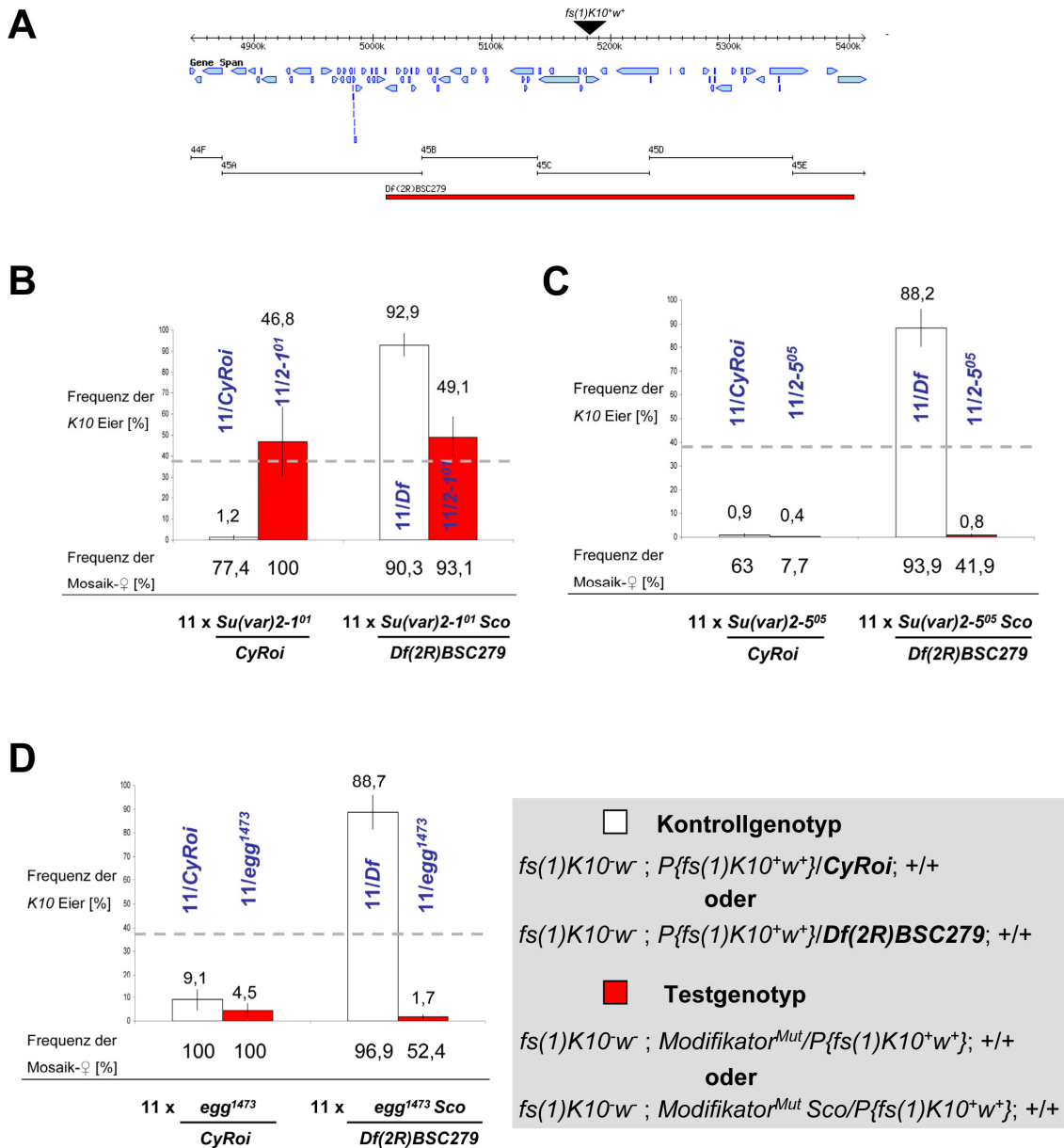


Abb.3.57. Einfluss der Defizienz *Df(2R)BSC279* auf *K10*- Silencing am Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10+w+}11*. **A.** Genomische Region um die Insertionsstelle der Linie *P{fs(1)K10+w+}11*. Die Defizienz *Df(2R)BSC279* (roter Balken) deletiert die homologe Region. **B – D.** Die Einkreuzung von *Su(var)2-101* (B), *Su(var)2-505* ([HP1], C) bzw. *egg1473* ([dSETDB1], D) in die Linie *P{fs(1)K10+w+}11* zeigt einen alternativen (*Su(var)2-101*) bzw. paternalen Modus (HP1 und dSETDB1), der bei Vorhandensein der Defizienz nicht ausgeprägt wird. Die Frequenz der Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der *P{fs(1)K10+w+}11* Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*- Eiern (Kontrolle).

Um den Einfluss von *Transvection*- Prozessen direkt zu untersuchen, wurde mit Hilfe einer Deletion [*Df(2R)BSC279*] die homologe Region, in der die Insertionsstelle der *K10*- Linie 11 liegt, deletiert (Abb. 3.57A). In der F1- Generation sollte der

Kontrollgenotyp nicht mehr supprimiert sein, da die Region in den homologen Chromosomen fehlt. Der Testgenotyp sollte davon unbeeinflusst sein (Abb. 3.56C). Für diese Analysen wurden sowohl *Su(var)2-1⁰¹* (alternativer Modus) als auch *eggless*¹⁴⁷³

A

P *fs(1)K10-w;P{fs(1)K10+w⁺}* x *fs(1)K10-w;Df(2R)BSC279/Su(var)2-1⁰¹ Sco*

F1

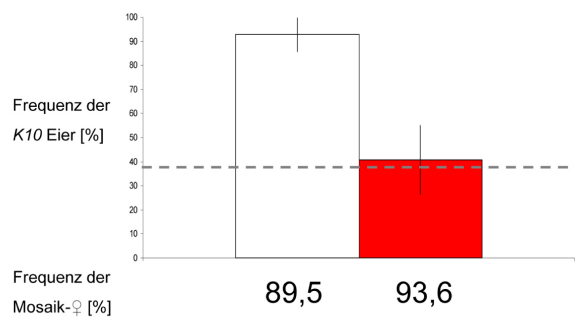
□ Kontrollgenotyp

fs(1)K10-w ; P{fs(1)K10+w⁺}/Df(2R)BSC279

■ Testgenotyp

fs(1)K10-w ; Su(var)2-1⁰¹ Sco/P{fs(1)K10+w⁺}

B



C

F1

fs(1)K10-w ; P{fs(1)K10+w⁺}/Df(2R)BSC279 x *fs(1)K10-w;CyRoi/Su(var)2-1⁰¹*

F2

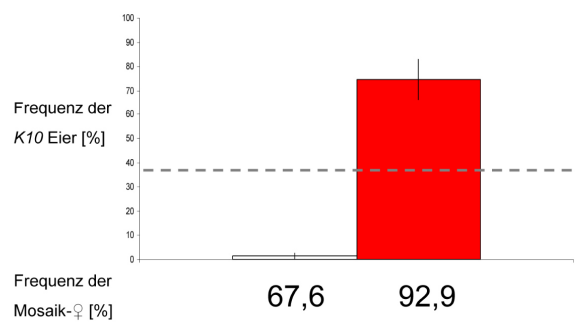
□ Kontrollgenotyp

fs(1)K10-w ; P{fs(1)K10+w⁺}/CyRoi

■ Testgenotyp

fs(1)K10-w ; Su(var)2-1⁰¹ / P{fs(1)K10+w⁺}

D



3.58. Analyse des Effektes der Deletion *Df(2R)BSC279* an der Insertionsstelle der Linie 11 über mehrere Generationen. **A.** und **C.** Kreuzungsschemata. **B.** Einkreuzung der Defizienz heterozygot über *Su(var)2-1⁰¹* (*Df(2R)BSC279/Su(var)2-1⁰¹ Sco*) in die *K10*- Linie 11. Kontrollen der F1- Generation, die die Defizienz tragen, zeigen eine signifikante Erhöhung der Frequenz der *K10*- Eier im Vergleich zur Kontrolle (gestrichelte Linie). **D.** Kreuzung dieser Kontrolltiere mit *Su(var)2-1⁰¹/CyRoi* führt zu einem stark erhöhten *Silencing* von *K10* in der Kontrolle der F2- Generation. Die Frequenz der Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der *P{fs(1)K10+w⁺};11* Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*- Eiern (Kontrolle).

[dSETDB1] und *Su(var)2-5⁰⁵* [HP1] (parentaler Modus) untersucht. Dazu wurden *fs(1)K10^{-w}*; *Modifikator^{Mut} Sco/ Df(2R)BSC279* Männchen in die *K10*-Linie 11 eingekreuzt (Abb. 3.57). In der F1- Generation zeigen die Kontrollen mit der Defizienz keine Suppression mehr, sondern eine signifikante Erhöhung der Frequenz der *K10*- Eier im Vergleich zur Kontrollfrequenz (Abb. 3.57, gestrichelte Linie). Die Testgenotypen, die die *Su(var)*- Mutation tragen, sind in allen 3 Fällen unbeeinflusst (Abb. 3.57 B bis D). Kreuzt man Jungfrauen des Kontrollgenotyps (*K10/K10^{-w}*; *Df(2R)BSC279/P{fs(1)K10⁺w⁺}*) wiederum mit *Su(var)2-I⁰¹/CyRoi* Männchen, so zeigt sich in der F2- Generation der supprimierte Phänotyp der Kontrollen erneut (Abb. 3.58). Diese Ergebnisse sind mit einem *E(var)*- Effekt der Defizienz am Insertionsort der *K10*-Linie 11 erklärbar (Abb. 3.59C). Dieser *E(var)*- Effekt tritt nur in der Keimbahn auf und ist im Soma mit Hilfe des *In(1)w^{m4} Rearrangements* nicht nachweisbar (Abb. 3.59B).

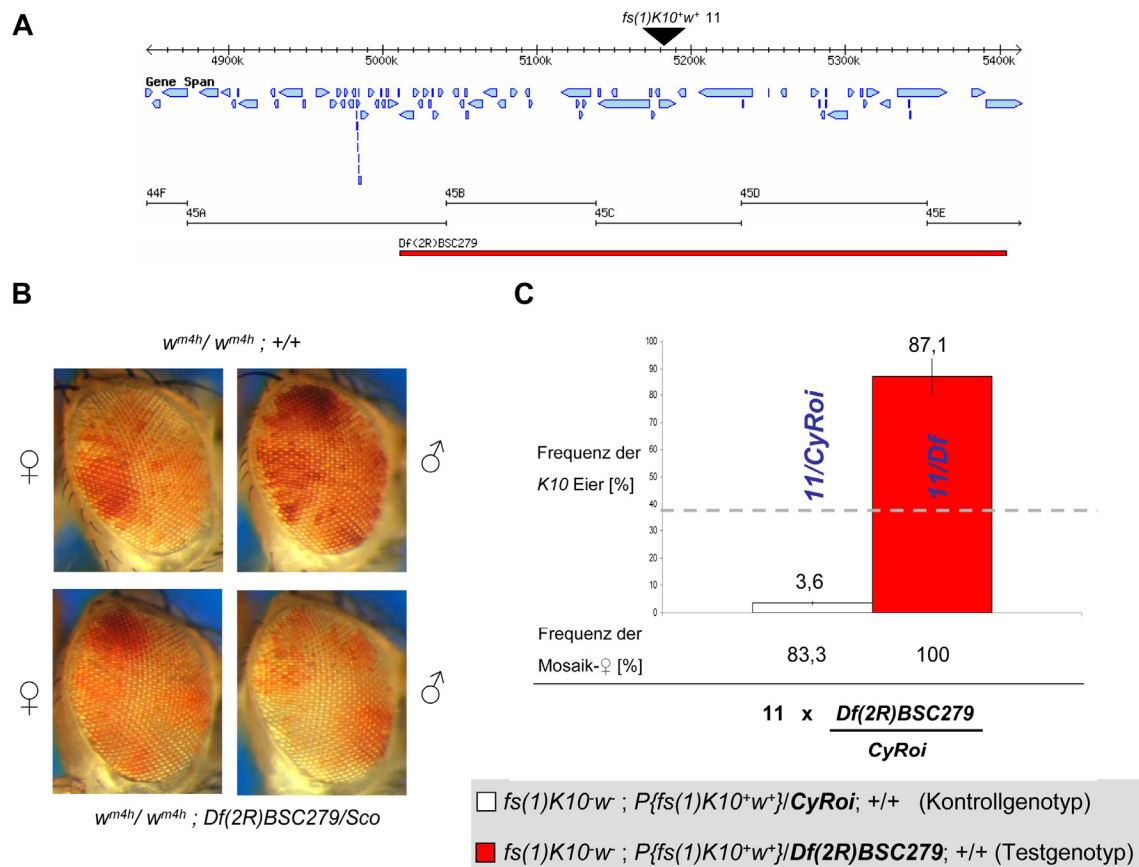


Abb.3.59. Die Defizienz *Df(2R)BSC279* induziert am Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}*11 nur in der Keimbahn und nicht im Soma einen *E(var)*- Effekt. **A.** Genomische Region um die Insertionsstelle der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}*11. Die Defizienz *Df(2R)BSC279* (roter Balken) deletiert die homologe Region. **B.** Nach Einkreuzung der Defizienz in das *w^{m4h} Rearrangements* zeigt sich weder in Weibchen noch in den Männchen ein *E(var)*- Effekt im Auge. **C.** Im *K10*- PEV zeigt die Defizienz *Df(2R)BSC279* den alternativen Modus, wobei der Kontrollgenotyp einen *Su(var)*- Effekt und der Testgenotyp eine Erhöhung [*E(var)*] über die Variegation der Linie im Stamm hinaus zeigt (gestrichelte Linie).

Somit konnte mit Hilfe des *K10-PEV*- Systems erstmals die Funktion einiger wichtiger somatischer Chromatin- Modifikatoren in der Keimbahn gezeigt werden. Da die Deletion *Df(2R)BSC279* einen *E(var)*- Effekt zeigte, ist eine kleinere Deletion notwendig, um zu prüfen, ob auch *Transvection*- Prozesse in der Keimbahn wirken.

3.3 ChIP- Analysen in primordialen Keimbahnzellen (PGC)

3.3.1 Etablierung eines Systems zur spezifischen Isolierung von Chromatin aus PGC

Obwohl die primordialen und die ovariellen Keimbahnstammzellen in *Drosophila* gut untersucht sind, fehlte bisher die Möglichkeit, eine molekulare Analyse des Keimbahnchromatins mittels ChIP durchzuführen. Da die Keimbahnstammzellen sich immer in direkter Nähe zu den somatischen Zellen befinden, ist eine selektive Isolation des Keimbahnchromatins nur schwer möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte auf der Grundlage des UAS/GAL4-Systems eine Methode etabliert werden, mit der es möglich ist, spezifisch Keimbahn- Chromatin aus frühen Embryonen zu isolieren und anschließend mittels ChIP molekular zu analysieren. Dabei wurde das Histon H2B C-terminal mit einer Biotinylierungssequenz (GLNDIFEAQKIEWHE) fusioniert, die von der aus *E.coli* stammenden *BirA*-Ligase erkannt und biotinyliert werden kann. In transgenen *Drosophila*- Linien sind beide Gene unter der Kontrolle eines UAS-Promotors, der eine gewebespezifische Anschließung der Gene ermöglicht. Mittels eines *vasaGAL4*-Treibers, der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde, erfolgt eine Keimbahn-spezifische Expression. Abbildung 3.60 zeigt, dass die Transkripte von *H2BBIO* und der *BirA*- Ligase mittels RT-PCR nur beim Vorhandensein des *vasaGAL4*-Treibers nachweisbar sind (Abb. 3.60A). Des Weiteren konnte bei einer immunzytologischen Analyse früher Embryonen mit einem Biotin- spezifischen Antikörper ebenfalls nur in den Embryonen, die sowohl H2B mit der Biotinylierungssequenz (*H2BBIO*), als auch die *BirA*- Ligase und den *vasaGAL4*- Treiber exprimieren, eine Färbung der PGC gezeigt werden (Abb. 3.60 B). Die Keimbahn- Spezifität des *vasaGAL4*-Treibers wird dadurch bewiesen, dass nur die primordialen Keimbahnstammzellen (PGC) und nicht die somatischen Blastodermzellen gefärbt sind.

Damit konnte die Grundlage für eine spezifische Isolierung von PGC- Chromatin mit Hilfe eines H2B BIO- Fusionsproteins geschaffen werden, auf der nachfolgend die

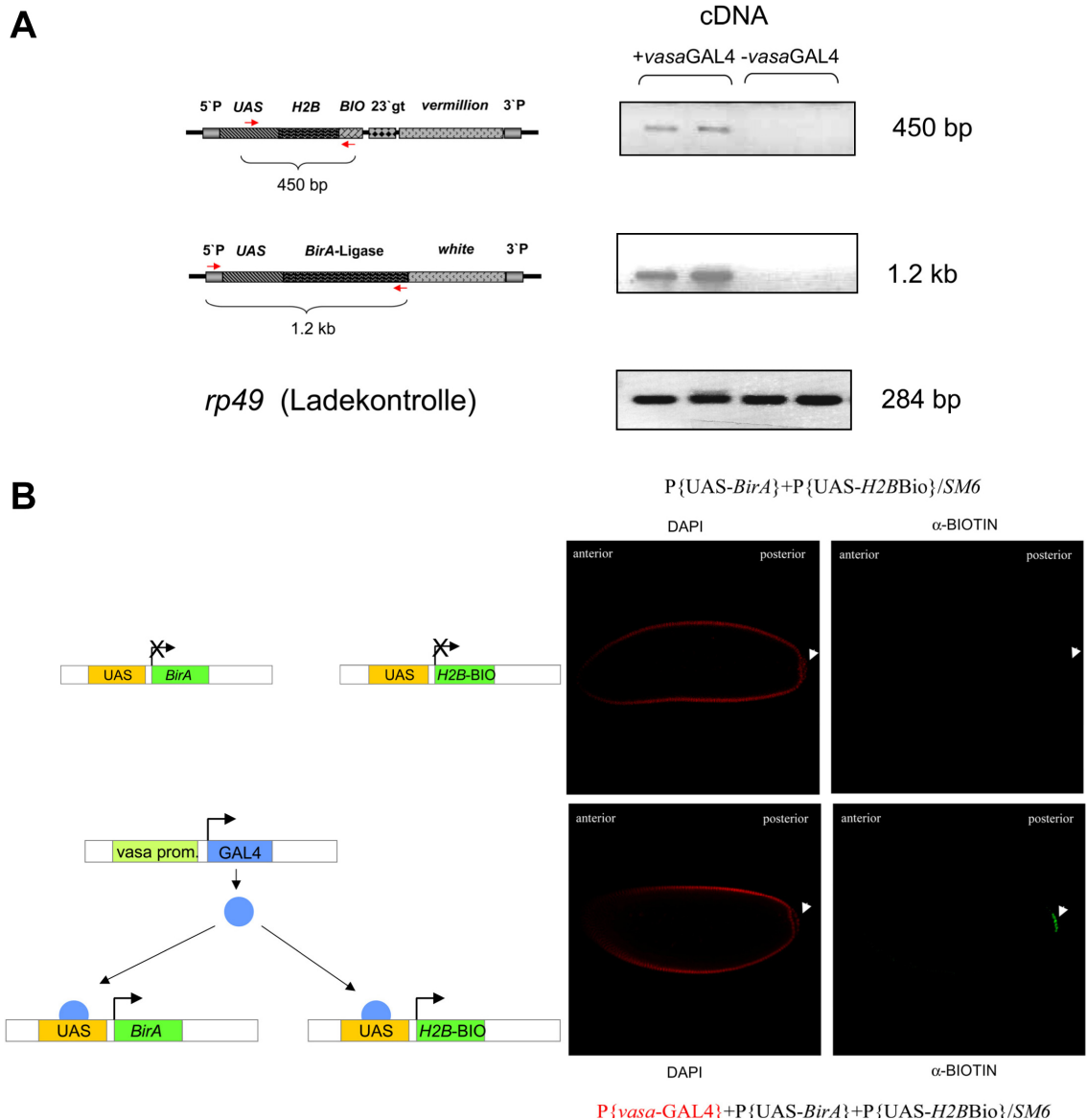


Abb.3.60. Transgenes System zur spezifischen Isolierung von Keimbahn- Chromatin. A. RT- PCR an Embryonen (0-6h AEL) als Nachweis der spezifischen Expression von *H2BBIO* und der *BirA*- Ligase bei Vorhandensein des *vasaGAL4*-Treibers. **B.** Immunzytologische Analysen zeigen, dass nur bei zusätzlicher Anwesenheit des *vasaGAL4*-Treibers eine keimbahnspezifische Expression der beiden Transgene erfolgt, da ein Signal des Antikörpers gegen den Biotin- *Tag* nur in den PGC (Pfeil) zu sehen ist (rot-DNA (DAPI)-Färbung, grün- Antikörper).

Etablierung der Keimbahn- ChIP erfolgte. Da das Keimbahn- Chromatin sowohl mittels des Biotin- *Tags* und magnetischer Streptavidin- *Beads* spezifisch isoliert, als auch auf Histon-Modifizierungen hin untersucht werden sollte, musste das Material einer nochmaligen ChIP unterzogen werden. Die Biotin- Streptavidin- Bindung stellt eine der stärksten in der Natur bekannten Bindungen dar und kann nur unter Bedingungen getrennt werden, die das Chromatin zerstören würden. Da es für die sich direkt anschließende zweite ChIP aber noch intakt sein sollte, wurde das Chromatin zunächst

mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Histonmodifizierungen isoliert und nachfolgend das Keimbahn- Chromatin mittels des Biotin-*Tags* aus dem Gesamt-Chromatin aufgereinigt. Dazu war es nötig, ein neues ChIP-Protokoll zu etablieren. Es basiert mit Abwandlungen auf bereits etablierten *Drosophila*- und *Arabidopsis*- ChIP-Protokollen (Dellino et al., 2004; Gendrel et al., 2002; Lawrence et al. 2004). Neben den bei *Drosophila* für die ChIP von Soma- Chromatin genutzten Kontrollen für Eu- (*β-tubulin* 56D) und Heterochromatin (359bp *satellite repeats*, Satellit) wurde *vasa* als Kontrolle für die erfolgreiche Isolation von Keimbahn-Chromatin genutzt, da es in den somatischen Zellen transkriptionell völlig stillgelegt ist und nur in Keimbahnzellen exprimiert wird (Abb. 3.60). Als zusätzliche Reinheitskontrolle wurde neben den Embryonen, die alle drei Transgene $P\{UAS-H2BBIO\}$, $P\{UAS-BirA\}$ und $P\{vasaGAL4\}$ enthalten, eine Wildtyp-Kontrolle mitgeführt. Die untersuchten Gene liegen in der Region des Insertionsortes der *K10*-Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}124$, der sich im *par-1* Gen befindet (Abb. 3.61A). Es wurden jeweils Primer in den ersten Exons (beginnend mit ATG) der untersuchten Gene abgeleitet und die euchromatische Histonmodifizierung H3K4me1 untersucht. Bei den ersten Analysen zeigte sich, dass die Trennung von Soma- und Keimbahn- Chromatin nur ungenügend erfolgt war, da die Werte der als Reinheitskontrolle dienenden Wildtyp-Negativkontrolle ähnlich hoch waren wie die Werte des Keimbahn- Chromatins. Um sicher somatisches und Keimbahn- Chromatin zu trennen, wurden 10 weitere Waschschrte der Streptavidin-*Beads* mit gebundenem Keimbahn- Chromatin mittels ChIP *dilution buffer* (Gendrel et al., 2002; Lawrence et al., 2004) eingeführt. Dadurch konnte der *background* (Werte der Wildtyp- Kontrolle) so stark reduziert werden, dass eine spezifische Isolation von Keimbahn- Chromatin gezeigt werden konnte (Abb. 3.61B). Auf der Grundlage des hier erfolgreich etablierten Systems können weitere molekulare Analysen der Keimbahnzellen und deren Chromatin erfolgen.

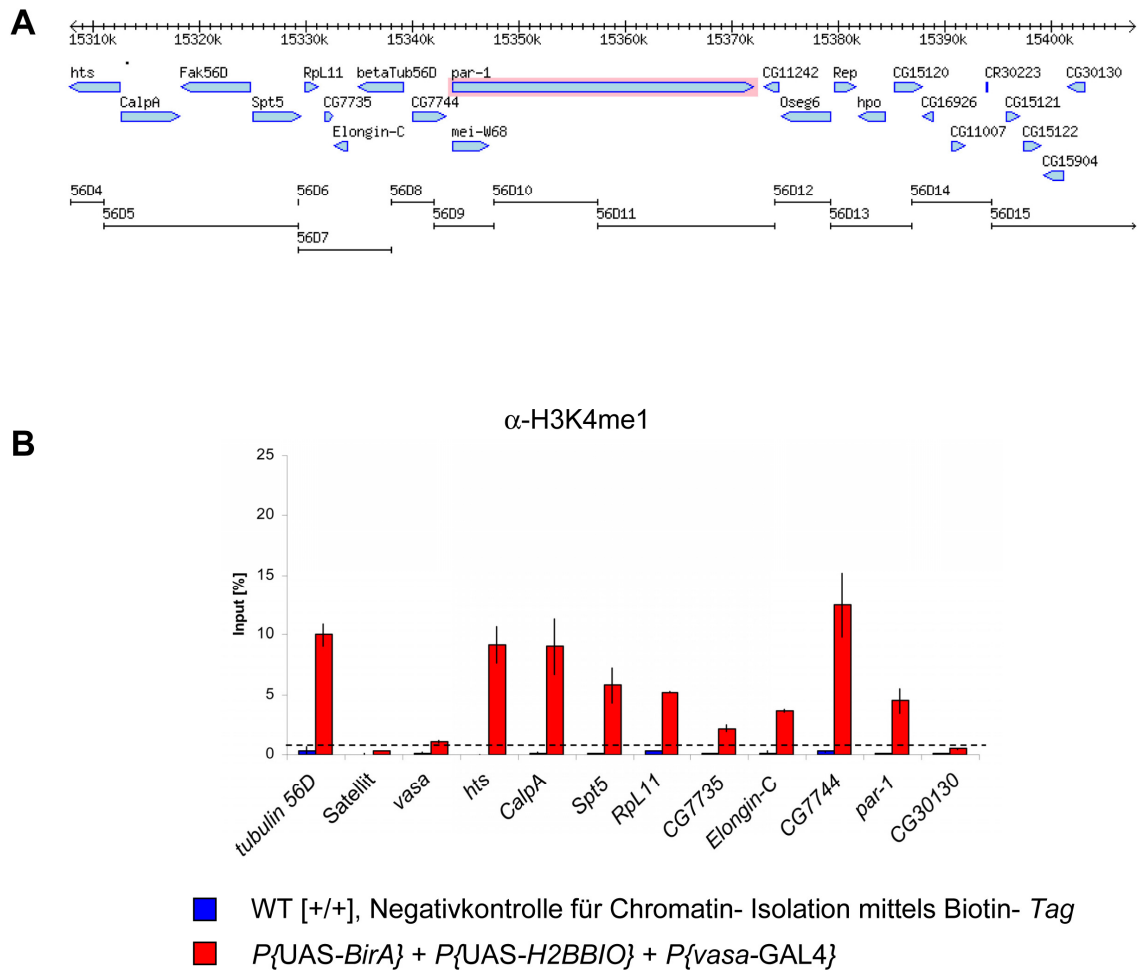


Abb.3.61. ChIP- Analyse von differentiell isoliertem Keimbahn- Chromatin aus Embryonen 0-6h AEL . Analyse der Region um das *par-1* Gen (Insertionsort der *K10*-Linie $P[fs(1)K10^{+w^+}]124$). Die Isolation wurde mit einem H3K4me1 spezifischen Antikörper durchgeführt. **A.** Genomische Region, die mittels ChIP in den PGC untersucht wurde. **B.** Spezifische Isolation von Keimbahn- Chromatin aus Embryonen 0-6h AEL. Es ist eine eindeutige Trennung von Soma (blaue Balken) und Keimbahn (rote Balken) erkennbar. Die gestrichelte Linie zeigt den *background*.

3.3.2 Analyse des Keimbahn- Chromatins aus PGC

Nach erfolgreicher Etablierung und Optimierung der ChIP- Methodik wurde neben den heterochromatischen Modifikationen H3K9me2 und H3K9me3 auch das Histon H2B untersucht. Als Kontrollen wurden hierbei wieder β -*tubulin 56D* (Euchromatin), Satellit (359bp *satellite repeats*, Heterochromatin), *vasa* (Keimbahn) und *par-1* als Insertionsort der *K10*-Linie $P[fs(1)K10^{+w^+}]124$ untersucht. Als Reinheitskontrolle diente der Wildtyp ([+ / +]; ohne Transgene). Die Ergebnisse der Keimbahn- ChIP mit den Antikörpern für H2B, H3K9me2 und H3K9me3 zeigen, dass die entwickelte Methodik positive Resultate liefert (Abb. 3.62). In Abbildung 3.62 sind die Analysen von Soma- (weiß) und Keimbahn (rot)- Chromatin dargestellt. Die Isolation des Soma-Chromatins

erfolgte aus adulten Köpfen (200 pro Probe), das Keimbahn-Chromatin wurde aus 1g Embryonen (0-6h AEL) isoliert. Die Werte für Soma und Keimbahn sind untereinander zunächst nicht vergleichbar, weil die Assoziation der untersuchten Region mit Nukleosomen für die Keimbahn bisher unbekannt ist. Eine Angleichung der Nukleosomen an den untersuchten Sequenzen kann über Histone und die Bildung von *ratios* erfolgen.

In Soma und Keimbahn zeigen die Werte der Kontrollen für die euchromatische Modifizierung H3K4me1 eine ähnliche Tendenz (Abb. 3.62). Sowohl im Soma, als auch in der Keimbahn zeigt die H3K4 Monomethylierung hohe Werte am *tubulin*- Gen (Euchromatin) und geringe Werte im Bereich der Satellitensequenz (359bp *satellite repeats*, Heterochromatin) und dem Keimbahn-spezifischen *vasa*-Gen. Für die epigenetische Aktivierung dieses Gens in der Keimbahn scheinen andere Modi-

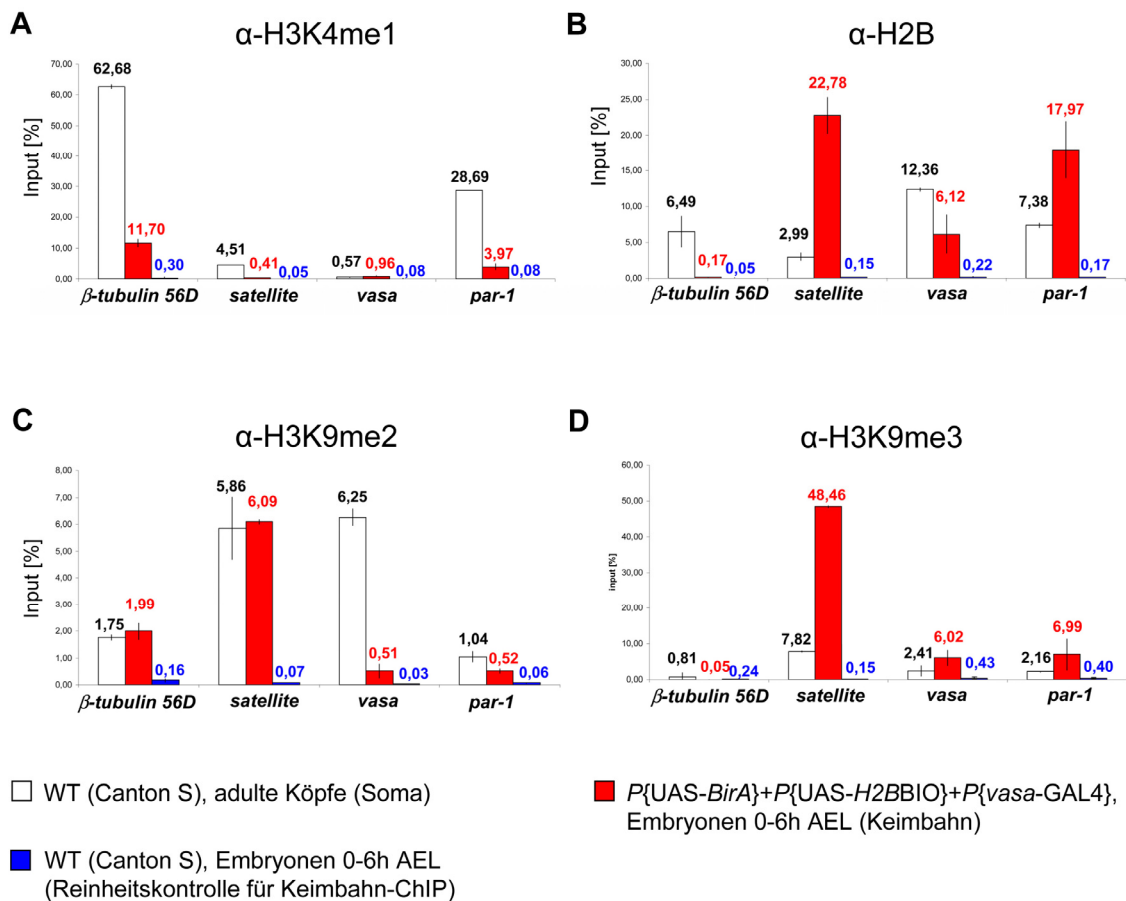


Abb.3.62. Analyse des Keimbahn- Chromatins mit eu- und heterochromatischen Histonmodifikationen. Eine Keimbahn-ChIP mit Antikörpern gegen H3K4me1 (A), Histon H2B (B), H3K9me2 (C) und H3K9me3 (D) zeigt eine spezifische Isolation von Keimbahn- Chromatin. Neben den Kontrollen β -tubulin 56D (Euchromatin), Satellit (359bp *satellite repeats*, Heterochromatin) und *vasa* (Keimbahn) wurde *par-1* als Insertionsort der *K10*-Linie $P[fs(1)K10^{w^+}]124$ untersucht. Die blauen Balken repräsentieren den *background*.

fizierungen verantwortlich zu sein, da der Input- Wert für H3K4me1 auch im Keimbahn- Chromatin gering ist. Das *par-1* Gen zeigt im Soma einen höheren Inputwert für H3K4me1 als *vasa* und die Satellitensequenz (359bp *satellite repeats*), was eine Expression dieses Gens vermuten lässt. In der Keimbahn könnte dieses Gen jedoch epigenetisch inaktiv zu sein, da die Werte für H3K4me1 am *par-1* Gen gering sind.

Bei der heterochromatischen H3K9 Dimethylierung zeigen die Inputwerte im *tubulin*- und *par-1* Gen zwischen Soma und Keimbahn keine großen Unterschiede. Der Wert für das *vasa*- Gen zeigt hingegen starke Abweichungen. Erwartungsgemäß entsprechen die Inputwerte von *vasa* im Soma denen der Satellitensequenz, da es in somatischen Geweben nicht exprimiert wird. In der Keimbahn hingegen ist der Wert für die Satelliten- Sequenz (359bp *satellite repeats*) ähnlich hoch wie im Soma allerdings weist *vasa* verglichen dazu einen wesentlich geringeren Input-Wert auf.

Die Satellitensequenz (359bp *satellite repeats*) zeigt in Soma und Keimbahn die höchsten Inputwerte bei H3K9me3. Im Soma scheint die epigenetische Inaktivierung von *vasa* über H3K9me2 zu erfolgen, da die Werte für H3K9me3 verglichen mit der Satellitensequenz gering sind. In der Keimbahn ist dieses Gen epigenetisch aktiv, was die geringen Werte für H3K9me2 und H3K9me3 erklärt. *Tubulin* zeigt als euchromatisches Gen geringe Werte für H3K9me3 in Soma und Keimbahn.

Es konnte gezeigt werden, dass Keimbahn- Chromatin isoliert wurde, da (1) der erwartete niedrige Inputwert in der Keimbahn für *vasa* bei H3K9me2 (0,51%) noch weit über dem Wert des backgrounds (0,03%) liegt und (2) *vasa* nur in der Keimbahn exprimiert wird und daher dort keine Heterochromatin-assoziierten Modifizierungen tragen sollte.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine wichtige Grundlage zur Isolierung und molekularen Analysierung von Keimbahn- Chromatin in frühen Embryonen mittels ChIP erfolgreich etabliert werden. Eine Kombination der umfangreichen genetischen und jetzt möglicher molekularer Analysen der Keimbahn ermöglichen eine umfassende Untersuchung des Chromatins dieser Zellen.

4 Diskussion

Die epigenetische Regulation der Genexpression durch Chromatin- Faktoren ist während der gesamten Entwicklung ein zentraler Prozess, der die Differenzierung verschiedener Zelltypen kontrolliert. Die N- terminalen Enden der Histone stellen die Ziele posttranslationaler Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung oder Methylierung dar. Sequenziell oder in Kombination bilden sie den sog. Histon- Code, der von verschiedenen Chromatin- assoziierten Proteinen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten und in verschiedenen Geweben in Form von Transkriptionsaktivierung und Änderungen in der Chromatinstruktur übersetzt werden kann (Strahl und Allis 2000; Jenuwein und Allis 2001; Fischle et al., 2003; Berger 2007). Im Chromatin der Keimbahnzellen sollten ebenfalls koordinierte genetische und epigenetische regulatorische Programme ablaufen. Über diese Prozesse ist in *Drosophila* sehr wenig bekannt, da bisher essentielle Methoden für die direkte genetische Analyse der Chromatinregulation und die molekulare Charakterisierung des Keimbahn- Chromatins fehlten.

4.1 Das Chromatin der PGC ist in der Rabl- Konfiguration angeordnet

Die Rabl- Konfiguration stellt eine besondere Organisation des Chromatins in der Interphase dar, bei der sich die Telomere und Zentromere an den entgegengesetzten Polen der Zellkerne befinden. Diese spezifische Organisation entsteht, wenn die Konfiguration der Chromosomen aus der Anaphase der Mitose in die Interphase übernommen wird (Marshall et al., 1996). Für die somatischen Blastodermzellen von *Drosophila* Embryonen wurde diese Chromatin- Konfiguration bereits in der Literatur beschrieben (Hochstrasser et al., 1986; Foe et al., 1993; Marshall et al., 1996; Marshall und Sedat 1999), nicht jedoch für die primordialen Keimbahnzellen (PGC). Durch Färbungen gegen das Zentromer- assoziierte CID- Protein und einer FISH- Analyse mit subtelomerischen Sonden konnte diese Rabl- Konformation im Rahmen der Arbeit auch eindeutig für die PGC gezeigt werden (Abb. 3.4, Seite 25). Da die PGC nicht wie die somatischen Blastodermzellen eine Kernelongation durchlaufen, scheint die Bildung der Rabl- Struktur von diesem Prozess unabhängig zu sein. Eine Analyse der *kugelnkern-*

Mutante (Brandt et al., 2006), bei der die Blastodermzellen keine Kernelongation durchlaufen, zeigte ebenfalls eine normale Ausbildung der Rabl- Konfiguration. Dies untermauert, dass beide Prozesse, die Bildung der Rabl- Konfiguration und die Kernelongation, unabhängig voneinander sind (Bär 2008).

Es wird postuliert, dass die Rabl- Konfiguration bei Organismen mit einem sehr großen Genom etabliert wird, um die Organisation langer Metaphase- Chromosomen zu erleichtern. Dies trifft für Weizen, Gerste und Hafer (Dong und Jiang 1998) zu, die relativ große Genome besitzen, nicht aber für *Drosophila*, *Schizosaccharamyces pombe* und *Sacharomyces cerevisiae* , die alle kleine Genome aufweisen und auch die Rabl- Konfiguration ausbilden (Funabiki et al., 1993; Gilson et al., 1993; Palladino et al., 1993; Jin et al., 1998). In Mäusen und dem Menschen, die ebenfalls relativ große Genome besitzen, wurde diese Chromatin- Organisation bisher nicht eindeutig nachgewiesen (Billia und De Boni 1991; Manuelidis 1984, 1985; Manuelidis und Borden 1988; Ferguson und Ward 1992; Croft et al., 1999; Bridger et al., 2000).

Bei *Drosophila* sind die stark heterochromatisierten Chromozentren in allen Kernen des Embryos nach außen gerichtet. Die Bildung der Rabl- Struktur erfolgt gleichermaßen in Soma- und Keimbahnzellen (PGC) innerhalb der Mitosezyklen 11 bis 14. Ein großer Unterschied wird aber nach der Färbung gegen das Zentromer- assoziierte CID- Protein deutlich. Es scheint eine Separierung der Homologenpaare zu erfolgen, die nur in den PGC zu sehen ist, nicht jedoch in den Blastodermzellen. Da diese Separierung weder in der H3K9me2- Färbung der Zyklus 14 Embryonen, noch in der FISH- Analyse an den Telomeren sichtbar war, sollten weitere Analysen dazu erfolgen. Am Ende der Embryogenese konnte in den Gonaden jedoch auch mit der H3K9me2 Färbung die Separierung der Chromosomen gezeigt werden (Abb. 3.15, Seite 34).

Auch in den globulären Blastodermkernen der *kugelkern*- Mutante wurden genau wie in den PGC bei der CID- Färbung mehrere Foci nachgewiesen (Abb. 3.5, Seite 26). Somit könnte auch die kugelförmige Kernstruktur Ursache für die Trennung der Foci sein. In nachfolgenden Untersuchungen sollte daher die Chromosomenpaarung in den primordialen Keimbahnzellen und den Blastodermkernen der *kugelkern*- Mutante analysiert werden. Dazu könnten Fliegenlinien genutzt werden, bei denen repetitive *lacO*- Sequenzen und *lacI*-GFP im Genom transgen integriert sind (Vazquez et al., 2001). Durch die Untersuchung der Bindung von LacI- GFP an den *lac* Operator *lacO* kann gezeigt werden, ob die Chromosomen gepaart vorliegen. Bei einer Paarung der

Chromosomen ist jeweils ein Punkt detektierbar, liegen die Chromosomen getrennt vor, sind in der GFP- Färbung zwei Punkte erkennbar.

Des Weiteren könnten Analysen der PGC am Elektronenmikroskop helfen, die gefundene Separierung der Chromosomen hochauflösend darzustellen.

4.2 Histonmodifizierungen und deren epigenetische Kontrolle in primordialen Keimbahnzellen (PGC)

In der frühen Keimbahn von *Drosophila* und *C. elegans* erfolgt die Repression der somatischen Genexpression auf mRNA- Ebene. Während bei der Nematode PIE-1 die RNA Polymerase II inhibiert (Ghosh und Seydoux 2008; Seydoux und Braun 2006), verhindert in *Drosophila* das Protein Polar granule component (Pgc) durch die Bindung an Promotoren die Interaktion der RNA Polymerase II mit dem zur Aktivierung nötigen Kinase- Komplex P-TEFb (Nakamura und Seydoux 2008). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann jedoch geschlossen werden, dass bei *Drosophila* verschiedene Wege der transkriptionellen Repression in den PGC vorliegen. Es konnte gezeigt werden, dass die PGC kein H3K4me2 aufweisen (Van Doren et al., 1998; Schaner et al., 2003; Abb. 3.6, Seite 26). Das *Drosophila*- Homologe des LSD-1 Proteins aus Säugern ist auch in den PGC aktiv und demethyliert die transkriptionsaktive Modifikation H3K4me2 (Rudolph et al., 2007; Kouzarides 2002; Gerber und Shilatifard 2003; Hampsey und Reinberg 2003). H3K4me3 ist erst in Zyklus 14 Embryonen (3.5- 4h AEL) in den PGC nur an distinkten Punkten nachweisbar (Abb. 3.7, Seite 27). Da die von der RNA Polymerase I transkribierten Gene in der Keimbahn nicht reprimiert sind (Seydoux und Dunn 1997), könnten die distinkten Punkte in der H3K4me3 Färbung mit der rRNA Transkription korrelieren. Um eine mögliche Kollokalisierung zu zeigen, sollten Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen RNA Polymerase I und H3K4me3 durchgeführt werden.

Somit scheint es keinen universellen Mechanismus zu geben, der die Transkription generell reprimiert (Van Doren et al., 1998). Vielmehr wird die RNA Polymerase II in frühen PGC an der Initiation der Transkription gehindert (Verzögerung [*stalling*]; Seydoux und Dunn 1997; Zeitlinger et al., 2007). Das Verzögern könnte eine effiziente Methode zu sein, die Expression der Gene zu inhibieren ohne ihre Transkriptionskompetenz durch Veränderungen in der Chromatinstruktur zu beeinträchtigen (Nakamura und Seydoux 2008). Damit würde sich auch erklären lassen,

warum alle anderen, im Rahmen der Arbeit getesteten euchromatischen Histon-Modifizierungen (H3K4me1, H3K9ac, H3K36me1, H3K36me2, H3K36me3) und die heterochromatischen Modifikationen (H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3) die gleiche Verteilung zeigen wie in den transkriptionsaktiven somatischen Blastodermzellen. H3K36me2, H3K27me2 und H3K27me3 könnten in den primordialen Keimbahnstammzellen sogar eine größere Bedeutung haben, da für diese Modifikationen eine stärkere Färbung in den PGC nachweisbar ist. Obwohl sie eine stärkere Färbung zeigten, sind sie jedoch wie in den somatischen Blastodermzellen im Euchromatin detektierbar (Abb. 3.10, Seite 29). In den PGC von Mäusen spielt H3K27me3 erst bei der epigenetischen Reprogrammierung eine wichtige Rolle, da ab E8.25 diese Modifizierung verstärkt wird, während die repressive H3K9 Dimethylierung vollständig verschwindet (Seki et al., 2007). In *Drosophila* unterscheidet sich H3K9me2 in den PGC und Somazellen weder im Verteilungsmuster noch in der Intensität und wird auch während der Wanderung der PGC aufrechterhalten (Abb. 3.11, Seite 30; Abb. 3.15, Seite 34).

Der Mechanismus der transkriptionellen Repression in frühen Keimbahnzellen scheint sich zwischen den Arten zu unterscheiden, da bei Mäusen die RNA Polymerase II in den entstehenden PGC aktiv ist (Sasaki und Matsui 2008). Zwischen E7.5 und E8.25 ist die Polymerase II jedoch transient reprimiert, da aufgrund der ablaufenden epigenetischen Reprogrammierung zu diesem Zeitpunkt kaum inaktive Histonmodifizierungen in den PGC vorhanden sind. In *Drosophila* scheint auch H3K9me3 eine wichtige Rolle im Chromatin der PGC zu spielen, da sie 2 Mitosezyklen früher in den Keimbahnzellen detektierbar ist als in somatischen Blastodermkernen. Es ist bekannt, dass die transkriptionelle Repression am stärksten ist, wenn die Promotoren die H3K9 Trimethylierung tragen (Wang et al., 2003). Da das frühere Auftreten von H3K9me3 in den PGC zeitlich mit der Etablierung der euchromatischen Histonmodifizierung H3K4me2 in somatischen Kernen korreliert (Abb. 3.13, Seite 32), könnte die frühe Etablierung von H3K9me3 ein zusätzlicher Schutzmechanismus der PGC sein, um transkriptionelle *Quiescence* in den PGC zu gewährleisten.

4.2.1 Die H3K9 Methylierung wird in PGC durch SU(VAR)3-9 und dSETDB1 kontrolliert

Da H3K9me3 in *Drosophila* offensichtlich eine sehr wichtige Rolle im Chromatin der PGC zu spielen scheint, ist der Faktor, der ihre Etablierung kontrolliert, essentiell für

die Keimbahn. In *Drosophila* sind drei Methyltransferasen näher untersucht worden, die die H3K9 Methylierung katalysieren können: SU(VAR)3-9, dSETDB1 (*eggless*) und dG9a. Die drei KMTasen sind in den polytären Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila* bereits gut untersucht (Tschiersch et al., 1994; Schotta et al., 2002; Seum et al., 2007), aber über ihre Funktion in der frühen Embryogenese speziell in den PGC war bisher nichts bekannt. In HeLa- Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass Suv39h1, G9a und SETDB1 in einem multimeren Komplex assoziiert sind (Fritsch et al., 2010). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten schließen eine Assoziation von SU(VAR)3-9 und dSETDB1 in einem gemeinsamen Komplex bei *Drosophila* nicht aus, wobei sich die Spezifität der beiden H3K9 spezifischen KMTasen entwicklungsabhängig unterscheidet. In der frühen Embryogenese zeigte sich, dass in somatischen Blastoderm- und primordialen Keimbahnzellen H3K9me1 vorrangig SU(VAR)3-9- abhängig ist, H3K9me2 und H3K9me3 werden hingegen durch dSETDB1- katalysiert. Da jedoch nur die homozygote *eggless*¹⁴⁷³- Mutation zur weiblichen Sterilität führt (Clough et al., 2007; Yoon et al., 2008), die *Su(var)3-9*⁰⁶- Mutation aber kaum Einfluss auf die Fertilität hat (Ebert 2005), scheinen vorrangig H3K9me2 und H3K9me3 für die Keimbahnentwicklung essentiell zu sein. H3K9me3 könnte dabei eine besonders wichtige Rolle spielen, da diese Modifizierung zeitlich versetzt zuerst in PGC und ab Zyklus 13 in Blastodermkernen etabliert wird (Abb. 3.12, Seite 30).

Durch reziproke Kreuzungen heterozygoter *egg*¹⁴⁷³- Tiere mit dem Wildtyp konnte außerdem gezeigt werden, dass dSETDB1 als mütterliche Komponente in der Embryogenese essentiell für die Katalyse von H3K9me2 und H3K9me3 ist (Abb. 3.25, Seite 43). Da die starke Reduktion von H3K9me2 in *egg*¹⁴⁷³- Mutanten auch am Ende der Embryogenese in den Gonaden nachweisbar ist, in den adulten Weibchen aber keine GSC detektierbar sind, kommt es offenbar zum Verlust der Keimbahn. Dieser Keimbahnverlust wäre durch die Annahme erklärbar, dass durch die sehr starke Reduktion von H3K9me2 und H3K9me3 in den Keimbahnzellen Apoptose induziert wird. Um den Zeitpunkt der möglichen Apoptose der PGC oder GSC zu analysieren, sollten in weiterführenden Arbeiten die larvalen Gonaden näher untersucht werden. Dabei sollten neben dem generellen Aufbau der Gonaden auch Apoptose- Marker (Verlust von DIAP1 [Ryoo et al., 2003; Wilson et al., 2002]; Färbung gegen aktive Caspase-3 [*cleaved*- Caspase- 3 Antikörper, Peterson et al., 2003; Fan und Bergmann 2010]) analysiert werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde dG9a, die dritte H3K9 spezifische KMTase aus *Drosophila*, nicht näher untersucht. Aus der Literatur ist jedoch bekannt, dass dG9a einen Einfluss auf die Fertilität hat (Mis et al., 2006). Da keine Analysen von dG9a in embryonalen Stadien und speziell den PGC vorhanden sind, sollten Untersuchungen dazu durchgeführt werden. Es sollte auch dBlimp1 (*B lymphocyte- induced maturation protein 1*) in die Analysen einbezogen werden, da es in den PGC der Mäuse essentiell für die Repression des somatischen Programmes ist (Ohinata et al., 2005) und mit G9a direkt über Zinkfinger motive interagiert (Gyory et al., 2004). Obwohl für den humanen Blimp1- Komplex eine spezifische Histonmethyltransferaseaktivität nachgewiesen werden konnte (Gyory et al., 2004), gibt es bisher keine Analysen zu diesem Protein in *Drosophila*.

4.2.2 Die Rolle von Ecdyson-Signaling in PGC

Steroidhormone spielen in verschiedenen physiologischen und Entwicklungsprozessen eine Schlüsselrolle. Ecdyson (20- Hydroxyecdyson, 20E), das Haupt-Steroidhormon in *Drosophila*, wirkt über einen heterodimeren Rezeptorkomplex im Zellkern, der aus den Komponenten EcR (Ecdyson-Rezeptor) und Usp (Ultraspiracle) besteht (Koelle et al., 1991; Shea et al., 1990; Oro et al., 1992; Yao et al., 1992, 1993). TAIMAN, einer der Coaktivatoren des EcR-Rezeptor- Komplexes, wurde als dominanter Suppressor für *white- Gen- Silencing* im *In(1)w^{m4} Rearrangement* identifiziert (Apelt 2005) und ist homolog zu den Steroidrezeptor- Coaktivatoren der p160- Familie. Als Coaktivator im Ecdyson-Rezeptorkomplex verstärkt TAIMAN dessen transkriptionelle Aktivität (Anzick et al., 1997). Bisher erfolgten keine Analysen zur Wirkung von TAIMAN auf die epigenetische Programmierung in der frühen Embryogenese. Daher wurden im Rahmen der Arbeit Embryonen, die von homozygoten *Df(2L)tai2-* Weibchen produziert werden, näher untersucht. Bereits die Ovarien, in denen die Embryonen gebildet werden, sind partiell defekt.

Obwohl einige Chromatinfaktoren bereits identifiziert werden konnten, die in der frühen Embryonalentwicklung an der Bildung eu- und heterochromatischer Bereiche beteiligt sind, sind die molekularen Signale, die diese Differenzierung initiieren, bisher unbekannt. Die Analyse der homozygoten *Df(2L)tai2-* Embryonen zeigte massive, globale Veränderungen euchromatischer (H3K4me3, H3K9ac) und heterochromatischer (H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3) Chromatinmodifikationen in Blastodermzellen und den PGC. Daher könnte TAIMAN eine Rolle bei der Initiation

der Chromatindifferenzierung in der Embryogenese spielen. Das Protein könnte aber auch die Expression von Chromatinfaktoren steuern, die beim Fehlen von TAIMAN dereguliert wären. Ein signifikanter Unterschied zwischen Blastodermzellen und PGC ist bei H3K4me3 nachweisbar, da diese Modifikation nur in den somatischen Zellen und nicht in den PGC der *taiman*- Mutante signifikant erhöht ist (Abb. 3.30, Seite 49). Dieses Ergebnis ist durch die Annahme erklärbar, dass die Expression der H3K4me3 spezifischen KMTase in den PGC anders reguliert ist als in den Blastodermzellen, da in den PGC des Wildtyps im Gegensatz zu den Blastodermzellen nur distinkte Punkte einer H3K4me3- Färbung detektierbar sind.

Weiterhin wurde festgestellt, dass bei etwa 50% aller *Df(2L)tai2*- Embryonen keine PGC ausgebildet werden und einige Embryonen Einstülpungen somatischer Zellakkumulationen am posterioren Pol zeigen (Bär 2008). Wahrscheinlich ist die Expression der normalerweise maternal geladenen Faktoren des Polplasmas bereits in den Ovarien homozygoter *Df(2L)tai2*- Weibchen gestört, was zum Verlust der Keimbahn in den Embryonen führt. Warum sich der Phänotyp aber nur zu 50% ausprägt, muss in weiterführenden Analysen näher untersucht werden. Die PGC der homozygoten *Df(2L)tai2*- Embryonen können in späteren Entwicklungsstadien nicht weiter analysiert werden, da die Embryonen in der Gastrulation aufgrund der massiven Chromatinveränderungen eine hohe Letalitätsrate zeigen (Lein 2011).

4.3 Das Chromatin in ovariellen Stammzellen (GSC) zeigt Unterschiede zu den PGC und wird anders kontrolliert

Beim Übergang vom Larven- zum Puppenstadium bilden sich aus den PGC die GSC. Zell- Zell- Interaktionen zwischen den Nischenzellen (Terminalfilamentzellen und *Cap*-Zellen) und den GSC innerhalb der Germarien regulieren die Proliferation, Aufrechterhaltung und Differenzierung der Keimbahnstammzellen (King 1970; Forbes et al., 1996; Schulz et al., 2002). Haben die Stammzellen einmal die Nische verlassen, wird sofort die Differenzierung eingeleitet (McKearin und Ohlstein 1995; Gilboa et al., 2003).

In den ovariellen Stammzellen (GSC) wurden dieselben Histonmodifikationen wie in den PGC immunzytologisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass beide Keimbahnzelltypen in ihrer Chromatinstruktur ähnlich aber nicht identisch sind. Signifikante Unterschiede zeigen sich bei H3K4me2 und H3K4me3. Da die GSC sich

als Stammzellen kontinuierlich teilen und ständig Faktoren für diesen Prozess benötigt werden, ist keine transkriptionelle *Quiescence*, sondern komplexe genetische Aktivität erforderlich. Daher zeigen diese Zellen eine mit transkriptioneller Aktivität korrelierende H3K4 Dimethylierung. H3K4me3 hingegen tritt erst in späteren Eikammern auf und ist vom Germarium komplett ausgeschlossen (Abb. 3.20, Seite 38). In *C. elegans* werden in den frühen Keimbahnzellen (P-Linie) aktive Chromatinzustände gefunden, die durch H3K4me2 und H3K4me3 gekennzeichnet sind und die erst ab dem 100 Zellstadium in den späteren Keimbahnzellen (Z-Linie) reduziert sind. Ist die Larve geschlüpft und beginnt zu fressen, ist in Z2/Z3 H3K4me2 und H3K4me3 in den Keimbahnzellen wieder detektierbar (Schaner et al., 2003). Ob H3K4me2 in *Drosophila* auch bereits in den Gonaden der Larven wieder gefunden werden kann, konnte bisher aufgrund nicht durchführbarer Doppelfärbungen nicht untersucht werden, da keine guten monoklonalen Antikörper für H3K4me2 oder VASA erhältlich sind.

In den GSC von *Drosophila* wurde sowohl H3K4me2 als auch H3K27me3 nachgewiesen (Abb. 3.19, Seite 37; Abb. 3.22, Seite 39). In embryonalen Stammzellen von Mäusen konnte gezeigt werden, dass bivalente Strukturen aus größeren Regionen mit H3K27me3 bestehen, die kleinere Domänen mit H3K4me2 beinhalten. In diesen Regionen werden wahrscheinlich Entwicklungsgene stillgelegt, aber für die rasche Aktivierung/ Expression bereitgehalten. Diese Regionen sind im Chromatin der ES-Zellen im Vergleich zu differenzierten Zellen stark angereichert (Bernstein et al., 2006). Untersuchungen von *Xenopus*- Embryonen zeigten allerdings, dass das Vorhandensein von H3K27me3 und H3K4me2 in den gleichen Regionen nicht immer mit bivalenter Indizierung gleichzusetzen ist (Akkers et al., 2009). Um zu prüfen, ob in den GSC von *Drosophila* ebenfalls bivalente Chromatinstrukturen vorliegen könnten, müssten genomweite ChIP- Analysen für H3K4me2 und H3K27me3 in den GSC durchgeführt werden. Dazu ist es nötig, ein Gen zu finden, das nur in den GSC exprimiert wird, um einen GSC- spezifischen GAL4- Treiber zu etablieren. Mit Hilfe eines UAS/ GAL4- basierten Systems könnte dann spezifisch Chromatin aus ovarialen Stammzellen (GSC) isoliert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bereits eine ChIP- Methodik erfolgreich etabliert werden, mit der in Embryonen spezifisch Keimbahnchromatin aus PGC isoliert wurde.

Für die ChIP- Analysen in GSC könnten allerdings auch Mutationen genutzt werden, die zu einer Überproliferation der ovarialen Stammzellen führen. In *Drosophila*

existieren bereits genomweite Expressionsanalysen von *bam*⁻ - Mutanten und *dpp*-Überexpressionslinien, bei denen die GSC proliferieren ohne sich zu differenzieren (Kai et al., 2005).

4.3.1 SU(VAR)3-9 und nicht dSETDB1 kontrolliert die H3K9 Dimethylierung in den GSC

In den primordialen Keimbahnzellen steht nur H3K9me1 unter Kontrolle von SU(VAR)3-9, nicht jedoch H3K9me2 und H3K9me3 (Abb. 3.24, Seite 42). Da H3K9me1 für die Keimbahnentwicklung eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, bilden sich in den adulten homozygoten und fertilen *Su(var)3-9⁰⁶*-Weibchen normale Ovarien mit funktionellen GSC.

Bereits in früheren Arbeiten wurde H3K9me3 in den GSC adulter *Su(var)3-9^{Mut}*-Weibchen untersucht (Yoon et al., 2008). Es zeigten sich in den Germarien keine Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp. Die Unterschiede bei H3K9me3 zwischen Wildtyp und Mutante in späteren Eikammern führten jedoch zu der Schlussfolgerung, dass SU(VAR)3-9 in den Germarien keine Funktion besitzt, sondern erst später in den Ovariolen H3K9 trimethyliert (Yoon et al., 2008). Im Rahmen der Arbeit konnte allerdings eindeutig gezeigt werden, dass H3K9me2 in den Germarien von SU(VAR)3-9 katalysiert wird, nicht jedoch H3K9me1 und H3K9me3 (Abb. 3.28, Seite 46; Abb. 3.29, Seite 47). Somit besitzt SU(VAR)3-9 eine wichtige Funktion in den Germarien und bei der epigenetischen Kontrolle des Chromatins der GSC. Es erfolgt allerdings eine entwicklungspezifische Umschaltung der enzymatischen Spezifität von H3K9me1 (Embryogenese, PGC) zu H3K9me2 (adulte Weibchen, GSC).

In den PGC wurden H3K9me2 und H3K9me3 durch dSETDB1 katalysiert (Abb. 3.24, Seite 42). Diese beiden Modifizierungen scheinen für eine normale Keimbahnentwicklung essentiell zu sein, da homozygote *egg¹⁴⁷³*- Weibchen steril sind und nur rudimentäre Ovarien ohne GSC bilden (Pohl 2010). Sehr wahrscheinlich führt diese Mutation auch zu männlicher Sterilität, da die Testis ebenfalls stark reduziert sind (Pohl 2010). Um zu testen, ob diese Männchen wirklich steril sind, müssten homozygote *egg¹⁴⁷³* Männchen gegen Wildtyp- Weibchen gekreuzt werden.

Da die homozygoten *eggless¹⁴⁷³*- Weibchen keine GSC bilden, wurden die GSC der heterozygoten *egg¹⁴⁷³*- Mutanten untersucht. Dabei ließ sich im Bezug auf H3K9me1, H3K9me2 und H3K9me3 kein Unterschied zum Wildtyp erkennen (Abb. 3.28, Seite 46). Dies widerspricht den Daten von Yoon et al. (2008), die mit der *dsetdb1^{G19561}* –

Mutante nachweisen konnten, dass dieses Enzym H3K9me3 in den Germarien katalysiert. Diese Mutante ist entgegen der *egg¹⁴⁷³*- Mutante jedoch auch homozygot in der Lage, ovariale Stammzellen zu bilden. Die Entwicklung in diesen Ovarien stoppt erst in Stadium 6. Auch Wang et al. (2011) konnten zeigen, dass dSETDB1 H3K9 in den GSC trimethyliert, die H3K9 Dimethylierung aber nicht katalysiert. Im Rahmen der Arbeit konnte dies nicht bestätigt werden, da in den Ovarien der heterozygoten adulten Weibchen offensichtlich die Hälfte des Genproduktes ausreicht, um die vollständige Funktion des Proteins zu erreichen. Somit kann aufgrund der Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass dSETDB1 tatsächlich in den Germarien H3K9me3 katalysiert, obwohl keine Unterschiede zwischen *egg¹⁴⁷³*- Mutante und Wildtyp gefunden wurden. In weiterführenden Arbeiten sollten in den Ovarien homozygoter *dsetdb1^{G19561}* – Weibchen (Yoon et al., 2008) die GSC nochmals im Bezug auf H3K9me1, H3K9me2 und H3K9me3 untersucht werden.

Anhand der Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass die H3K9 spezifischen KMTasen SU(VAR)3-9 und dSETDB1 entwicklungspezifisch kontrollierte Aktivitäten zeigen (Abb. 4.1). Die Umschaltung der enzymatischen Spezifitäten in *Drosophila*

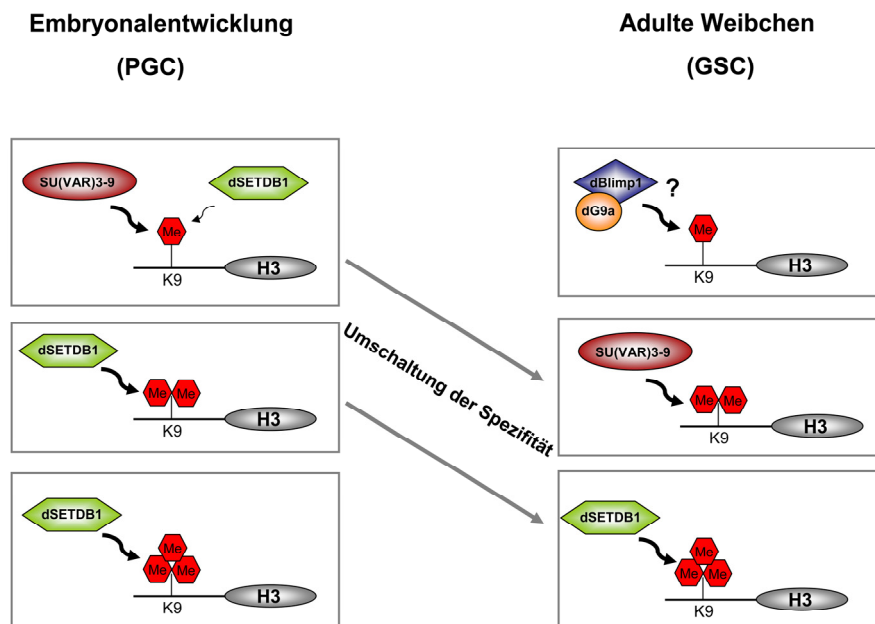


Abb.4.1. Die entwicklungspezifische Aktivität und Spezifität der H3K9 spezifischen KMTasen dSETDB1 und SU(VAR)3-9 in der Keimbahn von *Drosophila*. Während der Embryogenese katalysiert in den PGC hauptsächlich SU(VAR)3-9 H3K9me1. H3K9me2 und H3K9me3 wird in diesem Entwicklungsstadium von dSETDB1 übernommen. In den adulten Keimbahnstammzellen (GSC) ist die KMTase, die H3K9me1 katalysiert, noch unbekannt. Es könnte ein Komplex aus dG9a und Blimp1 sein. Es erfolgt eine Umschaltung in der Spezifität in den GSC, da SU(VAR)3-9 H3K9me2 und dSETDB1 nur noch H3K9me3 katalysiert.

könnte durch entwicklungsabhängig verschieden assoziierte Bindungspartner gesteuert sein. Von SETDB1/ ESET ist bekannt, dass es mit mAM/ hAM interagiert (Ichimura et al., 2005). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stimuliert dieser Cofaktor die SETDB1/ ESET- abhängige Reaktion von H3K9me2 zu H3K9me3 (Wang et al., 2003). In *Drosophila* wurde bereits das Homologe von mAM, Windei, näher untersucht, das ebenfalls als essentieller Cofaktor von dSETDB1 für dessen Lokalisation innerhalb des Kerns und dessen Funktion in der weiblichen Keimbahn unbedingt erforderlich ist (Koch et al., 2009).

Welches Enzym H3K9me1 im Germarium katalysiert, kann nur spekuliert werden. Die Daten von Lee et al. (2010) zeigen, dass dG9a nicht die verantwortliche KMTase ist, da alle drei H3K9 Methylierungsstufen in den Germarien im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert waren. Ein weiterer Kandidat könnte ,wie bereits im Rahmen der PGC Analysen diskutiert, dBlimp1, das *Drosophila*- Homologe des humanen *B lymphocyte-induced maturation protein 1* (Blimp1) sein. Für den humanen Blimp1- Komplex konnte bereits eine spezifische Histonmethyltransferaseaktivität nachgewiesen werden (Gyory et al., 2004). Diese Aktivität war jedoch durch G9a vermittelt und nicht durch Blimp1 und es konnte gezeigt werden, dass beide direkt über Zinkfinger motive miteinander interagieren (Gyory et al., 2004). Für das *Drosophila*- Homologe dBlimp1 wurden bisher keine Untersuchungen zur Histonmethyltransferaseaktivität durchgeführt. Wie das humane Protein besitzt es jedoch ebenfalls eine SET- Domäne und mehrere Zinkfinger. Um einen Einfluss auf PEV zu zeigen, müsste eine *dBlimp1*- Mutante isoliert und im *In(1)w^{m4} Rearrangement* (Soma) bzw. im *K10*- PEV (Keimbahn) untersucht werden. Des Weiteren könnten Histonmethyltransferase- Assays Aufschluss über das *in vitro* Verhalten von dBlimp1 geben. Bei den *in vivo* Analysen sollten immunzytologische Färbungen gegen H3K9me1, H3K9me2 und H3K9me3 zeigen, ob das Enzym einen Einfluss auf diese Modifizierungen im Embryo, den larvalen polytären Speicheldrüsenchromosomen oder in den Ovarien adulter Weibchen hat. Sollten sich keine Unterschiede zeigen, könnte die Analyse von *dBlimp1/ dG9a* Doppelmutanten Aufschluss darüber geben, ob in *Drosophila* beide Enzyme ebenfalls über eine direkte Interaktion die Methytransferaseaktivität vermitteln.

4.3.2 Der Einfluss von Ecdyson- Signaling auf die Oogenese

Neuere Analysen beweisen einen Einfluss von TAIMAN auf die ovariellen Keimbahnstammzellen von *Drosophila* (König et al., 2011). Aus früheren Arbeiten ist

bereits bekannt, dass Komponenten verschiedener Ebenen des Ecdyson- Signalweges funktionell in den Ovarien benötigt werden (Buszczak et al., 1999). Ovarien EcR-defizienter Weibchen zeigen verschiedene Defekte in den Eikammern, wie kleinere Nährzellkerne, den Verlust von Nährzellen in der frühen Vitellogenese und den Verlust von Follikelzellen (Carney und Bender 2000). Solche Defekte konnten in der homozygoten *taiman*- Mutante nicht detektiert werden. In einigen Ovariolen wurde jedoch ein dekondensierter Eizellkern nachgewiesen (Abb. 3.32, Seite 51), wodurch die Entwicklung wahrscheinlich vor dem Beginn der Vitellogenese stoppt und kein Embryo gebildet wird. Es scheint eine Verbindung zwischen Chromatinstruktur und Hormon-Signalwegen über TAIMAN zu geben, da die Dekondensierung mit dem Anstieg von H3K4me2 im Eizellkern korreliert. Für Ecdyson konnte eine solche Verbindung bereits gezeigt werden, da es mit dem Chromatin- *remodeling*- Faktor ISWI und Nurf301, der größten Untereinheit des NURF Chromatin- *remodeling*- Komplexes, funktionell interagiert und die Proliferation und Selbsterneuerung der adulten Keimbahn-Stammzellen (GSC) kontrolliert (Ables und Drummond-Barbosa 2010).

Färbungen der GSC gegen die Histon- Modifizierungen H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2, H3K9me3, H3K27me3, H3K9ac und die Histon- Deacetylase RPD3 zeigten im Vergleich zum Wildtyp nur Unterschiede bei H3K9ac, H3K9me3 und RPD3 (HDAC1; Abb. 3.33, Seite 52). Diese Veränderungen im Chromatin der GSC durch TAIMAN stehen allerdings etwas konträr zu den Ergebnissen von König et al. (2011), die das TAIMAN- Protein hauptsächlich in den somatischen Zellen (*Cap*- Zellen, ESC [*escort stem cells*], FSC [*follicle stem cells*]) und kaum in den Keimbahnzellen detektierten. Sie schlossen allerdings eine duale Funktion in Soma und Keimbahn nicht aus. Eine weitere mögliche Erklärung für beide Ergebnisse wäre eine indirekte Wirkung von TAIMAN in den Keimbahnzellen über eine Vernetzung mit anderen Signalwegen.

Der einzige Unterschied zwischen den GSC der *taiman*- Mutante (Ovariolen mit Karyosom und Ovariolen mit dekondensierter Eizelle) bei der Deacetylase RPD3 kann nicht ursächlich für die beobachtete starke Dekondensierung des Eizellkerns sein. Daher sollte untersucht werden, ob TAIMAN neben der Beeinflussung der Wanderung der Border- Zellen (Bai et al., 2000) auch über den EcR- Rezeptorkomplex die Expression der Faktoren reguliert, die an der Bildung des Karyosoms beteiligt sind. Die möglichen Kandidatengene *Src64*, *par-1*, *Doa*, *bob*, *benedict* und *fried* (Djagaeva et al., 2005; Navarro et al., 2001; Morris et al., 2003), deren Mutantenphänotyp dem der untersuchten *taiman*- Mutante entspricht, könnten im defizienten *taiman*- Hintergrund

fehlreguliert sein, was dazu führt, dass keine Kondensierung des Eizell- Chromatins erfolgt. Um zu zeigen, ob *taiman* in den Ovarien Faktoren reguliert, die am Aufbau des Karyosoms beteiligt sind oder ob es Signalwege beeinflusst, könnte eine Expressionsanalyse von Ovarien homozygoter *taiman*- Defizienz-Weibchen erfolgen.

Bei der im Rahmen der Arbeit untersuchten *taiman*- Mutante [*Df(2L)tai2*] konnte im Bezug auf die Anzahl der GSC und Nischenzellen keine Veränderung in den Germarien detektiert werden. Analysen von König et al. (2011) an Ovarien transheterozygoter *taiman*- Mutanten (*tai*⁰¹³¹⁵; *tai*^{EY11718}; *tai*^{KG02309}; *tai*^{BG02711} jeweils über *tai*^{G161} und *tai*^{k15101}) zeigten jedoch einen anderen Phänotyp, bei dem die Anzahl der GSC und der *Cap*- Zellen signifikant erhöht waren. Daraus könnte man schlussfolgern, dass TAIMAN im Prozess der GSC- Bildung eine große Rolle zu spielen scheint. Die verstärkte Proliferation der Stammzellen in der *taiman*- Mutante deckt sich mit der Rolle des humanen Homologen AIB1 bei der Entstehung von Brustkrebs (Bai et al., 2000). Es scheint daher, dass TAIMAN offensichtlich eine vielfältige Funktion in der Keimbahn hat und direkt oder indirekt über die Vernetzung mit anderen Signalwegen Einfluss auf essentielle Keimbahnfunktionen in den Ovarien hat.

4.4 E(Z), HP1 und dSETDB1 sind essentiell für die Keimbahnentwicklung in *Drosophila*

Die von Fire et al. (1998) erstmals in *C. elegans* gezeigte RNA Interferenz (RNAi), die zum spezifischen *Knockdown* verschiedener Gene eingesetzt wird, ist Grundlage vieler heute existierender RNAi- basierter Methoden in verschiedenen Organismen. Im Rahmen der Arbeit erfolgte der RNAi *Knockdown* mittels shmi- RNAs, die in einem UAS/GAL4- basierten System exprimiert wurden (TRiP consortium Boston, <http://www.flyrnai.org>). Verschiedene Ergebnisse weisen darauf hin, dass Faktoren der RNAi- Maschinerie auch in die Kontrolle von Entwicklungsprozessen involviert sind. Bei *C. elegans* wird *ego-1* für die Keimbahnentwicklung und die Fertilität der Nematode unbedingt benötigt und fördert die RNA Interferenz in der Keimbahn (Smardon et al., 2000; Qiao et al., 1995). Auch in der Oogenese von *Drosophila* spielen RNAi- Mechanismen eine große Rolle. *Aubergine* (*aub*) und *spindle-E* (*spn-E*) sind für diese Prozesse in der Oocyte unerlässlich (Kennerdell et al., 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden RNAi-Linien für verschiedene Chromatinfaktoren wie HP1, SUV4-20, E(Z) und RPD3 genutzt, um mit Hilfe von *nanos*GAL4- und *vasa*GAL4-Treibern einen Keimbahn-spezifischen *Knockdown* zu erreichen und die Funktion der entsprechenden Gene in der Keimbahn zu analysieren. Der RNAi *Knockdown* war bei der maternalen Herkunft des *nanos*GAL4- Treibers viel effektiver als bei der reziproken Kreuzung, da *nanos* in den Ovarien der Weibchen sehr stark exprimiert und in den Embryo geladen wird. Somit wird auch der *nanos*GAL4- Treiber bei einer maternalen Kreuzung in großer Menge in den Embryo geladen (Abb. 3.34, Seite 55).

Mit Hilfe des spezifischen RNAi *Knockdowns* in der Keimbahn konnten auch Analysen von Faktoren erfolgen, deren Mutationen homozygot früh letal sind, wie beispielsweise *E(z)* (LaJeunesse und Shearn 1996). Dabei zeigte sich, dass HP1, *eggless* [dSETDB1], *E(z)*, *piwi* und *vasa* für eine korrekte Keimbahnentwicklung unerlässlich sind, da der RNAi *Knockdown* mittels *nanos*GAL4 und coexprimiertem UAS-*Dicer2* zu Sterilität in den adulten Weibchen der F1- Generation führte (Abb. 3.38, Seite 59). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die anderen getesteten Regulatoren Funktionen in der Keimbahn haben, obwohl die genutzten RNAi- Transgene zunächst keinen Effekt zeigten. Daher sollten weitere RNAi- Linien von SUV4-20, JIL-1 und TAIMAN analysiert werden, um deren Funktion in der Keimbahn zu bestätigen bzw. auszuschliessen. Des Weiteren könnten die RNAi- Linien, die keinen Effekt zeigten, mit dem MTD- GAL4- Treiber (*maternal triple driver*) getestet werden. Dieser Treiber enthält neben zwei *nanos*GAL4- Transgenen auch eine *otu*GAL4 (*ovarian tumour*)-Insertion. MTD- GAL4 wurde bereits erfolgreich zum *Knockdown* von *domino* eingesetzt (N. Steffen und S. Vengadasalam pers. Mitteilung). Mit *nanos*GAL4 und coexprimiertem UAS-*Dicer2* konnte hingegen kein effektiver *domino Knockdown* gefunden werden.

Bei der Analyse des RNAi *Knockdowns* von HP1, *eggless* und *E(z)* in frühen Embryonen der F1- Generation zeigte sich kein Unterschied zum Wildtyp im Bezug auf die untersuchten Histonmodifikationen. Da es zu RNAi- Experimenten in frühen primordialen Keimbahnzellen von *Drosophila* keine Arbeiten gibt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die RNAi zu einem so frühen Zeitpunkt in den Keimbahnzellen keine Wirkung zeigt. Auch die maternale Ladung von RNA und Proteinen könnte eine Rolle dabei spielen, dass die RNAi in den PGC offenbar wirkungslos ist. Die Funktionalität des UAS/GAL4 - Systems im frühen Embryo konnte

im Rahmen dieser Arbeit anhand des neu etablierten Keimbahn-ChIP- Systems bereits gezeigt werden. Wahrscheinlich prägt sich der RNAi- Effekt von HP1, *eggless*, *E(z)* und *vasa* erst in den larvalen Gonaden aus. Die Ergebnisse von Sato et al. (2010) zeigen eine reduzierte Anzahl der PGC durch einen RNAi *Knockdown* von *Dpp* und *Hh* in den Gonaden des 3. Larvenstadiums. Dieses Stadium wurde im Rahmen der Arbeit nicht analysiert, sollte jedoch in nachfolgende Analysen unbedingt einbezogen werden.

In den stark rudimentären Ovarien der adulten Weibchen findet nach dem RNAi *Knockdown* von HP1, *eggless* und *E(z)* keine vollständige Oogenese mehr statt (Abb. 3.41, Seite 61; Abb. 3.45, Seite 64). Für das Auftreten der Typ A Ovarien (reduziert, aber GSC vorhanden) und Typ B Ovarien (keine GSC, Verlust Keimbahnidentität) beim *E(z)* *Knockdown* könnten Schwellenwerte verantwortlich sein. Das Unterschreiten eines kritischen H3K27 Methylierungswertes würde so zu Typ B Ovarien ohne GSC führen. Liegen die Methylierungswerte geringfügig darüber, entstehen Typ A Ovarien mit GSC. Da die Bildung der GSC offensichtlich von der H3K27 Methylierung abhängig ist, sollten in weiteren Analysen unbedingt larvale Ovarien des *E(z)* RNAi *Knockdowns* untersucht werden.

Für die Ausbildung der Typ 1 Ovariolen (keine VASA- Färbung) und Typ 2 Ovariolen (VASA- Färbung) der Ovarien des RNAi *Knockdowns* von *eggless* und HP1 ist hingegen wahrscheinlich die mosaikartige Expression des *nanosGAL4*- Treibers verantwortlich (J. Szabad pers. Mitteilung). Da in beiden Ovariolentypen keine GSC detektiert werden konnten, scheinen neben der H3K27 Methylierung auch H3K9me2 und H3K9me3 essentiell für die Bildung der ovariolen Stammzellen zu sein. Diese Ergebnisse zeigten sich auch bereits bei der Analyse der *egg*¹⁴⁷³- Mutation. Es ist auch beim RNAi *Knockdown* von *eggless* und HP1 in weiteren Arbeiten unbedingt erforderlich, larvale Gonaden zu untersuchen. Dies könnte Aufschluss darüber geben, zu welchem Zeitpunkt der Keimbahnentwicklung H3K9me2 und H3K9me3 essentiell sind.

4.5 In der Keimbahn existieren viele verschiedene Wege zur Bildung epigenetisch inaktiver Chromatinstrukturen

Die Bildung der dorso-ventralen Achse des Embryos beruht auf der Expression von mindestens 11 maternalen Genen (Anderson und Nüsslein- Volhard 1984; Gans et al.,

1975). Eines der am frühesten in die Ausbildung der dorso-ventralen Achse involvierten Gene ist *fs(1)K10* (Wieschaus und Szabad 1978; Wieschaus 1979, 1980), das als negativer Transkriptionsregulator des TGF- α ähnlichen Wachstumsfaktors *gurken* (Neuman-Silberberg und Schüpbach 1993) indirekt an der Achsenbildung beteiligt ist (Forlani et al., 1993). Mutationen im *K10*- Gen führen zur vollständigen Dorsalisierung (Wieschaus und Szabad 1978; Wieschaus 1979, 1980) während eine Überexpression keinen Effekt auf die embryonale Achsenbildung hat (Forlani et al., 1993). Dies beruht wahrscheinlich auf einem starken Kompensationsmechanismus in der späteren Entwicklung (Driever und Nüsslein-Volhard 1988). *Fs(1)K10* diene als Markergen in dem PEV- System, das für die genetische Analyse von somatischen Chromatin- Faktoren in der Keimbahn genutzt wurde.

Nach der Remobilisierung eines X- chromosomalen *K10*- P- Elementes [*P{fs(1)K10^{w+}}*] wurden insgesamt 178 Insertionen isoliert und im Bezug auf ihren Integrationsort und die *K10*- Variegation näher untersucht (Abb. 3.49, Seite 69). Durch die Analyse der Linien, deren Genompositionen identifiziert wurden und die über das 2. und 3. Chromosom verteilt sind, kann erstmals eine grobe Aussage darüber gemacht werden, wo im Keimbahnchromatin sich genetisch aktive bzw. inaktive Bereiche befinden. Es scheinen in der Keimbahn sogar größere Chromatinbereiche genetisch inaktiv zu sein als im Soma, da 12,6% der Linien eine *K10*- Variegation über 1% zeigten, aber nur bei 3% der Linien ein *white*- Gen- *Silencing* nachgewiesen wird.

Von den zufallsgemäß im Genom integrierten 178 *K10*- Linien wurden 10 ausgewählt, um Chromatinfaktoren, die im Soma wirken, auf eine mögliche Funktion in der Keimbahn zu untersuchen. Dabei konnte bei den analysierten Regulatoren SU(VAR)3-9, HP1, SUV4-20, JIL-1, dLSD1 [SU(VAR)3-3], E(Z), dSETDB1, TAIMAN, E(VAR)LID, SU(VAR)2-1 und Piwi erstmals auch eine wichtige Rolle im Gen- *Silencing* der Keimbahn von *Drosophila* nachgewiesen werden. Es können jedoch in der Keimbahn mehrere molekulare Wege von Gen- *Silencing* gefunden werden, da in jeder der getesteten *K10*- Linien eine verschiedene Anzahl der Faktoren einen Effekt zeigt. Im Soma existieren allerdings auch mindestens fünf alternative Wege des Gen- *Silencings* in verschiedenen Genombereichen (Phalke et al., 2009). In der Keimbahn scheint es hingegen mindestens neun verschiedene Wege zu geben. Da sowohl Linie 82 als auch Linie 174 keine bzw. schwache Effekte mit den getesteten Regulatoren zeigten, aber eine *K10*- Variegation von über 80% aufweisen, scheint das *Silencing* an diesen Stellen im Genom über mindestens einen zusätzlichen, noch unbekanntem Weg zu

erfolgen. Obwohl in den weiteren 8 getesteten Linien für eine unterschiedliche Anzahl von Chromatinfaktoren Effekte in der Keimbahn nachgewiesen werden können, zeigen sich auch Übereinstimmungen. In jedem *Silencing*-Weg ist mindestens eine H3K9 KMTase [SU(VAR)3-9 und dSETDB1] und eine H3K4 Demethylase [SU(VAR)3-3 und E(VAR)LID] involviert (Abb. 7.10, Seite A17). Obwohl in den *Silencing*-Prozessen der Linien 12 und 131 eine Wirkung von SU(VAR)3-9 oder dSETDB1 nachgewiesen werden konnte, sind diese Wege unabhängig von HP1. Im Soma von *Drosophila* existiert solch ein alternatives Gen-*Silencing* ohne HP1 nur bei der Bildung von Heterochromatin an den Telomeren (Phalke et al., 2009). In drei der acht *K10*-Linien konnte eine Rolle der H3K27 spezifischen KMTase E(Z) gezeigt werden. Somit scheint das Gen-*Silencing* in der Keimbahn hauptsächlich über H3K9 Methylierung zu erfolgen und nur an einigen Stellen über H3K27 Methylierung. Dabei wird das *K10-Silencing* der Linie 131, die im *3S18* Transposons inseriert ist, offensichtlich nur über dSETDB1 katalysiert und ist unabhängig von SU(VAR)3-9 und HP1.

Analysen im Soma zeigten, dass das Heterochromatin der Telomere einer besonderen Chromatinorganisation unterliegt und nicht von einem SU(VAR)3-9-abhängigen Mechanismus (Schotta et al., 2002, 2004) kontrolliert wird. Allerdings betreffen keine der isolierten *K10*-Insertionen Telomer- und subtelomerische Bereiche oder perizentromere Regionen. Die Länge der Chromosomen in *Drosophila* wird durch die hohe Kopienzahl der Retrotransposons *HeT-A*, *TART* und *Tahre* aufrechterhalten. In diesen Bereichen können weder H3K9me₃ noch HP1, aber eine Anreicherung an H4K20me₃ detektiert werden (Mason et al., 2008; Phalke et al., 2009; Wacker 2008). Daher wäre es interessant, die Chromatinstruktur der Telomerbereiche auch in der Keimbahn zu charakterisieren. Um *K10*-Insertionen auch in diesen Bereichen analysieren zu können, müssen *site*-spezifische Integrationen mit Hilfe des FLP/FRT Systems (Golic und Lindquist 1989; Golic 1994) erfolgen. In Vorarbeiten von J. Wacker (Wacker 2008) konnten bereits 18 Fliegenlinien etabliert werden, die über RS5-Elemente (DrosDel-Kollektion) *site*-spezifische Insertionen in den Telomerbereich von 2L (Linie 5-HA-1191), 3R (Linie 5-HA-1992) oder das 4. Chromosom (Linie 5-HA-2033) erlauben. Ein Konstrukt, das eine spezifische Insertion in RS3-Elemente erlaubt, würde die Anzahl der möglichen Insertionsstellen in den gewünschten Bereichen vergrößern, da bestimmte Regionen nur mit Hilfe beider Elemente genauer analysiert werden können. Es erfolgten bereits Versuche zur Erstellung des *pRS3*-Konstruktes, die jedoch bis jetzt nicht erfolgreich waren (Wacker 2008).

4.5.1 Spielen *Transvection*- Prozesse eine Rolle im Gen-*Silencing* in der Keimbahn?

Mit Hilfe des *K10*- PEV- Systems konnte für die untersuchten Regulatoren erstmals eine wichtige Rolle im Gen- *Silencing* der Keimbahn von *Drosophila* nachgewiesen werden. Dabei traten jedoch verschiedene und teilweise unerwartete Effekte auf. Nach der Art der Wirkung der Effektoren konnten drei verschiedene Wirkungsmodi unterschieden werden: (1) der reguläre Modus, bei dem nur der Testgenotyp, der die *Su(var)*- Mutation trägt, supprimiert ist, nicht aber die Kontrolle, (2) der parentale Modus, bei dem beide Genotypen [Kontrollgenotyp ohne *Su(var)* und Testgenotyp mit *Su(var)*] einen Suppressor- Effekt zeigen und (3) der unerwartet aufgetretene alternative Modus, der im Soma nie beobachtet wurde. Hier ist nur der Kontrollgenotyp ohne *Su(var)*- Mutation supprimiert. Der Genotyp mit der *Su(var)*- Mutation zeigt hingegen in einigen Fällen eine Erhöhung über die Kontrolle hinaus. Der parentale Modus konnte in verschiedenen *K10*- Linien hauptsächlich bei *Su(var)2-5* [HP1], *eggless* [dSETDB1] und *piwi* detektiert werden, der bisher nur in der Keimbahn aufgetretene alternative Modus zeigte sich vorrangig bei *Su(var)2-1*. Paternale oder maternale Effekte der Mutationen als Ursache für die drei Wirkungsmodi können ausgeschlossen werden, da reziproke Kreuzungen gleiche Resultate erbrachten.

Die unerwartete Reduktion des Kontrollgenotyps im parentalen und alternativen Modus könnte auf *Transvection*- Prozessen beruhen, die im Soma von *Drosophila* bereits intensiv analysiert wurden (Gemkov et al., 1998; Pirrotta 1999; Duncan 2002). Die von EB Lewis (1954) erstmals am Bithorax- Komplex (BX- C) entdeckten *Transvection*- Prozesse beruhen in fast allen Fällen (außer *iab-5,6,7* des BX-C) auf Paarung der homologen Chromosomen in somatischen Zellen, was an einigen Stellen die Genexpression signifikant beeinflussen kann. Dabei können sowohl *Enhancer*- Elemente als auch *Silencer*- Elemente in *trans* involviert sein. In einigen Fällen wird das Zeste- Protein für *Transvection*- Prozesse benötigt, wobei vermutet wird, dass es als DNA- bindendes Protein das Paaren der homologen Chromosomen durch Selbst- Aggregation unterstützt (Chen et al., 1992). Daher sollten sowohl Zeste selbst als auch Polycomb in die Untersuchungen einbezogen werden.

Die Untersuchungen von *E(z)* [*E(z)^{l5}*] im *K10*- PEV der Keimbahn zeigte nur in den Linien 12 (Intron *Df31*) und 128 (Intron *Tm1*) den alternativen bzw. parentalen Modus. In den Linien 11 (Intron *Drep-2*) und 46 (5'UTR *Mvl*) ist der Kontrollgenotyp unbeeinflusst. In ersten Analysen mit einer *E(Pc)*- Mutante [*E(Pc)^l*] im *K10*- PEV

konnte bereits ein alternativer Modus in den Linien 11 (Intron *Drep-2*; $E(z)$ regulär) und 45 (intergenisch, $E(z)$ ohne Funktion) detektiert werden (Abb. 7.1, Seite A8).

Bei den Analysen der Chromatin- Faktoren zeigte sich weiterhin, dass SU(VAR)2-1 für den *Transvection*- Prozess wichtig sein könnte, da es der einzige Faktor ist, bei dem immer der alternative Modus detektiert wurde (Abb. 3.50-3.52; Abb. 3.54-3.55; Abb. 7.2- 7.3A; Abb. 7.5-7.8). Der *Transvection*- Prozess ereignet sich wahrscheinlich früh in der Keimbahnentwicklung. Mit Hilfe der bereits diskutierten Fliegenlinien, bei denen repetitive *lacO*- Sequenzen und *lacI*-GFP im Genom transgen integriert sind (Vazquez et al., 2001) könnten in den primordialen Keimbahnzellen Chromosomenpaarungen analysiert werden. Dabei wird die Bindung von LacI- GFP an den *lac* Operator *lacO* untersucht. Bei einer Paarung der Chromosomen ist jeweils ein Punkt detektierbar, liegen die Chromosomen getrennt vor, sind in der GFP- Färbung zwei Punkte erkennbar. Somit könnte im Hintergrund der verwendeten *Su(var)2-1⁰¹*- Mutation immunzytologisch analysiert werden, ob SU(VAR)2-1 eine Rolle bei der Paarung der homologen Chromosomen spielt.

Mit Hilfe der Defizienz *Df(2R)BSC279*, bei der der homologe Bereich der *K10*- Insertionslinie 11 deletiert war und somit keine Übertragung von Chromatinzuständen erfolgen konnte, war es im Rahmen der Arbeit nicht möglich, *Transvection*- Prozesse in der Keimbahn von *Drosophila* eindeutig zu zeigen. Grund hierfür ist die Größe der Defizienz von 393 kb, in der 51 Gene deletiert sind. Es konnte jedoch ein neuer $E(var)$ für *K10*- Variegation innerhalb der Defizienz gefunden werden, der für eine starke Erhöhung der Variegation in der Linie 11 verantwortlich ist. Der $E(var)$ - Effekt der Defizienz *Df(2R)BSC279* ist in der Linie 12 ebenfalls nachweisbar (Abb. 7.9, Seite A16). In den *K10*- Linien 46, 124 und 128 prägt diese Deletion jedoch einen starken *Su(var)*- Effekt aus (Abb. 7.9, Seite A16). Da das Einkreuzen dieser Defizienz in das *In(1)w^{m4} Rearrangement* weder einen *Enhancer*-, noch einen *Suppressor*- Effekt zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass dieser neue Chromatinfaktor Keimbahn-spezifisch wirkt. Innerhalb der Defizienz sind die 14 Gene mit unbekannter Funktion die wahrscheinlichsten Kandidaten für den Auslöser des $E(var)$ - bzw. *Su(var)*- Effektes. Mit Hilfe überlappender Defizienzen innerhalb des Bereiches der *K10*- Linie 11 könnte der Faktor auf einen kleineren Bereich eingegrenzt und kartiert werden.

Um *Transvection*- ähnliche Prozesse in der Keimbahn mit Hilfe von Defizienzen doch analysieren zu können, muss eine kleine Deletion selbst hergestellt werden, da keine

weiteren Defizienzen für diesen Bereich zur Verfügung stehen. Dabei wird des *P*-Element der *K10*- Insertion $P\{fs(1)K10^+w^+\}11$ remobilisiert. Erfolgt ein unkorrekter Ausbau, besteht die Möglichkeit, dass eine kurze Deletion entsteht, die nur eine kleine homologe Region deletiert und damit eine bessere Analyse ermöglicht. Am Aufbau einer solchen kleineren Defizienz wird zurzeit gearbeitet.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass die im Soma bereits intensiv analysierten Chromatin- Faktoren auch eine sehr wichtige Funktion bei Gen- *Silencing*- Prozessen in der Keimbahn besitzen. Um das Gen-*Silencing* in der Keimbahn noch besser analysieren zu können und eventuell weitere Wege der epigenetischen Inaktivierung zu finden, sollten bisher nicht genauer untersuchte Linien mit *K10*- Variegation einbezogen werden. Weiterhin würde die Analyse bisher nicht in der Keimbahn untersuchter Faktoren wie dG9a, RPD3, dBlimp-1, Polycomb oder *spindle E* als RNAi- Komponente ebenfalls dazu beitragen, das Gen- *Silencing* in Keimbahnzellen besser zu verstehen. Um Regulatoren zu detektieren, die ausschließlich im Keimbahn- Chromatin wirken, könnten in ihrer Sequenz definierte Deletionen in *K10*- Linien eingekreuzt werden. Dabei muss eine Einkreuzung in mehrere Linien erfolgen, da die im Soma bereits untersuchten Modifikatoren nicht in jeder getesteten *K10*- Linie einen Effekt zeigten. Ein Keimbahn- spezifischer Chromatinfaktor konnte im Rahmen der Untersuchungen zu *Transvection*- Prozessen bereits gefunden werden. Jedoch können mit den im Rahmen der Arbeit genutzten Analysen die unerwarteten Reduktionen der Kontrollgenotypen im alternativen und parentalen Modus nicht vollständig erklärt werden.

5 Zusammenfassung

Die epigenetische Regulation der Genexpression durch Chromatin- Faktoren ist während der gesamten Entwicklung ein zentraler Prozess, der die Differenzierung verschiedener Zelltypen kontrolliert. Auch im Chromatin der Keimbahnzellen sollten koordinierte genetische und epigenetische regulatorische Programme ablaufen. Über diese Prozesse ist in *Drosophila* sehr wenig bekannt, da bisher essentielle Methoden für die direkte genetische Analyse der Chromatinregulation und die molekulare Charakterisierung des Keimbahn- Chromatins fehlten.

Die vorliegende Arbeit zeigt intensive immunzytologische Analysen des Chromatins der primordialen (PGC) und ovariellen Keimbahnstammzellen (GSC). Dabei wurden neue Erkenntnisse zu epigenetischen Kontrollmechanismen in diesen Zellen gewonnen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die PGC und die sich daraus entwickelnden GSC Unterschiede im Chromatinaufbau aufweisen und somit nicht identisch sind. Für die H3K9 spezifischen KMTasen SU(VAR)3-9 und dSETDB1 wurde eine entwicklungspezifisch kontrollierte Aktivität gefunden, die wahrscheinlich durch die Assoziation verschiedener Bindungspartner gesteuert ist. H3K9me2 und H3K9me3, nicht jedoch H3K9me1, sind offenbar essentiell für die Keimbahnentwicklung. Nur bei einer Reduktion der H3K9 Di- und Trimethylierung in den PGC während der frühen Embryogenese werden in der späteren Entwicklung rudimentäre Ovarien ohne GSC gebildet. Auch die durch E(Z) katalysierte H3K27 Methylierung besitzt eine wichtige Funktion in der Keimbahnentwicklung und führt bei Verlust zu sehr stark reduzierten Ovarien.

Steroidhormone spielen in verschiedenen physiologischen und Entwicklungsprozessen eine Schlüsselrolle. TAIMAN, einer der Coaktivatoren des EcR-Rezeptor- Komplexes, wurde als dominanter Suppressor für *white*- Gen- *Silencing* im *In(1)w^{m4} Rearrangement* identifiziert. Immunzytologische Analysen zeigen, dass TAIMAN offensichtlich eine vielfältige Funktion in der Keimbahn besitzt und direkt oder indirekt über die Vernetzung mit anderen Signalwegen Einfluss auf wesentliche Keimbahnfunktionen in den Ovarien hat. Homozygote Embryonen weisen massive globale Veränderungen in der Chromatinstruktur auf, die sowohl euchromatische (H3K4me2, H3K9ac) als auch heterochromatische (H3K9me2, me3, H3K27me3) Modifikationen betreffen.

Mit Hilfe des *K10*- PEV wurde erstmals genetisch nachgewiesen, dass die im Soma bereits intensiv analysierten Chromatin- Faktoren SU(VAR)3-9, HP1, SUV4-20, JIL-1,

dLSD1 [SU(VAR)3-3], E(Z), dSETDB1, TAIMAN, E(VAR)LID, SU(VAR)2-1 und Piwi auch eine sehr wichtige Funktion bei Gen- *Silencing*- Prozessen in der Keimbahn besitzen. Dabei existieren in der Keimbahn offenbar mehrere molekulare Wege von Gen- *Silencing*. Die Etablierung einer Methode zur spezifischen Isolierung von Chromatin aus primordialen Keimbahnzellen ermöglicht nun auch die molekulare Analyse von Keimbahn- Chromatin mittels ChIP. Durch einen Vergleich der genetischen (*K10*- PEV) und molekularen (Keimbahn- ChIP) Untersuchungen können sehr genaue Analysen definierter genomischer Regionen in der Keimbahn erfolgen, die vorher nicht möglich waren.

6 Literaturverzeichnis

- Ables ET, Drummond-Barbosa D (2010) The steroid hormone ecdysone functions with intrinsic chromatin remodeling factors to control female germline stem cells in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* **7**(5): 581-592.
- Akkers RC, van Heeringen SJ, Jacobi UG, Janssen-Megens EM, François KJ, Stunnenberg HG, Veenstra GJ (2009) A hierarchy of H3K4me3 and H3K27me3 acquisition in spatial gene regulation in *Xenopus* embryos. *Dev Cell* **17**(3):425-34.
- Ancelin K, Lange UC, Hajkova P, Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T, Surani MA (2006) Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol* **8**: 623-630.
- Anderson KV, Nüsslein-Volhard C (1984) Information for the dorsal--ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* **311**(5983): 223-227.
- Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa O, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM und Meltzer PS (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* **277**: 965–968.
- Apelt C (2005) Genetische Analyse neuer Chromatingene von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T (2003) Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* **19**(2): 257-267.
- Asaoka M, Lin H (2004) Germline stem cells in the *Drosophila* ovary descend from pole cells in the anterior region of the embryonic gonad. *Development* **131**: 5079-5089.
- Asaoka-Taguchi M, Yamada M, Nakamura A, Hanyu K, Kobayashi S (1999) Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* **1**: 431-437.
- Ashburner M (1989) *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**: 120–124.

- Bai J, Uehara Y, Denise J, Montell DJ (2000) Regulation of Invasive Cell Behavior by Taiman, a *Drosophila* Protein Related to AIB1, a Steroid Receptor Coactivator Amplified in Breast Cancer. *Cell* **103**: 1047–1058.
- Baisch H (2010) Die H3K4me3 Histondemethylase LID reguliert die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bär J (2008) Chromatindifferenzierung in der frühen Embryogenese und in der weiblichen Keimbahn von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Barker DD, Wang C, Moore J, Dickinson LK, Lehmann R (1992) Pumilio is essential for function but not for distribution of the *Drosophila* abdominal determinant Nanos. *Genes Dev* **6**: 2312-2326.
- BDGP. Berkeley *Drosophila* Genome Project. <http://www.fruitfly.org>.
- Bender LB, Cao R, Zhang Y, Strome S (2004) The MES-2/MES-3/MES-6 Complex and Regulation of Histone H3 Methylation in *C. elegans*. *Curr Biol* **14**: 1639–1643.
- Berger SL (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**(7143): 407-412.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**: 315-326.
- Billia F, de Boni U (1991) Localization of centromeric satellite and telomeric DNA sequences in dorsal root ganglion neurons, *in vitro*. *J Cell Sci* **100** (Pt 1):219-226. *J Cell Sci*. 1991 Sep;100 (Pt 1):219-226.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523.
- Blackwell TK (2004) Germ cells: finding programs of mass repression. *Curr Biol* **14**: R229-R230.
- Boswell RE, Mahowald AP (1985) Tudor, a gene required for the proper assembly of the germ plasm of *Drosophila melanogaster*. *Cell* **43**: 97-104.
- Boswell RE, Prout ME, Steichen JC (1991) Mutations in a newly identified *Drosophila melanogaster* gene, *mago nashi*, disrupt germ cell formation and result in formation of mirror-image symmetrical double abdomen embryo. *Development* **113**: 373-384.

- Boyle M, DiNardo S (1995) Specification, migration and assembly of the somatic cells of the *Drosophila* gonad. *Development* **121**: 1815-1825.
- Boyle M, Bonini N, DiNardo S (1997) Expression and function of *clift* in the development of somatic gonadal precursors within the *Drosophila* mesoderm. *Development* **124**: 971-982.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**(2): 401-415.
- Brandt A, Papagiannouli F, Wagner N, Wilsch-Bräuninger M, Braun M, Furlong EE, Loserth S, Wenzl C, Pilot F, Voigt N, Lecuit T; Krohne G, Großhans J (2006) Developmental control of nuclear size and shape by *kugelkern* and *kurzkern*. *Current Biology* **16**: 543-552.
- Bridger JM, Boyle S, Kill IR, Bickmore WA (2000) Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr Biol* **10**(3):149- 152.
- Buszczak M, Freeman MR, Carlson JR, Bender M, Cooley L, Segraves WA (1999) Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development* **126**(20): 4581-4589.
- Carney GE, Bender M (2000) The *Drosophila* ecdysone receptor (EcR) gene is required maternally for normal oogenesis. *Genetics* **154**(3): 1203-1211.
- Chen JD, Chan CS, Pirrotta V (1992) Conserved DNA binding and self-association domains of the *Drosophila* zeste protein. *Mol Cell Biol* **12**: 598-608.
- Cinalli RM, Rangan P, Lehmann R (2008) Germ cells are forever. *Cell* **132**: 559-562.
- Clough E, Moon W, Wang S, Smith K, Hazelrigg T (2007) Histone methylation is required for oogenesis in *Drosophila*. *Development* **134**(1): 157-165.
- Crevel G und Cotterill S (1995) DF 31, a sperm decondensation factor from *Drosophila melanogaster*: purification and characterization. *EMBO J* **14**(8): 1711-1717.
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* **145**(6): 1119-1131.
- Dellino GI, Schwartz YB, Farkas G, McCabe D, Elgin SCR, Pirrotta V (2004) Polycomb Silencing Blocks Transcription Initiation. *Mol Cell* (**13**): 887-893.
- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**(7150): 151-156.

- Ding D, Parkhurst SM, Halsell SR, Lipshitz HD (1993) Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Mol Cell Biol* **13**: 3773-3781.
- Djagaeva I, Doronkin S, Beckendorf SK (2005) Src64 is involved in fusome development and karyosome formation during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol* **284**(1): 143-156.
- Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, Köprunner M, Dörries J, Meyer D, Esguerra CV, Leung T, Raz E (2002) Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1. *Cell* **111**: 647-659.
- Dong F, Jiang J (1998) Non-Rabl patterns of centromere and telomere distribution in the interphase nuclei of plant cells. *Chromosome Res* **6**(7): 551-558.
- Driever W, Nüsslein-Volhard C (1988) A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell* **54**(1):83-93.
- Driever W, Nüsslein-Volhard C (1988) The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* **54**(1):95-104.
- Duncan IW (2002) Transvection effects in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **36**: 521-556.
- Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T, Reuter G (2004) *Su(var)* genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**: 2973-2983.
- Ebert A (2005) *Su(var)*-Gene regulieren die Balance zwischen Euchromatin und Heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ebert A, Lein S, Schotta G, Reuter G (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Research* **14**: 377-392.
- Eissenberg JC, Morris GD, Reuter G, Hartnett T (1992) The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics* **131**: 345-352.
- Erdelyi M, Michon AM, Guichet A, Glotzer JB, Ephrussi A (1995) Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in *oskar* mRNA localization. *Nature* **377**(6549): 524-527.
- Fan Y, Bergmann A (2010) The cleaved-Caspase-3 antibody is a marker of Caspase-9-like DRONC activity in *Drosophila*. *Cell Death Differ* **17**(3): 534-539.
- Ferguson EL (1996) Conservation of dorsal-ventral patterning in arthropods and chordates. *Curr Opin Genet Dev* **6**(4): 424-431.

- Ferguson M, Ward DC (1992) Cell cycle dependent chromosomal movement in pre-mitotic human T-lymphocyte nuclei. *Chromosoma* **101**(9): 557-565.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669): 806-811.
- Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S (2003) Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**: 1870-1881.
- Flybase. The *Drosophila* genetic database. <http://flybase.bio.indiana.edu>.
- Foe, F. V.; G.M. Odell und B.A. Edgar (1993) Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. In: M. Bate and A. Martinez Arias, Editors, *The Development of Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratories Press, Cold Spring Harbor, NY 149-300.
- Forbes AJ, Lin H, Ingham PW, Spradling AC (1996a) *hedgehog* is required for the proliferation and specification of ovarian somatic cells prior to egg chamber formation in *Drosophila*. *Development* **122**(4): 1125-1135.
- Forbes AJ, Spradling AC, Ingham PW, Lin H (1996b) The role of segment polarity genes during early oogenesis in *Drosophila*. *Development* **122**(10): 3283-3294.
- Forlani, S, Ferrandon D, Saget O, Mohier E (1993) A regulatory function for *K10* in the establishment of the dorsoventral polarity in the *Drosophila* egg and the embryo. *Mech Dev* **41**: 109-120.
- Fritsch L, Robin P, Mathieu JRR, Souidi M, Hinaux H, Rougeulle C, Harel-Bellan A, Ameyar-Zazoua M, Ait-Si-Ali S (2010) A Subset of the Histone H3 Lysine 9 Methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP, and SETDB1 Participate in a Multimeric Complex. *Mol Cell* **37**: 46-56.
- Funabiki H, Hagan I, Uzawa S, Yanagida M (1993) Cell cycle-dependent specific positioning and clustering of centromeres and telomeres in fission yeast. *J Cell Biol* **121**(5): 961-976.
- Gans M, Audit C, Masson M (1975) Isolation and characterization of sex-linked female-sterile mutants in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **81**(4): 683-704.
- Gemkow MJ, Verveer PJ, Arndt-Jovin DJ (1998) Homologous association of the Bithorax Complex during embryogenesis: consequences for transvection in *Drosophila melanogaster*. *Development* **125**: 4541-4552.

- Gendrel AV, Lippman Z, Yordan C, Colot V, Martienssen RA (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene DDM1. *Science* **297**(5588): 1871-1873.
- Gerber M, Shilatifard A (2003) Transcriptional elongation by RNA polymerase II and histone methylation. *J Biol Chem* **278**(29): 26303-26306.
- Ghosh D, Seydoux G (2008) Inhibition of transcription by the *Caenorhabditis elegans* germline protein PIE-1: genetic evidence for distinct mechanisms targeting initiation and elongation. *Genetics* **178**(1): 235-243.
- Gilboa L, Forbes A, Tazuke SI, Fuller MT, Lehmann R (2003) Germ line stem cell differentiation in *Drosophila* requires gap junctions and proceeds via an intermediate state. *Development* **130**: 6625-6634.
- Gilboa L, Lehmann R (2004) How different is Venus from Mars? The genetics of germline stem cells in *Drosophila* females and males. *Development* **131**: 4895-4905.
- Gilson E, Laroche T, Gasser SM. (1993) Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol* **3**(4): 128-134.
- Gloor G und Engels W (1992) Single-Fly DNA Preps for PCR. *D I S*, **71**:148.149.
- Godt D, Laski FA. 1995. Mechanisms of cell rearrangement and cell recruitment in *Drosophila* ovary morphogenesis and the requirement of *bric a` brac*. *Development* **121**: 173–187.
- Golic KG, Lindquist S (1989) The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**(3): 499-509.
- Golic KG (1994). Local transposition of P elements in *Drosophila melanogaster* and recombination between duplicated elements using a site-specific recombinase. *Genetics* **137**(2): 551—563.
- González-Reyes A, Elliott H, St Johnston D (1995) Polarization of both major body axes in *Drosophila* by *gurken-torpedo* signalling. *Nature* **375**(6533): 654-658.
- Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos M (2004) Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics* **166**: 1775-1782.
- Gyory I, Wu J, Fejér G, Seto E, Wright KL (2004) PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol* **5**: 299-308.
- Hampsey M, Reinberg D. (2003) Tails of intrigue: phosphorylation of RNA polymerase II mediates histone methylation. *Cell* **113**(4): 429-432.
- Hayashi Y, Hayashi M, Kobayashi S (2004) Nanos suppresses somatic cell fate in *Drosophila* germ line. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 10338-10342.

- Hayashi K, de Sousa Lopes SM, Surani MA (2007) Germ cell specification in mice. *Science* **316**: 394-396.
- Heasman J, Wylie CC, Hausen P, Smith JC (1984) Fates and states of determination of single vegetal pole blastomeres of *X. laevis*. *Cell* **37**(1): 185-194.
- Heitz E (1929) Heterochromatin, Chromocentren, Chromomenen. *Ber dtsh Bot Ges* **47**: 217-284.
- Hilliker AJ, Lohe AR, Roberts PA (1993) Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**: 1149-1176.
- Hochstrasser M, Mathog D, Gruenbaum Y, Saumweber H, Sedat JW (1986) Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* **102**(1): 112-123.
- Horvay K, Claußen M, Katzer M, Landgrebe J, Pieler T (2006) *Xenopus* Dead end mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. *Dev Biol.* **291**(1): 1-11.
- Huang AM, Rehm EJ, Rubin GM (2000) *Drosophila Protocols*, Kap. Recovery of DNA Sequences Flanking P-element Insertions: Inverse PCR and Plasmid Rescue, 429- 447. Cold Spring Harbor Lab Press.
- Hubbard EJA, Greenstein D (2005) Introduction to the germ line. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.18.1, <http://www.wormbook.org>.
- Ichimura T, Watanabe S, Sakamoto Y, Aoto T, Fujita N, Nakao M (2005) Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *J Biol Chem* **280**(14): 13928-13935.
- Ikenishi K (1998) Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Develop Growth Differ* **40**: 1-10.
- Illmensee K, Mahowald AP (1974) Transplantation of posterior polar plasm in *Drosophila*. Induction of germ cells at the anterior pole of the egg. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 1016-1020.
- Inohara N, Nuñez G (1999) Genes with homology to DFF/CIDEs found in *Drosophila melanogaster*. *Cell Death Differ* **6**(9): 823-824.
- Jaglarz MK, Howard KR (1995) The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. *Development* **121**: 3495-3503.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**(5532):1074-1080.

- Jin Q, Trelles-Sticken E, Scherthan H, Loidl J (1998) Yeast nuclei display prominent centromere clustering that is reduced in nondividing cells and in meiotic prophase. *J Cell Biol* **141**(1): 21-29.
- Jongens TA, Ackerman LD, Swedlow JR, Jan LY, Jan YN (1994) *Germ cell-less* encodes a cell type-specific nuclear pore-associated protein and functions early in the germ-cell specification pathway of *Drosophila*. *Genes Dev* **8**: 2123-2136.
- Kai T, Williams D, Spradling AC (2005) The expression profile of purified *Drosophila* germline stem cells. *Dev Biol* **283**(2): 486-502.
- Kaufman TC, Tasaka SE, Suzuki DT (1973) The interaction of two complex loci, *zeste* and *bithorax* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **75**(2): 299-321.
- Kennerdell JR, Yamaguchi S, Carthew RW (2002) RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on *aubergine* and *spindle-E*. *Genes Dev* **16**(15): 1884-1889.
- King RC (1970) Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, New York.
- Knaut H, Werz C, Geisler R, The Tübingen 2000 Screen Consortium, Nüsslein-Volhard C (2003) A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* **421**: 279-282.
- Kobayashi S, Yamada M, Asaoka M, Kitamaru T (1996) Essential role of the posterior morphogen Nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature* **380**: 708-711.
- Koch CM, Honemann-Capito M, Egger-Adam D, Wodarz A (2009) Windei, the *Drosophila* homolog of mAM/MCAF1, is an essential cofactor of the H3K9 methyl transferase dSETDB1/Eggless in germ line development. *PLoS Genet* **5**(9): e1000644.
- Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**(1): 59-77.
- Kouzarides T (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 198-209.
- König A, Yatsenko AS, Weiss M, Shcherbata HR (2011) Ecdysteroids affect *Drosophila* ovarian stem cell niche formation and early germline differentiation. *EMBO J* **30**(8): 1549-1562.
- Kuhfittig S, Szabad J, Schotta G, Hoffmann J, Máthé E, Reuter G (2001) *pitkin(D)*, a novel gain-of-function enhancer of position-effect variegation, affects chromatin

- regulation during oogenesis and early embryogenesis in *Drosophila*. *Genetics* **157**(3): 1227-1244.
- Krauss V (1995) Mutantanalyse, evolutionäre Konservierung und Interaktionen des *Su(var)3-9*- Gens – ein dosisabhängiges Modifikatorgen für Positioneffekt-Variation bei *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle.
- Kunwar PS, Starz-Gaiano M, Bainton RJ, Heberlein U, Lehmann R (2003) Tre1, a G Protein-Coupled Receptor, Directs Transepithelial Migration of *Drosophila* Germ Cells. *PLoS Biol* **1**(3): 372-384.
- Kunwar PS, Siekhaus DE, Lehmann R (2006) *In vivo* migration: A germ cell perspective. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 237-265.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-120.
- LaJeunesse D, Shearn A (1996) *E(z)*: a polycomb group gene or a trithorax group gene? *Development* **122**(7): 2189-2197.
- Lall S, Patel NH (2001) Conservation and divergence in molecular mechanisms of axis formation. *Annu Rev Genet* **35**: 407-437.
- Lantz V, Ambrosio L, Schedl P (1992) The *Drosophila orb* gene is predicted to encode sex-specific germline RNA-binding proteins and has localized transcripts in ovaries and early embryos. *Development* **115**: 75-88.
- Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W, Pikaard CS (2004) A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell* **13**: 599-609.
- Lee KS, Yoon J, Park JS, Kang YK (2010) *Drosophila* G9a is implicated in germ cell development. *Insect Mol Biol* **19**(1):131-139.
- Lehmann R, Nüsslein-Volhard C (1986) Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of *oskar*, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell* **47**: 141-152.
- Lehmann R, Nüsslein-Volhard C (1991) The maternal gene *nanos* has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development* **112**: 679-693.
- Lein S (2011) Differentielle Kontrolle von Histon-Methylierung und Demethylierung bei der Etablierung des heterochromatischen *Gensilencings* in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Lewis EB (1954) The theory and application of a new method of detecting chromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* **88**: 225–239.
- Lindsley DL, Zimm GG (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. *Academic Press*, New York.
- Lin H, Spradling AC (1997) A novel group of *pumilio* mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development* **124**: 947-976.
- Manseau L, Schüpbach T (1989) *cappuccino* and *spire*: two unique maternal-affect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **3**: 1437-1452.
- Manuelidis L (1984) Different central nervous system cell types display distinct and nonrandom arrangements of satellite DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**(10): 3123-3127.
- Manuelidis L (1985) Individual interphase chromosome domains revealed by *in situ* hybridization. *Hum Genet* **71**(4): 288-293.
- Manuelidis L, Borden J (1988) Reproducible compartmentalization of individual chromosome domains in human CNS cells revealed by *in situ* hybridization and three-dimensional reconstruction. *Chromosoma* **96**(6): 397-410.
- Markstein M, Pitsouli C, Villalta C, Celniker S, Perrimon N (2008) Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nature Genetics* **135**: 1439-1449.
- Marshall WF, Dernburg AF, Harmon B, Agard DA, Sedat JW (1996) Specific interactions of chromatin with the nuclear envelope: positional determination within the nucleus in *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Cell* **7**(5): 825-842.
- Marshall WF and Sedat JW (1999) Nuclear architecture. *Results Probl Cell Differ* **25**: 283-301.
- Mason, J.; R. C. Frydrychova und H. Biessmann (2008) *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. *Bioessays* **30** (1): 25-37.
- McKearin D, Ohlstein B (1995) A role for the *Drosophila* bag-of-marbles protein in the differentiation of cystoblasts from germline stem cells. *Development* **121**(9): 2937-2947.
- Mello CC, Schubert C, Draper B, Zhang W, Lobel R, Priess JR (1996) The **PIE-1** protein and germline specification in *C. elegans* embryos. *Nature* **382**: 710–712.

- Mis J, Ner SS, Grigliatti TA (2006) Identification of three histone methyltransferases in *Drosophila*: dG9a is a suppressor of PEV and is required for gene silencing. *Mol Genet Genomics* **275**: 513–526.
- Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, Schaible K, Stebler J, Sunshine MJ, O'Brien W, Raz E, Littman D, Wylie C, Lehmann R (2003) The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* **130**(18): 4279-4286.
- Moore LH, Broihier HT, Van Doren M, Lunsford LB, Lehmann R (1998) Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in *Drosophila*. *Development* **125**: 667-678.
- Morris JZ, Navarro C, Lehmann R (2003) Identification and analysis of mutations in *bob*, *Doa* and eight new genes required for oocyte specification and development in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **164**(4): 1435-1446.
- Muller HJ (1930) Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Genetics* **22**: 299-334.
- Nakamura A, Amikura R, Mukai M, Kobayashi S, Lasko PF (1996) Requirement for a noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment. *Science* **274**: 2075-2079.
- Nakamura A, Seydoux G (2008) Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development* **135**(23): 3817-3827.
- Navarro C, Lehmann R, Morris J (2001) Oogenesis: Setting one sister above the rest. *Curr Biol* **11**(5): R162-165.
- Neuman-Silberberg FS, Schüpbach T (1993) The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell*. **75**(1): 165-174.
- Ni JQ, Markstein M, Binari R, Pfeiffer B, Liu LP, Villalta C, Booker M, Perkins LA, Perrimon, N (2008) Vector and Parameters for Targeted Transgenic RNAi in *Drosophila melanogaster*. *Nature Methods* **5**: 49-51.
- Ni JQ, Liu LP, Binari R, Hardy R, Shim HS, Cavallaro A, Booker M, Pfeiffer B, Markstein M, Wang H, Villalta C, Lavery T, Perkins L, Perrimon N. (2009) A *Drosophila* Resource of Transgenic RNAi Lines for Neurogenetics. *Genetics* **182**(4): 1089-1100.
- Nüsslein-Volhard C (1979) Maternal effect mutations that alter the spatial coordinates of the embryo of *Drosophila melanogaster*. In: Determination of spatial

- organization. (ed. G. Subtelney and I.R. Koenigsberg), pp. 185–211. Academic Press, New York.
- Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, Saitou M, Surani MA (2005) Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* **436**(7048): 207-213.
- Orgad S, Nelson H, Segal D, Nelson N (1998) Metal ions suppress the abnormal taste behavior of the *Drosophila* mutant *malvolio*. *J Exp Biol* **201**(1): 115-120.
- Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) The *Drosophila* retinoid X receptor homolog *ultraspiracle* functions in both female reproduction and eye morphogenesis. *Development* **115**(2): 449-462.
- Page SL, Hawley RS (2001) c(3)G encodes a *Drosophila* synaptonemal complex protein. *Genes Dev* **15**(23): 3130-3143.
- Pai LM, Barcelo G, Schüpbach T (2000) D-cbl, a negative regulator of the Egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Cell* **103**(1): 51-61.
- Palladino F, Laroche T, Gilson E, Axelrod A, Pillus L, Gasser SM (1993) SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* **75**(3): 543-555.
- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**: 1577-1589.
- Peterson JS, Barkett M, McCall K (2003) Stage-specific regulation of caspase activity in *drosophila* oogenesis. *Dev Biol* **260**(1): 113-123.
- Phalke S, Nickel O, Walluscheck D, Hortig F, Onorati MC, Reuter G (2009) Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet* **41**(6): 696-702.
- Pirrotta V (1999) Transvection and chromosomal *trans*-interaction effects. *Biochim Biophys Acta* **1424**: M1–M8.
- Pohl F (2010) Genetische und molekularbiologische Analyse der dSETDB1- Mutante *egg*¹⁴⁷³ in *Drosophila melanogaster*. Bachelor-Arbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Poirie M, Niederer E, Steinmann-Zwicky M (1995) A sex-specific number of germ cells in embryonic gonads of *Drosophila*. *Development* **121**: 1867-1873.

- Qiao L, Lissemore JL, Shu P, Smardon A, Gelber MB, Maine EM (1995) Enhancers of *glp-1*, a gene required for cell-signaling in *Caenorhabditis elegans*, define a set of genes required for germline development. *Genetics* **141**(2): 551-569.
- Raff JW, Whitfield WGF, Glover DM (1990) Two distinct mechanisms localize cyclin B transcripts in syncytial *Drosophila* embryos. *Development* **110**: 1249-1261.
- Rais R, Girard C, Gipouloux JD (1981) Study of the catecholamines in the notochord of *Anura* Amphibia embryos. Its possible relationships with the adenylyl-cyclase activity and the primordial germ cells migration. (author's transl) *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **70**(3): 149-160.
- Rangan P, DeGennaro M, Lehmann R (2008) Regulating gene expression in the *Drosophila* germ line. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **73**: 1-8.
- Reuter G, Dorn R, Hoffmann HJ (1982) Butyrate sensitive suppressor of position-effect variegation mutations in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **188**: 480-485.
- Reuter G, Spierer P (1992) Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays* **14**: 605-612.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* **12**: 1591-1598.
- Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK, Engels WR (1988) A stable genomic source of *P* element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**: 461-470.
- Rongo C, Lehmann R (1996) Regulated synthesis, transport and assembly of the *Drosophila* germ plasm. *Trends Genet* **12**(3): 102-109.
- Rothwell WF, Sullivan W (2000) The centrosome in early *Drosophila* embryogenesis. *Curr Top Dev Biol* **49**: 409-447.
- Rubin GM, Spradling AC (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**(4570): 348-353.
- Rubin GM (1996) Around the genomes. The *Drosophila* Genome Project. *Genome Research* **6**: 71-79.
- Rudolph T, Yonezawa M, Lein S, Heidrich K, Kubicek S, Schäfer C, Phalke S, Walther M, Schmidt A, Jenuwein T, Reuter G (2007). Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell* **26**: 103-115.

- Ryder E, Blows F, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Coulson D, Drummond J, Webster J, Gubb D, Gunton N, Johnson G, O'Kane CJ, Huen D, Sharma P, Asztalos Z, Baisch H, Schulze J, Kube M, Kittlaus K, Reuter G, Maroy P, Szidonya J, Rasmuson-Lestander A, Ekström K, Dickson B, Hugentobler C, Stocker H, Hafen E, LepesantJA, Pflugfelder G, Heisenberg M, Mechler B, Serras F, Corominas M, Schneuwly S, Preat T, Roote J, Russell S (2004) The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**: 797-813.
- Ryoo HD, Bergmann A, Gonen H, Ciechanover A, Steller H (2003) Regulation of *Drosophila* IAP1 degradation and apoptosis by *reaper* and *ubcD1*. *Nat Cell Biol* **4**(6): 432-438.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sano H, Renault AD, Lehmann R (2005) Control of lateral migration and germ cell elimination by the *Drosophila melanogaster* lipid phosphate phosphatases Wunen and Wunen 2. *J Cell Biol* **171**: 675-683.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**: 407-411.
- Sasaki H, Matsui Y (2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* **9**(2): 129-140.
- Sato K, Hayashi Y, Ninomiya Y, Shigenobu S, Arita K, Mukai M, Kobayashi S (2007) Maternal Nanos represses *hid/skl*-dependent apoptosis to maintain the germ line in *Drosophila* embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 7455-7460.
- Sato T, Ogata J, Niki Y (2010) BMP and Hh signaling affects primordial germ cell division in *Drosophila*. *Zoolog Sci* **27**(10): 804-810.
- Saunders C, Cohen RS (1999) The role of oocyte transcription, the 5'UTR, and translation repression and derepression in *Drosophila gurken* mRNA and protein localization. *Mol Cell* **3**(1): 43-54.
- Schaner CE, Deshpande G, Schedl PD, Kelly WG (2003) A conserved chromatin architecture marks and maintains the restricted germ cell lineage in worms and flies. *Dev Cell* **5**: 747-757.
- Schaner CE, Kelly WG (2006) Germ line chromatin. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.18.1,

- <http://www.wormbook.org>.
- Schotta G, Reuter G (2000) Controlled expression of tagged proteins in *Drosophila* using a new modular P-element vector system. *Mol Gen Genet* **262**(6): 916-920.
- Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R, Reuter G (2002) Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* **21**(5): 1121-1131.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**: 1251–1262.
- Schulz C, Wood CG, Jones DL, Tazuke SI, Fuller MT (2002) Signaling from germ cells mediated by the rhomboid homolog *stet* organizes encapsulation by somatic support cells. *Development* **129**(19): 4523-4534.
- Schulze J (2003) Etablierung eines genetischen Systems zur Analyse der Chromatinregulation in Keimbahnzellen bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schüpbach T, Wieschaus E (1986) Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Wilhelm Roux Arch Dev Biol* **195**: 302-317.
- Schüpbach T, Roth S (1994) Dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **4**(4): 502-507.
- Schwalm FE (1988) Insect morphogenesis. *Monogr Dev Biol.* **20**: 1-356.
- Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, Sano M, Shigeta M, Matsui Y, Saga Y, Tachibana M, Shinkai Y, Saitou M (2007) Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* **134**(14): 2627-2638.
- Seum C, Reo E, Peng H, Rauscher FJ, Spierer P, Bontron S (2007a) *Drosophila* SETDB1 is required for chromosome 4 silencing. *PLoS Genet.* **3**: 709–719.
- Seum C, Bontron S, Reo E, Delattre M, Spierer P (2007b) *Drosophila* *G9a* is a nonessential gene. *Genetics* **177**: 1955-1957.
- Seydoux G, Mello CC, Pettitt J, Wood WB, Priess JR, Fire A (1996) Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. *Nature* **382**: 713–716.
- Seydoux G, Dunn MA (1997) Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. *Development* **124**: 2191-

- 2201.
- Seydoux G, Braun RE (2006) Pathway to totipotency: Lessons from germ cells. *Cell* **127**: 891-904.
- Shea MJ, King DL, Conboy MJ, Mariani BD, Kafatos FC (1990) Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: a new C2H2 zinc finger protein and a C2C2 steroid receptor-like component. *Genes Dev* **4**(7): 1128-1140.
- Shearn A, Hersperger G, Hersperger E (1978) Genetic analysis of two allelic temperature-sensitive mutants of *Drosophila melanogaster* both of which are zygotic and maternal-effect lethals. *Genetics* **89**(2): 341-353.
- Shearn A, Hersperger G, Hersperger E, Pentz ES, Denker P (1978) Multiple Allele Approach to the Study of Genes in *Drosophila melanogaster* That Are Involved in Imaginal Disc Development. *Genetics* **89**(2): 355-370.
- Shmueli A, Cohen-Gazala O, Neuman-Silberberg FS (2002) Gurken, a TGF-alpha-like protein involved in axis determination in *Drosophila*, directly binds to the EGF-receptor homolog Egfr. *Biochem Biophys Res Commun* **291**(4): 732-737.
- Smardon A, Spoerke JM, Stacey SC, Klein ME, Mackin N, Maine EM (2000) EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* **10**(4):169-178.
- Song X, Zhu CH, Doan C, Xie T (2002) Germline stem cells anchored by adherens junctions in the *Drosophila* ovary niches. *Science* **296**: 1855-1857.
- Southon A, Farlow A, Norgate M, Burke R, Camakaris J (2008). Malvolio is a copper transporter in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **211**(5): 709-716.
- Spurr, A. R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* **26**: 31-43.
- Starz-Gaiano M, Lehmann R (2001) Moving towards the next generation. *Mech Dev* **105**: 5-18.
- Stebler J, Spieler D, Stanchev K, Molyneaux KA, Richter U, Cojocaru V, Tarabykin V, Wylie C, Kessel K, Raz E (2004) Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/ CXCL12. *Dev Biol* **272**(2): 351-361.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45.
- Strome S, Lehmann R (2007) Germ versus soma decisions: Lessons from flies and worms. *Science* **316**: 392-393.

- Surani MA, Durcova-Hills G, Hajkova P, Hayashi K, Tee WW (2008) Germ line, stem cells, and epigenetic reprogramming. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **73**: 9-15.
- Takeuchi T, Tanigawa Y, Minamide R, Ikenishi K, Komiya T (2010) Analysis of SDF1/CXCR4 signaling in primordial germ cell migration and survival or differentiation in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* **127**(1-2): 146-158.
- TRiP. Transgenic RNAi Project. <http://www.flyrnai.org/>.
- Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G, Reuter G. (1994) The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J* **13**: 3822-3831.
- Tzeng TY, Lee CH, Chan LW, Shen CK (2007) Epigenetic regulation of the *Drosophila* chromosome 4 by the histone H3K9 methyltransferase dSETDB1. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**(31): 12691-12696.
- Van Doren M, Williamson AL, Lehmann R (1998) Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. *Curr Biol* **8**: 243-246.
- Van Meyel D., Thomas JB, Agulnick AD (2003) Ssdp proteins bind to LIM-interacting co-factors and regulate the activity of LIM-homeodomain protein complexes *in vivo*. *Development* **130**(9): 1915-1925.
- Vazquez J, Belmont AS, Sedat JW (2001) Multiple regimes of constrained chromosome motion are regulated in the interphase *Drosophila* nucleus. *Curr Biol* **11**(16): 1227-1239.
- Wacker J (2008) Analyse der keimbahnspezifischen Chromatinregulation in ausgewählten genomischen Regionen von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wang H, An W, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Chatton B, Tempst P, Roeder RG, Zhang Y (2003) mAM facilitates conversion by ESET of dimethyl to trimethyl lysine 9 of histone H3 to cause transcriptional repression. *Mol Cell* **12**(2): 475-487.
- Wang X, Pan L, Wang S, Zhou J, McDowell W, Park J, Haug J, Staehling K, Tang H, Xie T (2011) Histone H3K9 trimethylase Eggless controls germline stem cell maintenance and differentiation. *PLoS Genet* **7**(12): e1002426.
- Weismann A (1893) *The Germ-Plasm, A Theory of Heredity*, Charles Scribner's sons, New York.

- Wieschaus E (1978) Cell lineage relationships in the *Drosophila* embryo. *Results Probl Cell Differ* **9**: 97-118.
- Wieschaus E, Szabad J (1979) The Development and Function of the Female Germ Line in *Drosophila melanogaster*: A Cell Lineage Study. *Develop Biol* **68**: 29-46.
- Wieschaus E (1980) A combined genetic and mosaic approach to the study of oogenesis in *Drosophila*. *Basic Life Sci* **16**: 85-94.
- Wilson R, Goyal L, Ditzel M, Zachariou A, Baker DA, Agapite J, Steller H, Meier P (2002) The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nat Cell Biol* **4**(6): 445-450.
- Wylie C (1999) Germ Cells. *Cell* **96**(2): 165-174.
- Xie T, Spradling AC (1998) *decapentaplegic* is essential for the maintenance and division of germ-line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* **94**: 251-260.
- Xie T, Spradling AC (2000) A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* **290**: 328-330.
- Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* **71**(1): 63-72.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993) Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* **366**(6454): 476-479.
- Yoon J, Lee KS, Park JS, Yu K, Paik SG, Kang YK (2008) dSETDB1 and SU(VAR)3-9 sequentially function during germline-stem cell differentiation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* **3**(5): e2234.
- Zeitlinger J, Stark A, Kellis M, Hong JW, Nechaev S, Adelman K, Levine M, Young RA (2007) RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat Genet* **39**(12): 1512-1516.
- Zhu GH, Xie T (2003) Clonal expansion of ovarian germ-line stem cells during niche formation in *Drosophila*. *Development* **130**: 2579-2588.

7 Anhang

7.1 Transgene Linien

Linie	Chromosom	Linie	Chromosom
P{GS. v⁺ (vasa GAL4)}		P{GS. v⁺ UAS (H2A)EGFP}	
1	3	1	X
2	X	2	3
3	2	3	2
4	2	4	2
5	2	5	2
7	X		
8	2	P{GS. v⁺ UAS (H2B)EGFP}	
9	2	1	3
10	3	2	2
		3	3
P{GS. v⁺ (ovo GAL4)}			
1			
P{GS. v⁺ UAS (H2B-BIO)}			
1	2		
2	2		

7.2 Verwendete Primer

Biotin-Konstrukte	
H2A for	GTGCGGCCGCATGTCTGGACGTGGAAAAGG
H2A rev	GTGCGGCCGCGCCTTCTTCTCGGTCTTC
H2B for	GTGCGGCCGCATGCCTCCGAAAAGTAGTGGAAAAG
H2B rev	GTGCGGCCGCTTTAGAGCTGGTGTACTTGG
H3 for	ATGGCTCGTACCAAGCAAAGCTG
H3 rev	GTGCGGCCGCAGCACGCTCGCCGCGAATG
Bio for Sall (5'P)	CGGCGCGCCGGATCCATCGATCC
Bio I rev	CAGAAGATTGAGTGGCATGAGGTCGACGACGTCGCTAGCATACTAGG
Biotin-tag for (5'P)	TCGACGGACTGAATGATATTTTTCGAGGCCAGAAAGATTGAGTGGCATGAG
EGFP-Konstrukte	
H2A revA	GTGCGGCCGCAGGCCTTCTTCTCGGTCTTC
H2B revA	GTGCGGCCGCATTTAGAGCTGGTGTACTTGG
H3 revA	GTGCGGCCGCAAGCACGCTCGCCGCGAATG
GAL4- Promotorkonstrukte	
ovo Promotor for	GGCTCTAGAGTTTTGAAGGGCAGCGCACTAATTTCTTATG
ovo Promotor rev	GGCGGGCCCCAACGCCGGCTCGCAACTTACTGTATTCGAGG
toc Promotor for	GGCTCTAGACAAGTGGTACACGAGCAGCTTCAAGCAGCG
toc Promotor rev	GGCGGGCCCTGCATACAGTTTTTTTATATTTTCGGGGATTG
K10 Promotor for	GGCTCTAGAGGATGTCTGTGTAACACTGCGCTCGTGCG
K10 Promotor rev	GGCGGGCCCAGTTTTTCCCACTAATGTATGTTTCCACTAAC
vasa Promotor for	GGCTCTAGACGGAGCTGTTGTTCCGGTGTGGTTGGCGCCG
vasa Promotor rev	GGCGGGCCCGTGAATTTGCCATTGTGCTATCGCAATTC

c(3)G Promotor for	TCTAGACTGTGAGCGCTGGGGCC
c(3)G Promotor rev	GGGCCCCGGTCCTGCGTTGAAAAGCAACGG
Gal4 VP16 for	ATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAACCAAGC
Gal4 VP16 rev2	GTCGACCTACCCACCGTACTCGTCAATTCCAAGGGC

Primer zur Sequenzierung

K10 for 1	GATTGTTATAGTTGTTTCACTC
K10 rev 1	CCTGGTCCGGAGTTAATTTTG
K10 for 2	ATGGTGTCCAAGAACCAATTC
K10 rev 2	CTAGGGATTTGGAATTG
K10 for 3	ATACCGAATCAATCGAATCG
K10 rev 3	ATGAAGATCAAGAGCGTG
K10 for 4	GACCGGATCCACCTGACAAG
K10 rev 4	TTTTTGTTGCAAATCTCTC
K10 for 5	AGGAAATGGGAATGGTAACAG
K10 rev 5	TGCTGGTTCGGACTGGGATGC
K10 for 6	GCAGCATCCCAGTCCGAACC
K10 rev 6	CCGGGTCCCCGTGGTCCGGG
K10 for 7	ACCGATGGGCCCTGGAGGAC
K10 rev 7	TTGGCCTTGACAGTGGCTGC
K10 for 8	GGGCCACAAAGACGACGAGC
K10 rev 8	GAAGGTGAAAATAGATATGAC
K10 for 9	GTGAGCATATAGAGACCCCC
K10 rev 9	CTGCAAAAAGAAATACGAG
K10 for 10	GGTTGTTCCCTTGGCACTG
K10 rev 2.1	GAATTGTTGCATCTTTAGCGCTTCCG
pHT4vorn	ACAAGCGCAGCTGAACAAGC
EGFP hsbck	CTTGTGGCCGTTTACGTC

Primer für Inverse PCR

5'P for 1	ACCCACTTTAATGATTTCGAG
5'P rev 1	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG
5'Pfor 2	ACCAGTGGGAGTACACAAACAG
5'Prev 2	CACACAACCTTTCTCTCAAC

Primer für ChIP-Analysen

tubulin56D for	GATGCCGGGACTCAAAAAGACCAC
tubulin56D rev	ATGAGGGAAATCGTTCACATCC
satellite for	ATAGGGATCGTTAGCACTTGG
satellite rev	ATTTTATTACGAGCTCAGTGAG
vasa for	CCCATTGTTGATACTCGCG
vasa rev	CTCCTCGATAACCTCCAG
hts for	AACAGTTTCGAGCCCATTATAG
hts rev	TGACTGAAGTTGAGCAACCGC
CalpA for	ATGGACGACTTGAGGGGATTCTTG
CalpA rev	ATAGTATAGCGCCCTATAAATAAC
Fak56D for	CGTCCATCCGTGCCAGATCCTC
Fak56D rev	ATGAACACCGCGGGAGCCACCAG
Spt5 for	ATGTCGGACTCGGAAGTCAG
Spt5 rev	CGCCGGATTCATCGCTCTTGC
RpL11 for	ATGGCGGTAGGTTCAACCACAATTG
RpL11 rev	GCACGGGTCAGCCTGTCACCG
CG7735 for	ATGGGAATGTTGCACAATTTGGC
CG7735 rev	ACTGTAAAAGTGTCCACCATG
Elongin C for	TTGGTGGAGCCAACTACTTAC
Elongin C rev	ATGATAGCAATGGACGAGCAGCG

CG7744 for	ATGCTAACCCCTACTAATTCGGC
CG7744 rev	AGGTCCAACCTGTTGCGATCCTG
par-1 for	ATGGATGAATTTTCGGAGAATATAGAAAAG
par-1 rev	GAAACTTCCTCCGCGGACTTG
CG30130 for	GCCTCTTCATTTTACTGCG
CG30130 rev	CAATGATCTATAATAATTTGCGCAC

Primer für FISH- Analysen

K10 for 5	AGG AAA TGG GAA TGG TAA CAG
K10 rev 5	TGC TGG TTC GGA CTG GGA TGC
K10 for 7	ACC GAT GGG CCC TGG AGG AC
K10 rev 7	TTG GCC TTG ACA GTG GCT GC
K10 for 9	GTG AGC ATA TAG AGA CCC CC
K10 rev 9	CTG CAA AAG AAA TAC GAG
INVDR fwd	CAC TGA AGG GAT CTT CTT ACA TGT CC
INVDR rev	TTC TGA TGA AAT TGT AAT AAT GCG GT

7.3 fs(1)K10 Insertionslinien

Insertionspunkte der Startlinien

Linie		Insertionsort		K10- Variegation [%]
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 1	homozygot X(-)	eas (1. Exon)	14B7	0
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 5	homozygot X(-)	eas (1. Exon)	14B7	0
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 7	homozygot X(-)	eas (1. Exon)	14B7	0
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 8	homozygot X(-)	eas (1. Exon)	14B7	0,02
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 10	homozygot X(-)	eas (1. Exon)	14B7	0
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 19	homozygot X(-)	eas (1. Exon)	14B7	0

Insertionen auf SM6- Chromosomen

Linie		Insertionsort		K10- Variegation [%]
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 176	rezessiv letal 2R(+)	CG17002 (1. Exon)	42E1	0,15
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 177	rezessiv letal 2L(+)	neb (Intron)	38B4	0
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 178	rezessiv letal 2L(-)	CG11454 (Promotor)	21B3	0
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 179	rezessiv letal 2R(-)	coro (1. Exon)	42D6	0
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 180	rezessiv letal 2R(-)	intergenisch	42B4	0
<i>P{fs(1)K10+w+}</i> 181	rezessiv letal 2R(+)	CG14757 (Promotor)	44B8	0

im Rahmen der Arbeit Variegation bestimmt

im Rahmen der Arbeit genauen Insertionsort bestimmt

Angrenzende Gene bei intergenischen Insertionen

Linie	Gen upstream	Abstand in bp	Gen downstream	Abstand in bp	K10- Variegation [%]
P{fs(1)K10+w+}45	mir-276b	44.180 bp	mir-276aS	1.218 bp	70
P{fs(1)K10+w+}114	CG30017	2.346 bp	CG30016	260 bp	0
P{fs(1)K10+w+}137	mir-313	115 bp	Nuf1a	1.772 bp	0
P{fs(1)K10+w+}153	esg	19.548 bp	CG15258	5.493 bp	0,3
P{fs(1)K10+w+}155	CG12004	10.817 bp	CG13917	6.737 bp	0,2
P{fs(1)K10+w+}180	Or42b	37.828 bp	dpr12	10.349 bp	0

Insertionen ohne K10- Variegation

Linie	Insertionsort	K10- Variegation [%]	white - Variegation
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }1	homozygot X(-) eas (1. Exon) 14B7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }4	homozygot X(-) eas (1. Exon) 14B7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }5	homozygot X(-) eas (1. Exon) 14B7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }7	homozygot X(-) eas (1. Exon) 14B7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }9	homozygot 3 nicht gemappt	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }10	homozygot X(-) eas (1. Exon) 14B7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }18	homozygot X(-) eas (1. Exon) 14B7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }19	homozygot X(-) eas (1. Exon) 14B7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }20	homozygot X(-) eas (1. Exon) 14B7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }37	rezessiv letal 2R(-) CG30502 (Promotor) 43C1	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }40	homozygot 2R(-) CG30502 (Promotor) 43C1	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }57	rezessiv letal 2L(-) chic (Intron) 26A5	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }74	homozygot 2R(-) CG1968 (Exon) 45C3	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }79	homozygot 3L(-) fax (Exon) 72E 5	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }86	rezessiv letal 2L(+) Cg25C 25C1	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }90	homozygot 3L(-) sina (Exon) 73D3	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }91	homozygot 2L(-) CG3625 (Intron) 21B7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }92	homozygot 2R(-) Tsp42Ee (Intron) 42E 5	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }93	homozygot 2R(+) bdg (Promotor) 52D2	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }95	homozygot 3L(-) CG1244 (Intron) 62E 8	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }97	homozygot 3L(-) CG7823 (Intron) 76D5	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }98	homozygot 2R(+) CG8026 (5' UTR) 45B3	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }99	rezessiv letal 3L(-) Csp (Intron) 79D3	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }100	semiletal 2L(+) BicD (5' UTR) 36C9	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }101	rezessiv letal 3R(+) tacc (Intron) 82D2	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }102	homozygot 3R(-) CG9813 (Intron) 87E 8	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }103	homozygot 3L(-) MTF-1 (Promotor) 67B5	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }104	homozygot 2L(-) 1360j483 (Transposon) 39A5	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }105	homozygot 3L(-) CG9666 76A3	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }106	homozygot 2L(+) CG4710 (Intron) 21F1	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }107	rezessiv letal 2L(-) vkg (Promotor) 25C1	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }108	homozygot 3R(+) tacc (Intron) 82D2	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }110	homozygot 3L(-) CG14998 (Intron) 64A7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }112	homozygot 3L(-) CG5241 (Exon) 72D4	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }113	homozygot 2R(-) GstS1 (Promotor) 53F	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }114	homozygot 2R(+) intergenisch 47C3	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }115	homozygot 3L(-) CG10133 (Promotor) 70B1	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }116	homozygot 3L(+) Pep (Promotor) 74E 4	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }117	semiletal 3L(-) CG14998 (Intron) 64A7	0	
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }118	homozygot 3L(+) Lmpt (Intron) 73D	0	

im Rahmen der Arbeit Variegation bestimmt

im Rahmen der Arbeit genauen Insertionsort bestimmt

Insertionen ohne *K10*- Variegation (Fortsetzung)

Linie	Insertionsort	K10- Variegation [%]	white - Variegation
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }119	homozygot 3R(+) CG31522 (Exon)	82B2	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }120	homozygot 3R(-) <i>Lk6</i> (5'UTR)	86E 18	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }121	homozygot 3R(+) <i>Hsr omega</i> (Promotor)	93D4	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }123	rezessiv letal 2R(+) <i>SCAP</i> (Promotor)	42A5	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }125	homozygot 2L(+) <i>kis</i> (Intron)	21A1	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }127	homozygot 2R(+) <i>Jhl-26</i> (Promotor)	53B1	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }129	homozygot 2R(+) CG33558 (5' UTR)	42E 1	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }132	homozygot 3R(-) <i>awd</i> (Exon)	100C3	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }133	homozygot 2L(+) <i>Trx-2</i> (Intron)	30C1	0 x
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }134	homozygot 2L(-) <i>TfllS</i> (Exon)	35B10	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }135	rezessiv letal 3R(+) CG8444 (5' UTR)	85D6	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }136	rezessiv letal 3R(+) <i>cv-c</i> (Intron)	88C2	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }137	homozygot 2R(-) intergenisch	57A6	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }138	3S18 Transposon (FISH nötig für genaue Lokalisation)		0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }139	homozygot 3L(+) <i>BtbVII</i> (Intron)	63B7	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }140	homozygot 3R(+) <i>lrp-1</i> (Promotor)	86B4	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }141	homozygot 3L(-) CG4437 (Exon)	67A8	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }142	rezessiv letal 3L(-) <i>Cip4</i> (Exon)	64B2	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }143	homozygot 3R(+) <i>Pif1A</i> (Promotor)	85B1	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }145	rezessiv letal 2R(+) <i>Aats-asp</i> (Promotor)	49D7	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }146	homozygot 2L(-) CG3625 (Intron)	21B7	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }147	rezessiv letal 3L(+) <i>Dcp2</i> (Intron)	72A1	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }148	homozygot 3R(-) CG6966 (Intron)	88E 1	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }149	homozygot 3R(-) CG16817 (Exon)	85E 3	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }150	homozygot 2R(+) <i>scb</i> (Exon)	51E 10	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }151	homozygot 2R(-) <i>exu</i> (Exon)	57A9	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }158	homozygot 3L(-) <i>SsRb</i> (Promotor)	72D9	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }159	rezessiv letal 3R(+) <i>Alh</i> (Intron)	84C1	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }160	homozygot 2L(-) <i>snRNA:U2:34ABa</i>	34A9	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }161	homozygot 3L(+) <i>sgl</i> (5' UTR)	65D5	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }162	homozygot 3R(+) <i>Lk6</i> (5'UTR)	86F6	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }165	homozygot 3R(+) <i>a-ManIIb</i> (Promotor)	89A5	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }166	homozygot 3R(+) <i>Cortactin</i> (Promotor)	89A5	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }167	homozygot 3L(-) CG4933 (Exon)	72E 2	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }172	homozygot 3R(-) <i>mod(mdg4)</i> (Intron)	93D9	0 x
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }175	homozygot 3L(+) <i>sgl</i> (5' UTR)	65D5	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }177	rezessiv letal 2L(+) <i>neb</i> (Intron)	38B4	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }178	rezessiv letal 2L(-) CG11454 (Promotor)	21B3	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }179	rezessiv letal 2R(-) <i>coro</i> (1. Exon)	42D6	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }180	rezessiv letal 2R(-) intergenisch	42B4	0
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }181	rezessiv letal 2R(+) CG14757 (Promotor)	44B8	0

im Rahmen der Arbeit Variegation bestimmt

im Rahmen der Arbeit genauen Insertionsort bestimmt

Insertionen mit *K10*- Variegation < 1%

Linie		Insertionsort		K10- Variegation [%]	white - Variegation
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }3	homozygot	2L(+)	<i>pyd</i> (Promotor)	85B7	0,17
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }8	homozygot	X (-)	<i>eas</i> (Exon)	14B7	0,02
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }28	homozygot	2L(+)	<i>PNUTS</i> (Exon)	21E2	0,03
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }78	homozygot	2L	(FISH)	34A-B	0,05
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }85	homozygot	2L(-)	<i>CG12375</i> (Exon)	28E7	0,23
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }111	homozygot	2L(+)	<i>esg</i> (Exon)	35D1	0,01
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }144	homozygot	3R(+)	<i>Fer1HCH</i> (Intron)	99F2	0,04
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }153	homozygot	2L(-)	intergenisch	35D2	0,3
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }154	homozygot	3R(-)	<i>Tm1</i> (Intron)	88E12	0,01
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }155	homozygot	3L(-)	intergenisch	62A6	0,2
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }156	homozygot	3R(+)	<i>CG14709</i> (Promotor)	86E11	0,05
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }157	homozygot	3	nicht gemappt		0,02
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }163	homozygot	3L(+)	<i>CG3371</i> (5' UTR)	61C8	0,3
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }164	homozygot	2R(-)	<i>Camta</i> (Intron)	46B6	0,04
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }168	homozygot	3R(-)	<i>E2f</i> (Intron)	93E10	0,01
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }169	rezessiv letal	3L(-)	<i>CG5130</i> (Exon)	77C6	0,07
P{fs(1)K10 ⁺ w ⁺ }176	rezessiv letal	2R(+)	<i>CG17002</i> (1. Exon)	42E1	0,15

Insertionen mit *K10*- Variegation > 1%

Linie		Insertionsort		K10- Variegation [%]	white - Variegation
P{fs(1)K10+w ⁺ } 11	homozygot	2R(+)	<i>Rep2</i> (5' UTR)	45C3	40,5
P{fs(1)K10+w ⁺ } 12	homozygot	2L(-)	<i>DF31</i> (Intron)	39E3	29,2
P{fs(1)K10+w ⁺ } 13	rezessiv letal	3R(+)	<i>SNF4γ</i> (Intron)	93C4	2,5
P{fs(1)K10+w ⁺ } 45	homozygot	3L(+)	intergenisch	6700	70
P{fs(1)K10+w ⁺ } 46	rezessiv letal	3R(+)	<i>Mvl</i> (5' UTR)	93B8	60
P{fs(1)K10+w ⁺ } 51	homozygot	2L	(FISH)	36D3	1
P{fs(1)K10+w ⁺ } 62	homozygot	3L(+)	<i>Pk61C</i> (Intron)	61B1	3,13
P{fs(1)K10+w ⁺ } 76	homozygot	3L(-)	<i>Pk61C</i> (Intron)	61B1	87,5
P{fs(1)K10+w ⁺ } 82	homozygot	3R(-)	<i>Ssdp</i> (Intron)	90F1	96
P{fs(1)K10+w ⁺ } 96	homozygot	3R(-)	<i>Fer1HCH</i> (Intron)	99F2	7
P{fs(1)K10+w ⁺ } 109	homozygot	3L(+)	<i>Psa</i> (Intron)	62A3	95
P{fs(1)K10+w ⁺ } 122	homozygot	3L(+)	<i>Rgl</i> (Intron)	70C5	60
P{fs(1)K10+w ⁺ } 124	homozygot	2R(-)	<i>par-1</i> (Intron)	56D9	80
P{fs(1)K10+w ⁺ } 128	rezessiv letal	3R(-)	<i>Tm1</i> (Intron)	88E12	55
P{fs(1)K10+w ⁺ } 131	homozygot	2R(+)	<i>3S18β853</i> Transposon	55D4	90
P{fs(1)K10+w ⁺ } 170	homozygot	3L(+)	intergenisch	78C9	75
P{fs(1)K10+w ⁺ } 171	homozygot	3R(-)	<i>CG11963</i> (Intron)	85B7	90
P{fs(1)K10+w ⁺ } 173	homozygot	3R(-)	<i>mod</i>	100E3	85
P{fs(1)K10+w ⁺ } 174	homozygot	3R(-)	<i>mod</i>	100E3	85

im Rahmen der Arbeit Variegation bestimmt

im Rahmen der Arbeit genauen Insertionsort bestimmt

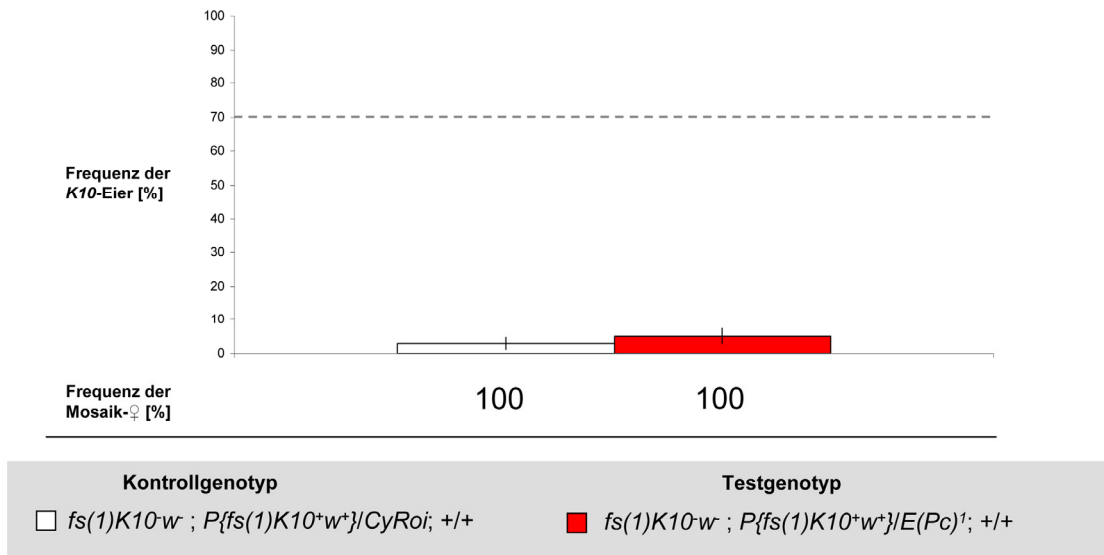
Insertionen mit starker *K10*- Variegation (>25%)

Linie	Insertionsort	Genfunktion	K10- Variegation [%]	white- Variegation
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 11	2R(+) <i>Rep2</i> (5' UTR)	involviert in Apoptose	38	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 12	2L(-) <i>Df31</i> (Intron)	Aufrechterhaltung der Chromatin-Architektur	29,2	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 45	3L(+) intergenisch	-	70	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 46	3R(+) <i>Mvl</i> (5' UTR)	Transporteraktivität	60	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 76	3L(-) <i>Pk61C</i> (Intron)	Serin/Threonin Kinase mit Rolle in Apoptose	87,5	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 82	3R(-) <i>Ssdp</i> (Intron)	Bestandteil eines Chip/Ap-Transkriptionsregulationskomplexes	96	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 109	3L(+) <i>Psa</i> (Intron)	Aminopeptidase mit Rolle in Proteolyse	95	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 122	3L(+) <i>Rgl</i> (Intron)	Rolle in GTPase vermittelter Signaltransduktion	60	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 124	2R(-) <i>par-1</i> (Intron)	notwendig für die Eizell-Determination	80	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 128	3R(-) <i>Tm1</i> (Intron)	beteiligt am Aufbau des Polplasmas	55	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 131	2R(+) 3S18/853 Transposon	LTR- Retrotransposon	90	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 170	3L(+) intergenisch	-	75	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 171	3R(-) <i>CG11963</i> (Intron)	Succinat-CoA-Ligase im Zuckermetabolismus	90	x
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 173	3R(-) <i>mod</i>	Beteiligung an der Chromatinverpackung	85	
<i>Pf</i> {s(1)K10+w+} 174	3R(-) <i>mod</i>	Beteiligung an der Chromatinverpackung	85	

im Rahmen der Arbeit näher untersuchte Linien

7.4 Zählungen von *fs(1)K10* Insertionslinien mit starker Variegation

$P\{fs(1)K10^+w^+\}11$



$P\{fs(1)K10^+w^+\}45$

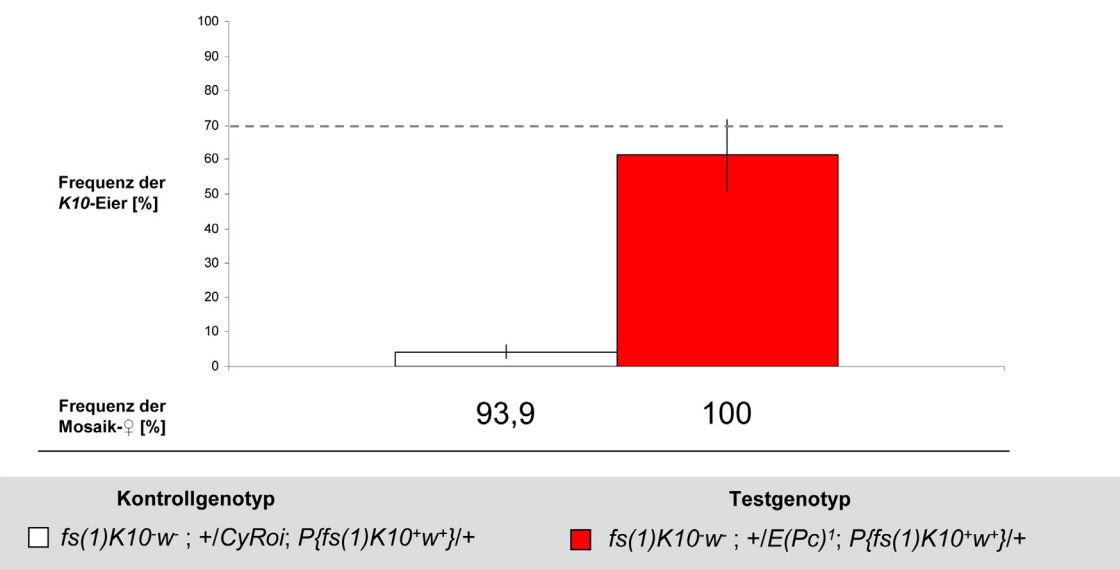


Abb.7.1. Analyse des Einflusses von $E(Pc)^1$ auf Gen- *Silencing* in der Keimbahn an den Insertionsorten der *fs(1)K10*- Transgene 11 und 45. Ergebnisse nach Einkreuzung der Mutationen (♂) in die Linien $P\{fs(1)K10^+w^+\}11$ bzw. 45. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1-Generation wurde über 10 Tage verfolgt. An beiden Insertionsstellen hat $E(Pc)$ einen starken Einfluss auf das Gen- *Silencing* im Keimbahngenom. Die Frequenz der Mosaik- Weibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der $P\{fs(1)K10^+w^+\}11$ bzw. 45 Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*- Eiern (Kontrolle).

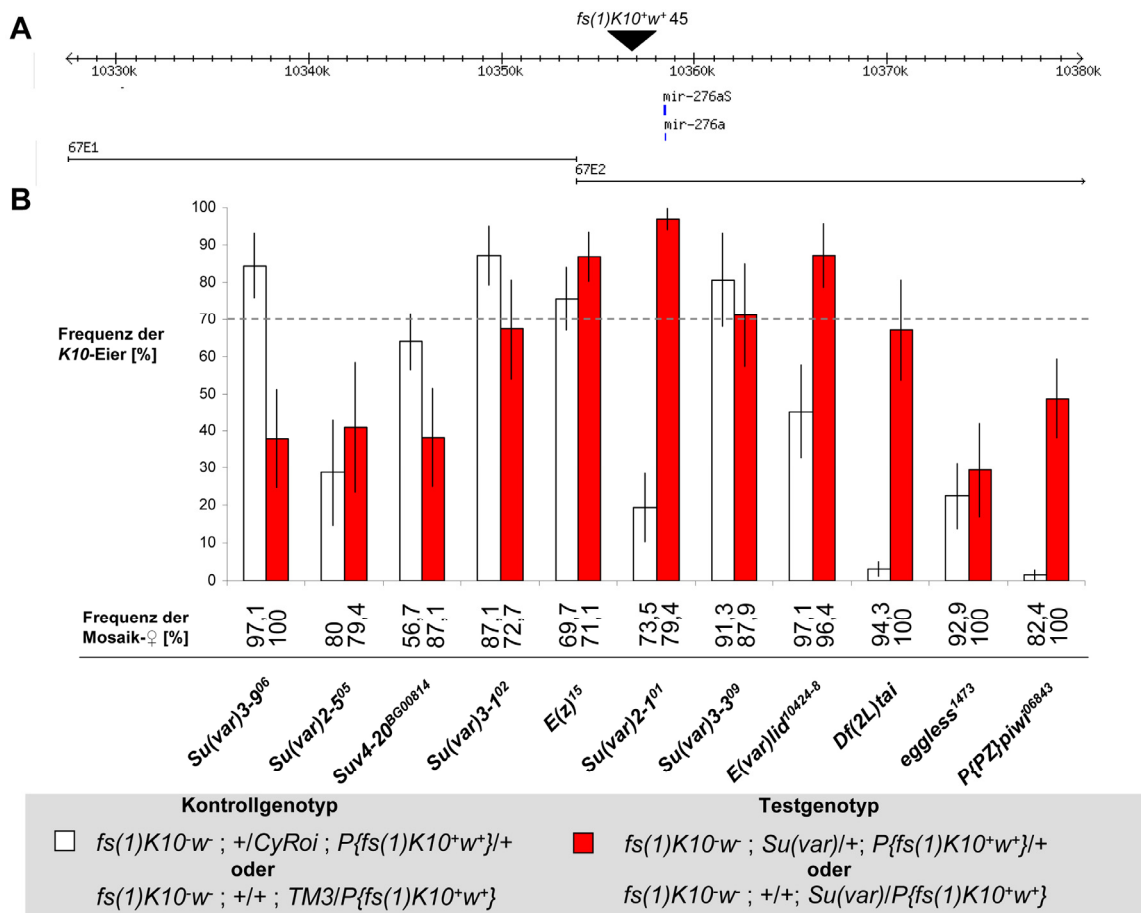
$P\{fs(1)K10^+w^+\}45$


Abb.7.2. Analyse des Gen- Silencings in der Keimbahn am Insertionsort des *fs(1)K10- Transgens 45*. Ergebnisse nach Einkreuzung der Mutationen (♂) in die Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}45$. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1- Generation wurde über 10 Tage verfolgt. **A.** Genomischer Insertionsort der Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}45$ in Region 67E2. **B.** An dieser Stelle im Keimbahngenom ist das Gen- Silencing von *Su(var)3-906*, *Su(var)2-505*, *Suv4-20^{BG00814}*, *Su(var)2-101*, *E(var)lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸*, *Df(2L)tai*, *eggless¹⁴⁷³* und *piwi* abhängig. Die Frequenz an Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der $P\{fs(1)K10^+w^+\}45$ Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10-* Eiern (Kontrolle).

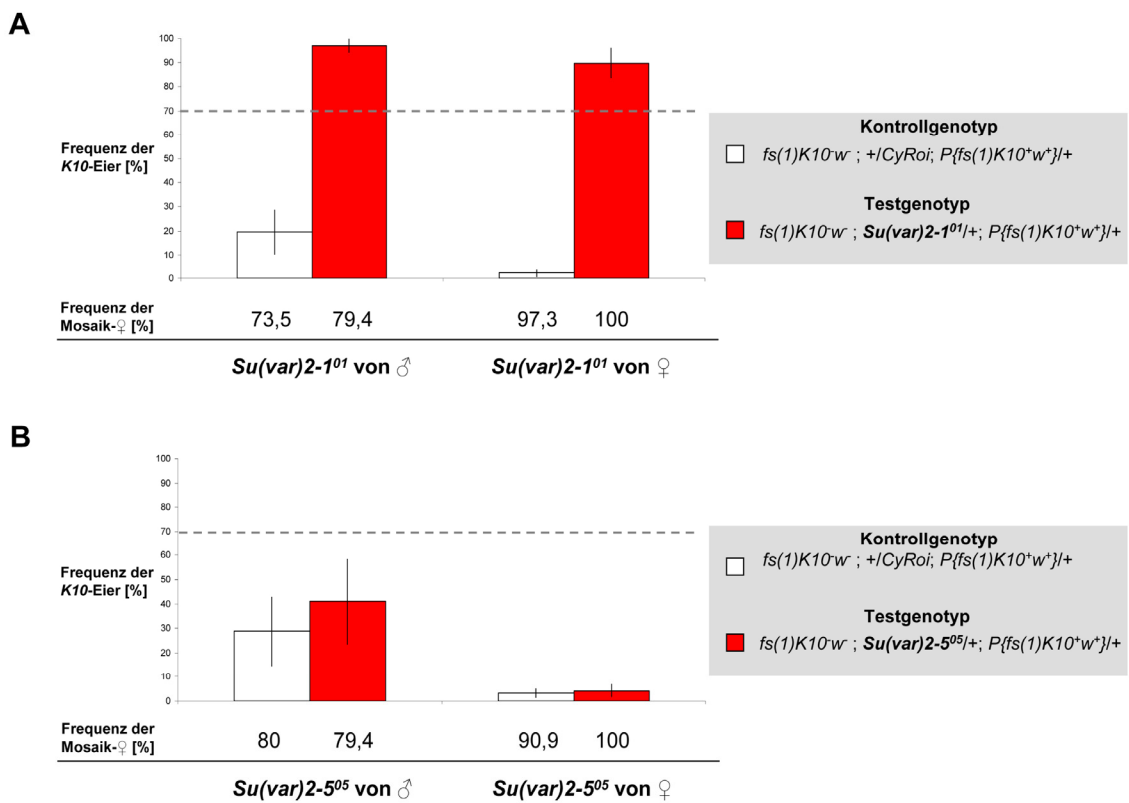
$$P\{fs(1)K10^+w^+\}45$$


Abb.7.3. Der alternative Modus von $Su(var)2-1^{01}$ und der parentale Modus von $Su(var)2-5^{05}$ am Insertionsort des $fs(1)K10$ - Transgens 45 sind unabhängig von der Herkunft der $Su(var)$ - Mutante. Ergebnisse nach Einkreuzung von $Su(var)2-1^{01}$ (A) und $Su(var)2-5^{05}$ (B) in die Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}45$. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1- Generation wurde über 10 Tage verfolgt. A. und B. Die Wirkungsmodi der Regulatoren sind unabhängig von der Herkunft der $Su(var)$ - Mutation, da reziproke Kreuzungen denselben Phänotyp zeigen. Die Frequenz an Mosaikweibchen ist unter den Diagrammen dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der $P\{fs(1)K10^+w^+\}45$ Kontrolllinie gemessene Frequenz von $K10$ - Eiern (Kontrolle).

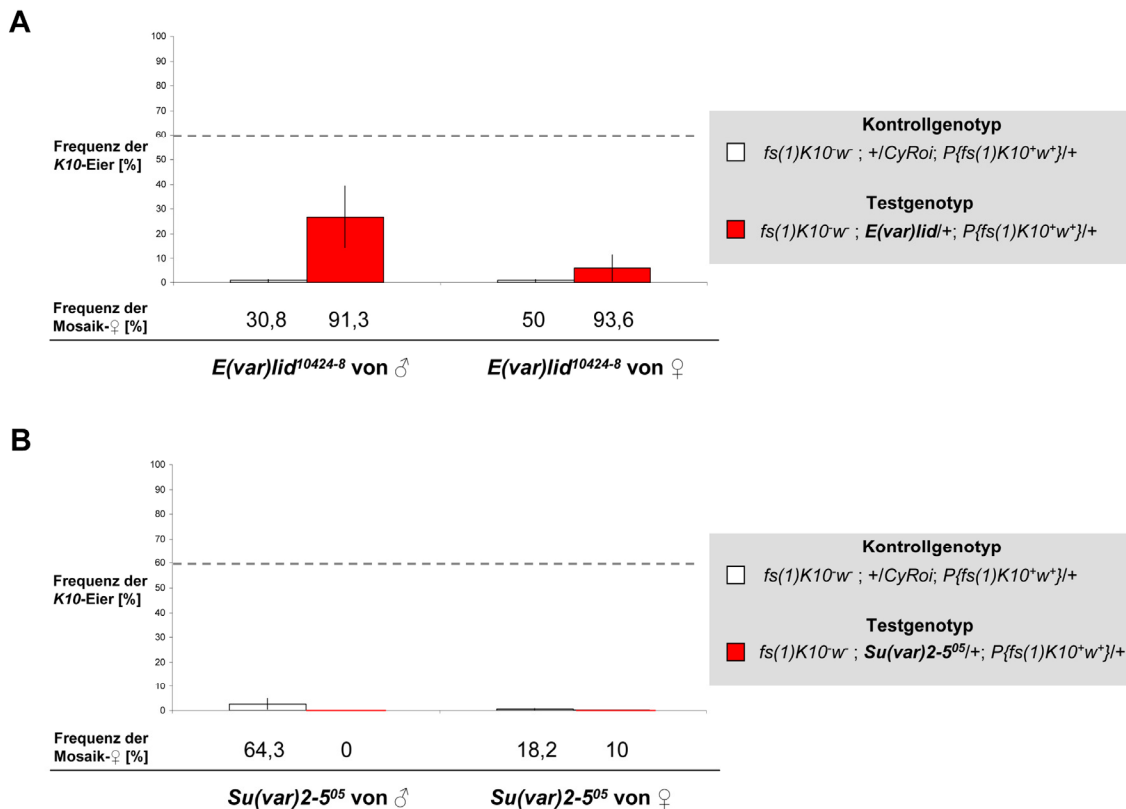
$$P\{fs(1)K10^+w^+\}46$$


Abb.7.4. Der parentale Modus von $Su(var)2-5^{05}$ und $E(var)lid^{10424-8}$ am Insertionsort des $fs(1)K10$ -Transgens 46 ist unabhängig von der Herkunft der Mutation. Ergebnisse nach Einkreuzung von $E(var)lid^{10424-8}$ (A) und $Su(var)2-5^{05}$ (B) in die Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}46$. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1- Generation wurde über 10 Tage verfolgt. A. und B. Reziproke Kreuzungen zeigen denselben supprimierten Phänotyp für Kontroll- und Testgenotyp bei $E(var)lid^{10424-8}$ und $Su(var)2-5^{05}$. Der Wirkungsmodus der Regulatoren ist im Keimbahngenom am Insertionsort der Linie 46 daher unabhängig von der Herkunft der Mutation. Die Frequenz an Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der $P\{fs(1)K10^+w^+\}46$ Kontrolllinie gemessene Frequenz von $K10$ - Eiern (Kontrolle).

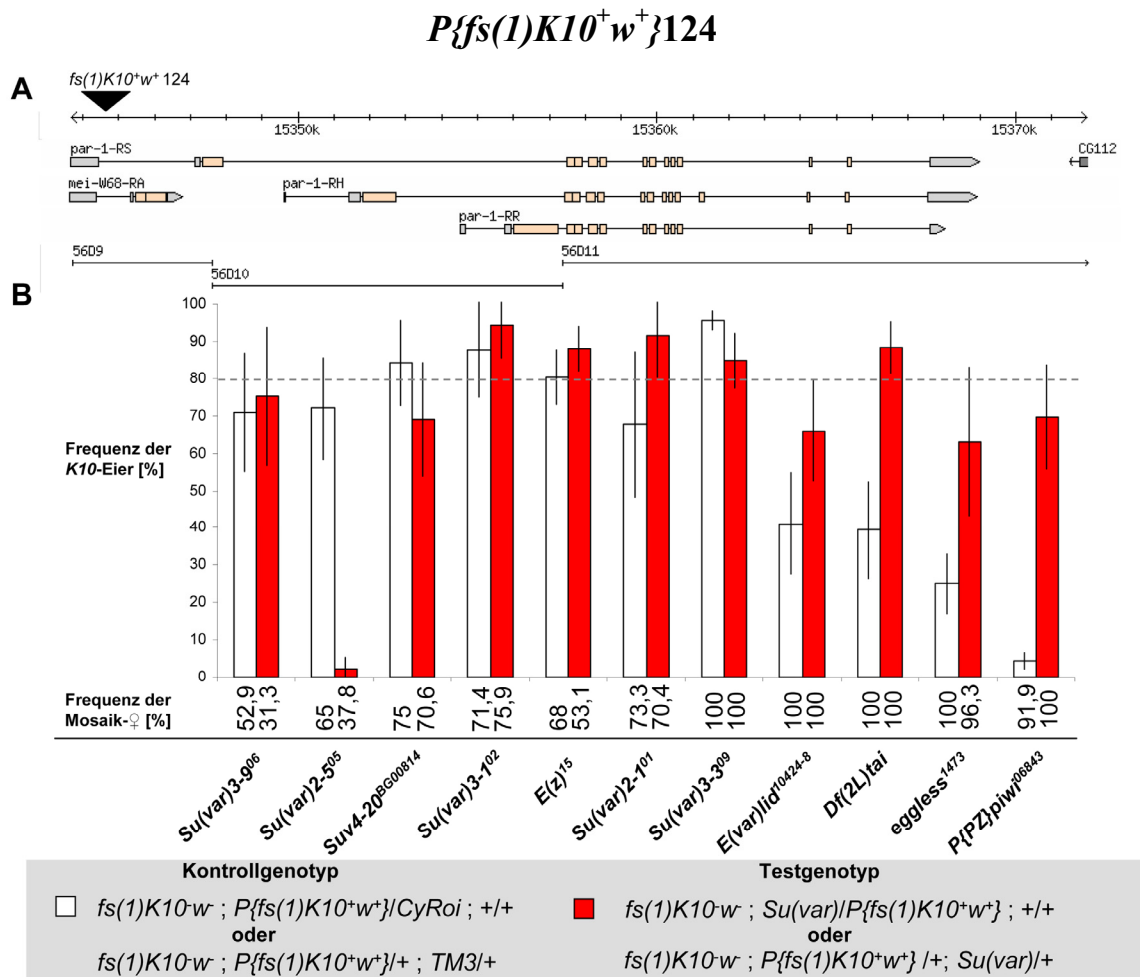


Abb. 7.5. Analyse der Bildung epigenetisch inaktiver Chromatinstrukturen in der Keimbahn am Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}124*. Ergebnisse nach Einkreuzung der Mutationen (♂) in die Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}124*. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1- Generation wurde über 10 Tage verfolgt. **A.** Genomischer Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}124* in Region 56D9. **B.** Am Insertionsort der Linie 124 sind nur *Su(var)2-5⁰⁵*, *E(var)lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸*, *Df(2L)tai*, *eggless¹⁴⁷³* und *piwi* am Gen-*Silencing* in der Keimbahn beteiligt. Die Frequenz an Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der *P{fs(1)K10⁺w⁺}124* Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*- Eiern (Kontrolle).

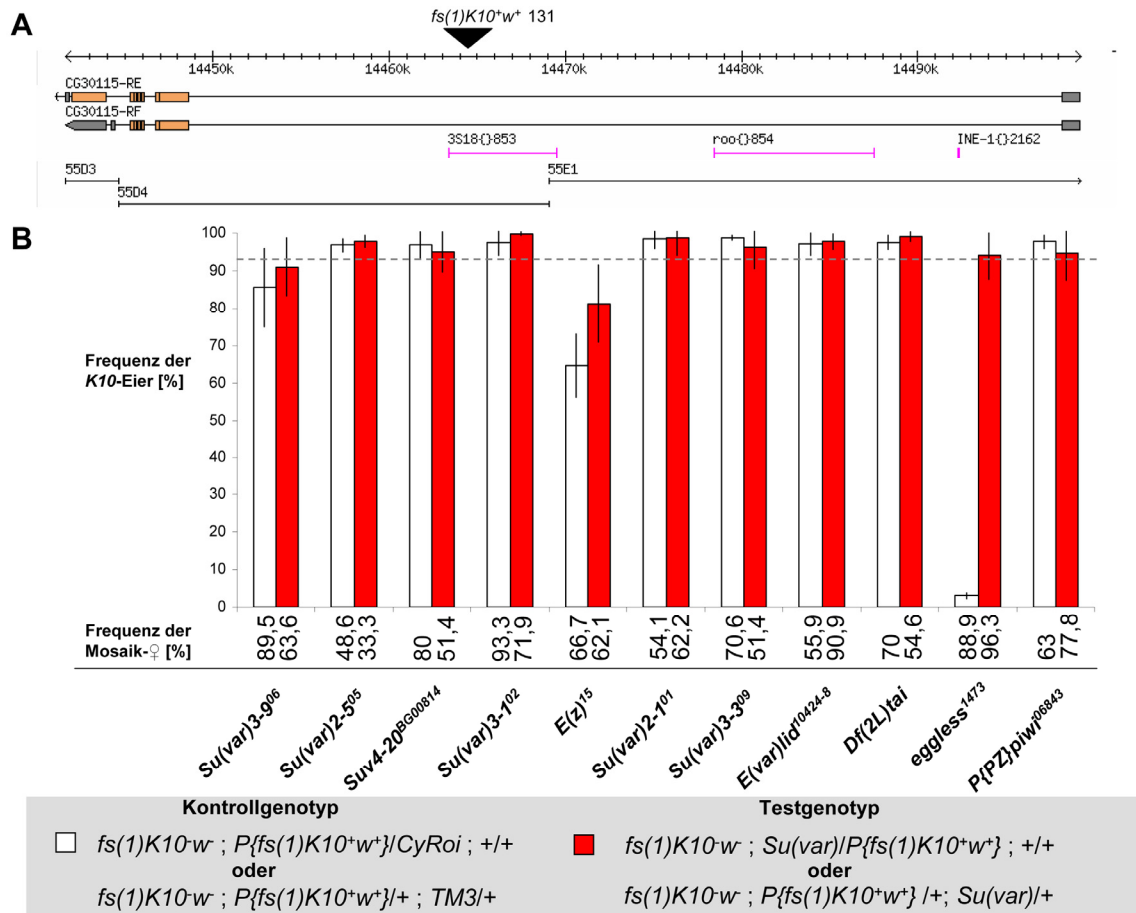
$P\{fs(1)K10^+w^+\}131$


Abb.7.6. Analyse im Soma bekannter Chromatinfaktoren in der Keimbahn mit Hilfe des *K10*-PEV am Insertionsort der Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}131$. Ergebnisse nach Einkreuzung der Mutationen (σ) in die Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}131$. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1- Generation wurde über 10 Tage verfolgt. **A.** Genomischer Insertionsort der Linie $P\{fs(1)K10^+w^+\}131$ in Region 55D4. **B.** Offensichtlich ist im Keimbahngenom nur *eggless*¹⁴⁷³ am Aufbau epigenetisch inaktiver Strukturen am Insertionsort der Linie 131 beteiligt. Die Frequenz an Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der $P\{fs(1)K10^+w^+\}131$ Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*- Eiern (Kontrolle).

P{fs(1)K10⁺w⁺}171

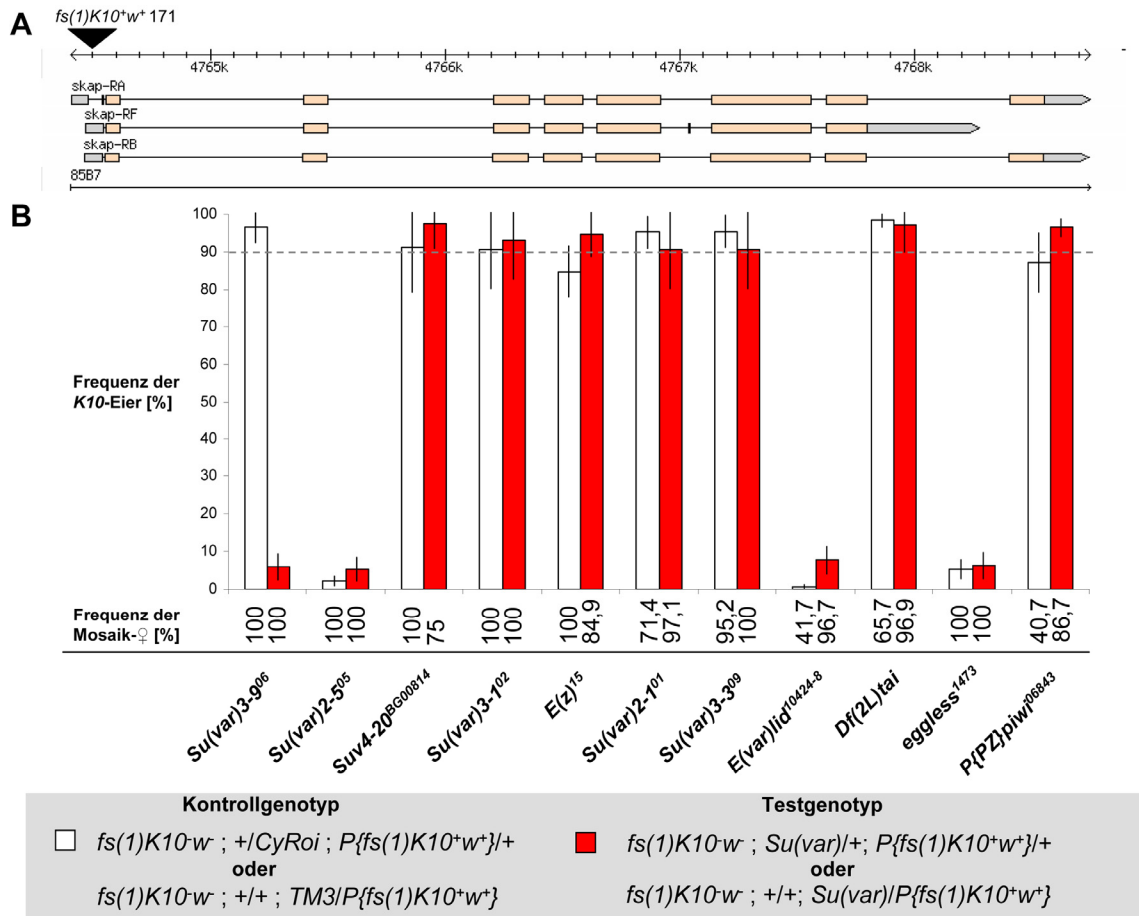


Abb. 7.7. Analyse des Gen-Silencings in der Keimbahn am Insertionsort des *fs(1)K10-* Transgens 171. Ergebnisse nach Einkreuzung der Mutationen (♂) in die Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}171*. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1- Generation wurde über 10 Tage verfolgt. **A.** Genomischer Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}171* in Region 85B7. **B.** An dieser Stelle im Keimbahngenom ist das Gen- Silencing von *Su(var)3-9⁰⁶*, *Su(var)2-5⁰⁵*, *E(var)lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸* und *eggless¹⁴⁷³* abhängig. Die Frequenz an Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der *P{fs(1)K10⁺w⁺}171* Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10-* Eiern (Kontrolle).

P{fs(1)K10⁺w⁺}174

Insertion in *modulo*, 100E3

A

Linie 174 mod (100E)

B

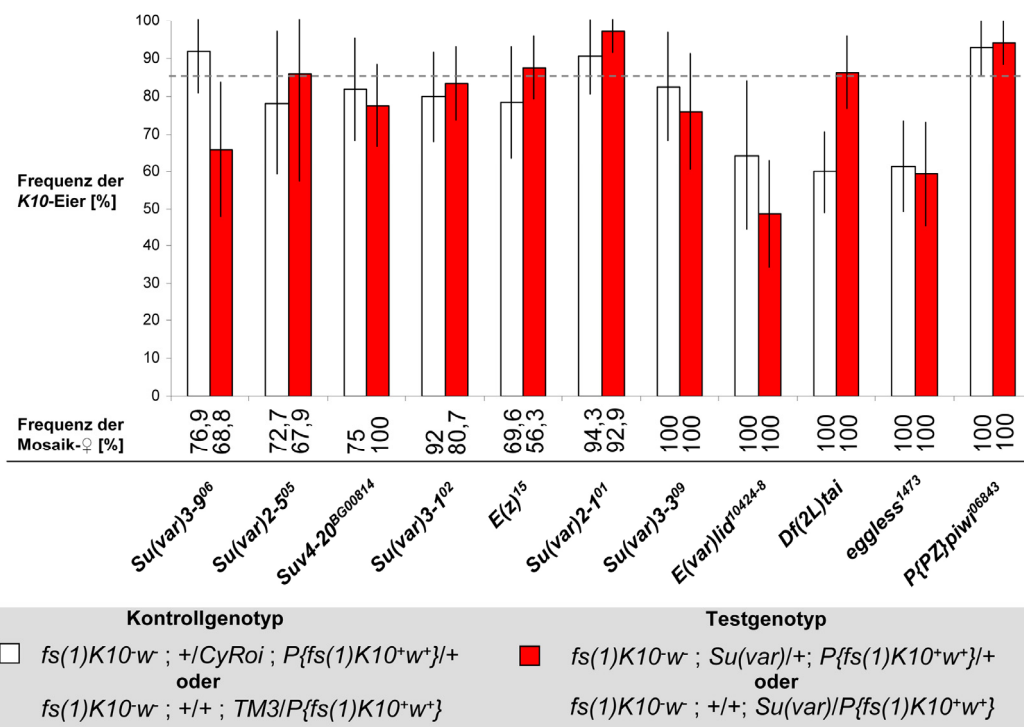


Abb.7.8. Analyse des Gen-*Silencings* in der Keimbahn mit Hilfe des *K10*- PEV am Insertionsort der Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}174*. Ergebnisse nach Einkreuzung der Mutationen (♂) in die Linie *P{fs(1)K10⁺w⁺}174*. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1- Generation wurde über 10 Tage verfolgt. **A.** Die Insertion des *fs(1)K10*- Transgens 174 erfolgte in das Gen *modulo* in Region 100E3. **B.** Von den getesteten Faktoren am Insertionsort der Linie 174 haben *E(var)lid¹⁰⁴²⁴⁻⁸*, *Df(2L)tai* und *eggless¹⁴⁷³* wahrscheinlich einen Einfluss auf das Gen-*Silencing* in der Keimbahn. Die Frequenz an Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der *P{fs(1)K10⁺w⁺}174* Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*- Eiern (Kontrolle).

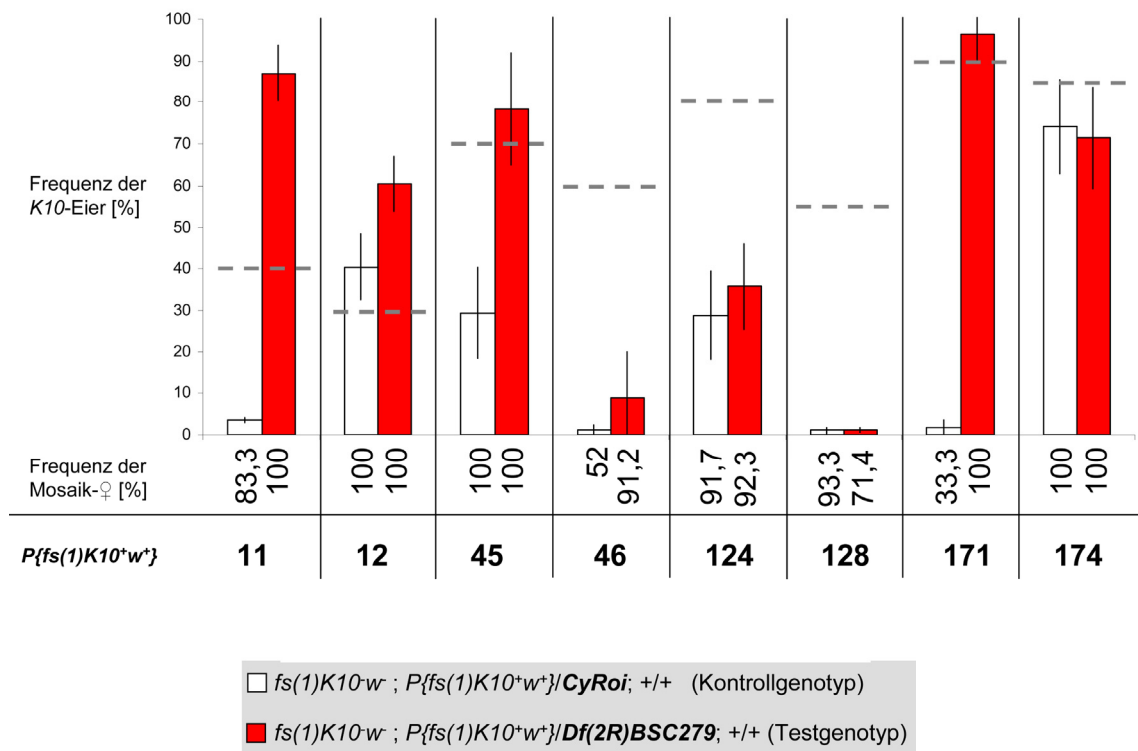
Df(2R)BSC279

Abb.7.9. Die Defizienz *Df(2R)BSC279* hat an verschiedenen *K10*- Insertionsorten Einfluss auf Gen-Silencing in der Keimbahn. Ergebnisse nach Einkreuzung der Defizienz (β) in die Linien $P\{fs(1)K10^+w^+\}$ 11, 12, 45, 46, 124, 128, 171 und 174. Die Eiablage von 38 Kontroll- und Testweibchen der F1- Generation wurde über 10 Tage verfolgt. Im *K10*- PEV zeigt die Defizienz *Df(2R)BSC279* einen *E(var)*- Effekt an den Insertionsorten der *K10*- Linien 11 und 12. In der genomischen Region der *K10*- Linien 46, 124 und 128 tritt ein *Su(var)*- Effekt auf. Eine Supprimierung des Kontrollgenotyps, der die Defizienz nicht trägt, ist in den *K10*- Linien 11, 45, 46, 124, 128 und 171 nachweisbar. Die Frequenz an Mosaikweibchen ist unter dem Diagramm dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert die in der $P\{fs(1)K10^+w^+\}$ 11, 12, 45, 46, 124, 128, 171 bzw. 174 Kontrolllinie gemessene Frequenz von *K10*- Eiern (Kontrolle).

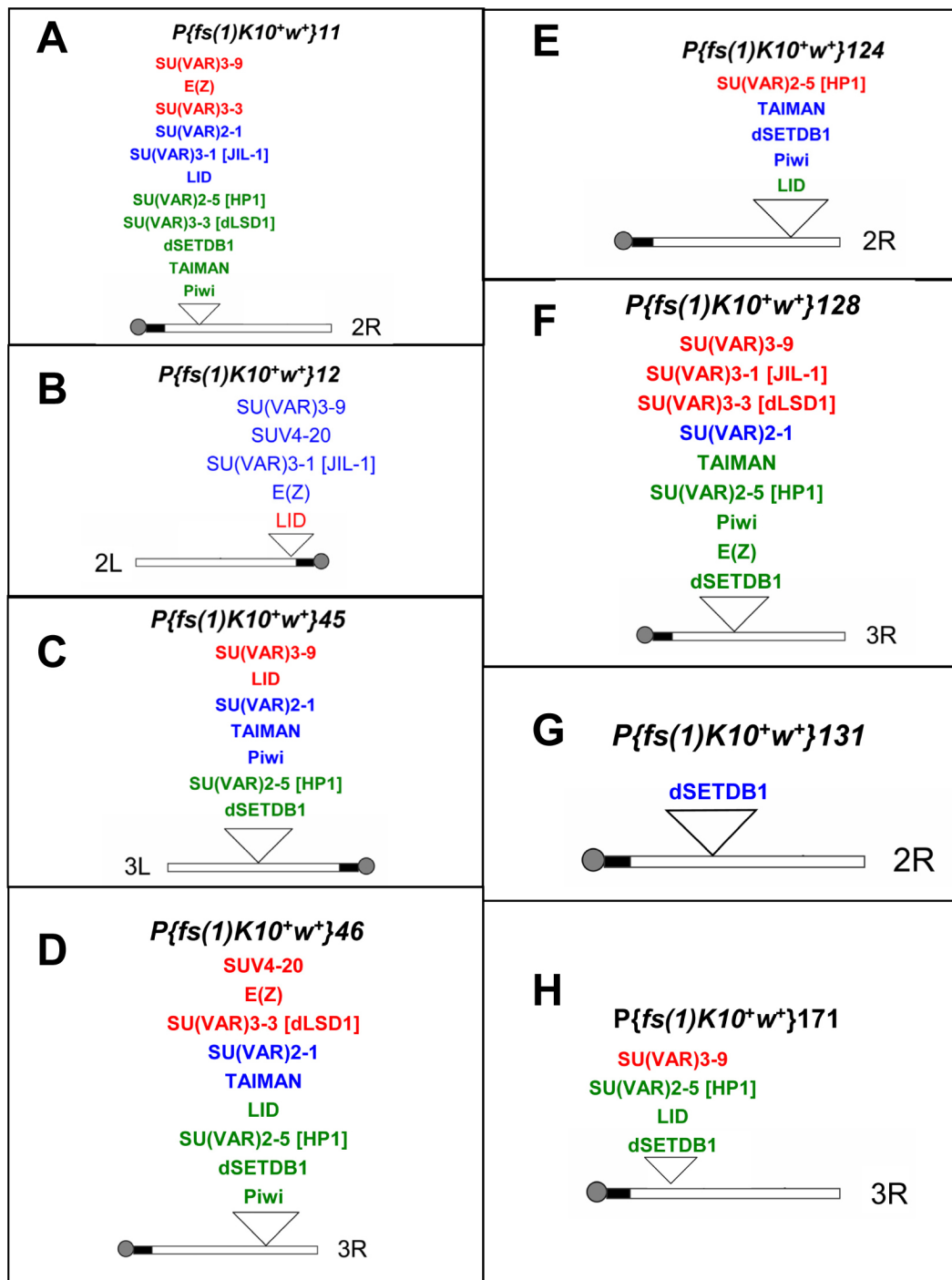


Abb.7.10. Verschiedene Wege der Heterochromatisierung in der Keimbahn. In Abhängigkeit des Insertionsortes der *K10*- Transgene zeigen sich verschiedene Wege der Bildung von inaktiven Chromatinzuständen. Für jede Linie gibt es einen individuellen Weg. In den *K10*- Linien 82 und 174 zeigte keiner der getesteten Modifikatoren einen starken Effekt. Sie sind daher hier nicht aufgeführt. (rote Schrift – regulärer Modus; blaue Schrift – alternativer Modus; grüne Schrift – parentaler Modus)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. Reuter für die Überlassung dieses interessanten und fesselnden Themas, seine tatkräftige Unterstützung bei allen genetischen Arbeiten, seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie für die zahlreichen Ideen und Vorschläge, die an vielen Stellen weitergeholfen haben. Überaus dankbar bin ich, dass er zusammen mit V. Pirrotta und J. Szabad die Idee eines Keimbahn- spezifischen PEV- Systems verwirklichte.

Bei J. Szabad möchte ich mich für die zahlreichen Diskussionen und vielen hilfreichen Tipps beim Umgang mit dem K10- System und der weiblichen Keimbahn von Drosophila bedanken.

Ein großer Dank gilt Jessica Wacker, Janina Bär und Falk Pohl, die mich mit ihren Diplom- bzw. Bachelorarbeiten in meiner Arbeit sehr unterstützt haben.

Bei Kristina Irmeler und Dr. Sandro Lein möchte ich mich für die stetige Hilfe und die nützlichen Tipps bei den ChIP- Analysen bedanken.

Einen großen Anteil am Gelingen der FISH- Analysen hat Olaf Nickel, dem ich dafür danken möchte.

Besonders möchte ich mich bei Gerd Hause und seinen Technischen Assistentinnen für zahlreiche Einbettungen, Dünnschnitte und die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Analysen bedanken.

Eric Wieschaus, Allen Shearn, Stephen Henikoff, Tulle Hazelrigg, Jörg Großhans, Renato Paro, Kristen Johansen und dem TRiP Consortium danke ich für die Überlassung von Fliegenstämmen bzw. Antikörpern.

Nicht unerwähnt bleiben sollen Manu und Christiane, mit denen ich nicht nur fachlich diskutieren, sondern einfach auch mal die Seele baumeln lassen konnte. Das tat unheimlich gut.

Bei der gesamten AG Entwicklungsgenetik, besonders Dr. Sandro Lein, Claudia Nickel, Olaf Nickel, Kristina Irmeler, Kathleen Gebhardt, Andrea Eichhorn, Wiebke Kummer und Matthias Walther möchte ich mich für die schöne und angenehme Arbeitsatmosphäre, Anregungen, Tipps und Tricks und die vielen leckeren Kuchen und Eis bedanken.

Allen Freunden und den Basketballmädels danke ich für all die schönen Ablenkungen und die Unterstützung in stressigen Zeiten.

Der größte Dank gilt meiner Mutti, meiner allerbesten Freundin Anja und meinem Freund Harald, die mich in allen Belangen fortwährend unterstützt haben, mir uneingeschränkten Rückhalt gegeben haben und mich getröstet haben, wenn es nötig war. Dafür liebe ich Euch.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit „**Das unbekannte Chromatin?- Analysen zur epigenetischen Regulation in Keimbahnzellen von *Drosophila melanogaster***“ selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die den genutzten Werken wörtlich bzw. inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde von mir an keiner anderen wissenschaftlichen Institution vorgelegt.

Halle/Saale, 25.06.2012

Sandy Mietzsch

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sandy Mietzsch
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 04.10.1978

Werdegang

1985 - 1993 Gesamtschule Muldenstein
1993 - 1997 Gymnasium Bitterfeld, Abitur 1997
1997 - 2000 Aushilfstätigkeit bei Allkauf GmbH und Praktiker Baumarkt, Bitterfeld
1998 - 2003 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg
2003 - 2004 Diplomarbeit: „Versuche zur GFP-Expression in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*“ am Institut für Pflanzenphysiologie der Martin-Luther- Universität Halle- Wittenberg
2004 - 2012 Promotionsstudium am Institut für Genetik (Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik) der Martin-Luther- Universität Halle- Wittenberg