

***Struktur-Funktionsanalyse der Polycomb Gruppen  
Proteine Psc, Su(z)2 aus Drosophila  
und Bmi-1 aus Maus***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)  
Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Dipl.-Ing. Hussein Baaj**

Berlin 2014

1.Gutachter: Prof. Dr. Stephan Sigrist

2.Gutachter: Prof. Dr. Ansgar Klebes

Disputation am : 13.03.2015

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Funktion der PcG und TrxG Gene in der <i>Drosophila</i> Entwicklung.....	7
1.2	TrxG- und PcG Multiproteinkomplexe in <i>Drosophila</i> .....	8
1.2.1	Polycomb repressiv complex 1 (PRC1) .....	9
1.2.2	Polycomb repressiv complex 2 (PRC2) .....	11
1.2.3	<i>Drosophila</i> Ring Associated Factor Komplex (dRAF) .....	12
1.2.4	Der Polycomb Repressive Deubiquitinase Komplex (PR-DUB).....	12
1.2.5	Pho Repressiv Complex (Pho-RC) .....	13
1.3	Die <i>cis</i> -regulatorischen <i>Polycomb Response Elements</i> (PREs) rekrutieren PcG Proteine und kontrollieren die Expression der Zielgene.....	13
1.4	Polycomb Gruppen Proteine reprimieren Zielgene durch Modifikationen des Chromatin.....	15
1.5	Posterior Sex Combs und Suppressor of zeste 2 sind essentielle PcG Faktoren, die teilweise redundant wirken.....	16
1.6	Die Vertebraten Orthologe <i>Bmi-1</i> und <i>Mel-18</i> wirken bei der Tumorgenese und Aufrechterhaltung von Stammzellpopulationen.....	18
1.7	Die HR von Psc und Su(z)2 bindet an Chromatin und die CTRs vermitteln nicht-kovalente Chromatinmodifikationen <i>in vitro</i> .....	20
1.8	Mögliche Grundlagen der CTR Funktion .....	22
1.9	Ziele dieser Arbeit.....	24
2	Material und Methoden .....	25
2.1	Genetische Methoden.....	25
2.1.1	Aufzucht und Haltung der Fliegen.....	25
2.1.2	Fliegenstämme .....	25
2.1.3	Ektopische Überexpression mittels des GAL4/UAS-System.....	26
2.1.4	Die Nagellack-Abdruck Technik.....	27
2.1.5	Herstellung transgener <i>Drosophila</i> -Linien.....	27
2.1.6	Lokalisation des P-Elements auf den polytären Chromosomen via Balancer-Kreuzungen	28
2.1.7	Herstellung von Quetschpräparaten für Immunfärbung von Polytänchromosomen.....	28
2.1.8	Erzeugung von Zellklonen mittels Flippase-vermittelter mitotischer Rekombination .....	29
2.1.9	Nachweis der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in <i>Drosophila</i> -Imaginalscheiben.....	30
2.2	Molekularbiologische Methoden .....	30

2.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden.....	30
2.2.2	Klonierung einer Psc cDNA.....	31
2.2.3	Sequenzspezifische Mutagenese.....	31
2.2.4	Verwendete Plasmide und Oligonukleotide.....	31
2.2.5	Verwendete Bakterienstämme.....	33
2.2.6	Geräte.....	33
2.3	Arbeiten mit Proteinen.....	34
2.3.1	Western Blot Analyse an Histonmodifikationen in Abhängigkeit von Su(z)2, Psc und Bmi-1.....	34
2.3.2	SDS-PAGE.....	34
2.3.3	Western Blot.....	35
2.4	Histochemische Methoden.....	37
2.4.1	Fixierung und Immunofärbungen von Imaginalscheiben.....	37
2.4.2	Feinpräparation der Imaginalscheiben und Fluoreszenzmikroskopie.....	37
2.4.3	Präparation adulter Flügel.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Komplementationsanalyse und phänotypische Analyse der beiden PcG Gene <i>Psc</i> und <i>Su(z)2</i> .....	39
3.1.1	Genetische Charakterisierung rekombinanter Su(z)2 und Psc Stämme.....	39
3.1.2	<i>Psc</i> und <i>Su(z)2</i> sind essentielle Gene.....	40
3.1.3	Phänotypische Effekte von <i>Su(z)2/Psc</i> einzel- und doppelmutanten Zellklonen in der Imaginalscheibenentwicklung.....	41
3.1.4	Effekte des <i>Psc</i> -Funktionsverlusts in einzelmutanten Zellklonen.....	42
3.1.5	Effekte des <i>Su(z)2</i> -Funktionsverlusts in einzelmutanten Zellklonen.....	44
3.1.6	Sowohl <i>Su(z)2</i> als auch <i>Psc</i> sind für die Flügelentwicklung wichtig.....	48
3.1.7	Effekte des <i>Psc</i> - und <i>Su(z)2</i> -Funktionsverlusts in doppelmutanten Zellklonen.....	48
3.1.8	Auswirkungen der <i>Su(z)2</i> - und <i>Psc</i> -RNA-Interferenz.....	51
3.2	Herstellung transgener Stämme zur Expression von <i>Su(z)2</i> , <i>Psc</i> und <i>Bmi-1</i> .....	56
3.2.1	Klonierung verschiedener <i>Su(z)2</i> -, <i>Psc</i> - und <i>Bmi-1</i> -Konstrukte und Herstellung transgener Linien.....	56
3.2.2	Vergleich der Expressionsstärken ausgewählter transgener <i>Su(z)2</i> - und <i>Psc</i> -Linien.....	58
3.3	Chromatinlokalisierung von <i>Su(z)2</i> und <i>Psc</i> .....	61
3.3.1	Lokalisation der Fusionsproteine.....	61
3.3.2	Chromatinbindung der <i>Su(z)2</i> -Fusionsproteine.....	65
3.3.3	Chromatinbindung der <i>Psc</i> -Fusionsproteine.....	69

3.3.4	Vergleich der Chromatinlokalisierung der Su(z)2-Myc und Psc-Myc transgenen Fusionsproteine.....	72
3.4	Funktionelle Untersuchung der Konstrukte durch Überexpression .....	73
3.4.1	Die Überexpression von <i>Su(z)2</i> erzeugt dominante Effekte .....	74
3.4.2	Genetische Interaktionen bestätigen die PcG Funktion von <i>Su(z)2</i> und zeigen die dominant-negative Wirkung von Su(z)2-N1.....	79
3.4.3	Die simultane <i>Su(z)2</i> und <i>Psc</i> Überexpression in der Augenentwicklung wirkt nicht additiv.....	80
3.4.4	<i>Su(z)2</i> Überexpression in der Flügelentwicklung .....	81
3.4.5	Die Effekte der Überexpression von <i>Psc</i> ähneln der von <i>Su(z)2</i> .....	86
3.4.6	<i>Psc</i> Überexpression erzeugt dominante Effekte .....	86
3.4.7	Zusammenfassung – Vergleich der Su(z)2- und Psc-Überexpression unter Berücksichtigung der Chromatinlokalisierung.....	90
3.5	Vergleich der Fliegenproteine Su(z)2 und Psc mit dem Säugerprotein Bmi-1 .....	92
3.5.1	Chromatinlokalisierung der drei Bmi-1 Fusionsproteine .....	92
3.5.2	Effekt der Bmi-1 Überexpression auf die Embryonalentwicklung .....	94
3.5.3	Expression der Bmi-1 Konstrukte in der Augenentwicklung.....	94
3.5.4	Bmi-1 Wirkung auf die Musterbildung in Flügelimagnalscheiben.....	95
3.5.5	Auswirkung der Bmi-1 Expression auf die Flügelentwicklung.....	97
3.6	Zusammenfassung - Vergleich der Funktion der <i>Drosophila</i> Proteine Su(z)2 und Psc mit dem Vertebraten Bmi-1.....	98
4	Diskussion.....	100
4.1	Bewertung der Su(z)2 Funktionsverlust mutanten Phänotypen.....	100
4.1.1	Su(z)2 und Psc unterliegen der PcG Kreuzregulation.....	101
4.1.2	Der Su(z)2 Funktionsverlust zeigt auch in der Imaginalentwicklung Defekte .....	102
4.1.3	<i>Su(z)2</i> mutante Zellklone ähneln der Fehlexpression von <i>engrailed</i> .....	103
4.1.4	Der <i>Su(z)2</i> Funktionsverlust verursacht Entwicklungsverzögerung .....	104
4.1.5	Beitrag des JAK/STAT-Signalwegs zum Überproliferationsphänotyp.....	105
4.1.6	<i>Psc</i> zeigt auch Transkriptions-unabhängige Funktion .....	106
4.1.7	Kritische Bewertung der RNAi Experimente.....	106
4.2	Befunde der Chromatinbindung und funktionellen Untersuchung Charakterisierung funktioneller Proteinbereiche. ....	107
4.2.1	Dominant wirkende transgene Proteine mit expansiver Chromatinbindung .....	107
4.2.2	Schwach wirkende Fusionsproteine ohne deutlicher Chromatinbindung .....	111
4.2.3	Dominant-negativ wirkende Fusionsproteine mit diskreter Chromatinbindung.....	113

4.3	Vergleich der Fliegen und Vertebraten Proteine .....	115
4.3.1	Maus Bmi-1-FL wird an Psc-Bindestellen rekrutiert und zeigt schwache Wirkung.....	116
4.3.2	Maus Bmi-1-N wirkt dominant-negativ mit einigen Unterschieden zu Su(z)2-N1 und Psc-N1.....	117
4.3.3	Unterschiede der Chromatinbindung der Bmi-1-HR zu den Fliegenproteinen.....	117
4.3.4	Funktion der Bmi-1-CTR .....	118
4.3.5	Der RING-Finger ist für die Funktion von Bmi-1 bedeutend .....	118
4.3.6	Die Ursachen der Überproliferationsphänotypen von <i>Bmi-1</i> und <i>Su(z)2/Psc</i> sind unterschiedlich .....	120
4.3.7	<i>Mel-18</i> wirkt als Tumorsuppressor.....	121
4.4	Potential der neuen Erkenntnisse und Reagentien für weiterführende Analysen .....	121
4.4.1	Genetische Interaktionsstudien zur Analysen der Funktionalität .....	122
4.4.2	Entschlüsselung molekularer Mechanismen.....	122
4.4.3	Evolutionäre Unterschiede.....	123
4.4.4	Kompositione der Multiproteinkomplexe .....	123
4.4.5	Identifizierung relevanter Zielgene .....	124
5	Zusammenfassung.....	125
	<u>Summary</u> .....	127
6	Literaturverzeichnisse .....	129
	Anhang .....	139
1.	Transgene Fliegen.....	139
2.	vgBE-GAL4-, und C765-Gal4-Expressionsmuster.....	140
3.	Adulte Flügelphänotype und C765-Gal4-Überexpression der Su(z)2-Konstrukte .....	141
4.	Adulte Flügelphänotype und C765-Gal4-Überexpression der Psc-Konstrukte .....	142
5.	Adulte Flügelphänotype und C765-Gal4-Überexpression der Bmi-1-Konstrukte .....	143
6.	Vergleich meiner klonierten Psc-cDNA mit publizierten Sequenzen (NCBI) .....	143
7.	Proteinsequenzen von Su(z)2, Psc, und Bmi-1 .....	145
7.1.	Su(z)2-FL (Flybase).....	145
7.2.	Psc-FL (Flybase).....	145
7.3.	Bmi1-FL (Genatlas) .....	146
8.	Su(z)2- und Psc-Kernlokalisierungssignal .....	147
8.1.	Su(z)2-Kernlokalisierungssignal .....	147
8.2.	Psc-Kernlokalisierungssignal.....	148
9.	Vektoren .....	149

9.1.	Su(z) <sup>2</sup> -Vektorkarten .....	149
9.2.	Psc- Vektorkarten .....	150
9.3.	Bmi-1- Vektorkarten .....	151
9.4.	pGEM-T-Easy-Vektorkarte .....	151
9.5.	pUAST-Vektorkarte.....	152
10.	Abkürzungsverzeichnis .....	153

# 1 Einleitung

Im Verlauf der Entwicklung vielzelliger Organismen werden Zellen aufgrund differentieller Genexpression progressiv unterschiedlich. Ausgangspunkt ist in den meisten tierischen Metazoa eine omnipotente Zygote. Durch verschiedene Mechanismen, wie z.B. die Wirkung von Signalen und Transkriptionsfaktoren, Hormonen oder Umwelteinflüssen kann die Expression von Entwicklungsgenen in verschiedenen Zellen unterschiedlich reguliert werden. In vielen Organismen etablieren einige Zellen durch die Wirkung epigenetischer Mechanismen ein zelluläres Gedächtnis. Hierbei wird der Expressionszustand relevanter Entwicklungsgene, der durch o.g. Mechanismen initiiert wurde, in diesen Zellen auch durch Replikation und Zellteilung hindurch stabil an deren Tochterzellen weitergegeben. Ein Beispiel hierfür bilden somatische Stammzellen in Säugern oder imaginale Zellen in *Drosophila*. Für einige dieser Zellen konnte experimentell durch Explantationsexperimente ihre Entwicklungsplastizität und die Festlegung auf ein bestimmtes Entwicklungsschicksal nachgewiesen werden (Hadorn et al., 1968). Die molekulare Basis dieses zellulären Gedächtnis bilden epigenetische Regulatoren, die die genomische Region ihrer jeweiligen Zielgene binden und die entsprechenden Chromatinregionen biochemisch modifizieren. Hierbei kann entweder die DNA oder Chromatinproteine, wie z.B. die Histone, modifiziert werden. In *Drosophila* spielt die DNA-Methylierung als epigenetischer Mechanismus keine bedeutende Rolle (Lyko et al., 2004). Vielmehr sind hier mit genetischen Methoden zwei Gruppen von Genen als relevante epigenetische Regulatoren charakterisiert worden, die Polycomb-Gruppen (PcG) und die Trithorax-Gruppen (TrxG) Gene, deren evolutionär konservierte Sequenzen auch in einer Vielzahl mehrzelliger Organismen, einschließlich den Säugern, gefunden wurden (Übersichtsartikel: Francis und Kingston, 2001; Ringrose und Paro, 2004; Müller und Verrijzer, 2009). Etliche Enzyme der PcG und TrxG vermitteln verschiedene Modifikationen der Histonproteine, wie z.B. Acetylierung, Mono-, Di oder Trimethylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, etc. Bestimmte Kombinationen dieser Modifikationen korrelieren mit aktiven oder reprimierten Expressionszuständen, woraus sich die Hypothese eines "Histon-Codes" ableitet (als Übersichtsartikel: Jenuwein und Allis, 2001). Dieses Modell schreibt bestimmten



Kombinationen von Histonmodifikationen einen Informationsgehalt zu, der u.a. den epigenetischen Expressionsstatus bestimmt.

## 1.1 Funktion der PcG und TrxG Gene in der *Drosophila* Entwicklung

Ein wichtiger Aspekt der frühen Entwicklung von *Drosophila* stellt die Unterteilung des Keimstreifs in Segmente dar. Hierbei wird den drei ursprünglichen Kopfsegmenten, drei Thorakalsegmenten und acht abdominalen Segmenten durch die Expression einer bestimmten Kombination homöotischer (Hox) Gene des Antennapedia-Komplexes (ANT-C) und Bithorax-Komplexes (BX-C) eine spezifische Identität zugeordnet (Chan und Gehring, 1971; Lewis, 1978; Kaufman et al, 1980; Duncan 1998). Für die Ausprägung segmentspezifischer Strukturen ist es essentiell, dass die Expressionsdomänen der Hox Gene während der gesamten Entwicklung stabil aufrechterhalten bleiben (St. Johnston und Nüsslein-Volhard, 1989; Pankratz und Jäckle, 1990). Nach dem Blastoderm-Stadium, in dem die Expressionsdomänen der Hox Gene durch die Aktivität von Lücken- (*gap*-) und Paarregelgenen (*pair-rule*-) etabliert werden, übernehmen PcG und TrxG Faktoren die Aufrechterhaltung der segmentspezifischen Expression bis in die adulte Fliege (Übersicht in Francis und Kingston, 2001; Grimm et al., 2009; Ringrose und Paro, 2004; Müller und Verrijzer, 2009). Hierbei wirken PcG Faktoren als epigenetische Repressoren beim dauerhaften „Stummschalten“, während TrxG Proteine genetisch als Antagonisten der PcG wirken und somit den dauerhaften Aktivitätszustand ihrer Zielgene befördern (Lewis, 1947). Insgesamt tragen diese beiden Gruppen somit zum „zelluläre Gedächtnis“ bei. Entsprechend dieser Funktion bei der Regulation der homöotischen Gene wurden die strukturell nicht verwandten PcG Gruppen Gene genetisch definiert als Gene, deren mutante Allele homöotische Transformationen zeigen, ohne jedoch die Gensequenz der homöotischen Gene selbst zu betreffen (Lewis, 1978). Diese mutanten Phänotypen erklären sich aus der Fehlregulation der homöotischen Gene bei Verlust der PcG-vermittelten epigenetischen Repression. Bislang wurden in *Drosophila* ca. 17 PcG Gene und sechs PcG Multiproteinkomplexe identifiziert (Tab.1.1).

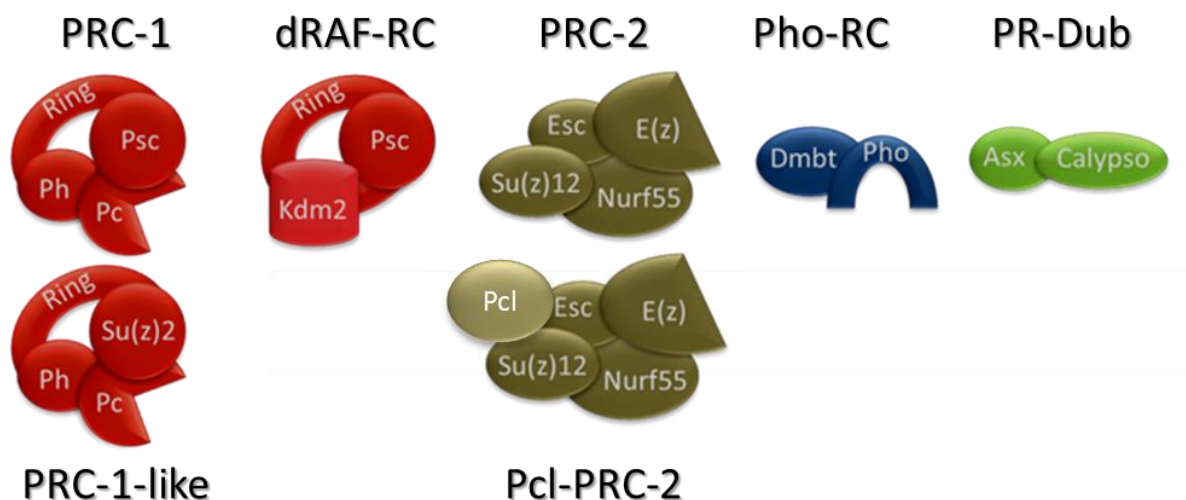
Genetische und molekulare Analysen und insbesondere jüngere genomische Arbeiten zeigen, dass PcG und TrxG Faktoren nicht nur die Gene der beiden Hox-Cluster regulieren, sondern darüber hinaus hunderte, wenn nicht gar tausende andere Zielgene kontrollieren. Zu diesen

Zielgenen zählen eine Großzahl von Entwicklungsgenen, also Transkriptionsfaktoren, Komponenten von Signaltransduktionskaskaden, etc. in *Drosophila* und anderen Systemen wie z.B. humanen Stammzellen, die selber die differentielle Genexpression während der Entwicklung regulieren (Übersicht in Schwartz und Pirrotta 2006; Ringrose und Paro, 2004 und 2007; Pietersen und van Lohuizen, 2008).

## 1.2 TrxG- und PcG Multiproteinkomplexe in *Drosophila*

Sowohl PcG-, als auch TrxG-Proteine wirken als Multiproteinkomplexe. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der PcG, weshalb an dieser Stelle TrxG-Komplexe nur kurz beschrieben werden. Entsprechend der genetischen Definition als PcG Antagonisten vermitteln TrxG Proteine und Komplexe verschiedene biochemische Aktivitäten, die zur aktiven Transkription beitragen. Bislang wurden in *Drosophila* vier strukturell und funktionell diverse TrxG-Komplexe mit biochemischen Methoden nachgewiesen, deren Komponenten sich in zwei Kategorien einteilen lassen: Histon-Modifikationen und *Chromatin Remodeling*. Dementsprechend finden sich zwei *Chromatin Remodeling* Komplexe: SWI/SNF- (auch Brahma- (BRM) Komplex), und der NURF-Komplex (Nucleosome Remodeling Factor-Komplex), die jeweils unter ATP Hydrolyse die Chromatinstruktur auflockern können. Die beiden anderen TrxG Komplexe, Trithorax Acetylation Complex 1 (TAC1) und der Absent, Small or Homeotic Discs-1- (ASH1) Komplex, enthalten jeweils ein SET-Domänen Protein (Trx oder Ash1), das die als aktivierende epigenetische Markierung geltende Histon H3, Lysin 4-Trimethylierung (H3K4me3) vermittelt (Simon und Tamkun, 2002; Ringrose und Paro, 2004). In Vertebraten sind die Trx Orthologe MLL1-3 in TrxG Komplexen assoziiert, die aus anderen Kernkomponenten als der *Drosophila* TAC1-Komplex bestehen. Diese Komponenten wie z.B. Ash2 finden sich allerdings auch im *Drosophila* Genom, weshalb die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, dass MLL-ähnliche Komplexe auch in der Fliege vorhanden sind.

Nachfolgend sollen die wichtigsten bislang charakterisierten *Drosophila* PcG Multiproteinkomplexe kurz beschrieben werden.



**Abbildung 1.1. Polycomb Repressiv Komplexe und deren Kernkomponenten mit Angabe der Funktion.**

**Polycomb Repressive Complex 1 (PRC-1, Shao et al., 1999):** **Sce/dRing** – H2AK119 E3 Ubiquitinligase, **Psc** – unbekannt, evt. Kofaktor der E3 Ligase, Inhibitor des *Chromatin Remodeling*, **Pc** – bindet H3K27me3, **Ph** – unbekannt, **Scm** kann enthalten sein (nicht gezeigt) – unbekannt

**PRC1-like** (Lo et al., 2009): **Sce/dRing** – s.o., **Su(z)2** – unbekannt, evt. Kofaktor der E3 Ligase, Inhibitor des chromatin remodeling, **Pc** – s.o., **Ph** – s.o.

**Drosophila RAF Komplex (dRAF)** (Lagarou et al., 2008): **Sce/dRing** – s.o., **Psc** – s.o., **Kdm2** – H2A Ubiquitylierung, H3K36me2-Demthylase

**Polycomb Repressive Complex2 (PRC-2)** (Czernient et al., 2002, Müller et al., 2002): **E(z)** – H3K27 Methyltransferase, **Ecl** – unbekannt, steigert HMT-Aktivität von E(z); **Su(z)12** – unbekannt, Nukleosomenbindung, **Nurf-55/Caf** – unbekannt, Nukleosomenbindung

**Polycomb-like PRC2 (Pcl-PRC2)** (Nekrasov et al., 2007): **E(z)** – H3K27 Methyltransferase, **Ecl** – unbekannt, steigert HMT-Aktivität von E(z), **Su(z)12** – unbekannt, Nukleosomenbindung, **Nurf-55/Caf** – unbekannt, Nukleosomenbindung, **Pcl** – unbekannt

**Pho Repressive Komplex (Pho-RC)** (Klymenko et al. 2006): **Pho** (oder **Pho-like**) – sequenzspezifische DNA-Bindung, **Sfmbt** – Bindung an methylierte Lysinreste von H3 und H4

**PR-Dub** (Scheuermann et al., 2010) **Calypso/BAP1** – Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase, **Asx** – unbekannt. Für weitere Erklärungen s. Text.

### 1.2.1 Polycomb repressiv complex 1 (PRC1)

Der Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) besteht aus mindestens vier Kernkomponenten: Polyhomeotic (Ph), Posterior Sex Combs (Psc), Polycomb (Pc), Sex Combs Extra/*Drosophila* RING (Sce/DRing) und ein weiteres PcG Protein kann mit diesem Komplex assoziiert sein, Sex Comb on Midleg (Scm) (Franke et al, 1992; Shao et al, 1999; Saurin et al, 2001). Zusätzlich können weitere nicht-PcG Proteine gebunden sein, wie z.B.: TATA-BindingProteine (TBP), Zeste (Z) oder GAGA-Faktor/Trithorax-like (GAF/Trl) (Saurin et al, 2001), die möglicherweise zur Funktion, insbesondere der Rekrutierung der PcG Komponenten an bestimmte Chromatinregionen

beitragen. In einem ebenfalls biochemisch aufgereinigten PRC1-ähnlichen Komplex der Fliege ersetzt das Psc Paralog Suppressor of zeste 2 (Su(z)2) das Psc Protein (Lo et al., 2009). Beide Proteine weisen strukturelle Ähnlichkeit auf und zeigen teilweise funktionelle Redundanz. Diese beiden Faktoren sollen in dieser Arbeit funktionell charakterisiert werden (s. unten, Abbildung 1.3 und Abb 1.4).

**Tabelle 1.1 – Polycomb Gruppen Proteine in *Drosophila* und Mensch mit konservierte Proteindomänen.**

Protein Name in <i>Drosophila</i>	Gen	<i>H. sapiens</i> Homolog	konservierte Domänen	Zitat
Polycomb	<i>Pc</i>	HPC1, HPC2, HPC3	Chromodomain	<i>Paro und Hogness, 1991</i>
Polyhomeotic	<i>Ph</i>	HPH1, HPH2, SAM	SAM domain, Zn-finger	<i>DeCamillis et al., 1992</i>
Posterior sex combs	<i>Psc</i>	BMI-1/ MEL18	RING-finger	<i>Brunk et al., 1991</i>
Supressor of zeste 2	<i>Su(z)2</i>	BMI-1/ MEL18	RING-finger	<i>Brunk et al., 1991</i>
dRING/Sex combs extra	<i>Sce/ DRing</i>	RING1	RING-finger	<i>Fritsch et al., 2003</i>
Enhancer of zeste	<i>E(z)</i>	EZH1, EZH2	SET domain, SANT domain	<i>Jones et al., 1990</i>
Extra sex combs	<i>Esc</i>	EED	WD40 repeats	<i>Frei et al., 1985</i>
Extra sex combs like	<i>Escl</i>		WD40 repeats	<i>Wang et al., 1985</i>
Supressor of zeste 12	<i>Su(z)12</i>	SU(Z)12	VEFS-box Zn-finger	<i>Birve et al., 2001</i>
Polycomb-like	<i>Pcl</i>	PHF1/ hPcl1	Tudor domain, PHD-finger	<i>Lonie et al., 1994</i>
Pleiohomeotic	<i>pho</i>	YY1	Zn-finger	<i>Brown et al., 1998</i>
Pho-like	<i>phol</i>		Zn-finger	<i>Brown et al., 2003</i>
Sex combs on Midleg	<i>Scm</i>	SCML1, SCML2	SAM domain, Zn-finger MBT repeats	<i>Bornemann et al., 1996</i>
Additional sex combs	<i>Asx</i>	ASX1, ASX2, ASX3	PHD-finger, ASXH domain	<i>Sinclair et al., 1998</i>
dSfmbt	<i>dSfmbt</i>	Sfmbt	SAM domain, Zn-finger MBT repeats	<i>Klymenko et al, 2006</i>
Calypso	<i>calypso</i>	/	/	<i>Gaytan de Ayala Alonso et al, 2007</i>
Super sex combs	<i>sxc</i>	Ogt	TPR repeats, Glycosyl Transferase domain	<i>Gambetta et al, 2009</i>

Durch die Chromodomäne der Pc Komponente kann dieser Komplex dreifach methyliertes Lysin 27 des Histons H3 (H3K27me3) spezifisch binden (Cao et al, 2002; Czermin et al, 2002; Fischle et al, 2003; Min et al, 2003). Das Ring Protein wirkt als E3 Ubiquitin Ligase bei der Mono-Ubiquitinylierung des Lysinrestes 119 im carboxyterminalen Bereich von Histon H2A

(H2AK119ub) (Wang et al, 2004, Cao et al., 2005; Buchwald et al., 2006; als Übersichtsartikel: Weake und Workman, 2008). Diese Modifikation gilt ebenso wie die H3K27me3 als eine repressive Markierung. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass PRC1 das für die Transkription notwendige *Chromatin Remodeling* durch den SWI2/SNF2 TrxG-Komplex (Brm-Komplex) inhibiert. Weiterhin vermag dieser Komplex die Perlschnurstruktur (10nm Faser) nukleosomaler Arrays zu kompaktieren (Francis et al, 2001; 2004). Beide *in vitro* Funktionen können interessanterweise auch durch aufgereinigtes Psc oder Su(z)2 Protein oder allein durch deren carboxyterminale Region (CTR, SAACR; s. unten) ausgeführt werden (Francis, et al., 2004, Lo et al., 2009).

In Säugern, wie dem Menschen, besteht der homologe PRC1-Komplex (HPRC-1) aus jeweils einem der paralogen Säugerhomologe (HPC1-3/STX1a, HPH 1-3/SAM, Ring1/Ring1A, Bmi-1/MEL-18) (Levine et al, 2002, Wang et al., 2004). Bmi-1 (B lymphoma Mo-MLV insertionregion 1), das große strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu Psc und Su(z)2 aufweist, wirkt als Kofaktor der E3 Ubiquitinligase RING2/RING1B (Cao et al., 2005) und wird in dieser Arbeit ebenfalls untersucht (s. unten).

### 1.2.2 Polycomb repressiv complex 2 (PRC2)

PRC2 ist ein ca. 600 kDa großer Multiproteinkomplex, der die Kernkomponenten Enhancer of zeste (E(z)), Extra sex combs (Esc), Suppressor of zeste 12 (Su(z)12) und Nurf55 (p55, Czermin et al, 2002; Müller et al, 2002) enthält. Die katalytisch aktive Einheit bildet das E(z) Protein, das durch seine SET-Domäne als Histone Methyl-Transferase (HMTase) spezifisch die Di- und Trimethylierung von H3K27 vermittelt (Rea et al, 2000; Müller et al, 2002). Das Esc Protein scheint die Aktivität der E(z) HMT zu steigern (Müller et al, 2002; Nekrasov et al, 2005) und spielt ebenso wie Su(z)12 und Nurf55 bei der Bindung an Nukleosomen eine Rolle (Nekrasov et al, 2005; Ketel et al, 2005). Der in Säugern gefundene homologe PRC2 zeigt auch H3K27me3-spezifische HMTase-Aktivität (Cao et al, 2002; Kuzmichev et al, 2002, Wang et al., 2005). Das Vorhandensein von Varianten, wie z.B. eines PRC2-Pcl Komplexes, der als zusätzliche Komponente das PcG Protein Polycomb-like (Pcl) enthält (Nekrasov et al, 2007), zeigt, dass die Situation in Zellen jedoch viel komplexer ist, als die biochemische Aufreinigung dieser

Kernkomplexe vermuten lässt. Es wird angenommen, dass diese Pcl-enthaltende Variante für den größten Teil der H3K27me3 Modifikationen verantwortlich ist. Allerdings ist noch wenig über den molekularen Mechanismus der gesteigerten H3K27 Trimethylierung durch Pcl bekannt.

### 1.2.3 *Drosophila* Ring Associated Factor Komplex (dRAF)

Der *Drosophila Ring Associated Factor* Komplex (dRAF, Lagarou et al., 2008) zeigt einige Ähnlichkeit zum PRC1, indem er als Kernkomponenten ebenfalls Sce/dRING und Psc enthält, wohingegen allerdings Pc, Ph oder Scm fehlen (Lagarou et al., 2008). Zusätzlich findet sich in diesem Komplex die Histon Lysin Demethylase *Drosophila* KDM2 (dKDM2, Lysine (K)-specific Demethylase 2). Dieses Protein unterstützt und steigert die Ubiquitinligase-Aktivität von dRing/Sce *in vitro* und wirkt darüber hinaus als H3K36me2 Demethylase. Das Entfernen dieser K36 Methylgruppen unterstützt die repressive Aktivität dieses PcG-Komplexes, da H3K36me2 als aktivierende Histonmodifikation angesehen wird. Durch die Verbindung dieser Funktionen in einem Multiproteinkomplex wird die Komplexität der miteinander wechselwirkenden epigenetischen Mechanismen deutlich. Studien in Zellkulturzellen haben fernerhin gezeigt, dass dKdm2, dRing und Psc, aber nicht Pc oder Ph, für die Histon H2AK119 Mono- Ubiquitinierung erforderlich sind und dass die Ubiquitinylierung abhängig von der Kdm2 Dosis ist (Lagarou et al., 2008 ; Scheuermann et al., 2010). Daher wird vermutet, dass der dRAF-Komplex und nicht PRC1 in *Drosophila* für den Großteil der H2AK119ub Modifizierung verantwortlich ist.

### 1.2.4 Der Polycomb Repressive Deubiquitinase Komplex (PR-DUB)

Die Komplexität der miteinander wechselwirkenden Histonmodifikationen zeigt sich auch in der Wirkung des *Polycomb repressive deubiquitinase* Komplex (PR-DUB, Scheuermann et al., 2010). Dieser Komplex beinhaltet neben dem PcG Protein Additional Sex Combs (Asx) das erst kürzlich identifizierte Calypso Protein, eine Histon H2A Deubiquitinase (Gaytan et al., 2007; Scheuermann et al., 2010). Im Gegensatz zur Erwartung zeigt *calypso* genetisch PcG Aktivität, d.h. es wird für die Stummschaltung von Zielgenen benötigt, obwohl es biochemisch die

Entfernung der repressiven H2AK119ub Markierung bewirkt. Diese scheinbar widersprüchliche Wirkung ist bislang noch weitgehend unverstanden.

### 1.2.5 Pho Repressiv Complex (Pho-RC)

Der *Pho Repressive Complex* (PhoRC, Klymenko et al. 2006) ist ein PcG Protein-Komplex aus zwei Proteinen: Pleiohomeotic (Pho) und dem *Drosophila* Scm-related gene containing four mbt domains (*dSfmbt*). Pho, und das funktionell redundante Pho-like, die wechselweise in diesem Komplex vorkommen können, enthalten jeweils eine Zink-Finger Domäne und sind die einzigen bekannten sequenzspezifisch DNA-bindenden PcG Proteine (Brown et al, 1998; 2003). Aufgrund dieser Eigenschaft wird diskutiert, ob der Pho-RC bei der Rekrutierung der anderen PcG Proteine an ihre Zielgene eine Rolle spielt (als Übersichtsartikel s. Schwartz et al., 2006). Allerdings sind in *Pho* mutanten Speicheldrüsen die übrigen PcG Faktoren noch spezifisch in diskreten Banden an Polytächromosomen lokalisiert, so dass weitere Mechanismen der Rekrutierung existieren müssen (Klymenko et al., 2006).

### 1.3 Die *cis*-regulatorischen *Polycomb Response Elements* (PREs) rekrutieren PcG Proteine und kontrollieren die Expression der Zielgene

In *Drosophila* wurden mehrere hundert Basenpaar lange *cis*-regulatorische Elemente charakterisiert, die PcG Komplexe rekrutieren können und die PcG-abhängige Stummschaltung der assoziierten Gene vermitteln. Die bislang charakterisierten DNA Sequenzen weisen keine eindeutigen Übereinstimmungen der Primärsequenz auf, werden jedoch aufgrund ihrer genetischen Funktion als *Polycomb Response Elements* (PRE) bezeichnet (Ringrose et al., 2003; als Übersichtsartikel Ringrose und Paro, 2004 und 2007). Entsprechend wurden auch Trithorax Response Elements (TREs) identifiziert, die z.T. mit PREs überlappen. Trotz insgesamt fehlender Sequenzidentität der PREs finden sich oft kurze Motive, die Konsensusbindstellen für verschiedene DNA-bindende Proteine, wie GAF/Trl, Zeste, Pipsqueak, DSP1, PHO und PHOL darstellen (Horard et al, 2000; Hodgson et al, 2001; Faucheux et al, 2003; Dejardin et al, 2005),

denen eine Funktion bei der Rekrutierung von PcG-RCs zugesprochen wird. Eine weitere Komplexitätsebene ergibt sich aus jüngeren Beobachtungen, dass auch kleine RNAs und Komponenten der RNAi Maschinerie an der Rekrutierung von PcG Faktoren beteiligt sind (Grimaud et al., 2005; Kim et al., 2006). Allerdings ist die Bedeutung aktiver Transkription und des Zusammenspiels von PcG und dem RNAi Mechanismus bislang noch nicht gut verstanden. Durch die Kombination von Hochdurchsatzverfahren mit Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurden genomweit Bindestellen für verschiedene PcG Faktoren in *Drosophila* Zellkulturzellen und Embryonen kartiert und bieten somit einen wertvollen Katalog zur Untersuchung der PcG-PRE Interaktionen und der PcG Zielgene (Schwartz et al., 2006; Schuettengruber et al., 2009; Enderle et al., 2011).

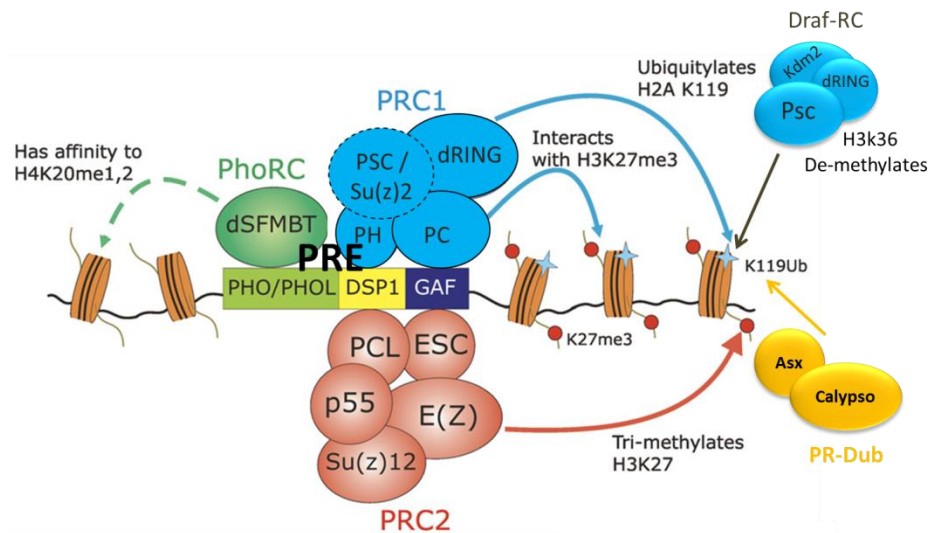
Um die Aktivität von PREs zu beurteilen wird gewöhnlich ein transgener Reporteransatz angewendet, bei dem häufig die Augenpigmentierung als Maß der *white*-Reporterexpression quantifiziert wird (Ringrose und Paro, 2003, Fauvarque und Dura, 1993; Chan et al, 1993; Kassis, 1994; Pirrotta und Rastelli, 1993; Gindhart und Kaufman, 1995; Zink und Paro, 1995, Pirrotta, 1997). Die zufällige Integration dieser PRE-Reporterkonstrukte durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation birgt jedoch das Problem von Positionseffekten. In jüngerer Zeit wird deshalb die *PhiC31*-vermittelte Rekombination (Golic,1991) zur Integration in eine definierte Position eingesetzt, so dass Positionseffekte im Vergleich mehrerer Transgene konstant bleiben (Müller und Bienz, 1991; Poux et al, 1996; Pirrotta, 1997, Ringrose 2004). Neben der Interaktion mit umliegenden Sequenzen in kurzer Entfernung wurden für PREs auch physikalische und genetische Interaktionen mit anderen PREs beschrieben, die weit entfernt oder sogar auf anderen Chromosomen lokalisiert sein können (Vazquez et al., 1993, Cavalli 2009). In vielen Fällen zeigen transgene PREs auch das genetische Phänomen des *Pairing Sensitive Silencing (PSS)*, das durch die Interaktion zwischen den in *Drosophila* auch in somatischen Zellen gepaart vorliegenden homologen Chromosomen auftritt (Kassis J.A 2002). Hierbei zeigen zwei Kopien der transgenen PRE-*white* Konstrukte stärkere Repression des Reporters als nur eine Kopie, was sich in weniger stark pigmentierten Augen zeigt. Zusätzlich lässt sich an diesen Transgenen die ektopische Rekrutierung von PcG Faktoren mittels Immunofärbungen an Polytäanchromosomen oder durch ChIP-Experimente nachweisen. In



Vertebraten ist die Sequenzspezifität der PcG Bindung noch schlechter verstanden als in der Fliege, auch wenn kürzlich erstmals funktionelle PREs aus Säugern charakterisiert wurden (Sing et al., 2009; Alfieri et al., 2013).

#### **1.4 Polycomb Gruppen Proteine reprimieren Zielgene durch Modifikationen des Chromatin**

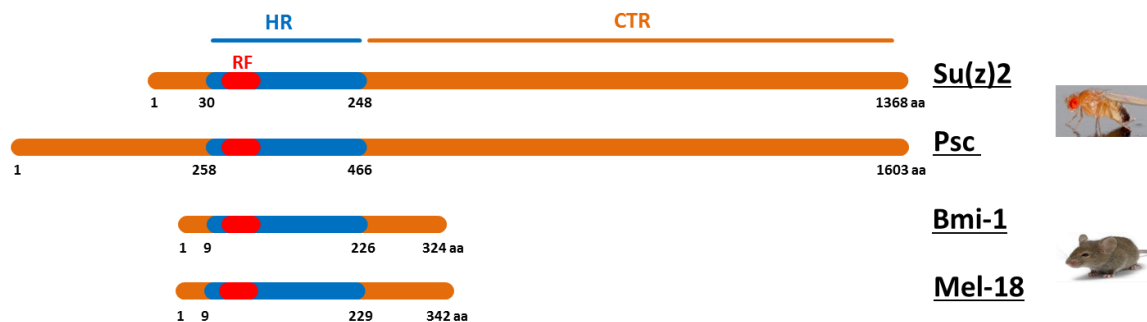
Genetische und molekulare Befunde wurden in Modellen der PcG-vermittelten Stummschaltung zusammengefasst (Abbildung 1.2; Übersichtsartikel: Ringrose und Paro, 2004; Schuettengruber et al. 2007; Schwartz und Pirrotta 2008; Simon und Kingston 2009). Hiernach wirkt zunächst der PRC2 auf eine bestimmte Chromatinregion. An der Rekrutierung und Bindung bestimmter PREs ist wahrscheinlich der Pho-RC und weitere sequenzspezifische Chromatinproteine beteiligt. Die E(z) Histon-Methyltransferase des PRC2 Komplex katalysiert die Trimethylierung des Lysinrestes (K) 27 des Histonproteins H3 (H3K27me3). Diese repressive Markierung wird durch das namensgebende Polycomb (Pc) Protein erkannt. Die Chromodomäne des Pc Proteins bindet spezifisch H3K27me3 und rekrutiert somit wahrscheinlich die anderen PRC1 Faktoren in diese Chromatinregion. Nach dem Looping-Modell erleichtern Konformationsänderungen, insbesondere die Ausbildung von Schleifen die H3K27-Methylierung größerer Regionen. Die transiente Interaktion der Pc Chromodomäne mit H3K27me3 erleichtert und stabilisiert vermutlich solche Schleifen (Czermin et al., 2002; Kahn et al, 2006; Schwartz et al, 2006). Die weiteren Prozesse, die zum dauerhaften Stummschalten dieser Chromatinregionen führen, sind noch nicht vollständig verstanden, dürften aber auch H2AK119-Ubiquitylierung und möglicherweise auch nicht-kovalente Modifikationen wie die *in vitro* nachgewiesene Inhibition des *Chromatin Remodeling* durch Psc und Su(z)2 beinhalten.



**Abbildung 1.2. Funktionsmodell der PcG-vermittelten Repression** (verändert nach Schwartz und Pirrotta, 2008). Polycomb Repressive Komplexe werden durch den Pho-RC und PcG-assoziierte Faktoren wie Gaga Faktor (GAF/Trl) und Dorsal switch protein 1 (DSP1) an ein Polycomb Response Element (PRE) rekrutiert. Dort katalysieren sie kovalente Histonmodifikationen, wie H3K27 Trimethylierung, die wiederum Bindungsstellen für andere PcG Proteine/Komplexe bilden. Für weitere Erklärungen s. Text.

## 1.5 Posterior Sex Combs und Suppressor of zeste 2 sind essentielle PcG Faktoren, die teilweise redundant wirken

Der Funktionsverlust von Psc in homozygot mutanten Tieren verursacht schwere Entwicklungsdefekte, wie z.B. homöotische Transformationen und embryonale Letalität (Lohuizen et al., 1995). Allerdings kann in vielen Entwicklungsprozessen der Psc Funktionsverlust durch ein anderes ebenfalls essentielles PcG Gen, *Suppressor of zeste 2* (*Su(z)2*), kompensiert werden. So zeigen beispielsweise weder Psc noch *Su(z)2* einzelmutante homozygote Zellklone in larvalen Imaginalscheiben erkennbare Defekte. Dahingegen werden in *Psc/Su(z)2* doppelmutanten Zellklonen eine Vielzahl von Zielgenen dereguliert, die normalerweise durch diese PcG Funktion in diesen Zellen stummgeschaltet sind (Classen et al., 2009; Beuchle et al., 2001; Scheuermann, 2010). Der molekulare Mechanismus, der die partielle Redundanz erklärt, ist allerdings noch nicht gut verstanden.



**Abbildung 1.3. Schema der *Drosophila* PcG Proteine Suppressor of zeste 2 (Su(z)2) und Posterior Sex Combs (Psc) sowie der Maus Faktoren Bmi-1 und Mel-18.** Die *Homology Region* (HR) ist blau unterlegt. rot- RING-Finger Domäne (RF), braun – CTR (C-Terminale Region), die auch als Similar amino acid content region (SAACR) bezeichnet wird. Zahlenangaben in Aminosäuren.

Die partielle funktionelle Redundanz spiegelt sich auch in der strukturellen Ähnlichkeit beider Proteine wider (Abbildung 1.3). Die entsprechenden Gene finden sich benachbart auf dem zweiten Chromosom und sind wahrscheinlich durch eine Genduplikation entstanden. Im aminoterminalen Bereich beider Proteine ist eine etwa 200 Aminosäuren umfassende *homology region* (HR) lokalisiert, die große Sequenzidentität (37%) aufweist (Brunk et al., 1991; Lohuizen et al., 1995). Innerhalb dieser Region ist jeweils eine RING Domäne und ein *helix-turn-helix* (HTH) Motiv lokalisiert (vgl. Abbildung 1.4). Die RING Domäne stellt ein modifiziertes Zinkfinger Motiv der C3HC4-Familie dar und dient vermutlich ebenso wie HTH Motive der Protein-Protein-Interaktion. Allerdings konnte bislang weder für Psc, Su(z)2 oder Bmi-1 Ubiquitin-Ligaseaktivität nachgewiesen werden. Für Bmi-1 konnte allerdings *in vitro* gezeigt werden, dass es die E3 Ubiquitinligase Aktivität von RING2/RING1B um ein Vielfaches steigert (Cao et al., 2005). Die weiter carboxyterminal gelegenen Sequenzen von Psc und Su(z)2, die mit 87% und 85% den größten Anteil dieser Proteine ausmachen, weisen keine direkte Sequenzähnlichkeiten zueinander auf. In beiden Proteinen zeigen diese Bereiche eine ungewöhnliche Zusammensetzung an Aminosäuren, mit einem überproportionalen Anteil an Prolinen und Serinen und anderen Aminosäuren, so dass sie als *Similar Amino Acid Content Region* (SAACR) bezeichnet wurden (Brunk et al., 1991). Im Weiteren wird diese SAACR als *Carboxy-Terminale Region* (CTR) bezeichnet. Überraschenderweise zeigen die CTRs trotz der fehlenden Sequenzähnlichkeit *in vitro* sehr ähnliche Funktion, wobei allerdings die molekularen

Mechanismen noch unverstanden sind (s. unten). In *Drosophila* existiert ein weiteres Gen, *lethal(3)73Ah*, was für ein Protein mit konservierter HR kodiert (Irminger-Finger und Nöthinger, 1998). Da die Expression von *lethal(3)73Ah* jedoch auf Fettkörperzellen und adulte Ovarien beschränkt ist, wird es in dieser Studie nicht einbezogen.

## 1.6 Die Vertebraten Orthologe *Bmi-1* und *Mel-18* wirken bei der Tumorgenese und Aufrechterhaltung von Stammzellpopulationen

Beide Vertebraten Orthologe *Bmi-1* und *Mel-18* (auch als *PCGF2* bezeichnet) zeigen innerhalb der HR Sequenzidentität zu den Fliegen-Orthologen, die zwischen *Psc* und *Bmi-1* mit 43 % Identität (Protein) sogar größer ist, als zwischen *Psc* und *Su(z)2* (37%). Obwohl die carboxyterminalen Regionen der Säugerproteine wesentlich kürzer sind als bei den Fliegenproteinen, ähneln sie sich in Bezug auf den hohen Serin- und Prolinanteil (Brunk et al. 1991; van Lohuizen et al. 1991; Alkema et al. 1993; Ishida et al. 1993). Beide Vertebraten Gene spielen bei der Regulation der Zellproliferation, Seneszenz und Tumorgenese eine Rolle und ihre Expression wird für einigen Tumorarten wie z.B. Brust- und Kolorektalkrebs als prognostischer Marker eingesetzt (Übersichtsartikel in Gil et al., 2005; Rajasekhar und Begemann, 2009). Darüber hinaus wirkt *Bmi-1* als wichtiger Faktor bei der Selbsterneuerung von Hämatopoetischen-, Neuralen- und Mammastammzellen, die entsprechend in Funktionsverlustmutationen dieser Gene nicht aufrechterhalten werden können (als Übersichtsartikel: Sparmann und van Lohuizen 2006; Grinstein und Wernet, 2007; Sangiorgi und Capecchi 2008; Pietersen und van Lohuizen 2008).

Während *Bmi-1* als Onkogen wirkt, besitzt *Mel-18* die Aktivität eines Tumorsuppressors (Zhang et al., 2010). *Bmi-1* reprimiert die beiden Tumorsuppressoren *p16<sup>Ink4a</sup>* und *ARF*, die von einem einzigen genomischen Locus exprimiert werden. Mutationen in *p16<sup>Ink4a</sup>* und *ARF* beeinflussen die Funktion der Retinoblastoma und p53 Proteine und tragen somit zu Defekten der Zellzykluskontrolle, Selbsterneuerung von Stammzellen, Tumorgenese und Seneszenz bei (als Übersichtsartikel s. Grinstein und Wernet, 2007). Auch wenn die Funktion von *Mel-18* noch kritisch diskutiert wird und möglicherweise auch abhängig von dem jeweils untersuchten Zelltyp sein könnte, wurde experimentell gezeigt, dass sich die unterschiedlichen Effekte von *Bmi-1* und

*Mel-18* zumindest z.T. daraus erklären lassen, dass *Mel-18* die Expression von *Bmi-1* negativ reguliert (Guo et al., 2007; Wiederschain et al., 2007; Lee et al. 2008). Somit bietet diese regulatorische Beziehung ein Beispiel für die Autoregulation von PcG Gene.

Interessanterweise zeigen auch in der Fliege *Psc/Su(z)2*-doppelmutante Zellklone in Imaginalscheiben stark erhöhte Proliferationsraten, was zu tumorartigen Wachstum führt, wobei allerdings die Effektorgene noch nicht identifiziert sind (Oktaba et al. 2008, Classen et al. 2009; A. Klebes, unveröffentlicht). Auch in *Drosophila* Follikelstammzellen führt der *Psc/Su(z)2* Funktionsverlust zu tumorartigen Wachstum, wobei diese Zellen ebenso wie metastatische Tumorzellen den Gewebeverband verlassen und an ektopischen Stellen proliferieren (Li et al., 2010).

In bislang unveröffentlichten Studien haben wir kürzlich Anhaltspunkte dafür gefunden, dass auch die Expression von *Psc* und *Su(z)2* durch PcG Faktoren reguliert wird, was auch durch die Charakterisierung von PREs in der *Psc* und *Su(z)2* genomischen Region nahegelegt wird (Park et al., 2012). Eine weitere Übereinstimmung in der Funktionsweise des Fliegenpaars *Psc/Su(z)2* mit dem Vertebratenpaar *Bmi-1/Mel-18* bietet die partielle funktionelle Redundanz. Genomweite Untersuchungen der *Bmi-1* und *Mel-18* genomischen Bindestellen zeigt weitgehende Überlappungen, so dass vermutet werden kann, dass beide Faktoren bei der Regulation vieler Zielgene redundant wirken. Hierzu passt auch die Beobachtung, dass beide Proteine in biochemischen Analysen in nahezu identischen Multi-Proteinkomplexen detektiert wurden (Wiederschain et al., 2007).

Zusammen weisen diese Befunde darauf hin, dass einige Aspekte der Wirkweise dieser PcG Proteine in *Drosophila* und Vertebraten konserviert sind. Die Expression von transgenen *Bmi-1* in *Drosophila* zeigt spezifische Lokalisation in diskreten Banden auf Polytänchromosomen (Sharp et al., 1997, diese Arbeit). Dementsprechend wurden z.B. die Bereiche, mit denen *Bmi-1* mit anderen Vertebraten PRC-1 Komponenten interagiert auf die HR eingegrenzt (Hemmenway et al., 1998), was auch für *Psc* zutrifft (Abbildung 1.3., s. unten, Kyba und Brock, 1998; King et al., 2005). Es stellt sich darüber hinaus die Frage, ob außerhalb der HR funktionelle Bereiche ebenfalls konserviert sind, auch wenn außer der ungewöhnlichen Aminosäurenkomposition keine direkten Übereinstimmungen der Primärsequenzen der CTRs zu finden sind. Obwohl

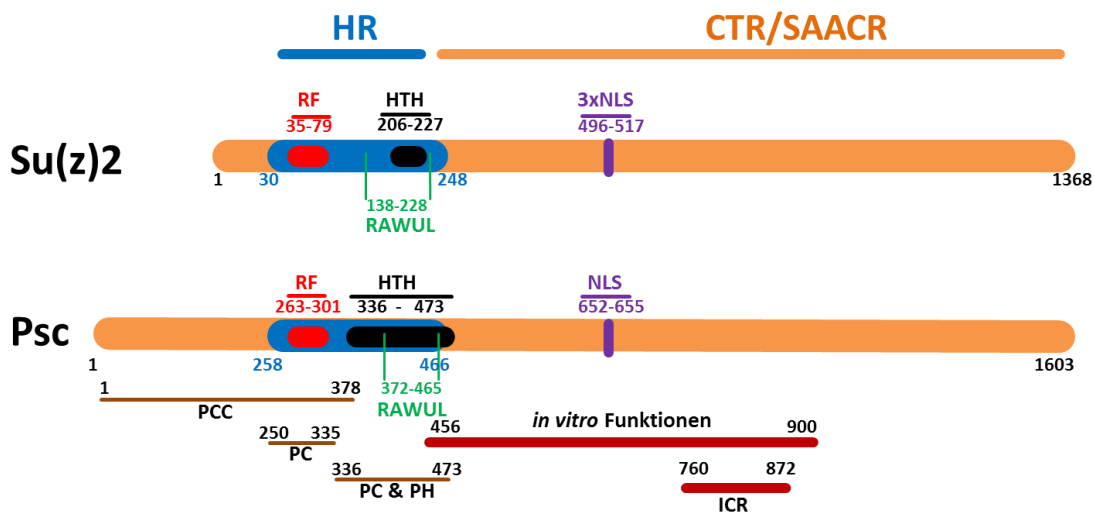
bislang keine *Bmi-1* mutanten Allele mit carboxyterminalen Deletionen beschrieben wurden, weist die Analyse von Deletionskonstrukten auf wichtige Funktionen innerhalb dieses Bereiches hin (Yadav et al., 2010).

## **1.7 Die HR von Psc und Su(z)2 bindet an Chromatin und die CTRs vermitteln nicht-kovalente Chromatinmodifikationen *in vitro***

Der genaue Wirkmechanismus von Psc und Su(z)2 ist bis heute weitgehend unverstanden. Für die *Drosophila* Protein und Säuger Bmi-1 konnte gezeigt werden, dass die HR für die Chromatinlokalisierung notwendig ist (Sharp et al., 1997). Innerhalb der HR konnten neben den Sequenzmotiven des RING-Fingers und einem putativen Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH) für Psc experimentell eine Region eingegrenzt werden (Aminosäuren (AS) 0-378), die notwendig für die Chromatinbindung und Assoziation mit dem PRC-1 Kernkomplex ist (Polycomb core complex, PCC; Abbildung 1.4) (diese Arbeit, Sharp et al., 1997; King et al., 2005). In *in vitro* Studien interagiert der Bereich von AS 336-473, der das putative HTH-Motiv enthält, sowohl mit dem Ph Protein als auch mit dem Pc Protein, das zusätzlich, wenn auch schwächer, mit dem RING Finger (AS 250-335) interagieren kann (Kyba und Brock, 1998). Innerhalb der HR, carboxyterminal zu den RING-Finger Motiven wurde aufgrund von Sequenzähnlichkeiten eine sogenannte RAWUL (Ring-finger And WD40 associated Ubiquitin-Like) Domäne beschrieben. (Sanchez-Pulido et al., 2008). Hierbei handelt es sich um ein Motiv mit Ähnlichkeiten zu Ubiquitin, das zum einen in RING-Domänen Proteinen, wie Bmi-1, Mel-18, Su(z)2 und Psc vorkommt und zum anderen in WD40-Domänen Proteinen der p80-Familie sowie in Ubiquitin-ähnlichen Proteinen (*Ubq-like*, z.B. SUMO, NEDD8, etc.) gefunden wird. Aufgrund von Sequenzunterschieden zu charakterisierten Ubiquitylierungsproteinen wird jedoch angenommen, dass die RAWUL Domäne selber nicht zur Modifikation Ubiquitin-ähnlicher Proteine beiträgt.

Durch Analysen verschiedener Deletionskonstrukte, die zumeist *in vitro*, aber in einigen Fällen auch *in vivo* durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass neben der HR auch die CTR für die Psc Funktion wichtig ist (King et al., 2005). Diese Untersuchungen decken zusätzlich zu dem Beitrag zur kovalenten Chromatinmodifikation als Kofaktor der E3-Ubiquitinligase (Bmi-

1, s. oben) auch nicht-kovalente Chromatinmodifikationen auf. So wirken die CTRs *in vitro* als Inhibitoren der Transkription und des *Chromatin Remodeling* (ICR) (Francis et al., 2004; Lo et al., 2009, Beh et al., 2012). Das Verschieben oder Herauslösen von Nukleosomen wie es unter ATP-Hydrolyse beim *Chromatin Remodeling* passiert, ist für die aktive Transkription essentiell. Somit bietet die Inhibition dieses Prozesses eine attraktive Erklärung für die Psc- und Su(z)2-vermittelte Stummschaltung ihrer Zielgene (Shao et al., 1999). Diese Funktion ist in der CTR lokalisiert, da dieser Abschnitt beider Proteine *in vitro* jeweils ausreichend hierfür ist. Ferner konnte in der Psc CTR zunächst ein Bereich zwischen den Aminosäuren 456 und 909 eingengt werden, der für diese *in vitro* Funktionen notwendig ist (Wu und Howe, 1995; King et al., 2005; Beh et al., 2012). Dieser Bereich wurde später auf die Aminosäuren 760 bis 872 begrenzt, die für die ICR Aktivität essentiell sind (Francis et al., 2004). Demnach sind diese *in vitro* Aktivitäten unabhängig von der Assoziation beider Proteine mit anderen PcG Faktoren, wie sie durch die HR vermittelt werden (Francis et al., 2004; Lo et al., 2009).



**Abbildung 1.4. Funktionell oder aufgrund von Sequenzvergleichen identifizierte Bereiche der Su(z)2 und Psc Proteine.** Zahlenangaben in Aminosäuren. HR – Homology Region; CTR – Carboxy-Terminale Region; SAACR – *Similar Amino Acid Content Region*; RF RING-Finger, HTH *Helix-Turn-Helix*; NLS – *Nuclear Localisation Signal*; RAWUL - *Ring-finger And WD40 associated Ubiquitin-Like*; Für Psc ermittelt: PCC – *Polycomb Core Complex* (PRC-1 Bindung); PC – Polycomb Bindung; PC und PH – Polycomb und Polyhomeotic Bindung; *in vitro* Funktionen – Chromatin Kompaktierung, Inhibition der Transkription und des *Chromatin Remodeling*, Multimerisierung, nicht-sequenzspezifische DNA-Bindung; ICR- Inhibition des *Chromatin Remodeling*. Die Su(z)2-CTR zeigt ähnliche *in vitro* Funktionen. Für weitere Erläuterungen s. Text.

Durch *in vitro* Studien wird ferner nahegelegt, dass Psc und Su(z)2 multimerisieren können und dass diese Fähigkeit zur Brückenbildung zwischen Nukleosomen und somit zur Chromatinkompaktierung beitragen kann (Lo et al., 2012). Die Multimerisierung korrespondiert auch gut mit dem genetischen Phänomen der intragenischen Komplementation (Wu und Howe, 1995). Hierbei zeigen zwei unterschiedliche mutante Allele von Psc, die in die HR kartieren, bzw. eine carboxyterminale Deletion ab Aminosäure 910 verursachen, in transheterozygoten Tieren volle Vitalität. Jedes dieser Allele verursacht jedoch Letalität, wenn es mit einer Defizienz kombiniert wird. Die Beobachtung, dass mehrere Funktionen innerhalb des Psc Proteins voneinander getrennt werden können, die sich *in vivo* auf verschiedenen Molekülen wieder miteinander kombinieren lassen, kann gut durch Di- oder Multimerisierung von Psc erklärt werden.

Eine weitere Eigenschaft von Psc und Su(z)2 Deletionskonstrukten, die ebenfalls nur durch *in vivo* Ansätze aufgedeckt werden konnten und die die Bedeutung der CTR weiter untermauert, ist die dominant-negative Aktivität einiger transgener Konstrukte, denen jeweils der überwiegende Anteil der CTR fehlt (diese Arbeit, King et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die aminoternale Region, die die HR einschließt, für die spezifische Lokalisation von transgenen Psc, Su(z)2 und Bmi-1 an *Drosophila* Polytäanchrosomen, bzw. an das Chromatin notwendig und ausreichend ist und die Bindung an andere Komponenten des PRC-1 vermittelt (Sharp et al., 1997; Kyba und Brock, 1998; King et al., 2005). Die CTR beider Proteine ist für die *in vivo* Funktion notwendig und nicht-kovalente Chromatinmodifikationen (Bindung, Multimerisierung) werden durch die CTRs vermittelt. Diese *in vitro* Funktionen der CTR lassen sich als die Fähigkeit messen, Chromatin zu kompaktieren sowie Transkription und *Chromatin Remodeling* zu inhibieren.

## 1.8 Mögliche Grundlagen der CTR Funktion

Die Tatsache, dass *in vitro* die CTRs von Psc und Su(z)2 nahezu identisch wirken, steht im Widerspruch zu der geringen Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen. Schon bei der Klonierung



von Psc und Su(z)2 wurde erkannt, dass sich die CTRs beider Proteine in Bezug auf die Zusammensetzung der Aminosäuren im Vergleich zu den meisten anderen Proteinen unterscheidet, was zur Benennung als SAACR geführt hat (Brunk et al., 1991; Van Lohuizen et al., 1991). Bereits in diesen frühen Publikationen wurde diskutiert, dass eine gewisse Ähnlichkeit der CTRs in Bezug auf deren Sekundärstrukturen besteht. So wurden vergleichbare Verhältnisse unterschiedlicher Strukturmerkmale wie  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblattstrukturen, Haarnadelkehren und zufällige Knäulformationen (*random coil*) vorhergesagt. Jüngere Arbeiten schlagen vor, dass die CTRs größtenteils intrinsisch ungeordnet sind (*intrinsically disordered*), d.h. keine Domänen oder native Sekundär- oder Tertiärstruktur aufweisen (Lo et al., 2009). Für diese Annahme spricht, dass genau die Aminosäuren, die zur intrinsischen Ordnung beitragen (Cystein und aromatische Reste) unterrepräsentiert und solche, die die Ordnung brechen (Prolin und Serin) überrepräsentiert sind.

Zwar zeigt diese Betrachtung eine gewisse Ähnlichkeit der CTRs von Psc und Su(z)2 auf, allerdings wird hierdurch der Wirkmechanismus noch nicht verständlich. Einen möglichen Anhaltspunkt hierzu bietet die Analyse von Beh und Kollegen, die nach Konzeption dieser Arbeit und Herstellung der transgenen Fliegenlinien veröffentlicht wurde (Beh et al., 2012). Der Vergleich verschiedener Psc-CTR aus 17 Metazoen, die sowohl Arthropoden als auch Chordaten einschließen, zeigte, dass die Anhäufung mehrerer Bereiche positiver Ladung wichtig für die getesteten *in vitro* Funktionen (Chromatinbindung, ICR) ist. CTRs, bei denen die positiv geladenen Bereiche durch Abschnitte negativ geladener Aminosäurereste unterbrochen werden, zeigten geringe Aktivität. Die Aktivität konnte jedoch deutlich gesteigert werden, indem durch Umverteilung zusammenhängende Bereiche positiver Ladung bei gleichbleibender Gesamtladung geschaffen wurden. Dieser Befund und die Charakterisierung analoger Proteine in Vertebraten und Pflanzen, die ähnliche Ladungsverteilung und *in vitro* Funktion zeigen (s. Diskussion) lässt vermuten, dass weder Proteindomänen, noch Strukturmerkmale, sondern vielmehr eine Häufung ununterbrochener positiver Ladungen die Voraussetzung für die Aktivität darstellt. Konsistent mit dieser Annahme ist auch die Beobachtung, dass innerhalb der Psc-CTR der Bereich zwischen Aminosäuren 456 und 909, der als funktionell bedeutsam charakterisiert

wurde, sich durch eine besondere Anhäufung positiver Ladungen auszeichnet (Beh et al., 2012; Abbildung 4.1).

## 1.9 Ziele dieser Arbeit

Der molekulare Mechanismus der epigenetischen Stummschaltung durch PcG Faktoren ist noch nicht vollständig verstanden. Psc und das funktionell und strukturell verwandte Su(z)2 Protein nehmen in diesem Prozess im Kontext der PRC-1 und/oder dRAF Komplexe Schlüsselstellungen ein. Beide Proteine zeigen *in vitro* nahezu identische Funktionen und sind jeweils allein befähigt, Chromatin zu kompaktieren, die Transkription zu inhibieren und das *Chromatin Remodeling* zu verhindern. Insgesamt ergibt sich aus den vorliegenden Daten, dass die amino-terminale HR für die spezifische Chromatinbindung, wahrscheinlich durch Assoziation mit anderen PcG Faktoren der jeweiligen Komplexe, notwendig ist. Die carboxyterminal zur HR gelegenen Bereiche der CTR vermitteln andere Funktionen, die möglicherweise die Fähigkeit zur Multimerisierung und die oben genannten *in vitro* Funktionen beinhalten. Um ein tiefergehendes Verständnis der Funktion zu erlangen, soll in dieser Arbeit eine Untersuchung des Su(z)2 Funktionsverlustes sowie eine detaillierte *in vivo* Struktur-Funktionsanalyse durchgeführt werden. Durch diese Analysen sollen folgende Fragen systematisch untersucht werden:

- i. **Wie äußert sich der Su(z)2 Funktionsverlust?**
- ii. **Welche Bereiche der Psc und Su(z)2 Proteine sind für die Funktionen notwendig?**
- iii. **Was ist die jeweilige Funktion dieser Bereiche?**
- iv. **Welche dieser Funktionen sind im menschlichen Homolog Bmi-1 konserviert?**

Hierzu werden Transgene der wildtypischen Sequenzen und mutante Formen (Deletionen) der beiden Fliegenproteine Psc und Su(z)2 sowie des Säugerproteins Bmi-1 hergestellt, in Fliegen eingebracht und mittels des UAS/Gal4-Systems in verschiedenen Zelltypen und Entwicklungsstadien zur Expression gebracht. Aus dem Vergleich der Effekte soll auf die Funktionen verschiedener Proteinabschnitte geschlossen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Genetische Methoden

#### 2.1.1 Aufzucht und Haltung der Fliegen

Die Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgte auf Standardmedium (www.flybase.org), dem 250µl Nipagin und 1,8ml Propionsäure zur Vermeidung von Schimmelbildung und Bakterienwachstum zugefügt wurden. Die Fliegen wurden bei 25°C bzw. 18°C gehalten. Zum Sammeln der Embryonen für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden Fliegen in einem Flugkäfig bei 25°C gehalten.

Standardmedium (1 L): 70 g Maismehl

60 ml Zuckerrübensirup

3,5 g Agar-Agar

10 g Bierhefe

710 ml Wasser

Traubensaftagar (1 L): 600 ml Traubensaft

400 ml Wasser

40 g Agar-Agar

16 g Saccharose

#### 2.1.2 Fliegenstämme

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Fliegenstämme.

**Tab. 2.1:** Übersicht über die verwendeten Fliegenstämme.

Stamm	Genotyp	Chromosom(en)	Referenz
<i>w<sup>1118</sup></i>	<i>white</i>	1	-
<i>IF/Cyo;MKRS/TM6,Tb</i>	<i>y,w;IF/Cyo;MKRS/TM6b,Tb</i>	2,3	Via A.Bachmann
<i>FRT 42D Su(z)2<sup>1.b8</sup>/CyO</i>	<i>y<sup>1</sup>w*,P{neoFRT}42D Df(2R) Su(z)2<sup>1.b8</sup>/SM6b,P{eve-lacZ8.0}SB1</i>	1,2	Bloomington #24467
<i>FRT42D Su(z)2<sup>1.b7</sup>/CyO</i>	<i>w ;{neoFRT}42D, Su(z)2<sup>1.b7</sup>/CyO</i>	1,2	A. Klebes
<i>FRT42D, Psc<sup>1.d20</sup>/CyO</i>	<i>{neoFRT}42D, Psc<sup>1.d20</sup>/CyO</i>	2	A. Klebes
<i>flp-outGAL4</i>	<i>y,w,FLP1.22;P[abx/Ubx&lt;FRT f +FRT&gt;GAL4 acZ]</i>	X	G.Schubiger

<i>C765-GAL4</i>	<i>y,w;P(C765-GAL4,w)</i>	2	G.Schubiger
<i>vgBE-GAL4</i>	<i>w;vgBE-GAL4;vgBE-GAL4</i>	3	G.Schubiger
<i>GMR-GAL4</i>	<i>y,w;P(GMR-GAL4,w)</i>	2	G.Schubiger
<i>en-GAL4</i>	<i>y,w;P(en-GAL4,w)</i>	2	T.Kornberg
<i>da-GAL4</i>	<i>y, w; P(da-GAL4, w)</i>	1,3	B. Giebel, A. Wodarz
<i>ptc-GAL4</i>	<i>y,w;P(ptc-GAL4,w)</i>	2	T.Kornberg
<i>231.1-GAL4</i>	<i>y,w;P(231.1-GAL4,w)</i>	2	Labor eigen stock
<i>ey-GAL4</i>	<i>y,w;P(ey-GAL4)</i>	3	G.Schubiger
<i>UAS-GFP</i>	<i>y,w;P(UAS-GFP)</i>	2	G.Schubiger
<i>R7-lacZ</i>	<i>w; ls(3)H214 #3 P{w+;lac-Z}/TM3</i>	2	T.Kornberg
<i>UAS HA-Su(z)2</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; P{UAS-HA-Su(z)2,w}</i>	2	K.Herms , H.Baaj
<i>UAS-Su(z)2-GFP</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>;P{UAS-Su(z)2-GFP,w}</i>	2	K.Herms , H.Baaj
<i>UAS-Psc-FL-Myc /cyo</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; P{UAS-Psc-FL-Myc/Cyo,w}</i>	2	H.Baaj , D.Ibrahim
<i>UAS-Psc-N1-Myc -7M</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; +/+ ; P{UAS-Psc-N1-Myc,w}</i>	3	H.Baaj , D.Ibrahim
<i>UAS-Psc-N2-Myc-L2</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; P{UAS-Psc-N2-Myc,w}</i>	2	H.Baaj , D.Ibrahim
<i>UAS-Psc-C-Myc -9M</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; P{UAS-Psc-C-Myc,w}</i>	2	H. Baaj
<i>UAS-Su(z)2-FL-Myc-12</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; P{UAS-Su(z)2-FL-Myc,w}</i>	2	H.Baaj , D.Ibrahim
<i>UAS-Su(z)2-N1-Myc-36</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; P{UAS-Su(z)2-N1-Myc,w}</i>	2	H.Baaj , D.Ibrahim
<i>UAS-Su(z)2-N2-Myc-7M</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; P{UAS-Su(z)2-N2-Myc,w}</i>	2	H.Baaj , D.Ibrahim
<i>UAS-Su(z)2-C-Myc-1M</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; P{UAS-Su(z)2-C-Myc,w}</i>	1	H.Baaj , D.Ibrahim
<i>UAS-Su(z)2-HG-Myc-5F</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; +/+ ; P{UAS-Su(z)2-HG-Myc,w}</i>	3	H.Baaj , D.Ibrahim
<i>UAS-Bmi-1-FL-Myc-9F</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; +,+ ; P{UAS-Bmi-1-FL-Myc,w}</i>	3	H. Baaj
<i>UAS-Bmi-1-N-Myc-6M</i>	<i>y,w<sup>1118</sup>; P{UAS-Bmi-1-N-Myc,w}</i>	2	H. Baaj
<i>UAS-Bmi-1-C-Myc-4M</i>	<i>y,P{UAS-Bmi-1-C-Myc,w}; +,+;+,+</i>	1	H. Baaj

### 2.1.3 Ektopische Überexpression mittels des GAL4/UAS-System

Das aus der Hefe stammende GAL4/UAS-System (Brand und Perrimon, 1993) wurde eingesetzt, um bestimmte Gene räumlich und zeitlich kontrolliert zu exprimieren. Dabei wird im sogenannten „Aktivator-Stamm“ (Treiberlinie) der GAL4-Transkriptionsfaktor unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert. Aufgrund fehlender Bindungsstellen bleibt das GAL4-Protein in diesen Fliegenstämmen jedoch ohne Wirkung. So genannte „Effektor-Stämme“ tragen ihrerseits Zielgene, deren Expression durch GAL4-Bindungsstellen (Upstream Activation Sequence = UAS) kontrolliert wird. Durch Kreuzung der beiden Stämme werden die GAL4-Transkriptionsfaktoren und deren UAS-Bindestellen zusammengebracht und die Zielgene in der folgenden Generation, in Abhängigkeit von der zeitlichen und räumlichen Aktivität des GAL4-kontrollierenden Promotors, exprimiert. Im Rahmen dieser Studie diente dieses System zum einen der Untersuchung von Gain-of-Function (GOF)-Phänotypen sowie zur Detektion des Fusionsproteins in Geweben dritter Larven von *Drosophila melanogaster*. Zum anderen sollte

der Effekt von GAL4-aktivierten transgenen Konstrukten untersucht werden. Abhängig von der jeweiligen Fragestellung wurden bei den einzelnen Versuchen unterschiedliche Treiberlinien verwendet.

Zudem diene das System der Aktivierung verschiedener Gene in Zellklonen von *Drosophila*-Imaginalscheiben. Unter Verwendung der flip-out-Technik (Struhl und Basler, 1993) wurde dabei Hitzeschock-abhängig Rekombination induziert und so die Expression des GAL4-Proteins in einzelnen Zellen aktiviert.

#### **2.1.4 Die Nagellack-Abdruck Technik**

Eine häufig genutzte Methode zur Analyse der Augenmorphologie ist die Rasterelektronenmikroskopie (SEM). Jedoch steht oft das dafür notwendige Equipment nicht zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde aus diesem Grund eine neue, einfache und günstige Methode zur Analyse der Augen von *Drosophila* genutzt, die Nagellack-Abdruck Technik. Mit Hilfe dieser Methode kann die Oberfläche von den Augen adulter Fliegen lichtmikroskopisch in einer ähnlich guten Qualität wie beim SEM dokumentiert werden. Zur Herstellung der Präparate wird eine Fliege mittels Skalpell dekapitiert und mit Hilfe einer Pinzette in einen Tropfen transparenten Nagellack getaucht. Danach lässt man den Nagellack bei RT für ca. 5 min aushärten und anschließend wird der Abdruck vorsichtig mit einer Seziernadel von den Augen abgezogen. Der nun erhaltene Abdruck stellt eine genaue Kopie der Augenoberfläche dar und kann direkt unter einem Lichtmikroskop dokumentiert werden. Augenmerk lag bei dieser Methode vorallem auf die Anordnung der Ommatidien des Facettenauges, findet aber auch häufig Anwendung in der Analyse von Kutikula-Strukturen.

#### **2.1.5 Herstellung transgener *Drosophila*-Linien**

DNA-Fragmente, die als flankierende Sequenzen P-Element-Wiederholungen enthalten, können mittels einer Transposase in das Genom von *D.melanogaster* integrieren (Rubin und Spradling, 1982). Der Transformationsvektor wird dabei zusammen mit einem so genannten Helferplasmid (p $\Delta$ 2-3) in die Keimbahn von *D.melanogaster* Embryonen injiziert (hier **w<sup>1118</sup>**), der eine Mutation

für den entsprechenden Selektionsmarker (*white*) des Transformationsvektors trägt. Das Helferplasmid stellt dabei das für die Insertion des P-Elements in die Keimbahnzellen notwendige Transposase-Protein zur Verfügung. Die überlebenden Nachkommen werden mit dem für die Injektion verwendeten Stamm rückgekreuzt. Fliegen der Folgegeneration (F1) wurden auf *white*-Expression (rote bzw. orange Augen) selektiert.

Die Herstellung transgener *Drosophila*-Linien erfolgte nach (Spradling, Rubin, 1982) und (Horn, Wimmer, 2000) und teilweise bei Best Gene Inc, Chino Hills, CA 91709/U.S.A.

### **2.1.6 Lokalisation des P-Elements auf den polytären Chromosomen via Balancer-Kreuzungen**

Zur Generierung homozygoter transgener Fliegenstämme unter gleichzeitiger Bestimmung des Transgen-tragenden Chromosoms wurden für jede >Myc>attP-Linie Kreuzungen mit Balancer-Linien vorgenommen. Dazu wurden zuerst Männchen der transgenen Linien (Rot pigmentierte Augen) mit Jungfrauen der Linie *w<sup>1118</sup>* (*white*) gekreuzt. Diese Kreuzung diente als Test auf eventuelle Lokalisation des Transgens auf dem X-Chromosom. Weisen 100% der Weibchen in der F1-Generation rot pigmentierte Augen auf, befindet sich das Transgen auf dem X-Chromosom. Wenn sowohl Weibchen als auch Männchen der F1-Generation rote Augen aufwiesen, wurde mittels des vier Marker Stamms *w;IF/Cyo;MKRs/TM6* auf transgene Lokalisation auf dem 2. und 3. Chromosom getestet.

### **2.1.7 Herstellung von Quetschpräparaten für Immunfärbung von Polytäanchromosomen**

Für die Herstellung von Quetschpräparaten wurden Larven des 3. Stadiums verwendet. Der Larve wurde dazu in einem Tropfen Präparierlösung (20 µl) mittels zweier Pinzetten der Kopfteil abgetrennt, die Speicheldrüsen vorsichtig herauspräpariert und diese von anhaftendem Fettgewebe so gut wie möglich befreit. Anschließend wurden die Drüsen für 30 sec in einem Tropfen (13 µl) Quetschlösung gespült und für 4-5 min in einem weiteren auf einem Deckglas (18 x 18 mm) befindlichem Tropfen Quetschlösung belassen. Dieses wurde mit einem

Objektträger aufgenommen und vorsichtig durch leichtes Klopfen in alle vier Richtungen geglitten. Mit einer Pinzette wurde vorsichtig auf alle vier Ecken des Deckglases geklopft und dieses danach abermals über den Objektträger geglitten. Sowohl das Gleiten als auch das vorsichtige Klopfen mit der Pinzette diente zum Aufbrechen des Drüsengewebes. Mit der Faust wurde vorsichtig über das zuvor mit einem Papiertuch bedeckte Präparat gerollt und somit die Chromosomenarme ausgebreitet. Nach einer Qualitätsprüfung auf zufriedenstellende Ausbreitung der Chromosomenarme mittels Mikroskop wurden die Präparate in flüssigem Stickstoff eingefroren und nach Absprennen des Deckglases mittels einer Rasierklinge in 96 %igem Ethanol bei 4 °C gelagert. So konnten die Präparate für ca. 1 Woche aufbewahrt werden.

Präparierlösung: 1x Puffer A/ 10%iger Triton X-100  
 Quetschlösung: 45 %iger Essigsäure  
 10x Puffer A: 150 mM Tris HCl (pH 7,4)  
                   600 mM KCl  
                   150 mM Spermidin  
                   1,5 mM Spermin

### **2.1.8 Erzeugung von Zellklonen mittels Flippase-vermittelter mitotischer Rekombination**

Für die Erzeugung homozygoter Zellklone in heterozygoten Tieren wurde die Flippase-FRT Technik zur Induktion mitotischer Rekombination verwendet (Golic 1991, Beuchle et al 2001). Das *FLP*-Gen kodiert für eine sequenz-spezifische Rekombinase, die zwischen zwei „Flippase Recognition Target“ (FRT) Sequenzen eine Rekombination katalysiert (Golic et al. 1989). Zur Induktion mitotischer Rekombination wird das *FLP*-Gen unter die Kontrolle des *Drosophila* Hitzeschock-Promotors (*hsp70*) gestellt (*hs-flp*). Liegen auf den homologen Chromosomen FRT-Sequenzen in der gleichen Orientierung vor, können mittels eines Hitzeschocks die distal zu den FRT-Sequenzen liegenden Chromosomenarme rekombiniert (Golic, 1991) und so Zellklone erstellt werden. Die Tochterzellen sind somit homozygot für ein Allel in einem ansonsten heterozygoten Organismus. Zum Erstellen solcher Zellklone für *Su(z)2* und *Psc* wurden Männchen, bei denen sowohl eine FRT-Sequenz als auch das entsprechende *Su(z)2* bzw. *Psc*-Allel vorlag (Tab. 2.1), mit Weibchen gekreuzt, welche eine FRT-Sequenz sowie distal dazu ein unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors stehendes

GFP-Reportergergen trugen. Zusätzlich befand sich bei den Weibchen auf dem X-Chromosom das für die Rekombination notwendige Flipase Enzym unter der Kontrolle eines Hitzeschock Promoters (*hs-flp*) (Tab.2.1).

Die Fliegen wurden für mehrstündige Ablagen bei 25°C gehalten. Larven der F1-Generation wurden 24-90 Std. nach Eiablage einem 60-minütigen Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt, um dadurch mitotische Rekombination zu induzieren. Anschließend wurden die Larven mindestens 36 Std. bei 25°C gehalten. Imaginalscheiben der Larven im 3. Stadium wurden präpariert und für immunohistochemische Analysen weiterverwendet.

### 2.1.9 Nachweis der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in *Drosophila*-Imaginalscheiben

Imaginalscheiben wurden in PBS präpariert und für 30 Min. in 4%igem Glutaraldehyd bei RT fixiert. Nach einigen Waschschritten in PBT wurden die Scheiben in X-Gal Färbepuffer überführt. Die X-Gal-Lösung wurde in einem Verhältnis von 1:40 zugegeben. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurden die Imaginalscheiben mehrfach mit PBT gewaschen. Zum Einbetten wird das Gewebe zunächst in 50%igem Glycerin (Glycerin:PBS) äquilibriert und anschließend in 100%igem Glycerin feinpräpariert und auf Objektträgern eingebettet.

**Tab. 2.2:** Zusammensetzung des X-Gal-Färbepuffers und X-Gal.

X-Gal Färbepuffer	Menge
Färbepuffer ohne X-Gal	0.876g NaCl 0.020g MgCl x 6H <sub>2</sub> O 0.131g K <sub>4</sub> (Fe(CN) <sub>6</sub> ) 0.102g K <sub>3</sub> (Fe(CN) <sub>6</sub> ) in 100ml 10mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O (pH7.4) und 100µl Triton X-100
X-Gal	100mg X-Gal in 1.25ml Dimethylformamid

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

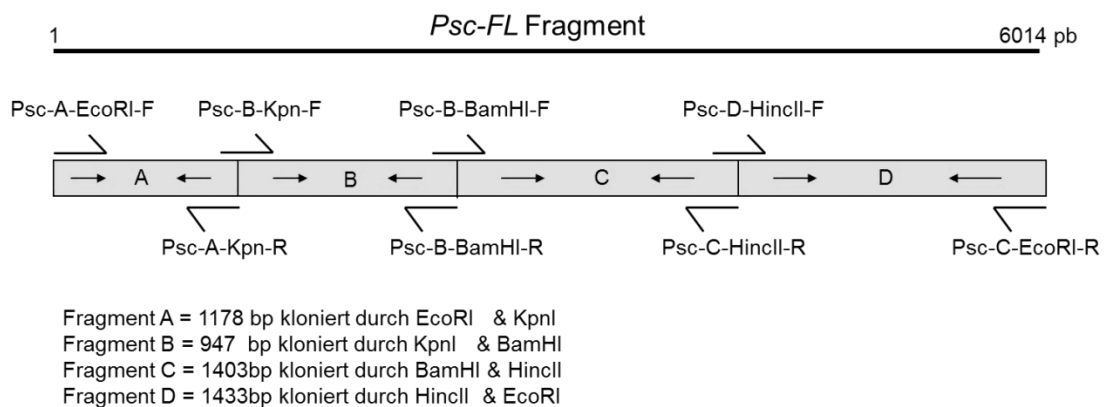
### 2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden (Min-/Midi-Prep, Gelextraktion u.s.w.) erfolgten nach Sambrook et al., 1989.



## 2.2.2 Klonierung einer Psc cDNA

Für die Konstruktion der verschiedenen Psc-Myc-Konstrukte wurde zunächst die Psc-Sequenz in vier Fragmente (A,B,C und D) mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert (Abbildung 2.1) und in den pGEM-T-Easy-Vektor subkloniert (Primer siehe Tab.2.1). Anschließend wurden die einzelnen Fragmente unter Verwendung der durch die PCR-Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen zu einer Psc-Gesamtsequenz (A/B/C/D) in pGEM-T-Easy subkloniert. Diese Psc cDNA diente als PCR-Template für die Amplifikation der unterschiedlichen Psc-Fragmente, die in pUAST umkloniert (EcoRI, XhoI) wurden.



**Abbildung 2.1:** Darstellung der einzelnen Psc cDNA Subfragmente und verwendete Primern (s. Tab.2.1). Die Zahlenangaben bezeichnen die jeweiligen Größen in Basenpaaren (bp). Für weitere Erklärungen s. Text.

## 2.2.3 Sequenzspezifische Mutagenese

Die für die Mutagenese vorgesehenen Su(z)2-Konstrukte wurden zuerst in den pGEM-T-Easy Vektor subkloniert. Die sequenzspezifische Mutagenese wurde mittels dem „FlipFlop Site-Directed Mutagenesis Kit“ nach Angaben des Herstellers (Bioline) durchgeführt. Die genutzten Primer sind in der Tabelle 4.2. aufgelistet. Mittels Kpn1-Restriktionsverdau wurde auf erfolgreiche Mutagenese getestet. Anschließend wurde das Su(z)2-Insert über EcoRI/XhoI in den pUAST Vektor kloniert, welcher nach Transformation in *E.coli* CH3blue amplifiziert und sequenziert wurde.

## 2.2.4 Verwendete Plasmide und Oligonukleotide

Die folgenden Tabellen zeigen eine Übersicht über die verwendeten Plasmide und Oligo-

nukleotide. Alle Oligonukleotide wurden von der TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin

**Tab.2.3:** Verwendete Plasmide

Name	Größe (bp)	Referenz
pGEM-T-Easy	3015	Promega GmbH, Mannheim
pUAST	9050	Brand und Kafatos (1993)

**Tab.2.4:** Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	
1	Bmi-1-sens -Xho	GAAATACAGAGTTTCGGCCACTCGAAAAAAG	Bmi-1-Primer
2	Bmi-1-rev-Xho	TTGTCTGAGACCAGATGAAGTTGCTG	
3	Bmi-1-ATG-sens	GCGGCATGCATCGAACAACCAG	
4	Bmi-1-Myc -not-sens	GGGCGGCCGCCATCGAACAACCAGAATC	
5	Bmi-1-kpn_rev;	GTCCGGTACCAGATGAAGTTGCTGATG	
6	MBmi-1-sense	GAAATGCATCGAACAACCAGAATCAAG	
7	MBmi-1-reverse	GTCCTAACCCAGATGAAGTTGCTG	
8	Bmi-1-N-F	CTACCTTTGAAATACAGAGTTGTCGACACT	
9	Bmi-1-N-R	CAAGTGTGACAACCTCTGTATTTCAAAGGT	
10	Bmi-1-N-ATG	CCTTTGAAATACAGAGTTATGCCAACTTG	
11	Psc-A-EcoRI-F	CTATGATGACGCCAGAATCGAAAGC	Psc-Primer
12	Psc-D-EcoRI-R	GACGACTCCTTCACTTGCTTTTGG	
13	Psc-C-BamHI-F	CGTGAGCACCCCTGAGTCC	
14	Psc-B-BamHI-R	CCGGTGATTCAACTTTCACCTTG	
15	Psc-B-KpnI-F	GGCACATGGCCGGGCATTG	
16	Psc-RT-sen	CGTCTTCAACGGCGACAACG	
17	Psc-A-KpnI-R	CGATTCCGAGCCTGAGTTGG	
18	Psc-D-HinII-F	GATCCTGCGGCTGATCGGG	
19	Psc-C-HinII-R	CGCTATCGATCACCATCTCT	
20	Psc-up-ATG_se	GATTGGATACAAAGATTGACGCTTGTGC	
21	PscCterm2Xho-r	CGTACTGTTGTTCTCGAGTGATCCTCCAC	
22	PscCterm1Xho-r	CGGGCAGGGACTCGAGTTCCACCTTCG	
23	PscNterm_Eco-s	CGAAGCTGGAACCTGAATTCATGCCCCG	
24	Psc_RING_H-A-r	CAACTGTGGCAGAAGGAGGCCAGACAC	
25	Psc_RING_H-A-s	GTGTCTGGCCTCCTTCTGCCACAGTTG	
26	Psc-stop-Xho-rev	GACTCTCGAGCTTGCTTTTGGTGGCCGGTG	
27	Psc-RING-HG-se	GTGCACGGGATCCTTCTGCCACAGTTG	
28	Psc-RING-HG-re	CAACTGTGGCAGAAGGATCCCGTGAC	
29	Psc Cterm RI-se	GAGCAACAGCTGGGAATTCAAATGGCGTCT	
30	Su(z)22intBse	GATAGCAAATACAGTCCCAATGCCTC	
31	Su(z)22reSTOP	TGGATCCGCACTTCATCTTCGGGAGCGAGG	
32	Su(z)22intBre	GCTGTGCCAGACTGCTGCTGGATCC	
33	Su(z)22ATGsen	GAATAGGCAGAAAGATGCACCTGC	
34	Su(z)2Spe-rev	CTTGACTAGTAGCGGAACCTGCCACCG	
35	Su(z)2Xho1058-se	CTCGAGTAAACGGGAAGCGGAACC	

36	Su(z)2Xho1644-re	CTCAGAGGAGTGCTTCTTCTTGCCTTG		
37	Su(z)2Xho-rev	GACTCGAGGGAACCTGCCACCGGAGCATTG		
38	Su(z)2H-A-rev	GCAACTCCGGCAATAGGTAGCATAACAG		
39	Su(z)2H-A-sense	CTGTTATGCTACCTATTGCCGGAGTTGC		
40	Su(z)2260NOT_sen	AGCGGCCGCCTTTGTCGCGGTTATATGATC		
41	Su(z)2270STOP_rev	TTAACCGCGACAAAGTCGGCACG		
42	Su(z)2NOT_sense	CAGCGGCCGCCACCTGCAAAACACGCACAA		
43	Su(z)2Cterm2Xho-r	GGTCCTCGAGTTTTGGCAGCACCAC		
44	Su(z)2Cterm1Xho-r	GACTCGAGGCGACGTACCGAATGCTC		
45	Su(z)2Nterm_Eco-s	GAGAATTCGTACGTCGCTCCATGTC		
46	Su(z)2_Ring_H-A-r	CCGGCAATAGGTAGCATAACAGTAATCC		
47	Su(z)2_Ring_H-A-s	GGATTACTGTTATGCTACCTATTGCCGG		
48	Su(z)2Ring-HG-sen	CTGTGGATTACTGTTATGGTACCTATTGCC		
49	Su(z)2Ring-HG-rev	GGCAATAGGTACCATAACAGTAATCCACAG		
50	Su(z)2-Hyb-F	GATGAGAACAACCTATCCAGGGTCGACCAG		
51	Su(z)2-Hyb-R	GCTCCTGGTTCAATGTCCTGGTCGACCCTGG		
52	Myc-Xho-Sense	CCTCGAGGGACGCGAACAAAAGTTGATTTC		Myc
53	Myc-Xba-rev	CGCGTCTAGAGTTCAAGTCTTCTTCTGAG		
54	GFPA-sen	GAATTCGGTACCAAGGAAGAACTTCACTGGG		GFP
55	GFPA-rev	CTTACTATTTGTATAGTTCATCCATG		

## 2.2.5 Verwendete Bakterienstämme

In der Tab.2.5. sind die verwendeten Bakterienstämme zusammengefasst.

**Tab.2.5:** Verwendete Bakterienstämme

Name	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> CH3blue	<i>mcrA<sup>-</sup>, mcrB<sup>-</sup>, mrr<sup>-</sup></i>	Bioline GmbH, Luckenwalde
XL1-Blue	<i>supE44, hsdR17, recA1, emdA1</i>	Stratagen. Group, Bremen

## 2.2.6 Geräte

PCR-Maschinen: Model: iCycler\_Thermal cycler, BIO-RAD

Mikroskope: Olympus SZH10 Research stereo

Olympus SD 30

Zeiss Axiovert 135

Zeiss Axiophot

Zeiss Stemi SV6

Delta Vision Spectris Optical Sectioning microscope (OSM)

Zentrifugen: Heraeus Biofuge fresco

Hettich Zentrifugen Mikro 200R

Heraeus Varifuge 3.0R

Wasserbäder: Julabo SW20 (73°C)

GFL Typ 1002 (37°C)

Pharmacia Biotech Multi temp III (4-16°C)

Brutschrank: Heraeus B12

Heizblöcke: Unitek HB-130 (37°C)

Bioblock scientific (95-100°C)

HLC Blockthermostat BT 1301 (42-65°C)

Schüttelinkubator: Innova 4000 Incubator shaker

## **2.3 Arbeiten mit Proteinen**

### **2.3.1 Western Blot Analyse an Histonmodifikationen in Abhängigkeit von Su(z)2, Psc und Bmi-1**

Zur Untersuchung der PcG-abhängigen Histonmodifikation wurden Flügelimaginalscheiben der dritten Larve der entsprechenden Genotypen in PBS feinpräpariert und in eisgekühlten PBS gesammelt. Die Scheiben wurden gezählt und mit einem Wolframdraht in PBS überführt. Danach folgte ein einmaliges Waschen in 1ml PBS und eine Zentrifugation bei 4°C und 4000rpm für 1 Min. Die Scheiben wurden mit 2xSDS-Probenpuffer versetzt und für 10 Min. im Heizblock bei 100°C aufgekocht. Die Proben wurden entweder direkt auf ein Gel aufgetragen oder bei -20°C eingefroren. Für diesen Versuch wurden 10%ige SDS-Gele verwendet und die Auftrennung erfolgte bei 70-80V für 3,5-4Std.

### **2.3.2 SDS-PAGE**

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli et al. 1970) auf einem 10%-15%igem Polyacrylamidgel bei 80V für 3Std. Als Marker wurde der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus #SM1811* (MBI Fermentas) verwendet.

### 2.3.3 Western Blot

Der Western Blot erfolgte in einem Wetblot-Tank von BioRad für 3Std. bei 4°C und 125V unter Verwendung einer PVDF-Membran (Millipore), die mit 99%igem Methanol aktiviert wurde. Die Membran wurde nach dem Transfer kurz mit PBT gewaschen und jeweils für 1Std. in 1% BSA geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper über Nacht bei 4°C (in 1%iger Magermilch, PBT). Darauf folgten drei Waschschrte der Membran für jeweils 10 Min. in PBS. Der 2. Antikörper wurde zugegeben und für mindestens 2 Std. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 10 Min. wurde die Membran einmal in NBT-Puffer für jeweils 20 Min. äquibriert. Zur Detektion der Proteine wurde in frischer NBT-Substratlösung (NBT-BCIP Färbepuffer) entwickeln, wobei die Färbung nach ca. 10 Min. mit Wasser abgebrochen wurde und die Membran an der Luft getrocknet wurde.

**Tab.2.6:** Verwendete Lösungen für Proteingele und Western Blot.

10%iger Trenngel	Menge
H <sub>2</sub> O	2,3ml
Acrylamid	1,67ml
2M Tris pH 8.8	0.94ml
20%iger SDS	25µl
10%iger APS	50µl
TEMED	3µl

Sammelgel	Menge
H <sub>2</sub> O	2.05ml
Acrylamid	0.5 ml
1M Tris pH 6.8	0.375ml
20%iger SDS	15µl
10%iger APS	30µl
TEMED	3µl

10x E-Puffer	Menge
Tris	0,25 M
Glycin	2,5M
SDS	1%iger

Transferpuffer für 1 Liter	Menge
Tris	3g
Glycin	14,4g
Methanol	20%iger

NBT-Puffer	Menge
1M Tris-HCl, pH9.5	10 ml
5M NaCl	100 ml
1M MgCl <sub>2</sub>	10 ml
Mit Reinst-H <sub>2</sub> O auffüllen	bis 1 Liter

NBT-Substratlösung	Menge
Z.B. NBT-Puffer	20 ml
NBT	20 µl
BCIP	16 µl

**Tab. 2.7:** Die für die Western Blot verwendeten primären Antikörper.

Antigen	Wirt	Typ	Verdünnung	Quelle
Myc (9E10)	Maus	monoclonal	Unverdünnt	Prof.H.Saumweber
H2A	Maus	monoclonal	Unverdünnt	Prof.H.Saumweber
Lam	Maus	monoclonal	Unverdünnt	Prof.H.Saumweber

**Tab. 2.8:** Die für die Western Blot verwendeten sekundären Antikörper.

Antigen	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Quelle
anti-Maus-AP	Ziege	Alkalische Phosphatase	1:2000	Jackson GmbH, USA

**Tab. 2.9:** In verschiedenen Experimenten verwendete Standardpuffer.

Puffer	Menge
Phosphate-buffered saline (PBS)	137mM NaCl 27mM KCl 12mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,76mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5
PBT	PBS+ 0,1%iger Tween-20
Tris-Acetat-EDTA (TAE)	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA

## 2.4 Histochemische Methoden

### 2.4.1 Fixierung und Immunofärbungen von Imaginalscheiben

Larven des 3. Stadiums wurden in PBS präpariert und die Flügelimaginalscheiben mit Gehirn und Mundhaken in 4%igem Paraformaldehyd in PBS für 30 Min. bei RT fixiert. Danach wurden die Scheiben dreimal für je 15 Min. in PBT gewaschen. Nach der Fixierung wurden die Scheiben in 5%igem Ziegen-Serum unter leichtem Schütteln für 1 Stunde geblockt. Die Inkubationszeit des Primärantikörpers (s. u.) betrug bei leichtem Schütteln entweder 2-3 Stunden bei RT oder erfolgte über Nacht bei 4°C. Es folgten 4 Waschschrte zu je 15 Min. in PBT. Anschließend wurden die Scheiben für ca. 2 Stunden bei RT mit dem zweiten Fluoreszenzantikörper sowie DAPI (0,1µg/ml) gefärbt.

**Tab. 2.10:** In dieser Arbeit verwendete primär und sekundär Antikörper.

Antigen	Wirt	Typ	Verdünnung	Quelle
Su(z)2	Kaninchen	monoklonal	1:200	Prof.A.Klebes
Psc, 6E8	Maus	monoklonal	unverdünnt	Hybridome Center
H3S10p	Kaninchen	polyclonal	1:20	Abcam.GmbH, Berlin
Abd-B	Maus	monoklonal	unverdünnt	Hybrid GmbH
Caspase	Rabbit	polyclonal	1:200	Cell Signaling
Engrailed/invected	Maus	monoklonal	unverdünnt	Hybridoma
GFP	Kaninchen	polyclonal	1:300	Rockland
GFP	Maus	monoklonal	1:200	Invitrogen, Karlsruhe
Myc (9e-10)	Maus	monoklonal	unverdünnt	Prof.H.Saumweber
β-Galactosidase	Kaninchen	polyclonal	1:200	Cappel:MP
Ziege-α-Kaninchen-Cy2	Ziege	polyclonal	1:500	Jackson GmbH, USA
Ziege-α-Maus-Cy3	Ziege	polyclonal	1:300	Jackson GmbH, USA
Alexa Fluor 555 α-Maus	Ziege	polyclonal	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 555 α-Rabbit	Ziege	polyclonal	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 α-Maus	Ziege	polyclonal	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 α-Rabbit	Ziege	polyclonal	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.4.2 Feinpräparation der Imaginalscheiben und Fluoreszenzmikroskopie

Nach der Fluoreszenzmarkierung der Imaginalscheiben wurden diese in Glycerinpropylgalat (4% Propylgalat, 10% PBS, 90% Glycerin) überführt und anschließend mit Pinzetten und

Wolframdraht feinpräpariert und auf Objektträgern eingedeckelt. Anschließend wurden die Scheiben unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### **2.4.3 Präparation adulter Flügel**

Zur Auswertung der adulten Flügelphänotypen, wurden die Flügel vorsichtig mit einer Pinzette abgezupft und auf einen Objektträger mit 100%igem Isopropanol gegeben. Nach fast vollständigem Abdampfen des Isopropanols wurden die Flügel unter Vermeidung von Blasenbildung in Hoyersmedium eingedeckelt und über Nacht bei 65°C inkubiert.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Komplementationsanalyse und phänotypische Analyse der beiden PcG Gene *Psc* und *Su(z)2*

#### 3.1.1 Genetische Charakterisierung rekombinanter *Su(z)2* und *Psc* Stämme

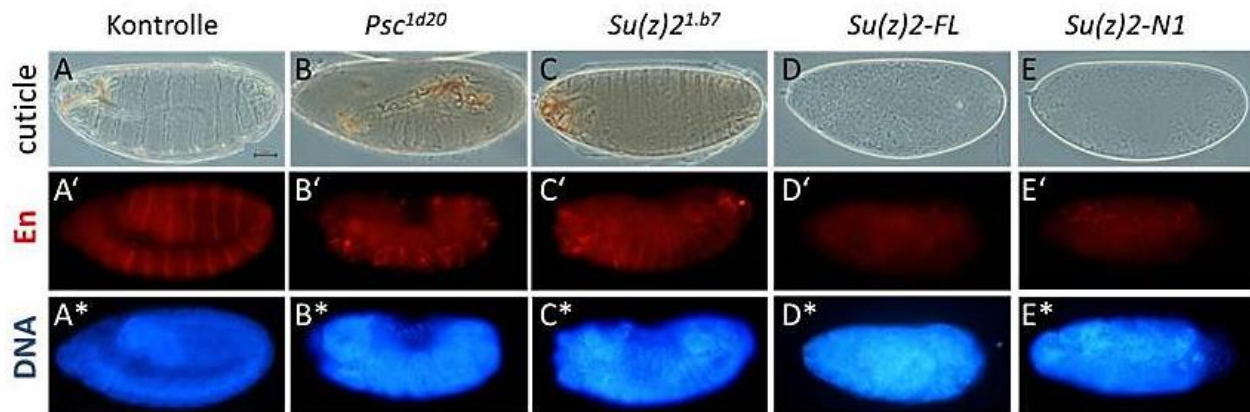
Zur Erzeugung homozygot mutanter *Su(z)2* Zellklone in der Flügelentwicklung wurde in vorangegangenen Arbeiten das mutante *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Allel auf ein Chromosom mit einem Flippase Recognition Target (FRT) Transgen in der zytologischen Position 42D rekombiniert. Da dieses Chromosom bislang nicht näher charakterisiert war, wurde zunächst eine Komplementationsanalyse mit anderen mutanten *Su(z)2* und *Psc* Allelen durchgeführt. Ebenso wurde der zur Erzeugung homozygot mutanter *Psc* Zellklone verwendete *FRT42D, Psc<sup>1d20</sup>* Rekombinationsstamm (Brunk et al., 1991) durch Komplementationsanalyse genetisch charakterisiert. Das *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Allel auf dem *FRT42D* Rekombinationschromosom komplementiert keine der getesteten anderen mutante *Su(z)2* Allele. Mutante *Psc* Allele werden jedoch komplementiert. Gleichmaßen verhält sich der *FRT42D, Psc<sup>1d20</sup>* Stamm allelisch zu *Psc*, nicht aber zu *Su(z)2* mutanten Allelen. Somit konnte genetisch gezeigt werden, dass beide verwendeten Stämme jeweils mutante Allele nur eines der beiden PcG Gene, *Su(z)2* oder *Psc*, darstellen und sich durch Mutationen in dem jeweils anderen Gen komplementieren lassen.

Für das *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Allel gibt es in der Datenbank ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)) unterschiedliche Beschreibungen. So wird es als Deletion, die 2kb oder 3,5kb genomische Sequenz unmittelbar stromabwärts des Promoters entfernt, beschrieben. Eine Studentin in der Arbeitsgruppe (Burcu Vitrinel) hat parallel zu dieser Arbeit das *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* mutante Allel molekular charakterisiert und durch Sequenzierung eine 3,5kb Deletion detektiert, die acht Basenpaare stromabwärts der TATA-box die ersten 3 ½ Exons und dazwischenliegende intronische Sequenzen entfernt. Zusätzlich finden sich in dem *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Allel eine vier Basen Insertion (TTCT) im Bruchpunkt (B.V. persönliche Mitteilung, Emmons et al., 2009) und Punktmutationen, wie z.B. eine Nonsense-Mutation des Lysin Codons in Position 284 (K284\*). Letztere hat ihren Ursprung in dem *Su(z)2<sup>1</sup>*

Allele, das als Ausgang für die Mutagenese gedient hat, aus der das *1.b7* Allel hervorgegangen ist (Wu und Howe, 1995; Emmons et al., 2009). Aufgrund der weiterhin vorhandenen TATA-box kann davon ausgegangen werden, dass das *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Allel transkriptionskompetent ist. Allerdings wird durch die beschriebenen Läsionen das Methionin-Startcodon und essentielle Bereiche der Homology Region (HR) entfernt, so dass es sich bei dem *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Allel um ein Nuallelale handeln dürfte.

### 3.1.2 *Psc* und *Su(z)2* sind essentielle Gene

Homozygot mutante *Psc<sup>1d20</sup>* Tiere sterben im Verlauf der Embryonalentwicklung und weisen morphologische Defekte auf. So zeigt z.B. eine DNA- und Immunfärbung gegen das Segmentpolaritätsgen *Invected/Engrailed* (*Inv/En*, von hieran als *En* bezeichnet) Defekte im Keimstreif und Kopfbereich (Abbildung 3.1). Diese Embryonen sterben gegen Ende der Embryogenese, nachdem bereits Kutikula sekretiert wurde, so dass sich in der Kutikulapräparation die Kopfdefekte im Fehlen anteriorer Kutikulastrukturen manifestieren. Die anterior und dorsal offene Kutikula zeigt regelmäßig Störungen des ventralen Zähnchenmusters und zusätzlichen in variabler Position und Ausprägung auftretenden Fehlbildungen und Sklerotisierungen.



**Abbildung 3.1. *Psc* und *Su(z)2* Funktionsverlust und Überexpression verursachen embryonale Letalität.** A. – E. Kutikulapräparation; A' – E' Anti-Inv/En-Immunfärbung (rot); A\* – E\* DNA-Färbung (DAPI, blau). A, A' und A\* Kontrollembryo; A. mit normal strukturierter Kutikula; A' den charakteristischen 14 Inv/En Streifen und A\* normal ausgebildeten Kopfbereich und gestrecktem Keimstreif. B, B' und B\* Homozygote *Psc*<sup>1d20</sup> Embryonen. B' Anterior und dorsal offene Kutikula mit sklerotisierten (braun) Bereichen. B' Gestörtes Engrailed Muster und B\* morphologische Defekte im Kopfbereich. C, C' und C\* Homozygote *Su(z)2*<sup>1.b7</sup> Embryonen. C. Die Kutikula ist besonders ventral (Zähnenbänder) wenig strukturiert und zeigt Defekte und sklerotisierte Stellen im Kopfbereich. C' und C\* Gestörtes En-Muster mit nur wenigen En-positiven Zellen und morphologischen Defekten im Kopfbereich. D, D' und D\* Überexpression von *Su(z)2*-FL-Myc mit da-Gal4 führt zum Absterben der Embryonen bevor sich eine strukturierte Kutikula ausbilden kann. D. Entsprechend ist in den Präparaten keine zusammenhängende Kutikula und, D' keine En-positiven Zellen zu finden. D\* Die DNA-Färbung zeigt morphologisch ungeordnete Zellen, die scheinbar keinen epithelialen Verband bilden. E, E' und E\* Überexpression von *Su(z)2*-N1-Myc mit da-Gal4 zeigt die gleichen Defekte wie *Su(z)2*-FL-Myc (D, D' und D\*). Anterior links, dorsal oben. Der Embryo in A' und A\* ist etwas jünger als die übrigen Embryonen der Immunfärbung.

Auch homozygote *Su(z)2*<sup>1.b7</sup> Tiere sterben während der Embryogenese oder in frühen larvalen Stadien, wobei in En-Immunfärbungen und Kutikulapräparationen ähnliche Defekte wie bei *Psc* mutanten Tieren zu beobachten sind, die jedoch in der Regel in ihrer Ausprägung milder ausfallen (Abbildung 3.1). Häufig finden sich Kutikulapräparate, die bis auf Defekte im Kopfbereich normal strukturiert sind. Zusammenfassend zeigt die embryonale Letalität, dass beide Gene essentielle Funktionen ausüben. Fällt jeweils eine Funktion aus, treten gegen Ende der Embryogenese morphologische Defekte auf, die jeweils besonders den Kopfbereich betreffen und für *Psc* in der Regel etwas gravierender ausfallen.

### 3.1.3 Phänotypische Effekte von *Su(z)2/Psc* einzel- und doppelmutanten Zellklonen in der Imaginalscheibenentwicklung

Entgegen der essentiellen Funktionen von *Psc* und *Su(z)2* in der frühen Entwicklung, zeigen diese in der Imaginalscheibenentwicklung partiell redundante Wirkung. Dementsprechend sind für

homozygot einzelmutante Zellklone dieser beiden Gene in Imaginalscheiben keine offensichtliche Defekte beschrieben worden (Beuchle et al., 2001). Dahingegen lassen sich in homozygoten *Su(z)2/Psc* doppelmutanten Zellklonen in Imaginalscheiben deutliche Defekte, wie z.B. die Deregulation homöotischer und anderer Zielgene und morphologische Defekte, insbesondere eine massive Überproliferation beobachten (Abbildung 3.7; Beuchle et al., 2001; Classen et al., 2009, King et al., 2005). Während meiner Arbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe beobachtet, dass auch *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* einzelmutante Zellklone zu morphologischen Defekten und Überproliferation führen (A. Klebes, unveröffentlicht). Diese Effekte zeigen sich allerdings nur, wenn zwischen Induktion der mitotischen Rekombination zur Erzeugung der homozygot mutanten Zellklone und deren Analyse genug Zeit liegt (ca. acht Tage). Um die Funktion von *Psc* und *Su(z)2* in Imaginalscheiben eingehend zu dokumentieren, wurden in dieser Arbeit *Psc*-, bzw. *Su(z)2*-einzelmutante Zellklone mit *Su(z)2/Psc*-doppelmutanten Zellklone verglichen. Zur Analyse der Zellklone wurde neben der morphologischen Betrachtung immunohistochemische Färbungen an Flügelimaginalscheiben durchgeführt. Hierbei wurden jeweils zwei Zeitpunkte miteinander verglichen; ein früher Zeitpunkt (vier Tage nach Induktion der Klone) und ein später Zeitpunkt (neun Tage nach Induktion). Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit A. Klebes und B. Vitrinel durchgeführt.

### 3.1.4 Effekte des *Psc*-Funktionsverlusts in einzelmutanten Zellklonen

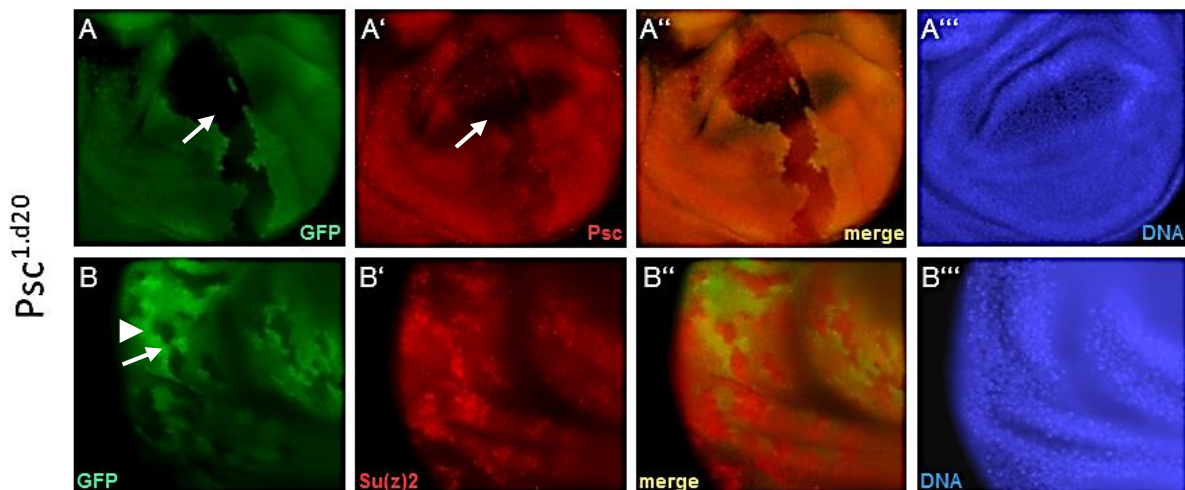
Zunächst wurden Zellklone des *Psc<sup>1.d20</sup>* Funktionsverlustallels (Wu und Howe, 1995) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Entwicklungsdauer der Larven normal ist. Fünf Tage nach Induktion der mitotischen Rekombination, die beim Übergang vom ersten zum zweiten Larvenstadium (L1-L2, 24-48h nach Eiablage) erfolgte, war die Larvalentwicklung in den allermeisten Individuen bereits beendet. Es fanden sich nur noch vereinzelt ‚Nachzügler‘-Larven des dritten Stadiums (L3), während die übrigen Tiere bereits verpuppt waren. Dieser Zeitverlauf entspricht der normalen Entwicklung unter diesen Bedingungen, wie ihn z.B. auch Kontrolltiere (*hs-flp; FRT 42D, ubi-GFP/CyO*) zeigen. Die Erzeugung homozygot mutanter *Psc<sup>1.d20</sup>* Zellklone führt demnach zu keiner Entwicklungsverzögerung, weshalb für diesen Genotyp lediglich Larven vier Tagen nach Induktion untersucht wurden.

### 3.1.4.1 Morphologische Effekte

Die *Psc* einzelmutanten Zellklone weisen eine normale Erscheinung mit ausgefranzten Rändern auf (Abbildung 3.2 A und B). Auch die Morphologie der gesamten Flügelimaginalscheiben ist normal, ohne offensichtliche Defekte oder Größenveränderung.

### 3.1.4.2 Proteinmengen von *Psc* und *Su(z)2*

Mittels immunohistochemischer Analyse wurde überprüft, ob in einzelmutanten *Psc* Zellklonen eine Reduktion der Proteinmengen nachzuweisen ist. Der Erwartung entsprechend ist die *Psc* Proteinkonzentration in den homozygot mutanten Zellen reduziert (Abbildung 3.2 A'). Die Immunfärbung gegen das *Su(z)2* Protein zeigte dahingegen, dass die *Su(z)2* Proteinmenge in *Psc<sup>1.d20</sup>*-mutanten Zellen erhöht ist (Abbildung 3.2 B'). Diese Ergebnisse zeigen, dass der homozygote Zustand des *Psc<sup>1.d20</sup>* Funktionsverlustallels nach einigen Zellteilungen zur Reduktion der *Psc* Proteinmenge führt und gleichzeitig mit einem Anstieg der *Su(z)2* Proteinmenge verbunden ist.



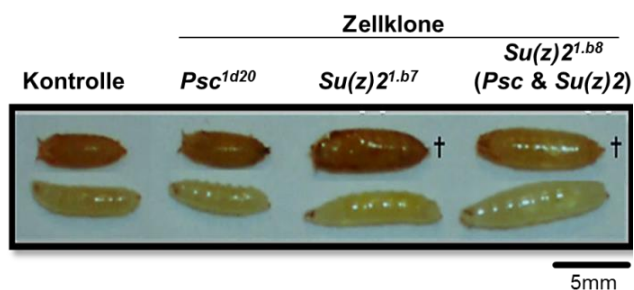
**Abbildung 3.2.** In einzelmutanten *Psc* Zellklonen ist die Proteinmenge von *Psc* reduziert und von *Su(z)2* erhöht. Ausschnitte aus zwei Flügelimaginalscheiben mit homozygoten *Psc<sup>1.d20</sup>* einzelmutanten Zellklonen. **A** Die Abwesenheit des GFP Signals (grün, Pfeil) markiert die Zellklone. **A'**  $\alpha$ -*Psc*-Antikörperfärbung (rot) zeigt reduziertes Signal in den Zellklonen (Pfeil). **A''** Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz. **A'''** Kontrollfärbung der DNA mit DAPI. **B**  $\alpha$ -GFP Immunfärbung (grün) zeigt viele kleine Zellklone (z.B. Pfeil). **B'**  $\alpha$ -*Su(z)2*-Antikörperfärbung (rot). Die gegenüber den umliegenden heterozygoten (mittelstarkes GFP Signal in A) oder homozygoten Kontrollzellen der Zwillingklone (starkes GFP Signal in A, Pfeilkopf) intensivere Rotfärbung in den mutanten Zellklonen deutet auf höhere *Su(z)2*-Proteinmengen hin. **B''** Überlagerung der grünen und roten Signale. **B'''** Kontrollfärbung mit DAPI.

### 3.1.4.3 Effekte auf die Zielgene *Abd-B* und *en*

Flügelimaginalscheiben sind Strukturen des zweiten thorakalen Segments (T2), in dem die Expression von *Abd-B* unterdrückt ist. Immunfärbungen an *Psc* einzelmutanten Zellklonen zeigten, dass der Funktionsverlust von *Psc* nicht ausreichend ist, um diese Repression aufzuheben (Abbildung 3.2). Ebenso bleibt *en* in den anterioren (A) Zellen der Flügelimaginalscheibe in *Psc* einzelmutanten Zellen weiterhin reprimiert. Im posterioren (P) Kompartiment ist keine Veränderung der *en*-Expression zu erkennen. Diese zwei Beispiele lassen vermuten, dass der Funktionsverlust von *Psc* alleine nicht ausreichend ist, um die Repression von PcG Zielgenen aufzuheben.

### 3.1.5 Effekte des *Su(z)2*-Funktionsverlusts in einzelmutanten Zellklonen

Wie eingangs beschrieben (vgl. 3.1.) wurden erst kürzlich in unserer Arbeitsgruppe erstmals morphologische Defekte und Überproliferation in Imaginalscheiben mit *Su(z)2*<sup>1.b7</sup> einzelmutanten Zellklonen beschrieben. Diese Defekte sind in ihrem Ausmaß nicht so gravierend wie im Fall von *Su(z)2/Psc* doppelmutanten Zellklonen. In beiden Fällen ist die Larvalentwicklung verzögert und nur wenige Tiere erreichen das Puppenstadium ca. 9-13 Tage nach Eiablage. Sowohl die gesamte Larve, wie auch die Imaginalscheiben sind gegen Ende der Larvalentwicklung deutlich vergrößert (Abbildung 3.3).



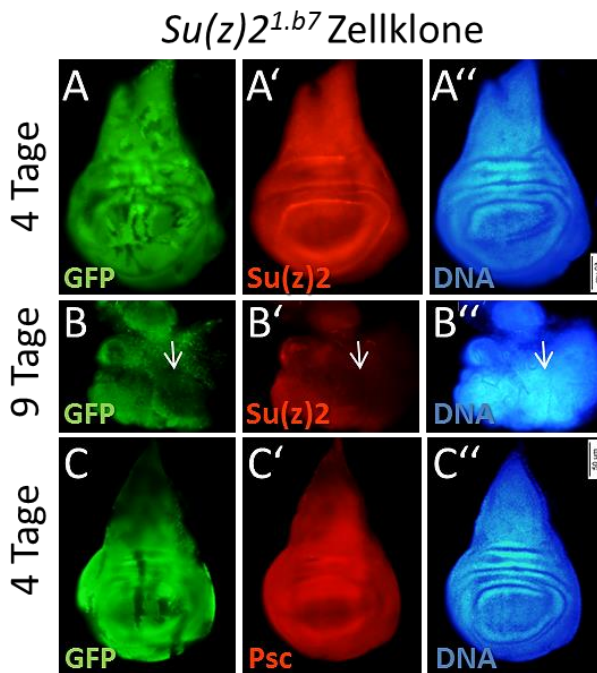
**Abbildung 3.3. *Su(z)2* Funktionsverlust verlängert die Entwicklungszeit und verursacht Größenzunahme von Larven und Puppen.** Kontrolltiere (*hs-flp; FRT42D, ubi-GFP; CyO*) zeigen normale Größe von Puppen und Wanderlarven im dritten Larvalstadium, das 3-4 Tage dauert. Die Induktion homozygoter *Psc*<sup>1d20</sup> Zellklone hat keinen Effekt auf Größe und Entwicklungsdauer. Einzelmutante *Su(z)2*<sup>1.b7</sup> und *Su(z)2/Psc*-doppelmutante Zellklone (*Su(z)2*<sup>1.b8</sup>) führen nahezu zur Verdopplung der Größe und Entwicklungszeit ( $\geq 9$  Tage).

### 3.1.5.1 Morphologische Effekte

Flügelimaginalscheiben mit  $Su(z)2^{1.b7}$  homozygot einzelmutanten Zellklonen weisen am Ende der Larvalentwicklung morphologische Defekte auf und sind deutlich größer als normale Scheiben (Abbildung 3.4). Eine Zuordnung einzelner Bereiche zu Flügel-, Gelenk- und Notumanlagen oder zu den A und P Kompartimenten lässt sich nicht mehr einfach vornehmen. Ebenso wie im Fall von  $Su(z)2/Psc$  doppelmutanten Zellklonen scheint die Zelladhäsion verändert zu sein. In vielen Bereichen sind das normalerweise einschichtige peripodiale- und kolumnare Epithel mehrschichtig. Zellgruppen bilden kugelförmige Aggregate und tendieren dazu, sich aus dem epithelialen Verband herauszulösen.

### 3.1.5.2 Proteinmengen von Psc und Su(z)2

In der anti- $Su(z)2$ -Immunfärbung von Flügelimaginalscheiben mit homozygoten einzelmutanten  $Su(z)2^{1.b7}$  Zellklonen zeigt sich, dass die  $Su(z)2$  Proteinmenge progressiv abnimmt (Abbildung 3.4). In diesen Färbungen ist in homozygot mutanten Zellen im Vergleich zu heterozygot mutanten Zellen oder Zellen mit zwei wildtypischen  $Su(z)2$  Kopien vier Tage nach Induktion der mitotischen Rekombination lediglich eine schwache Reduktion der  $Su(z)2$  Proteinmenge nachzuweisen. Dieser Effekt wird neun Tage nach Induktion der Rekombination noch deutlicher (Abbildung 3.4). Diese Beobachtungen legen nahe, dass das  $Su(z)2$  Protein in genotypisch homozygot mutanten  $Su(z)2$  Zellen relativ stabil ist. Dies ist auch unter Berücksichtigung der erhöhten mitotischen Aktivität dieser Zellen, die in einer deutlichen Größenzunahme der Imaginalscheiben resultiert, besonders bemerkenswert, da auch die Halbierung der Proteinmenge in jedem Teilungszyklus nicht zu einer deutlichen Reduktion der durch Immunfärbung nachweisbaren Proteinmenge führt.



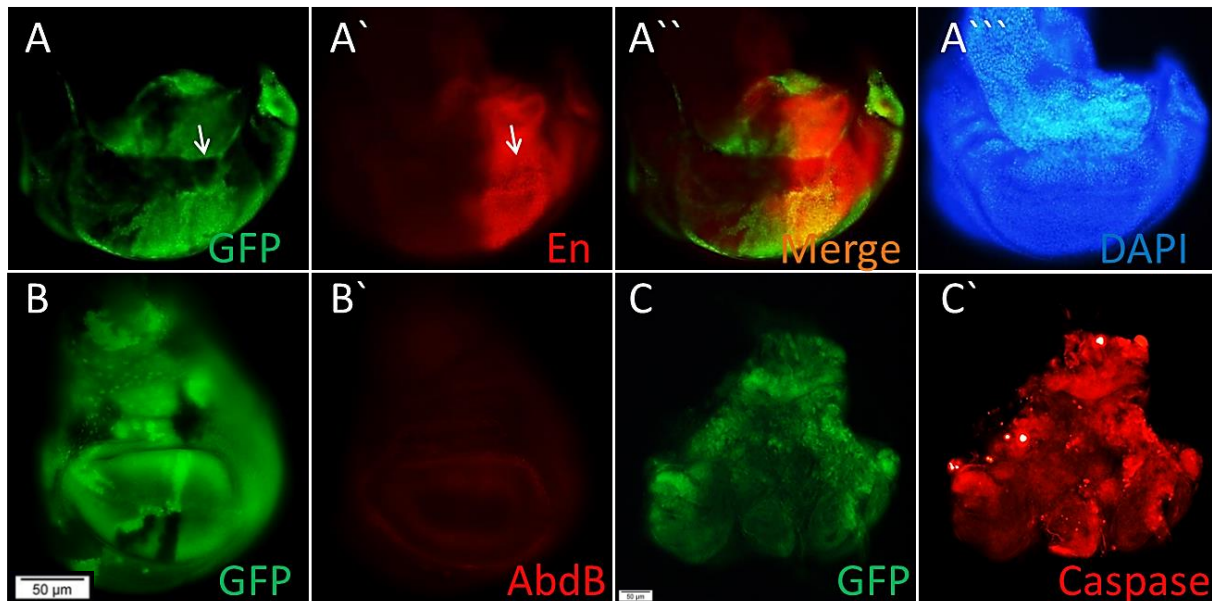
**Abbildung 3.4.** In einzelmutanten *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Zellklonen ist endogenes *Su(z)2* Protein stabil. **A., B., C.** Homozygote *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Zellklone werden durch die Abwesenheit des GFP-Signals (dunkle Flecken, z.B. Pfeil in B) markiert. **A'** In den mutanten Zellklonen ist vier Tagen nach Induktion kaum Reduktion der *Su(z)2* Proteinmengen festzustellen. **A''** Die Klone zeigen wenig Auswirkung auf die Morphologie der Imaginalscheibe. **B'** Neun Tage nach Induktion ist eine Abnahme der *Su(z)2* Proteinmenge zu erkennen (Pfeil). **B''** Morphologische Auffälligkeiten, die sich besonders im Abrunden von Zellgruppen (Pfeil) und Größenzunahme (Vergrößerung in B'' ist um den Faktor zwei geringer als in A'' und C'') zeigen. **C'** Die anti-Psc-Färbung zeigt keine Reduktion der Psc Proteinmengen. Auch in älteren Imaginalscheiben wurde kein Einfluss auf Psc festgestellt (nicht gezeigt).

Im Gegensatz zur moderaten Verminderung der *Su(z)2* Proteinmenge lässt sich in homozygot mutanten *Su(z)2* Zellklonen keine Veränderung der Psc Proteinmenge detektieren (Abbildung 3.4). Selbst wenn man berücksichtigt, dass die *Psc* Expression möglicherweise durch PREs und dementsprechend durch PcG Faktoren wie z.B. *Su(z)2* reguliert wird, scheint die leichte Reduktion der *Su(z)2* Proteinmenge in diesen homozygot mutanten *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Zellen nicht ausreichend zu sein, um die PcG-abhängige Dämpfung der *Psc* Expression zu überwinden.

### 3.1.5.3 Effekte auf die Zielgene *Abd-B* und *en* und Apoptose

Immunfärbungen für die beiden PcG Zielgene *en* und *Abd-B* zeigen nach *Su(z)2* Funktionsverlust keine ektopische Expression in Zellen, in denen sie normalerweise durch PcG unterdrückt werden; für *en* also im A Kompartiment und für *Abd-B* in der gesamten Flügelimaginalscheibe (Abbildung 3.5). In *Psc<sup>1.d20</sup>* einzelmutanten Zellklonen wurde ebenfalls keine Fehlregulation von *Abd-B* beobachtet (nicht gezeigt).





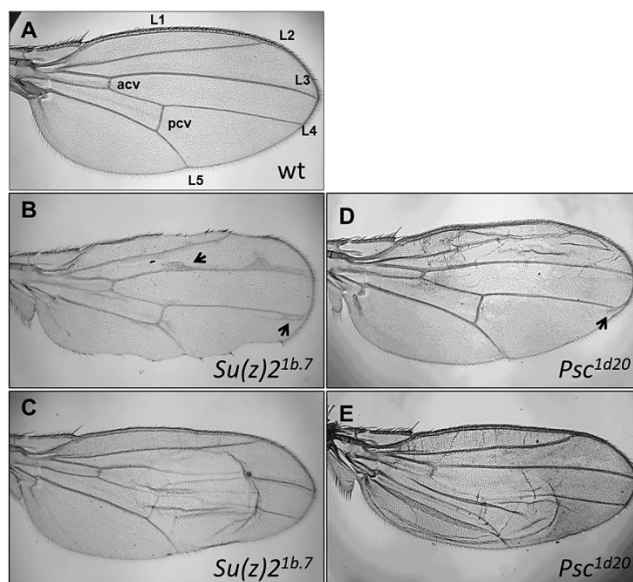
**Abbildung 3.5.** Einzelmutante *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Zellklone verursachen keine Deregulation von PcG Zielgenen. **A. – A'''** Markierung der Klone wie in Abbildung 3.4. Die *en* Expression im P Kompartiment ist nicht verändert (A' und A''). **A'''** Die DNA-Färbung zeigt das Überwachsen der Imaginalscheibe. **B. – B'** In homozygot mutanten *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Zellen wird kein *Abd-B* induziert. **C. – C'** Die Imaginalscheibe mit älteren Zellklonen (9 Tage) als in A. und B. ist deformiert und ungefähr doppelt so groß wie die Scheiben in A und B. Die Immunfärbung mit anti-aktivierte Caspase 3 zeigt viele Zellen in Apoptose.

Der Funktionsverlust von *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* führt neben einer ausgeprägten Überproliferation, die sich in der Größenzunahme der Imaginalscheiben äußert, gleichzeitig zum Anstieg der Rate apoptotischer Zellen (Abbildung 3.5).

Zusammen zeigen diese Beobachtungen, dass das *Su(z)2* Protein relativ stabil ist und durch den Funktionsverlust in homozygot mutanten Zellen lediglich Teilaspekte des *Su(z)2/Psc* doppelmutanten Phänotyps (s. unten) auftreten. Dies sind insbesondere eine verlängerte Lebensdauer der Larve und Letalität beim Übergang in des Puppenstadium sowie Überproliferation der Zellen. In diesen Imaginalscheiben lässt sich auch ein verstärktes Maß an Zellen in Apoptose nachweisen. Andere Aspekte wie die Fehlregulation von Zielgenen lassen sich hingegen in dieser einzelmutanten Situation nicht beobachten, was möglicherweise mit der Stabilität des *Su(z)2* Proteins auch in genetisch homozygot mutanten Zellen zusammenhängen könnte.

### 3.1.6 Sowohl *Su(z)2* als auch *Psc* sind für die Flügelentwicklung wichtig

Adulte Flügel mit nicht-markierten *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* Zellklonen, die im zweiten Larvenstadium induziert wurden, zeigen variable Effekte, was auch der zufälligen Position der Zellklone entspricht. In einigen Flügeln ist der Flügelrand betroffen und weist Lücken auf (Abbildung 3.6 B). Häufig finden sich Verdickungen und Auswüchse der Flügelvenen. Gelegentlich sind auch Blasen zwischen den dorsalen und ventralen Flügelblättern zu erkennen (Abbildung 3.6 C). In Flügeln mit homozygot mutanten *Psc<sup>1d20</sup>* Zellklonen sind die Effekte etwas milder. Es treten häufig Blasen auf und ektopische Venenbildung ist seltener zu beobachten als nach *Su(z)2* Funktionsverlust (Abbildung 3.6 D und E).



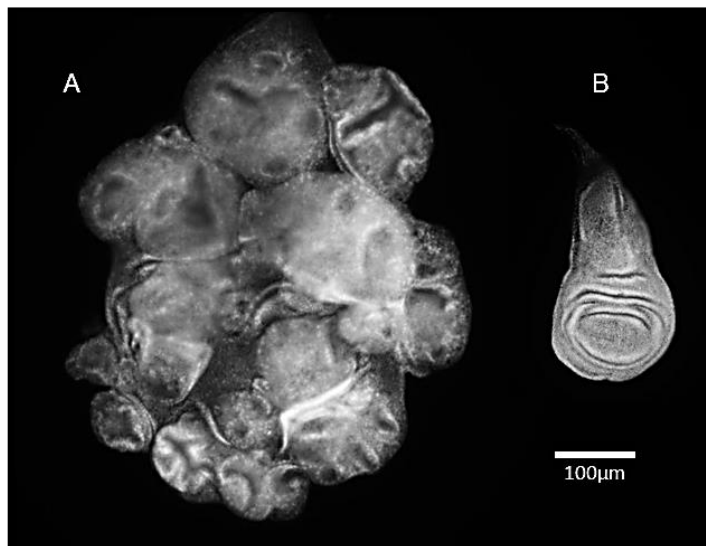
**Abbildung 3.6. Einzelmutante Zellklone von *Su(z)2* und *Psc* führen zu morphologischen Defekten in adulten Flügeln.** **A.** Kontrollflügel. Anterior oben, proximal links; L1-5 – Longitudinalvenen 1-5; acv – anteriore Quervene, pcv – posteriore Quervene. **B.** und **C.** Zwei Beispiele von Flügeln mit *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* homozygot mutanten Zellklonen. Die Position der Klone ist nicht markiert. Es zeigen sich Defekte des Flügelrands, Auswüchse und Fehlbildungen der Flügelvenen (Pfeile in **B**) sowie Blasenbildung zwischen den dorsalen und ventralen Flügelblättern (**C**). **D.** und **E.** Zwei Beispiele von Flügeln mit *Psc<sup>1d20</sup>* homozygot mutanten Zellklonen. Neben häufig auftretender Blasenbildung sind auch Fehlbildungen der Venen (Pfeil in **D**) zu beobachten. Insgesamt sind die Defekte für *Psc* schwächer als für *Su(z)2*.

### 3.1.7 Effekte des *Psc*- und *Su(z)2*-Funktionsverlusts in doppelmutanten Zellklonen

Doppelmutante *Su(z)2/Psc* Zellklone wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Classen et al., 2009, Beuchle et al., 2001, King et al., 2005).

### 3.1.7.1 Morphologische Effekte

Wie auch in (Abbildung 3.3) gezeigt, führt der simultane Funktionsverlust des *Df(2R)Su(z)2<sup>1.b8</sup>* Allels, bei dem beide Gene, *Psc* und *Su(z)2*, entfernt werden, zur Entwicklungsverzögerung, insbesondere im dritten Larvalstadium, larvaler oder puppaler Letalität, die mit Größenzunahme der gesamten Larve (Abbildung 3.3), dramatischer Überproliferation und morphologischen Defekten der betroffenen Imaginalscheiben verbunden ist (Abbildung 3.7). Hierbei sind die mutanten Zellen bestrebt, den Kontakt zu heterozygoten oder wildtypischen Zellen zu minimieren, was zur Abrundung der Klone und zur Segregation der klonalen Zellgruppen aus dem Epithel führt. Diese Verhalten führt zu gravierender morphologischer Umorganisation und erinnert im Ausmaß der Überproliferation und der Auflösung des epithelialen Verbands an metastasierende Tumore (Abbildung 3.7, Oktaba et al., 2008).

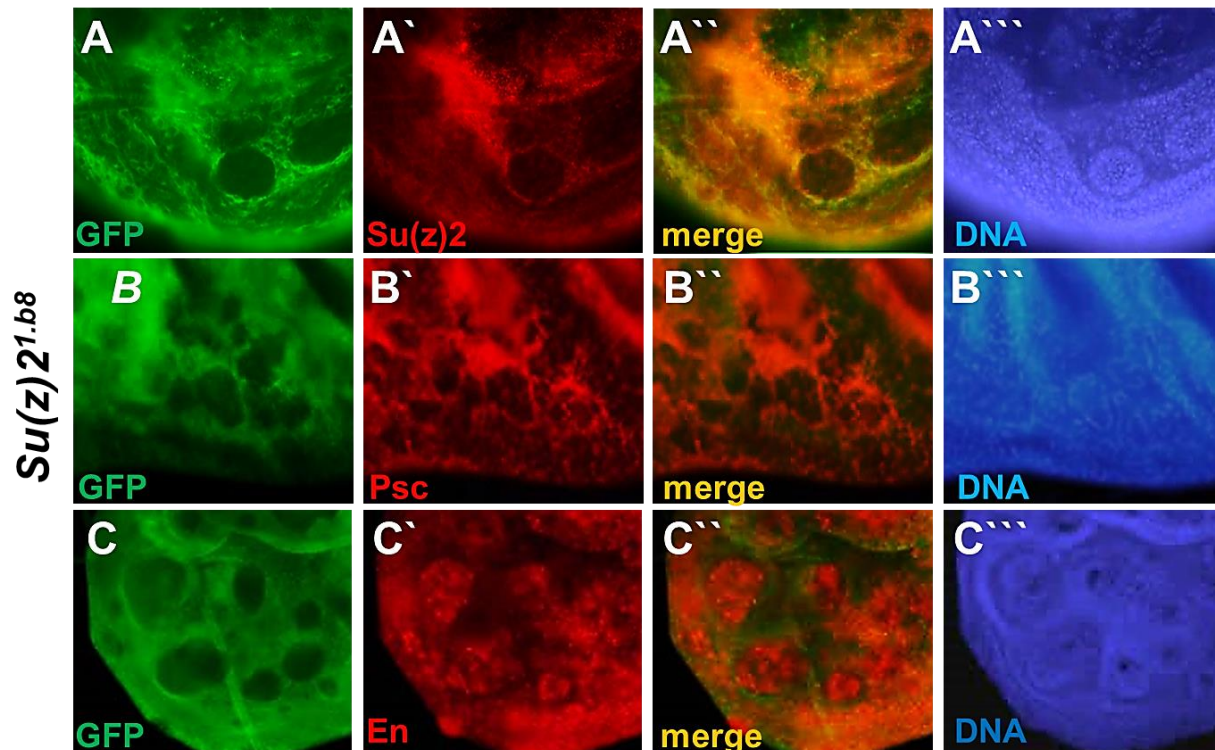


**Abbildung 3.7. Überproliferation und morphologische Defekte von Flügelimaginalscheiben mit *Su(z)2*- und *Psc*-doppelmutanten Zellklonen.** A. Flügelimaginalscheibe mit *Su(z)2*- und *Psc*-doppelmutanten Zellklonen im Vergleich zu B einer normalen Flügelimaginalscheibe. Die Größenzunahme und morphologischen Defekte sind deutlich zu erkennen. Mutante Zellen bilden kugelförmige Aggregate, die sich aus dem epithelialen Verband absondern. Färbung mit DAPI. Diese Abbildung wurde von A. Klebes zur Verfügung gestellt.

### 3.1.7.2 Proteinmengen von *Psc* und *Su(z)2*

Homozygot doppelmutante *Su(z)2/Psc* Zellklone, die durch die Abwesenheit von GFP markiert werden, weisen in Immunfärbungen bereits in kleinen Zellklonen im Vergleich zu benachbarten heterozygoten oder für *Su(z)2* und *Psc* wildtypischen Zellen eine deutliche Reduzierung des Fluoreszenzsignals - also der Proteinmengen von *Su(z)2* und *Psc* - auf

(Abbildung 3.8). Die betroffenen Larven zeigen ausgeprägte Entwicklungsverzögerung und Größenzunahme. So lassen sich noch nach neun und zehn Tagen Larven präparieren, deren sehr große blumenkohlartige Imaginalscheiben in Immunfärbungen kein detektierbares Su(z)2 und Psc Proteine in den mutanten Zellen zeigen (Abbildung 3.8). In der doppelmutanten Situation scheint das Su(z)2 Protein im Vergleich zu den *Su(z)2* einzelmutanten Zellklonen (s. oben) weniger stabil zu sein, da die Reduktion der Su(z)2 Proteinmenge deutlich schneller verläuft (nicht gezeigt). Diese erhöhte Instabilität des Su(z)2 Proteins in doppelmutanten Zellen fällt mit dem gleichzeitigen Abbau von Psc Protein zusammen, der in doppelmutanten, nicht aber in einzelmutanten *Su(z)2* Zellklonen (s. oben) zu beobachten ist.



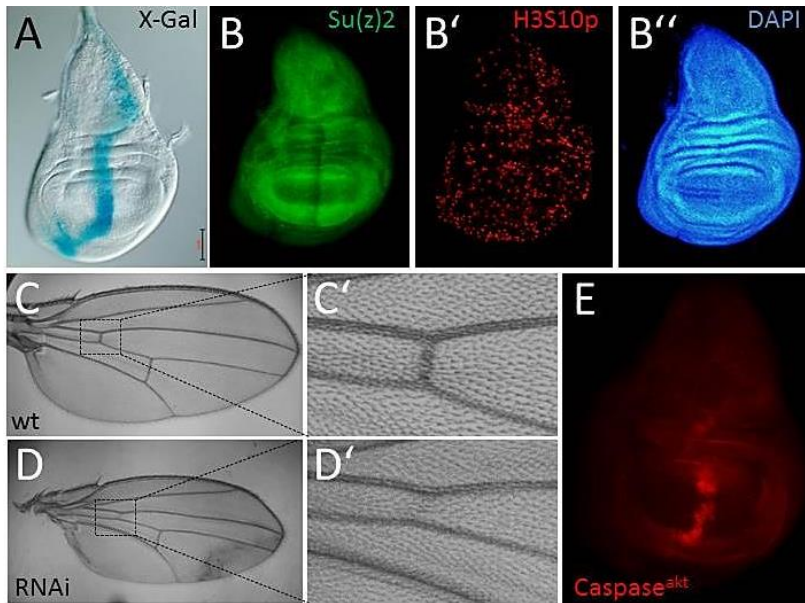
**Abbildung 3.8. Reduktion der Proteinmengen und Deregulation von Zielgenen in *Su(z)2/Psc* doppelmutanten Zellklonen.** **A-A''''** Anti-Su(z)2 Immunfärbung in *Su(z)2/Psc* -doppelmutanten Zellklonen (*hs-flp; FRT42D, Su(z)2<sup>1.b8</sup>*). **A** Die Abwesenheit von GFP (grün) markiert die mutanten Zellklone. **A'**  $\alpha$ -Su(z)2-Antikörperfärbung zeigt, dass Su(z)2-Signal (rot) in den Zellklonen reduziert ist. **A''** Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz. **A''''** Kontrollfärbung der DNA mit DAPI zeigt, dass in dem Bereich der mutanten Zellklone Zellen vorhanden sind, also keine Löcher im Epithel vorliegen. **B-B''''** Anti-Psc Immunfärbung in *Su(z)2/Psc* -doppelmutanten Zellklone. **B**  $\alpha$ GFP Färbung (grün). **B''** Psc-Signal (rot) ist in Zellklonen kaum detektierbar. **B''''** Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz. **B'''''** Kontrollfärbung der DNA. **C-C''''**  $\alpha$ -Engrailed Färbung in *Su(z)2-Psc*-doppelmutanten Zellklone. **C**  $\alpha$ -GFP (grün). **C'** Engrailed Protein (rot) wird in *Su(z)2-Psc*-Funktionsverlust Klonen im A Kompartiment (links) ektopisch exprimiert. Gezeigt ist der anterior-ventrale Teil einer Flügelimaginalscheibe mit Resten der endogene *en* Expression in posterioren Zellen auf der rechten Seite. **C''** Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz. **C''''** DNA (blau).

### 3.1.7.3 Effekte des simultanen *Su(z)2* und *Psc* Funktionsverlusts auf die Zielgene *Abd-B* und *en*

Der gleichzeitige Funktionsverlust von *Psc* und *Su(z)2* führt zur Deregulation von Zielgenen wie z.B. von *en* und *Abd-B*. Ektopische Expression des homöotischen Gens *Abd-B* lässt sich in doppelmutanten Zellklonen sowohl in anterioren, als auch posterioren Positionen der Flügelimaginalscheibe feststellen (Beuchle et al., 2001). In der normalen Entwicklung wird *Abd-B* nur in posterioren abdominalen Segmenten exprimiert und ist in den thorakalen Imaginalscheiben durch die PcG Funktion unterdrückt. Das Segmentpolaritätsgen *en* hingegen zeigt innerhalb der beiden Kompartimente (A/P) normaler Flügelimaginalscheibe unterschiedliches Verhalten, indem es in P Zellen exprimiert und in A Zellen durch die PcG-Funktion unterdrückt wird. Dementsprechend führt der gleichzeitige Funktionsverlust von *Psc* und *Su(z)2* zur ektopischen *en*-Expression in A Zellen (Abbildung 3.8 C).

### 3.1.8 Auswirkungen der *Su(z)2*- und *Psc*-RNA-Interferenz

Durch die Verfügbarkeit transgener UAS-Stämme, die durch Expression doppelsträngiger RNAs (dsRNAs) RNA Interferenz-Effekte (RNAi) auslösen, ist es möglich, die Transkriptmenge von *Su(z)2* und *Psc* gewebe- und zeitspezifisch zu reduzieren (*knock-down (kd)*). Zur Kontrolle der RNAi-Effizienz wurden diese dsRNA Transgene im *patched-* (*ptc*) Muster, d.h. in einem anterioren Streifen entlang der A/P Kompartimentsgrenze der Flügelimaginalscheibe exprimiert (Abbildung 3.9 A). Imaginalscheiben aus Wanderlarven (L3) wurden mit anti-*Su(z)2*, bzw. anti-*Psc* immungefärbt und adulte Flügel wurden auf Defekte innerhalb der *ptc*-Domäne, also im Bereich der A/P Kompartimentsgrenze zwischen den Längsvenen L3 und L4 hin untersucht. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit A. Klebes und B. Vitrinel durchgeführt.



**Abbildung 3.9. RNAi gegen *Su(z)2* induziert Apoptose.** **A.** *ptc*-Gal4 Expressionmuster in einem anterioren Streifen entlang der A/P Kompartimentsgrenze (*ptc*-Gal4, UAS-*lacZ*; X-Gal-Färbung, blau). **B.** Anti-*Su(z)2* zeigt die Herunterregulation in der *ptc*-Domäne durch *Su(z)2*-RNAi (*ptc*-Gal4, UAS-*Su(z)2*-*dsRNA*). **B'**. Mit dem Mitosemarker anti-phospho-Serin10-Histon H3 ist kein Anstieg der Zellezahl in G2-M Transition zu erkennen **B''** und auch die Morphologie der Scheibe ist unauffällig. **C.** – **C'** Kontrollflügel und Vergrößerung des Bereichs der anterioren Quervene (*aqv*) zwischen L3 und L4, der der *ptc*-Domäne entspricht. **D.** – **D'** Ein Flügel mit *Su(z)2*-RNAi im *ptc*-Muster ist insgesamt kleiner, zeigt Defekte im P Kompartiment sowie eine Reduktion des L3-L4 Intervenenbereichs und Verlust der *aqv*. **E.** In einer anderen Scheibe gleichen Genotyps ist eine deutliche Akkumulation apoptotischer Zellen in der *ptc*-Domäne zu sehen (anti-aktivierte Caspase3).

### 3.1.8.1 *Su(z)2* RNAi im *ptc*-Muster

RNAi gegen *Su(z)2* zeigte in der *ptc* Domäne eine deutliche Reduktion der *Su(z)2* Proteinmenge im Vergleich zu anderen Zellen des A oder P Kompartiments (Abbildung 3.9). Das Ausmaß dieser Reduktion war im Vergleich höher als in *Su(z)2* homozygot mutanten Zellklonen vier Tage nach Induktion (s. oben). Dieser Befund wird jedoch durch die Tatsache relativiert, dass die betroffenen Zellen der *ptc*-Domäne aufgrund der *Su(z)2* RNAi das Zelltodprogramm aktivieren, wie es durch die Aktivierung (Proteolyse) von Caspase 3 manifest wird (Abbildung 3.9 E). Gleichzeitig scheinen sich diese Zellen auch aus dem epithelialen Verband herauszulösen, so dass sie im Mikroskop in einer anderen Fokusebene zu detektieren sind (Abbildung 3.11). Eine Überproliferation scheint in der RNAi Situation jedoch nicht stattzufinden, da der Streifen mit reduzierten *Su(z)2* Immunsignal eher schmaler ist als die *ptc* Expressionsdomäne in Kontrollscheiben (vgl. Abbildung 3.9 A mit B). Auch mit dem Zellzyklusmarker - phosphoryliertes

Serin 10 von Histon H3 (pH3S10) – konnte in diesem Bereich der Imaginalscheibe keine erhöhte Anzahl an Zellen in G2-M Phase beobachtet werden (Abbildung 3.9 B`).

Aufgrund der erhöhten Apoptoserate ist eine Beurteilung der Psc Proteinmenge in den *Su(z)2*-RNAi Zellen schwierig. Die anti-Psc Immunfärbung zeigt zwar Psc Signal vor einem dunklen Hintergrund, der sich daraus ergibt, dass sich diese Zellen in einer anderen Fokusebene befinden, aber der Vergleich der Intensität dieses Signals mit anderen Bereichen derselben Imaginalscheibe weist darauf hin, dass die Psc-Proteinmengen nicht erhöht sind. Diese Beobachtung bestätigt, dass in *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* einzelmutanten Zellklonen die Psc Proteinmenge unverändert bleibt (s. oben).

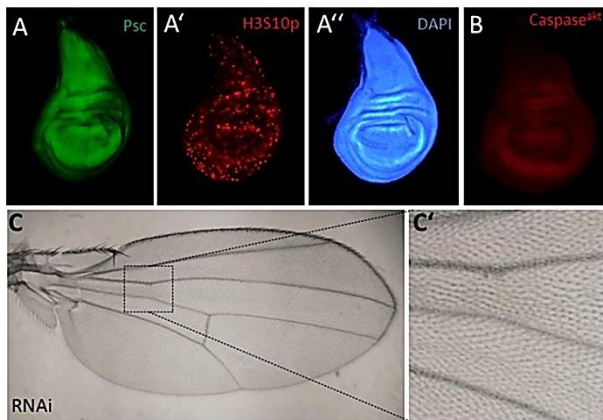
In Übereinstimmung mit der gesteigerten Rate an apoptotischen Zellen, ist in adulten Flügeln der Intervenenbereich zwischen L3 und L4 schmaler, als in Kontrollflügeln (Abbildung 3.9 D, D`). Diese Beobachtungen sind konsistent mit der Hypothese, dass *Su(z)2*-RNAi zur partiellen Reduktion der *Su(z)2* Proteinmenge führt und hierdurch das Apoptoseprogramm aktiviert wird. Trotz kompensatorischer Potenz der Imaginalscheibenzellen ist keine erhöhte Zellproliferationsrate zu beobachten, weshalb die korrespondierenden Anteile des adulten Flügels teilweise fehlen. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass die Induktion von RNAi unspezifisch wirkt, also unabhängig von der Reduktion der *Su(z)2* Transkriptmenge zur Induktion von Apoptose führt. Diese Möglichkeit erscheint jedoch unwahrscheinlich, da in Kontrollexperimenten, bei denen RNAi gegen das *white* Gen in der *ptc*-Domäne aktiviert wurde, keine erhöhten Apoptoseraten beobachtet werden konnten (nicht gezeigt).

### 3.1.8.2 *Psc*-RNAi

Die Aktivierung von RNAi gegen *Psc* in der *ptc*-Domäne führte zur moderaten Reduktion der Psc Proteinmenge in diesem Bereich (Abbildung 3.10 A). Im Gegensatz zur *Su(z)2* RNAi konnten hier jedoch keine gesteigerte Apoptoserate beobachtet werden. Allerdings sind hier in der DNA Gegenfärbung dieser Imaginalscheiben Lücken in der ansonsten dicht gepackten Anordnung der Kerne innerhalb der *ptc* Domäne zu beobachten. In adulten Flügeln ist der Bereich zwischen L3 und L4 etwas schmaler, als in Kontrollflügeln, was darauf hindeutet, dass auch diese RNAi



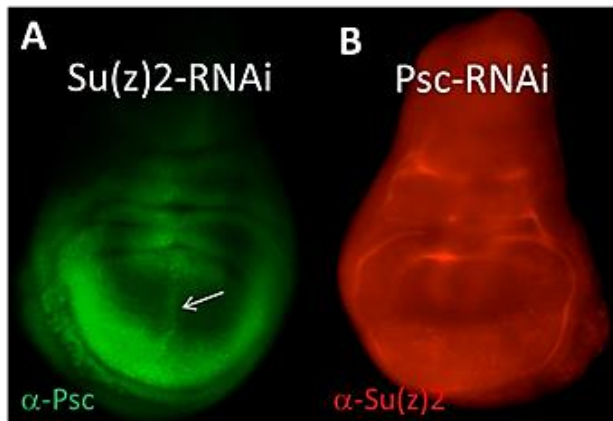
Effekte verursacht, obwohl nur eine sehr schwache Reduktion der Psc Proteinmenge in L3 Imaginalscheiben zu detektieren ist. Es kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass Zelltod zu anderen als den betrachteten Entwicklungsstadium auftritt, weshalb in Wanderlarven des dritten Stadiums keine aktivierte Caspase 3 in der Immunfärbung detektiert werden konnte (Abbildung 3.10). In dieser Arbeit wurde die Ursache dieser Defekte nicht weiter untersucht, jedoch werden diese Beobachtungen als Hinweis gewertet, dass *ptc* aktivierte *Psc* dsRNA-Expression zu biologischen Effekten führt, die in Kontrollexperimenten (*ptc*-GAL4, UAS-*white* RNAi) nicht zu beobachten sind.



**Abbildung 3.10. *ptc*-Gal4-aktivierte RNAi gegen *Psc*.**  
**A.** Psc Protein wird in der *ptc*-Domäne reduziert. **A'** Eine Zunahme des mitotischen Index ist anhand der anti-H3S10-phospho-Färbung nicht zu erkennen und **A''** auch die Morphologie der Scheibe ist unauffällig. **B.** Eine andere Imaginalscheibe gleichen Genotyps zeigt keine Zunahme apoptotischer Zellen in der *ptc*-Domäne. **C. – C'** Die adulten Flügel sind normal groß, zeigen aber den Verlust der anterioren Quervene im Bereich der *ptc*-Gal4-induzierten RNAi zwischen L3 und L4.

Immunfärbungen gegen *Su(z)2* in den *Psc*-RNAi Zellen der *ptc*-Domäne zeigen keinen Anstieg der *Su(z)2* Proteinmenge (Abbildung 3.11 B). Wie bereits oben erwähnt kann auch keine Veränderung der Psc Proteinmenge in der *Su(z)2*-RNAi beobachtet werden (Abbildung 3.11. A). Dieser Befund kann somit die gesteigerten *Su(z)2* Proteinmengen in *Psc*<sup>1d20</sup> homozygot mutanten Zellklonen (vgl. Abbildung 3.2) nicht bestätigen, was möglicherweise durch die relativ schwache, d.h. unvollständige Herunterregulation von *Psc* in dieser RNAi-Situation begründet sein könnte.

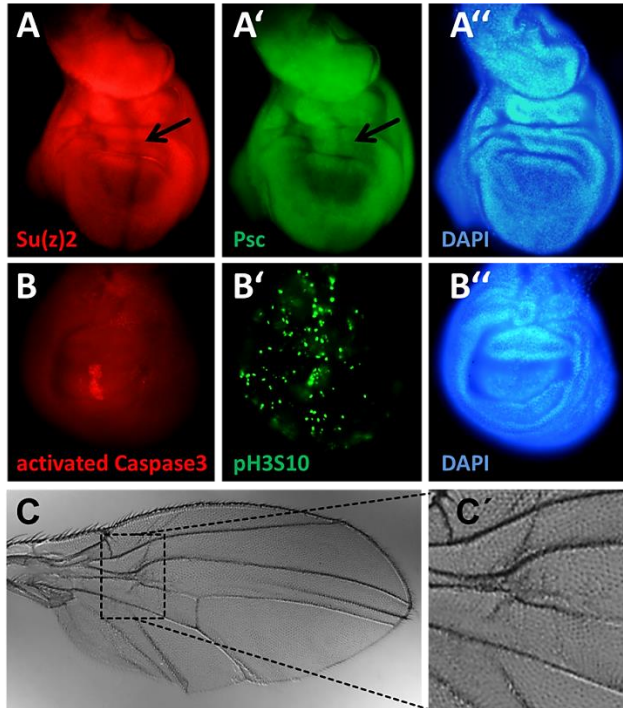




**Abb 3.11. Proteinmenge in RNAi-Zellen.** *ptc*-Gal4-aktivierte RNAi gegen **A.** *Su(z)2* und **B.** *Psc*. **A.** In *Su(z)2*-RNAi Zellen ist keine Zunahme der *Psc* Proteinmenge zu sehen (Pfeil), auch wenn diese Zellen vor den dunklen Hintergrund hervortreten. **B.** Auch in der *Psc*-RNAi Situation ist die *Su(z)2*-Proteinmenge unverändert.

### 3.1.8.3 Doppel-RNAi

Die simultane RNAi für beide Transkripte ruft im Wesentlichen die gleichen Effekte wie die *Su(z)2*-einzel-RNAi hervor (Abbildung 3.9). Die Reduktion der *Su(z)2* Proteinmenge fällt auch hier etwas deutlicher aus, als die Reduktion von *Psc* (Abbildung 3.12 A und A'). Apoptotische Zellen sind innerhalb der *ptc*-Domäne deutlich zu erkennen, während Zellen in G2-M Transition nicht oder nur in geringen Umfang in der *ptc*-Domäne angereichert sind (Abbildung 3.12 B und B'). Die adulten Flügel sind gegenüber den *Su(z)2*-einzel-RNAi Flügeln ein wenig stärker betroffen. Der Bereich zwischen L3 und L4 ist deutlich reduziert, so dass beide Längsvenen in einigen Flügeln miteinander in Kontakt stehen und insgesamt erscheinen die Flügelblätter besonders im P Kompartiment labil und bilden Falten aus (Abbildung 3.12 C und C').

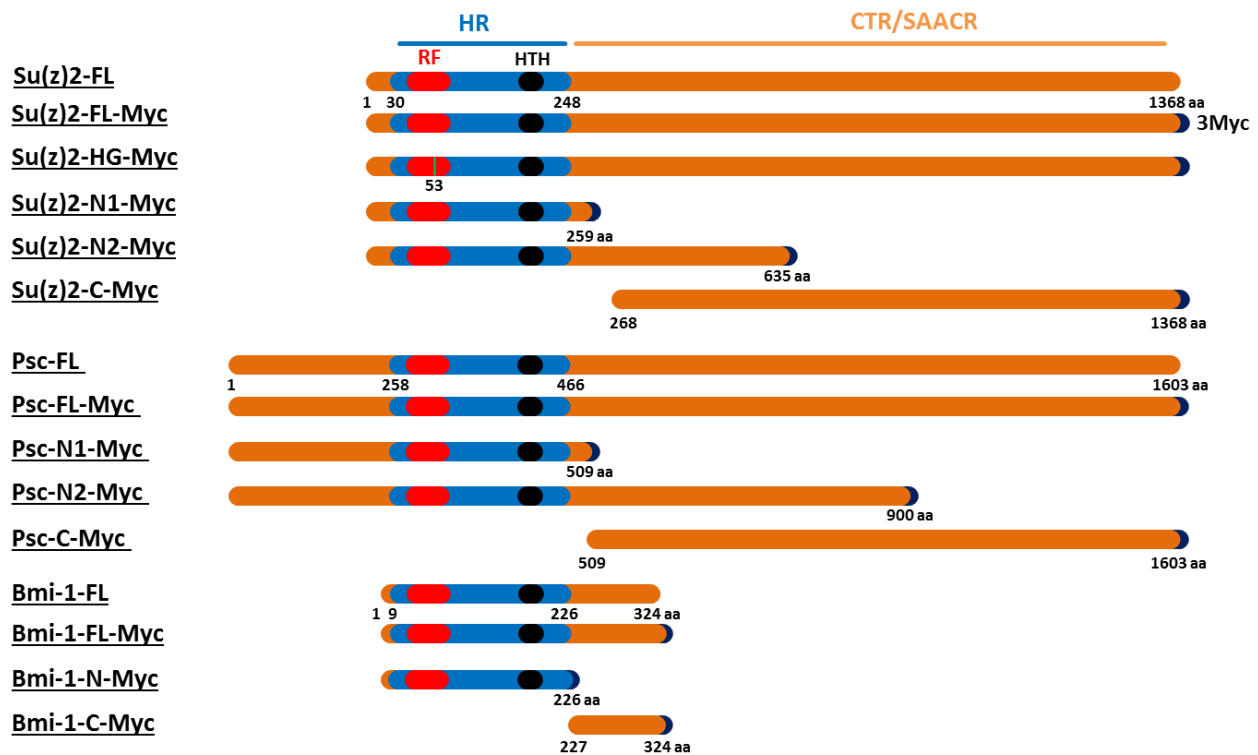


**Abbildung 3.12. Simultane RNAi für *Su(z)2* und *Psc*.** **A, B, und C.** *ptc*-Gal4-aktivierte doppel-RNAi. **A.** *Su(z)2* Proteinmengen sind in der *ptc*-Domäne reduziert (Pfeil). **A'** Das Ausmaß der Reduktion ist für *Psc* etwas geringer. **A''** In der alten Scheibe (Ausstülpung des Flügelbereichs) sind in der DNA-Färbung innerhalb der *ptc*-Domäne kleine Lücken zwischen den Zellkernen zu erkennen. **B.** Im Bereich der RNAi konzentrieren sich apoptotische Zellen, die in der anti-aktivierte-Caspase 3-Färbung detektiert werden. **B'** Der G2-M-Marker weist eine leichte Konzentration von Zellen in dieser Phase im *ptc*-Bereich auf. **B''** Auch in dieser Scheibe sind im *ptc*-Streifen leichte Lücken zu sehen. **C** und **C'** Adulter Flügel und Ausschnitt des Bereichs der anterioren Quervene (aqv). Der Bereich der *ptc*-Domäne zwischen L3 und L4 ist verengt, so dass die Längsvenen miteinander in Kontakt treten und keine aqv zu erkennen ist. Die Flügelblätter, insbesondere im P Kompartiment sind faltig.

## 3.2 Herstellung transgener Stämme zur Expression von *Su(z)2*, *Psc* und *Bmi-1*

### 3.2.1 Klonierung verschiedener *Su(z)2*-, *Psc*- und *Bmi-1*-Konstrukte und Herstellung transgener Linien

Ausgehend von einer *Su(z)2* cDNA, die von Jürg Müller (MPI, Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde, einer Maus *Bmi-1* cDNA, die uns von Jochen Hecht (MPIMG, Berlin) überlassen wurde und einer von mir selbst klonierten *Psc* cDNA (s. Anhang) wurden Konstrukte des vollständigen offenen Leserasters (*full-length*, FL) oder verschiedene mutante Konstrukte durch PCR-Klonierung hergestellt. In der folgenden Abbildung 3.13 sind diese 15 Konstrukte zusammengefasst.



**Abbildung 3.13. Schematische Darstellung der transgenen Konstrukte für *Su(z)2*, *Psc* und *Bmi-1*.** Für weitere Erklärungen vgl. Abbildung 1.4 Einleitung und Text.

Für jedes der drei Proteine wurde jeweils ein FL Konstrukt (*Su(z)2* – 1368 AS; *Psc* – 1603 AS; *Bmi-1* – 324 AS) mit und eins ohne das Myc-Epitop am carboxyterminalen Ende kloniert, um einen möglichen Einfluss des Myc-Epitops auf die Funktion beurteilen zu können. Des Weiteren wurde für jedes Protein Deletionskonstrukte hergestellt, die verschieden große Bereiche der CTR oder den aminoterminalen Bereich mit der HR entfernen. Die beiden carboxyterminalen Deletionen für *Su(z)2* umfassen 1109 (*Su(z)2*-N1-Myc), bzw. 733 Aminosäuren (*Su(z)2*-N2-Myc), wohingegen die aminoterminalen Deletion (*Su(z)2*-C-Myc) die ersten 267 Aminosäuren entfernt. Diesem C-Konstrukt wurde - wie auch im Falle der beiden anderen C-Konstrukte (s. unten) - jeweils ein zusätzliches Methionincodon als Startcodon an erster Position eingefügt. Entsprechend wurden für *Psc* in den N1- und N2-Konstrukten 1094, bzw. 703 carboxyterminale Aminosäuren und im *Psc*-C-Konstrukt 508 aminoterminalen Reste entfernt. Für *Bmi-1* wurde nur eine carboxyterminale Deletion erzeugt (*Bmi-1*-N-Myc), der gegenüber der vollständigen Sequenz 98 Aminosäuren fehlen und ein um die ersten 225 Aminosäuren verkürztes Konstrukt

(Bmi-1-C-Myc). Zusätzlich wurde ein mutantes Su(z)2-HG-Myc-Konstrukt hergestellt, bei dem das konservierte Histidin der RING-Finger Domäne in ein Glycin ausgetauscht ist.

Alle Konstrukte wurden in den pUAST Vektor kloniert, wodurch den jeweiligen cDNAs fünf Wiederholungen der *upstream activating sequence* (UAS) vorgeschaltet werden. Durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation wurden für jedes Konstrukt mehrere transgene Linien hergestellt (mit Ausnahme von Psc-FL-Myc) (Tab.3.1).

**Tab.3.1. Übersicht über die transgenen Linien mit Angabe der Größen des transgenen Transkripts und Proteins sowie dessen errechnetes Molekulargewicht.**

Konstrukt	Anzahl transgener Linien	Größe transgenes Transkript (bp)	Größe transgenes Protein (AS)	Berechnetes Molekulargewicht (kDa)
Su(z)2-FL	2	4107	1368	146.42
Su(z)2-FL-Myc	3	4230	1408	151.12
Su(z)2-HG-Myc	5	4230	1408	151.12
Su(z)2-N1-Myc	3	897	299	34.65
Su(z)2-N2-Myc	8	2025	675	76.04
Su(z)2-C-Myc	6	3420	1140	120.25
Psc-FL	9	4806	1601	169.86
Psc-FL-Myc	1	4929	1641	174.56
Psc-N1-Myc	10	1647	549	60.13
Psc-N2-Myc	3	2820	940	102.34
Psc-C-Myc	10	4536	1134	119.02
BMI1-FL	2	975	324	36.71
BMI1-FL-Myc	9	1098	364	41.41
BMI1-N-Myc	7	798	266	31.43
BMI1-C-Myc	7	414	138	14.7

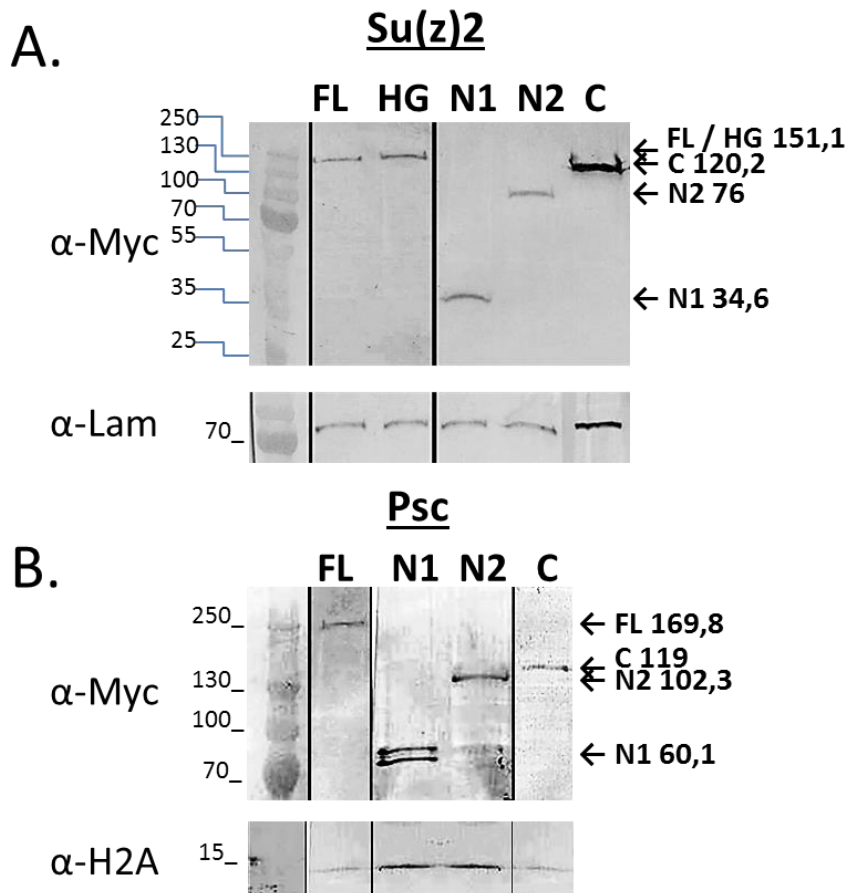
### 3.2.2 Vergleich der Expressionsstärken ausgewählter transgener Su(z)2- und Psc-Linien

Zur Analyse der Funktionsweise der verschiedenen UAS-Konstrukte sollte zunächst geklärt werden, ob unabhängige Insertionen jeweils eines Konstrukts vergleichbare - und somit positionsunabhängige - Effekte verursachen. Weiterhin sollen die verschiedenen transgene Konstrukte miteinander verglichen werden, weshalb Insertionslinien ausgewählt werden sollen, die nach GAL4-Aktivierung ungefähr gleichstarke Expression zeigen. Hierzu wurden in einer ersten Versuchsreihe alle erzeugten UAS-Insertionslinien mit dem C765-GAL4-Aktivatorstamm gekreuzt. Diese Analyse zeigte, dass unabhängige Linien eines Konstrukts jeweils vergleichbare

Defekte verursachten, die aufgrund von Positionseffekten jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt werden (ist *vgBE* Anhang). Auch die FL-Konstrukte mit und ohne Myc-Epitop zeigten vergleichbare Defekte. Durch den Vergleich der Defekte in adulten Flügeln wurde eine Reihung der unabhängigen Insertionen der einzelnen transgenen Konstrukte vorgenommen (s. Anhang: Abbildung 5.1, Abbildung 5.2). Diese Reihung nach Schwere der Defekte wurde in erster Näherung als Anhaltspunkt für die Expressionsstärke gewertet. Aufgrund dieser Klassifizierung wurde für die weiteren Arbeiten für jedes Konstrukt jeweils eine Insertionslinie ausgewählt, die mittelstarke Defekte verursacht.

Ein weiterer Nachweis der GAL4-induzierten Expression der verschiedenen transgenen Konstrukte wurde in verschiedenen Immunfärbungen (s.u.) und mittels Western Blot Detektion des Myc-Epitops dieser Fusionsproteine erbracht (Abbildung 3.14). Der Nachweis mittels anti-Myc Antikörper im Western Blot oder in der Immunfluoreszenz (s. unten) zeigt ferner, dass die getesteten Linien jeweils ein Myc-Fusionsprotein mit dem erwarteten Laufverhalten in der Elektrophorese - also in etwa der erwarteten Größe - exprimieren, wodurch neben der Sequenzierung der DNA-Konstrukte (nicht gezeigt) eine weitere Bestätigung der korrekten Klonierung erbracht wurde.

Anhand der Western Blot Analyse konnte auch die Expressionsstärke der ausgewählten Linien abgeschätzt werden. Hierbei zeigt sich, dass die meisten Linien in Relation zur Ladekontrolle (Histon H2A oder Lamin) vergleichbare Mengen der transgenen Proteine exprimieren (Abbildung 3.14 A). Nur die Linie Su(z)2-C-Myc zeigt etwas stärkere Expression, wobei in dieser Spur mehr Gesamtprotein aufgetragen wurde, was sich am stärkeren Signal der Ladekontrolle zeigt. Da jedoch dieses Konstrukt, zu keinen deutlichen morphologischen Defekten der adulten Flügel geführt hat (Abbildung 3.28 und s. Anhang: Abbildung 5.1), wird dies als Argument gewertet, dass dieses Konstrukt sogar bei vergleichsweise erhöhten Expressionsmengen in der Flügelentwicklung keine deutliche biologische Aktivität zeigt (s. unten). Deshalb wurde darauf verzichtet eine andere Insertionslinie dieses Konstruktes auszuwählen. Aufgrund dieser Befunde wurden alle weiteren Überexpressionsexperimente mit den Linien durchgeführt, die aufgrund der Schwere der erzeugten Überexpressionseffekte im Flügel und anschließender Expressionskontrolle ausgewählt wurden (Tab.3.2).



**Abbildung 3.14. Western Blot Nachweis der transgene Su(z)2 und Psc Expression.** Myc-Fusionsproteine aus larvalen Speicheldrüsen (Gal4 231.1). **A.** Die UAS-Su(z)2-Myc-Konstrukte FL, HG, N1, N2 und C zeigen jeweils eine Bande, die im Laufverhalten in etwa dem errechneten Molekulargewicht (Zahlen rechts in kDa) entspricht. Nachweis mit anti-Myc (9E10). Laminin (72kDa) dient als Ladekontrolle. In der letzten Spur „C“ ist mehr Gesamtprotein aufgetragen. **B.** Entsprechender WB für die Psc-Myc Fusionsproteine FL, N1, N2 und C. Für N1 wird eine Doppelbande sichtbar, die möglicherweise auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen ist. Histon H2A dient hier als Ladekontrolle.

**Tab.3.2. Für die weiteren Arbeiten ausgewählte transgenen Linien mit Angabe des Chromosoms der Insertion.**

Stamm Name	Genotyp	Chromosom
<i>Psc-FL-Myc /CyO</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-Psc-FL-Myc, w}/CyO</i>	2
<i>Psc-N1-Myc 7M</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-Psc-N1-Myc, w}</i>	3
<i>Psc-N2-Myc L2</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-Psc-N2-Myc, w}</i>	2
<i>Psc-C-Myc 9M</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-Psc-C-Myc, w}</i>	2
<i>Su(z)2-FL-Myc 12</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-Su(z)2-FL-Myc, w}</i>	2
<i>Su(z)2-HG-Myc 5F</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-Su(z)2-HG-Myc, w}</i>	3
<i>Su(z)2-N1-Myc 36</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-Su(z)2-N1-Myc, w}</i>	2
<i>Su(z)2-N2-Myc 7M</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-Su(z)2-N2-Myc, w}</i>	2
<i>Su(z)2-C-Myc 1M</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-Su(z)2-C-Myc, w}</i>	1
<i>Bmi-1-FL-Myc 9F</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, +, +, P{UAS-BMI-1-FL-Myc, w}</i>	3
<i>BMI-1-N-Myc 6M</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-BMI-1-N-Myc, w}</i>	2
<i>BMI-1-C-Myc 4M</i>	<i>y, w<sup>1118</sup>, P{UAS-BMI-1-C-Myc, w}</i>	1

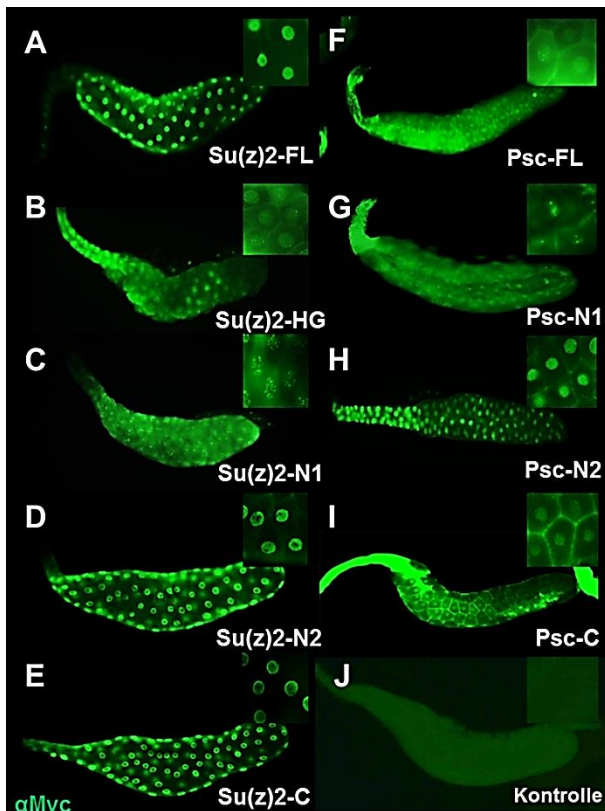
### 3.3 Chromatinlokalisierung von Su(z)2 und Psc

#### 3.3.1 Lokalisation der Fusionsproteine

Die epigenetische Regulation verschiedener Zielgene setzt voraus, dass die entsprechenden PcG Proteine in den Zellkern transportiert werden und dort zusammen mit ihren Interaktionspartnern an die Zielregionen binden. Vor Herstellung der transgenen Konstrukte wurden mögliche Kernlokalisierungssignale der Proteine *in silico* ermittelt. Sowohl Su(z)2 als auch Psc enthalten jeweils mehrere klassische Kernlokalisationssequenzen für den Importin  $\alpha$ -vermittelten Transport. Diese befinden sich bei Su(z)2 im Bereich der Aminosäuren 497 – 518 und bei Psc bei 652 – 654 und 760 – 782. Zusätzlich finden sich über den gesamten Bereich beider Proteine Sequenzen mit Anreicherungen basischer Aminosäuren (vgl. Anhang), denen nach verschiedenen Vorhersagealgorithmen ebenfalls Funktion als Kernlokalisierungssignale zugesprochen werden (z.B. NucPred; Brameier et al., 2007; s. Anhang). Da für Su(z)2 und Psc die Verteilung von Bereichen positiver und negativer Ladungen, insbesondere in der CTR, als mechanistisch bedeutsam diskutiert wird (s.oben; Beh et al., 2012), wurde bei der Herstellung der transgenen Konstrukte darauf verzichtet, durch Kernlokalisationssequenzen zusätzliche Ladungen einzufügen, um eventuelle Funktionsstörungen zu vermeiden.

Diese Vorgehensweise erfordert den Nachweis, dass die transgenen Proteine tatsächlich in den Zellkern importiert werden. Hierzu wurde durch Immunfärbungen an larvalen Speicheldrüsen, in denen jeweils eines der UAS-Konstrukte exprimiert wird (Gal4-231.1), die Kernlokalisierung untersucht. In Abbildung 3.15 ist gezeigt, dass alle untersuchten transgene Fusionsproteine in den Kernen von Speicheldrüsenzellen nachzuweisen sind. Allerdings sind die Immunsignale für die einzelnen Proteine unterschiedlich. So zeigt die vollständige Su(z)2 Sequenz (Su(z)2-FL-Myc) fast ausschließlich Signal im Kern, ohne Färbung des Zytoplasmas. Die Konstrukte: Su(z)2-N2-Myc, Su(z)2-C-Myc und Psc-N2-Myc zeigen in ähnlicher Weise nahezu vollständige Kernlokalisierung. Für die übrigen Konstrukte ist neben dem Signal im Kern auch zytoplasmatische Färbung zu erkennen (Su(z)2-HG-Myc, Su(z)2-N1-Myc) und zusätzliches Signal an der Plasmamembran (Psc-FL-Myc, Psc-C-Myc). In diesem Experiment wurden Drüsen aus Wanderlarven präpariert, die sich im Entwicklungsstadium leicht unterscheiden können. Da die

Qualität der Immunfärbungen an Speicheldrüsen vom Entwicklungszustand und der Handhabung abhängig ist, kann trotz mehrfacher Wiederholungen nicht ausgeschlossen werden, dass die oben beschriebenen Signalverhältnisse zwischen Kern und Zytoplasma zumindest teilweise technisch bedingt sein könnten. Dennoch zeigen diese Befunde, dass in beiden Proteinen sowohl im aminoterminalen Bereich der HR, als auch im carboxyterminal hierzu gelegenen Abschnitt der CTR endogene Kernlokalisationsignale enthalten sind, die auch voneinander isoliert Kerntransport vermitteln.



**Abbildung 3.15. Kernlokalisierung der transgenen Su(z)2- und Psc-Fusionsproteine.** Alle UAS-Konstrukte wurden mit Gal4 231.1 in larvalen Speicheldrüsen aktiviert. Speicheldrüsen aus Wanderlarven wurden mit anti-Myc immungefärbt. **A.** Su(z)2-FL, **B.** Su(z)2-HG, **C.** Su(z)2-N1, **D.** Su(z)2-N2, **E.** Su(z)2-C, **F.** Psc-FL, **G.** Psc-N1, **H.** Psc-N2, **I.** Psc-C. **J.** Negativkontrolle ohne Primärantikörper. Alle Fusionsproteine können im Zellkern nachgewiesen werden, auch wenn z.T. zytoplasmatisches Hintergrundsignal detektiert wird (s. Text).

### 3.3.2 Chromatinlokalisierung der endogenen Proteine.

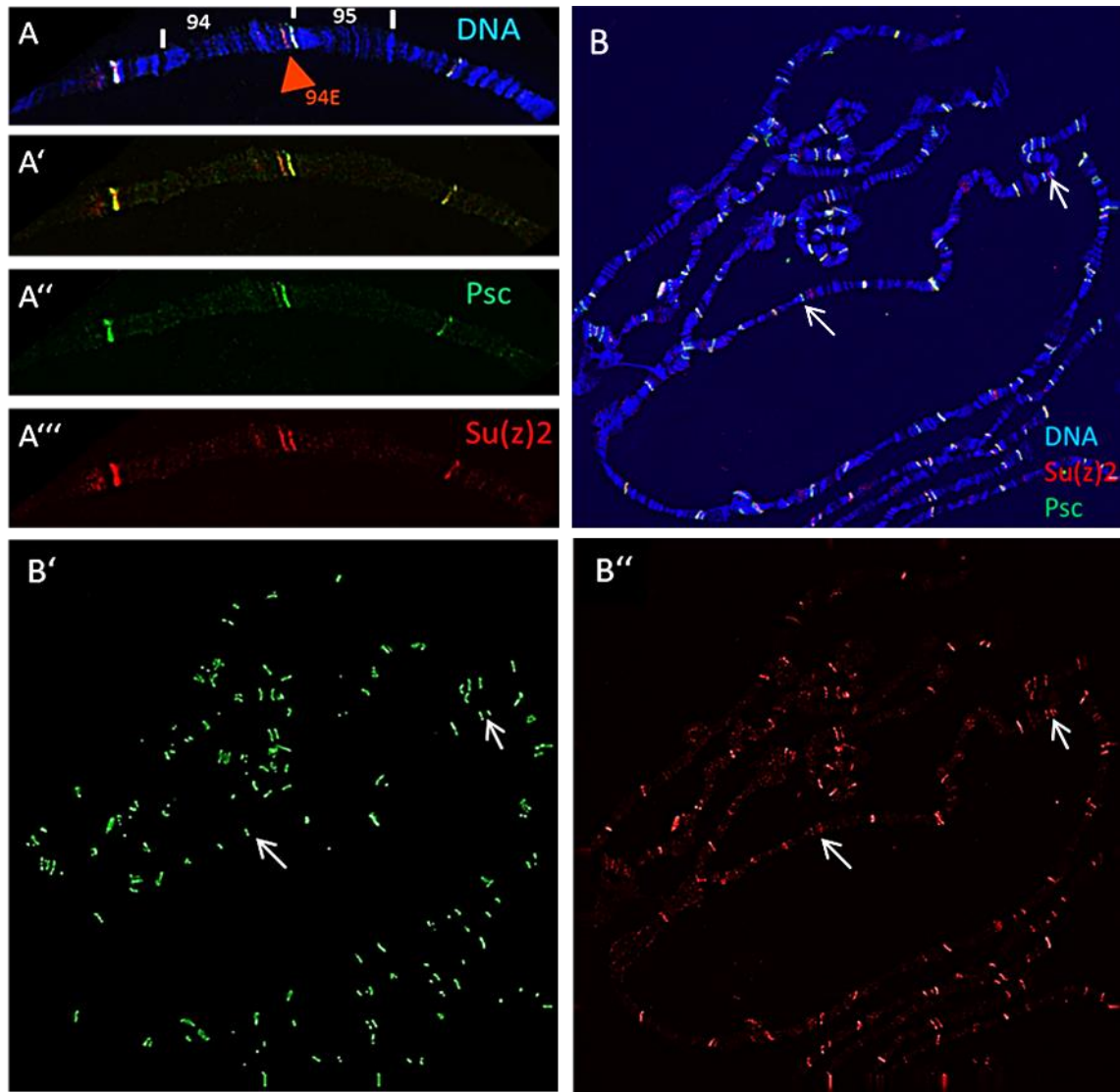
Quetschpräparate von Polytänchromosomen wildtypischer Speicheldrüsen zeigen in der Immunfärbung spezifische Bindung von Psc und Su(z)2. Genomweit finden sich ca. 95 (Psc)/97 (Su(z)2) Bindungsstellen (Abbildung 3.16, Tab.3.3). Hierbei ist zu erkennen, dass in fast allen



Positionen immer beide Signale vorhanden sind (mit nur zwei Ausnahmen, Abbildung 3.16, Tab.3.3). Die Intensitäten der Fluoreszenzsignale - und somit wahrscheinlich auch die Stärke der Bindung - ist an einigen Stellen in beiden Kanälen jedoch stark unterschiedlich. Es finden sich also Bindungsstellen, in denen das Psc-Fluoreszenzsignal wesentlich stärker als das Su(z)2-Signal ist und umgekehrt (Abbildung 3.16 A. – A``). Zusätzlich zu den übrigen Tests wird hierdurch die Spezifität des anti-Su(z)2 Antiserums bestätigt. Weiterhin lässt diese Beobachtung vermuten, dass in diesen Regionen die Proteinmenge jeweils eines Faktors überwiegt. Eine weitgehende Kolo-kalisation beider Proteine wurde bereits früher beschrieben (Rastelli et al., 1993), jedoch erlaubten die damals eingesetzten enzymatischen Immun-techniken keine hochauflösende Analyse der Kolo-kalisation. Dementsprechend sind die Anzahl und Positionen der Bindungsstellen, insbesondere solcher Positionen, in denen Rastelli und Kollegen jeweils nur eines der beiden Proteine detektieren, nicht deckungsgleich mit unseren Befunden (Tab.3.3).

**Tab.3.3. Quantifizierung der Chromatinbindung von Psc und Su(z)2 und Vergleich mit Literaturwerten.** Gezählt wurden deutlich sichtbare Signale von zwei Übersichtsabbildungen (wie Abbildung 3.16 B).

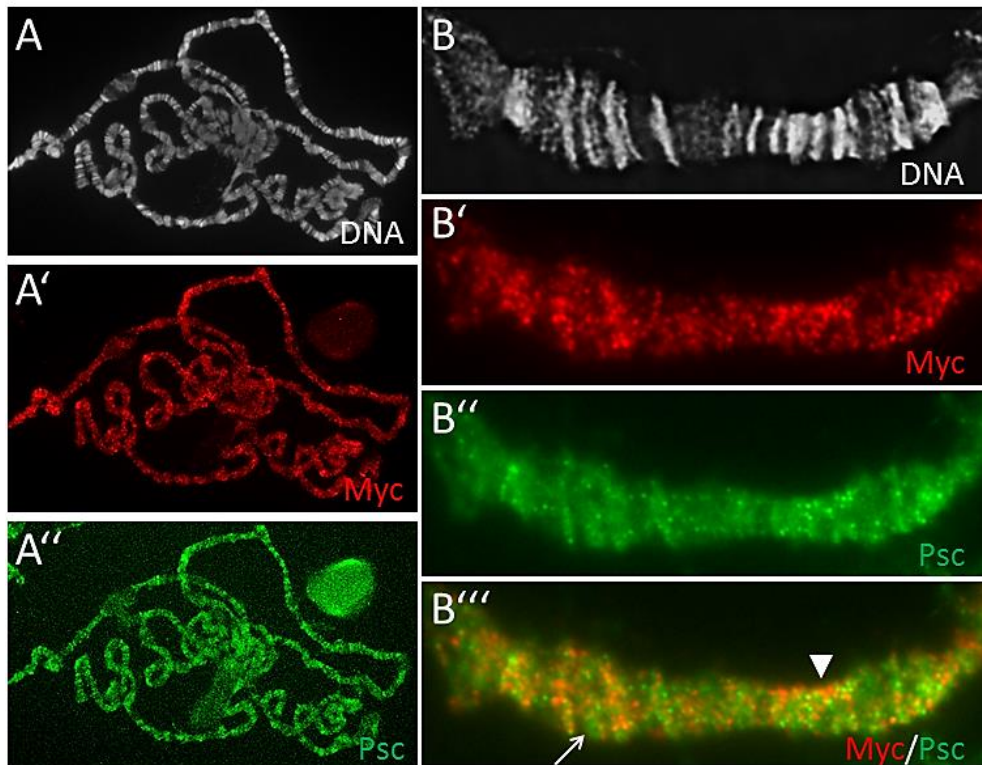
<b>Bindestellen</b>	<b>Psc</b>	<b>Su(z)2</b>	<b>Überlappung</b>
Rastelli et al., 1993	81	88	52 = 60%
Eigene Beobachtung	95	97	95 = 98%



**Abbildung 3.16. Su(z)2 und Psc kolocalisieren in diskreten Bindungsstellen. A. – A'''** Region des 3R Chromosoms mit anti-Psc (grün), anti-Su(z)2 (rot) und DNA-Färbung (blau) zeigt weitgehende Kolokalisation der beiden Proteine. **A.** Überlagerung aller drei Kanäle. Der rote Pfeilkopf weist auf ein überwiegend rot erscheinendes Signal in zytologischer Position 94E. **A'** Überlagerung der Immunfärbungen ohne DNA-Färbung. **A''** und **A'''** Die Einzelkanäle für Psc und Su(z)2 zeigen, dass in Position 94E beide Proteine binden, jedoch die Intensität des Su(z)2-Signals (rot) stärker ist. **B. – B''** Gesamtansicht der Polytänchromosomen eines Zellkerns mit vier Chromosomenabschnitten eines zweiten Kerns in der rechten unteren Ecke. Die Pfeile weisen auf singuläre Su(z)2 Bindestellen (nur rotes Signal). **B.** Überlagerung der drei Kanäle wie in A. **B'** und **B''** Die Signale für Psc (grün) und Su(z)2 (rot) zeigen 95, bzw. 97 diskrete Bindestellen pro Genom. Abbildungen in Zusammenarbeit mit A. Klebes.

### 3.3.2 Chromatinbindung der Su(z)2-Fusionsproteine

Um das Bindungsverhalten der verschiedenen transgenen Proteine zu untersuchen, wurden alle UAS-Konstrukte mit der Speicheldrüsen GAL4-Linie 231.1 exprimiert. Quetschpräparate polytärer Speicheldrüsenchromosomen aus Wanderlarven wurden immungefärbt, wobei jeweils das transgene Protein durch anti-Myc Färbung dargestellt wurde. Als Referenz und zur Beurteilung der Überexpressionseffekte auf das endogene Färbemuster wurde das Psc Protein (endogen und im Fall der Psc Konstrukte auch das transgene Protein) durch einen monoklonalen anti-Psc Antikörper nachgewiesen. Dieser Antikörper erkennt ein Epitop in der aminoterminalen Region und ist somit geeignet, alle Fusionsproteine, bis auf Psc-C-Myc zu detektieren. Diese Analysen wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. H. Saumweber (HU Berlin) durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente war noch kein anti-Su(z)2 Antiserum verfügbar.



**Abbildung 3.17. Su(z)2-FL bindet expansiv und verändert die endogene Psc-Lokalisation.** Überexpression von UAS-Su(z)2-FL-Myc mit Gal4 231.1. **A.** – **A''** Übersichtsbild in **A.** DNA-Färbung, **A'** anti-Myc- und **A''** anti-Psc-Immunfärbung zeigt die Ausweitung der Bindung über die diskreten Su(z)2/Psc Bindestellen hinaus (vgl. Abbildung 3.16). Das gesamte Chromatin ist mit beiden Proteinen dekoriert, wobei an manchen Stellen verstärkte Bindung zu sehen ist. **B.** – **B'''** Vergrößerung des Telomerendes von 3L. **B.** DNA-; **B'** anti-Myc-; **B''** anti-Psc-Färbung. In den Immunfärbungen sind neben der ausgedehnten unspezifischen Bindung bandenförmige Bereiche verstärkter Bindung zu erkennen. **B'''** Die Überlagerung der Myc und Psc Signale zeigt wenig Kolokalisation beider Signale. In einigen Positionen überwiegt das Psc Signal (Pfeil) in anderen das Myc Signal (Pfeilkopf).

### 3.3.2.1 Su(z)2-FL-Myc

Die Überexpression der wildtypischen Su(z)2 Sequenz (Su(z)2-FL-Myc) führt zu keinen erkennbaren morphologischen Defekten der Speicheldrüsenchromosomen. Dahingegen ist die Verteilung der Immunsignale jedoch deutlich anders als in wildtypischen Chromosomen (vgl. Abbildung 3.16). Das transgene Su(z)2 (Abbildung 3.17) ist sowohl in den endogenen Positionen (bandenförmige Signale) als auch granulär am gesamten Chromatin zu finden, wo normalerweise kein Su(z)2 Protein nachgewiesen werden kann (vgl. mit Abbildung 3.17 B`)). Somit bindet das Su(z)2-Myc-Fusionsprotein in den normalen Su(z)2 Bindestellen und expansiv das gesamte Chromatin. Auch das endogene Psc Protein ist noch in einigen normalen Bindungsstellen zu detektieren (Abbildung 3.17 B``) dehnt sich aber ebenso wie Su(z)2-Myc über das gesamte Chromatin aus. Interessanterweise zeigt die Betrachtung bei hoher Auflösung, dass die anti-Myc- und anti-Psc-Signale wenig miteinander kolokalisieren (Abbildung 3.17 B````).

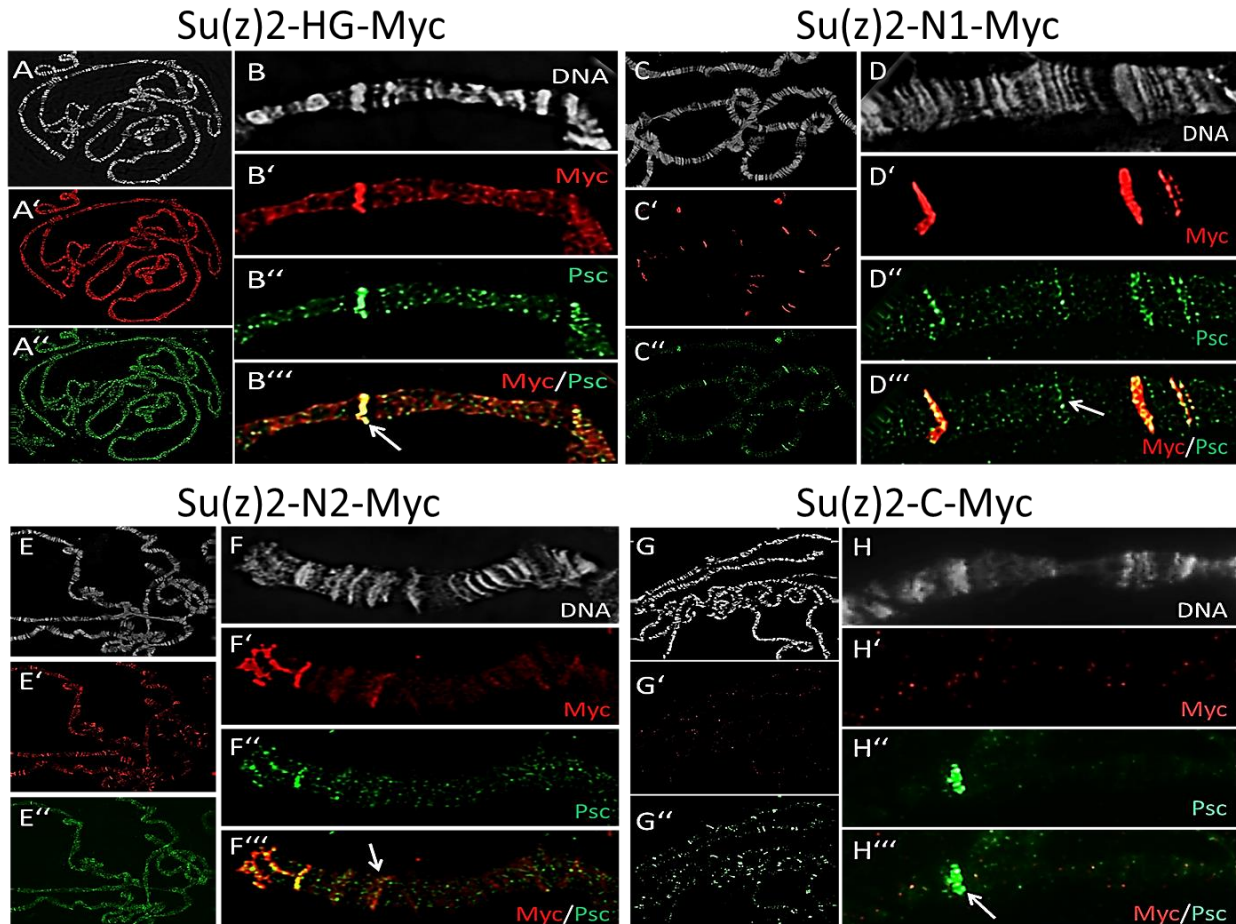
### 3.3.2.2 Su(z)2-N2-Myc

Die carboxyterminale Deletion um 733 Aminosäuren des Su(z)2-N2-Konstrukts zeigt gegenüber der Su(z)2-FL Überexpression eine leichte Abmilderung in Bezug auf die unspezifische Lokalisation (Abbildung 3.18 E und F). Ebenso wie für das *full-length* Su(z)2-Myc-Protein zeigt sich Bindung in diskreten Banden aber nur schwache granulär verteilte expansive Bindung. Dennoch hat dieses Bindeverhalten von Su(z)2-N2-Myc auf das endogene Psc Einfluss, so dass dieses nicht mehr ausschließlich in diskreten Banden, sondern zusätzlich auch granulär auf dem gesamten Chromatin nachzuweisen ist. In einigen wenigen Positionen sind Banden zu erkennen, die überwiegend das transgene Su(z)2-N2-Protein enthalten. Die Morphologie der Chromosomen ist weitgehend normal.

### 3.3.2.3 Su(z)2-HG-Myc

Die Punktmutation im HG-Konstrukt und damit der mutmaßliche Verlust der Funktionsfähigkeit der RING Domäne hat im Vergleich zur *full length* Sequenz keinen prinzipiellen Einfluss auf die Lokalisation des transgenen Proteins (Abbildung 3.18 A und B). Su(z)2-HG-Myc und auch das

endogene Psc sind sowohl in endogenen Positionen (Banden) als auch granulär über die gesamten Chromosomen verteilt.



**Abbildung 3.18. Chromatinbindung mutanter Su(z)2-Proteine und Lokalisation von endogenem Psc Protein.** Rot: Anti-Myc, grün: anti-Psc; grau: DNA. **A. – B.** Su(z)2-HG bindet in den endogenen Psc Positionen (Pfeil in B'') und zusätzlich entlang der gesamten Chromosomen. Das endogene Psc lokalisiert zusätzlich zu dem normalen Positionen auch granulär entlang der Chromosomen, wobei es wenig mit dem Myc-Fusionsprotein kolokalisiert. **C. – D.** Su(z)2-N1-Myc zeigt scharf abgegrenzte Signale in Banden in denen auch Psc lokalisiert ist. Das endogene Psc ist auch in feinen Granulen außerhalb der Banden zu erkennen und einige (schwache) Psc Banden werden nicht von Su(z)2-N1-Myc gebunden (Pfeil in D''). Die Chromosomen dieses Genotyps sind dicker als normal (D.). **E. – F.** Das N2-Fusionsprotein ist überwiegend in diskreten Banden nachzuweisen, die z.T. stärker gebunden werden als durch das endogene Psc (Pfeil in F''). Zusätzlich findet sich auch granuläres Signal außerhalb der Banden. Psc ist auch außerhalb der Banden verteilt. **G. - H.** Su(z)2-C-Myc zeigt nur sehr partiell Chromatinbindung, die nicht eindeutig von Hintergrundsignal unterschieden werden kann. Das endogene Psc ist normal in Banden lokalisiert (Pfeil in H'').

### 3.3.2.4 Su(z)2-C- Myc

Der Verlust der HR im Su(z)2-C-Myc Konstrukt führt zum vollständigen Verlust der Chromatinbindung (Abbildung 3.18 G und H). Abgesehen von einigen granulären Signalen, die nicht sicher von Hintergrundfärbung unterschieden werden können, ist kein Chromatin-

assoziiertes Su(z)2-C-Myc Protein zu erkennen. Das endogene Psc Protein ist dahingegen im wildtypisch endogenen Muster angefärbt. Es zeigen sich deutlich ausgeprägte bandenförmige Bindungsstellen und nur wenig granuläre Färbung außerhalb dieser Positionen.

### **3.3.2.5 Su(z)2-N1-Myc**

In allen Präparaten des Su(z)2-N1-Myc CTR-Deletionskonstrukts zeigt sich sehr sauber-wirkendes und scharf abgegrenztes anti-Myc-Signal in diskreten Banden (Abbildung 3.18 C und D). Auch das Psc-Signal zeigt das endogene distinkte Muster und zusätzliche eine fein-granuläre Verteilung außerhalb der Banden. Einige schwache bandenförmige Psc-Signale werden nicht vom Su(z)2-N1-Myc-Fusionsprotein gebunden. In allen Quetschpräparaten dieses Genotyps sind die Chromosomen dicker als in Kontrolltieren oder den anderen Überexpressionssituationen.

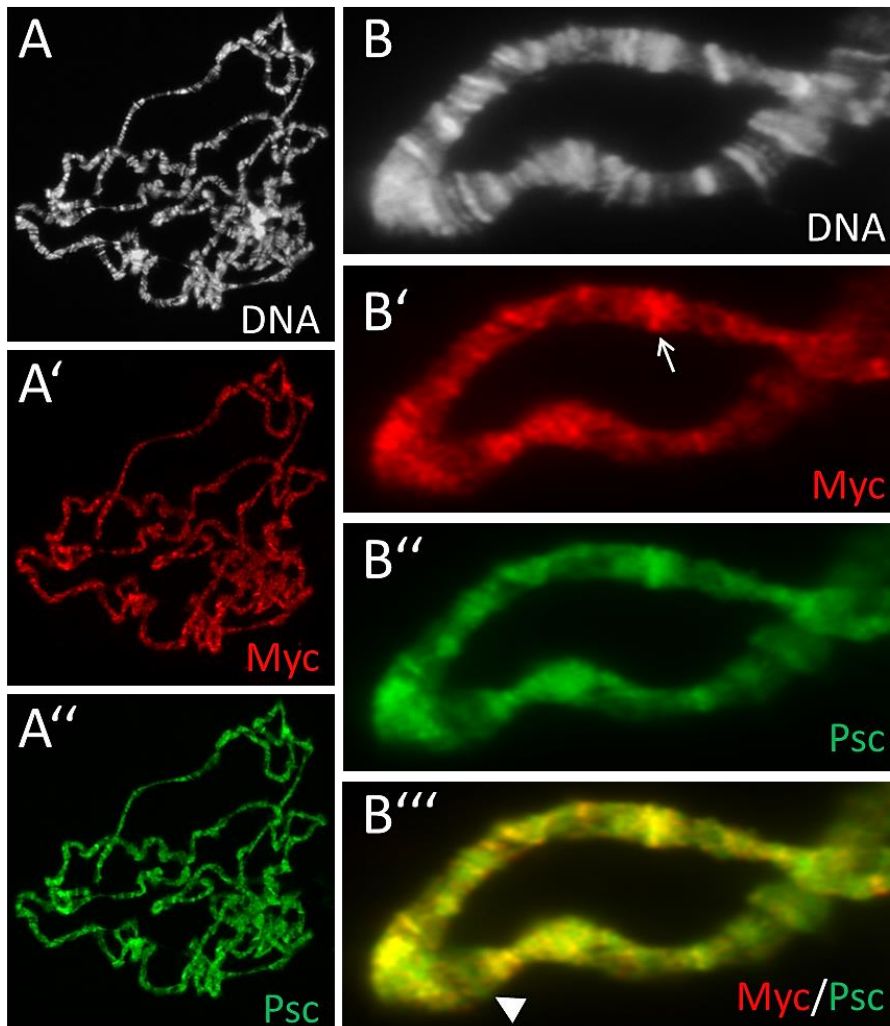
### **3.3.2.6 Zusammenfassung der Chromatinbindung der Su(z)2-Fusionsproteine**

Die Su(z)2-FL und HG Proteine binden in bandenförmigen Bereichen und zusätzlich entlang des gesamten Chromatins. Das transgene N2-Protein zeigt weitgehend bandenförmige Bindung und im Vergleich mit den anderen beiden Konstrukten schwächer ausgeprägte expansive Bindung außerhalb dieser Bereiche. Die Gesamtzahl der Bindestellen des N2-Fusionsoprotein scheint größer zu sein als die der endogenen Psc Bindungsstellen.

Der Verlust der HR im Su(z)2-C-Konstrukt führt zum Verlust der Chromatinassoziation. Die HR alleine bindet in sehr hintergrundarmer Weise in den Positionen der endogenen Psc-Bindestellen, wobei einige schwache Bindestellen nicht besetzt werden.



### 3.3.3 Chromatinbindung der Psc-Fusionsproteine

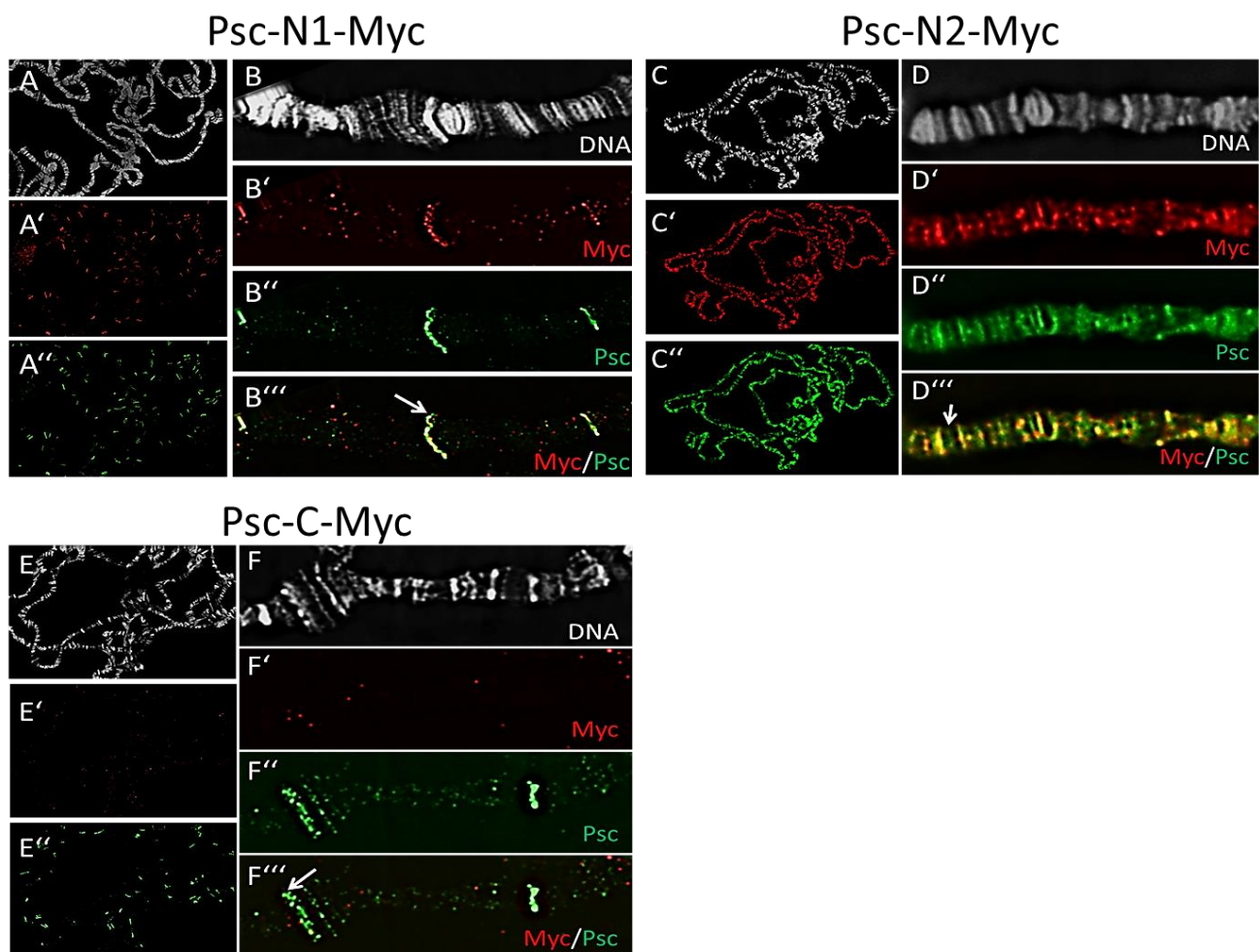


**Abbildung 3.19. Psc-FL-Myc Chromatinlokalisation.** Rot: anti-Myc; Grün: anti-Psc; grau: DNA. **A. – A''** Übersichtsansichten und **B. – B'''** Vergrößerungen eines Chromosomabschnitts. Die Überexpression von *full-length* Psc führt zur Bindung an das gesamte Chromatin. Einzelne Bereiche verstärkter Bindung sind als Banden zu erkennen (Pfeil in B'). Die anti-Psc-Immunfärbung erkennt transgenes und endogenes Psc Protein weshalb grünes und rotes Signal weitgehende Koloalokalisation zeigen. An wenigen Stellen (Pfeilkopf) überwiegt jedoch das grüne Signal, was andeutet, dass hier vorwiegend endogenes Protein bindet. Die Morphologie der Chromosomen ist leicht verändert, so dass die Chromosomen etwas dünner wirken.

#### 3.3.3.1 Psc-FL-Myc

Die Überexpression der wildtypischen Psc Sequenz führt dazu, dass die Speicheldrüsen kleiner als normal bleiben (Abbildung 3.15) und auch die Polytänchromosomen in Quetschpräparaten etwas dünner erscheinen als vergleichbare wildtypische Chromosomen (Abbildung 3.19). Die anti-Myc/anti-Psc Doppelimmunfärbung zeigt in beiden Kanälen ausgedehnte und

kolokalisierende Signale, die zum Teil noch diskreten Banden erkennen lassen. Da der monoklonale anti-Psc Antikörper sowohl das transgene als auch das endogene Psc erkennt, kann aus dieser Beobachtung lediglich geschlossen werden, dass das transgene Psc-Myc an weite Bereiche des Chromatin bindet. Interessanterweise kann jedoch an einigen Stellen überwiegend grünes anti-Psc Signal beobachtet werden (Pfeilkopf in Abbildung 3.19 B'''), was darauf hinweist, dass an diesen Stellen, die zumeist bandenförmig sind, endogenes Psc ohne/mit nur geringen Mengen Psc-FL-Myc Fusionsprotein lokalisiert.



**Abbildung 3.20. Chromatinlokalisierung von Psc-N1, Psc-N2 und Psc-C.** Gezeigt ist jeweils die DNA-Färbung (grau), anti-Myc (rot), anti-Psc (grün) und in den Vergrößerungen die Überlagerung des roten und grünen Kanals. **A.** und **B.** Psc-N1-Myc lokalisiert in diskreten Banden, die den Psc-Positionen entsprechen (Pfeil in B'''). Die Chromosomen wirken dicker als normal. **C.** und **D.** Psc-N2-Myc bindet in Banden und zusätzliche entlang der Chromosomen ("expansiv"). Diese Art der Bindung hat auch die Ausdehnung der Psc-Bindung zur Folge. In der Überlagerung ist zu erkennen, dass das Myc-Fusionsprotein und Psc allerdings nicht vollständig kolokalisieren. Der Pfeil in D''' deutet auf eine Stelle, in der das anti-Psc Signal (grün) überwiegt. **E.** und **F.** Psc-C-Myc zeigt kaum Bindung am Chromatin und das endogene Psc-Muster ist nicht verändert.



### 3.3.3.2 Psc-N2-Myc

Eine ähnliche Lokalisation wie für das *full-length* Psc-Myc Protein zeigt sich für Psc-N2-Myc. Auch das carboxyterminal verkürzte Psc ist in bandenförmigen Signalen zu erkennen und dekoriert zusätzlich weite Bereiche der Chromosomen (Abbildung 3.20 C und D). Die Chromosemstruktur ist jedoch im Gegensatz zur *full-length* Version nicht abnorm und die hochauflösende Betrachtung zeigt, dass es hier im Gegensatz zur *full-length* Überexpression etliche Bereiche gibt, in denen nur grünes Signal – also endogenes Psc Protein – zu sehen ist (Abbildung 3.20 D'', Pfeil). Demnach scheint die Chromatinassoziation von Psc-N2 schwächer zu sein als von der *full-length* Sequenz.

### 3.3.3.3 Psc-C-Myc

Ebenso wie im Fall von Su(z)2-C-Myc ist die Psc-HR für die Chromatinbindung notwendig, so dass in der anti-Myc-Immunfluoreszenz kein Signal am Chromatin zu erkennen ist (Abbildung 3.20 E und F). Da das Epitop des monoklonalen anti-Psc Antikörpers innerhalb der 300 aminoterminalen Aminosäuren liegt (6E8, Martin und Adler, 1993), kann das Psc-C-Myc Fusionsprotein, dem die ersten 509 Aminosäuren fehlen, nicht mit diesem Antikörper detektiert werden. Somit zeigt die anti-Psc Immunfärbung lediglich die Lokalisation des endogenen Proteins, die in diesen Präparaten ebenso wie die Chromosomenmorphologie normal ist.

### 3.3.3.4 Psc-N1-Myc

Das Myc-Fusionsprotein, das im Wesentlichen die Psc HR enthält, ist in diskreten Banden zusammen mit dem endogenen Psc Protein kolokalisiert (Abbildung 3.20 A und B). Wie bereits für Su(z)2-N1-Myc beschrieben, sind auch in dieser Immunfärbung die Banden besonders scharf zu erkennen und die Chromosomen deutlich dicker.

### 3.3.3.5 Zusammenfassung Psc-Myc Chromatinlokalisation

Die Überexpression der *full-length* Psc-Myc und Psc-N2-Myc Proteine führt zusätzlich zur Lokalisation in den endogenen Bindestellen zur ausgedehnten, expansiven Bindung ans

Chromatin. Wobei N2 "schwächer" bindet als FL. Der Verlust der HR im Psc-C-Myc transgenen Protein bedingt den Verlust der Fähigkeit zur Chromatinbindung, wohingegen die HR alleine in scharfen Banden lokalisiert, die weitgehend deckungsgleich mit den endogenen Bindestellen von Psc sind. Psc-FL führt zu dünneren und N1 zu dickeren Chromosomen.

### 3.3.4 Vergleich der Chromatinlokalisation der Su(z)2-Myc und Psc-Myc transgenen Fusionsproteine

Das Bindungsverhalten der Su(z)2-Myc und Psc-Myc Proteine ist sehr ähnlich. Für beide Proteine zeigen jeweils die *full-length* und N2 transgenen Proteine ektopische Bindung an weite Bereiche des Chromatins. Auch der Austausch des konservierten Histidinrests der RING Domäne ins Su(z)2-HG-Myc Fusionsprotein beeinträchtigt die Fähigkeit zur ektopischen Chromatinlokalisation nicht. Der Verlust der HR führt jeweils zum Verlust der Chromatinbindung (Su(z)2-C-Myc und Psc-C-Myc), während die isolierte HR in beiden Fällen (Su(z)2-N1-Myc und Psc-N1-Myc) in den endogenen Bindungsstellen lokalisiert. Auch der Einfluss auf die Chromosomenmorphologie ist in beiden N1-Konstrukten gleich, indem die Chromosomen deutlich dicker sind.

Tab.3.4 Zusammenfassung der Chromatinlokalisation für die transgenen Su(z)2-Myc- und Psc-Myc-Proteine.  
\*geringes granuläres Signal, vermutlich Hintergrundsignal.

Transgen	Chromosomenmorphologie	Fusionsprotein (Myc) Lokalisation in diskreten Banden (endogene Positionen)	ektopische Lokalisation des Fusionsproteins (Myc)	Psc-Lokalisation in diskreten Banden (endogene Positionen)	ektopische Psc- Lokalisation
Su(z)2-FL-Myc	+	+/-	+	+	+
Su(z)2-N2-Myc	+	+	+	+/-	+
Su(z)2-N1-Myc	dicker	+, sauber, scharf	-	+	-
Su(z)2-HG-Myc	+	+/-	+	+/-	+
Su(z)2-C-Myc	+	-	.*	+	.*
Psc-FL-Myc	+/- dünner	+/-	+	-	+
Psc-N2-Myc	+	+	+	+	+
Psc-N1-Myc	dicker	+, sauber, scharf	-	+	-
Psc-C-Myc	+	-	-	+	-

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass die HR für die Chromatinbindung erforderlich ist, wobei eine intakte RING Domäne - zumindest für Su(z)2 (Su(z)2-HG-Myc) - hierfür entbehrlich ist. Obwohl die carboxyterminale Region in den Kern lokalisiert, konnte mittels Immunfärbung weder für Su(z)2-C-Myc, noch Psc-C-Myc Chromatinbindung nachgewiesen werden. Eine Ausweitung der Bindung außerhalb der diskreten Banden der Proteine Su(z)2-FL und Su(z)2-HG zieht jeweils eine Umverteilung des endogenen Psc-Proteins nach sich. Für die Psc-Fusionsproteine Psc-FL und Psc-N2 erscheint eine derartige Umverteilung ebenfalls wahrscheinlich, kann aber nicht direkt nachgewiesen werden, weil der anti-Psc Antikörper auch das transgene Protein erkennt. Interessanterweise geht die expansive Bindung jedoch in den N1 Proteinen verloren. Demnach muß in der Proteinregion, durch die sich die N2- von den N1-Konstrukten unterscheiden, eine Funktion enthalten sein, die in der Überexpressionssituation für die Ausweitung der Chromatinbindung auch außerhalb der endogenen Bindestellen notwendig ist. So ist zwar der HR-enthaltende aminoternale Bereich der beiden Proteine für die Chromatinbindung essentiell und auch ausreichend, aber auch die CTR trägt mit der N2-N1-Differenzsequenz zur expansiven (wahrscheinlich sequenzunabhängigen, unspezifischen) Chromatinassoziation bei. Die Beobachtung, dass die N2 Proteine gegenüber FL und HG verminderte expansive Bindung zeigen, deutet darauf hin, dass Anteile der oben postulierten Proteinbereiche der CTR, die für die maximale expansive Bindung notwendig sind, dem N2-Transgenen fehlen.

### **3.4 Funktionelle Untersuchung der Konstrukte durch Überexpression**

Um die biologische Aktivität der verschiedenen Konstrukte zu beurteilen, wurde zunächst die Funktion der vollständigen (FL) Konstrukte von *Su(z)2* und *Psc* analysiert. Hierzu wurden diese UAS-FL Konstrukte mittels verschiedener GAL4 Aktivatoren in der Embryogenese sowie der Augen- und Flügelentwicklung im ansonsten wildtypischen genetischen Hintergrund exprimiert.

### 3.4.1 Die Überexpression von *Su(z)2* erzeugt dominante Effekte

#### 3.4.1.1 *Su(z)2* Überexpression in der Embryogenese

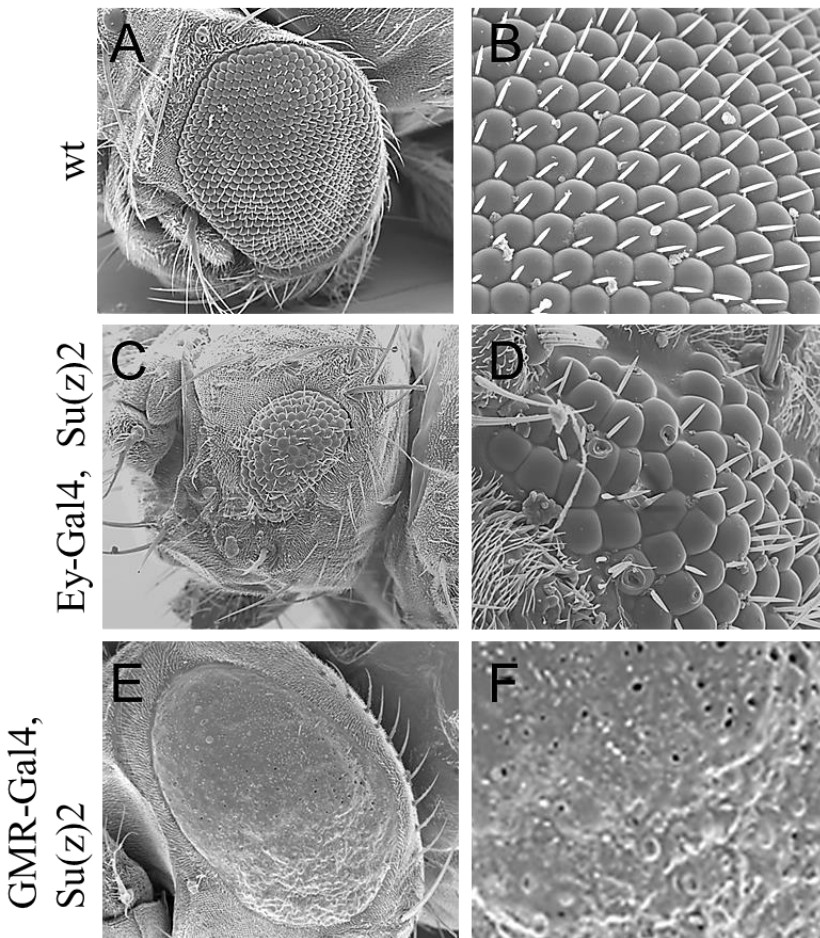
Die ubiquitäre Aktivierung von *Su(z)2*-FL-Myc in frühen Stadien der Embryogenese mit dem *daughterless*-GAL4 Stamm (*daG*) führt zu Entwicklungsdefekten und vollständiger embryonaler Letalität. Dies geht mit der Repression von PcG Zielgenen wie z.B. *Abd-B* und *even skipped* einher (Diplomarbeit Z. Djurdjevic, 2008). Diese Entwicklungsstörungen resultieren im Absterben der Embryonen bevor die larvale Kutikula von den epithelialen Zellen sekretiert wird, also vor Stadium 15 (Abbildung 3.1). Auch die anti-En-Immuno- und DNA-Färbung zeigt den vollständigen Verlust des 14 Streifen-En-Musters sowie massive morphologische Defekte. Zellen dieser Embryonen sind wahrscheinlich apoptotisch. Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass das *full-length* *Su(z)2*-Myc Protein biologisch aktiv ist, und bei Überexpression letale Entwicklungsstörungen verursacht, die durch die fehlerhafte Repression einer Vielzahl entwicklungsrelevanter PcG Zielgene ausgelöst sein dürfte.

Auch die anderen *Su(z)2*-Myc-Fusionsproteine wurden mit *da*-Gal4 in der Embryogenese aktiviert. Die Letalität war hierbei für *Su(z)2*-HG-Myc und *Su(z)2*-N2-Myc ebenfalls vollständig penetrant. Das *Su(z)2*-N1-Myc Transgen verursachte 30 %tige embryonale Letalität, wohingegen *Su(z)2*-C-Myc keinen messbaren Einfluss auf die Letalitätsrate gegenüber der Kontrolle (*white*<sup>1118</sup>) hatte, die ca. 5% nicht geschlüpfter Embryonen aufweist.

#### 3.4.1.2 *Su(z)2* Überexpression in der Augenentwicklung

Um die Funktion der transgenen Konstrukte weiter zu charakterisieren, wurde die Augenentwicklung als Modellsystem genutzt. Zunächst soll der Überexpressionsphänotyp von *full-length* *Su(z)2* charakterisiert werden, um anschließend durch die Analyse genetischer Interaktionen die Funktion genauer einordnen zu können. Hierzu wurde *Su(z)2*-FL-Myc mit dem augenspezifischen GMR-Gal4 Treiber posterior zur Morphogenetischen Furche (MF), bzw. mit *eyeless*-Gal4 (Ey-Gal4) anterior zur MF aktiviert. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit J. Baig und A. Klebes durchgeführt. Aus früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass die Funktion von *Su(z)2* und *Psc* für die normale Spezifizierung und Entwicklung

der Fotorezeptorzellen notwendig ist und dass die Überexpression von *Su(z)2* zur Absenkung des mitotischen Index in der Imaginalscheibenentwicklung und somit zu verkleinerten adulten Augen führt. Die Oberflächenstruktur dieser adulten Augen ist verändert und wirkt rau (Abbildung 3.21; Baig, 2010). Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigte, dass sowohl die Anordnung als auch die Größe der Linsen und Borsten der Einzelaugen gestört ist (Baig, 2010). Einzelne Linsen weisen Löcher auf und nicht jedes Einzelauge besitzt wie im Normalfall eine Borste (Abbildung 3.21).

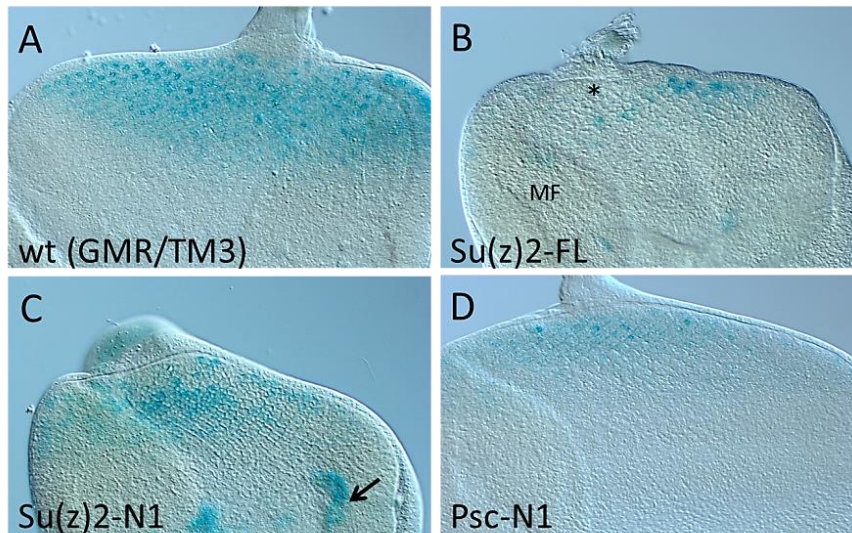


**Abbildung 3.21. Überexpression von *Su(z)2* führt zu kleineren Augen mit veränderter Oberflächenstruktur.** Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen von Köpfen von **A.** und **B.** wildtypischen und **C.** - **F.** UAS-*Su(z)2*-FL-HA überexprimierenden Tieren. Das Auge in **C.** (*Ey-Gal4*) ist deutlich kleiner als in der Kontrolle (**A.**) und die vergrößerte Aufnahme in **D.** zeigt Unregelmäßigkeiten in der Anordnung der Borsten und Linsen, die unterschiedlich groß sind und in einigen Fällen ein Loch aufweisen. **E.** und **F.** Die Überexpression mit *GMR-Gal4* führt zu einer moderaten Verkleinerung und einem Auflösen der Abgrenzungen der normalerweise konvexen Linsen. Es werden nur noch wenige Borsten ausgebildet. REM mit freundlicher Unterstützung von Prof. K. Hausmann, FU Berlin. Abbildungen von Jawaid Baig.

Insgesamt lassen diese Beobachtungen vermuten, dass die *Su(z)2* Überexpression zur falschen Spezifizierung der Zellen (etwa zu Kopfkutikula sekretierenden Zellen), mangelnder Zellproliferation oder Eliminierung von Zellen durch Apoptose führt, wobei diese drei Möglichkeiten sich gegenseitig nicht ausschließen. Nach Überexpression mit GMR-Gal4 sind die Augen ebenfalls kleiner als in der Kontrolle, jedoch in der Regel nicht so klein wie nach *Ey-Gal4* Aktivierung. In dieser Situation verlieren die Linsen der Einzelaugen ihre typische konvexe Reliefstruktur und es entsteht eine kontinuierliche, leicht raue Oberfläche (Abbildung 3.23 E und F), die bei Betrachtung mit der Stereolupe glatt erscheint (Abbildung 3.23).

Diese Störungen der Größe und der regelmäßigen Oberflächenstrukturen der Komplexaugen deutet sich bereits in früheren Stadien der Augenentwicklung an. Augenimaginalscheiben aus Wanderlarven (L3), die *Su(z)2-FL* mit dem GMR-Gal4-Aktivator im Bereich posterior der MF exprimieren, zeigen ein gestörtes Muster der Anordnung der presumptiven Fotorezeptorzelle R7 (Abbildung 3.22). Die hier verwendete *enhancer trap* Linie H214 (Mlodzik et al., 1992) zeigt schwache  $\beta$ -*Galactosidase* Expression in allen Fotorezeptorzellen mit etwas stärkerer Expression in dem R1/R6 Paar und besonders starker Expression in R7. In mehreren *Su(z)2* überexprimierenden Imaginalscheiben sind Bereiche der Fotorezeptorcluster zu erkennen, die keine X-Gal Färbung zeigen, d.h. in denen keine R7 Fotorezeptorzelle spezifiziert wurde. In einigen anderen Fällen waren annähernd normal viele Zellen gefärbt, die jedoch nicht im normalen wohlgeordneten Muster zueinander standen (nicht gezeigt). Die Ursache dieser Störungen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht, da es sich vermutlich um einen pleiotropen Effekt durch die Fehlregulation einer Vielzahl von *Su(z)2*-Zielgenen handeln dürfte. J. Baig konnte zeigen, dass durch die *Su(z)2* Überexpression in anterioren Zellen (*Ey-Gal4*) die Zellproliferationsrate vermindert und die Progression der MF gestört wird (Baig, 2010). Die Analyse der R7 *enhancer trap* Linie in der GMR-*Su(z)2* Überexpression zeigt jedoch im Vergleich zur anterioren Überexpression, dass das Feld der sich spezifizierenden Fotorezeptorzellen posterior zur MF ungefähr normal groß ist (Abbildung 3.23) und Immunfärbungen mit dem neuronalen Marker anti-Elav deuten darauf hin, dass posterior zur MF normal viele Fotorezeptorzellen spezifiziert werden (nicht gezeigt). Demnach scheint die posteriore Überexpression keinen starken Effekt auf die Zellproliferation und MF-Progression zu

haben. Zusammenfassend legen die gestörte Anordnung der presumptiven Fotorezeptorzellen und die verkleinerten adulten Augen nahe, dass die *Su(z)2* Überexpression im posterioren Bereich zur Störung der Musterbildung/Zellspezifikation führt, wodurch vermutlich sekundär ein verstärktes Maß an Apoptose induziert wird.



**Abbildung 3.22. *Su(z)2* Überexpression stört das regelmäßige Muster der presumptiven Fotorezeptorzellen in der Augenentwicklung.** **A.** X-Gal Färbung einer Kontroll-Augenimaginalscheibe der *R7-lacZ enhancer trap* Linie (H214-lacZ/TM3) zeigt das regelmäßige Muster der presumptiven Fotorezeptorzellen (R7) im posterioren Bereich (oben). **B.** Die Überexpression von *Su(z)2* stört dieses Muster. Blaues Signal der *lac-Z*-positive Zellen ist in wenigen Zellen zu sehen. Die Ausbildung von Zellclustern (Sternchen) der presumptiven Fotorezeptorzellen (und anti-elva-Färbung, nicht gezeigt) deuten darauf hin, dass die MF-Progression normal ist und Zellen posterior zur MF als Fotorezeptorzellen spezifiziert werden. **C.** Die Überexpression der *Su(z)2*-HR (GMR-Gal4, UAS-*Su(z)2*-N1-Myc) führt ebenfalls zu unvollständiger Spezifikation der R7 Zellen. Die Färbung anterior der MF (Pfeil) geht wahrscheinlich auf phagozytierende Hämocyten zurück. **D.** Auch die Überexpression der *Psc*-HR (GMR-Gal4, UAS-*Psc*-N1-Myc) führt zur Störung des regelmäßigen R7 Musters. Posterior oben in allen Abbildungen. Abbildung in Zusammenarbeit mit A.Klebes.

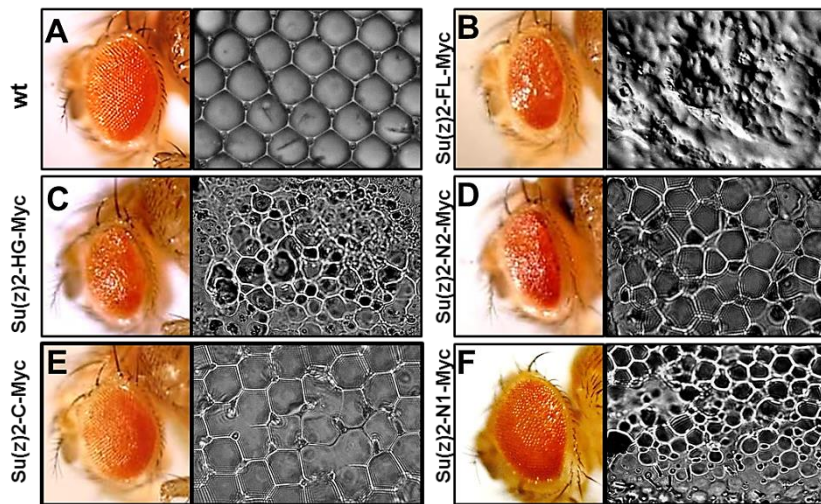
### 3.4.1.3 Auch die Überexpression der HR verursacht Störungen der Augenentwicklung

Die Überexpression der HR von *Su(z)2* ohne den CTR-Bereich (GMR-Gal4, UAS-*Su(z)2*-N1-Myc) zeigt ähnliche Defekte der Augenentwicklung wie die Überexpression des *Su(z)2 full-length* Konstrukts (s. unten). Färbung der *R7 enhancer trap* Linie in diesem genetischen Hintergrund führt auch hier zu einer Verminderung der Anzahl an *lacZ*-positiven Zellen, die in einem gestörten Muster angeordnet sind (Abbildung 3.22 C).

### 3.4.1.4 Vergleich der Effekte der verschiedenen Su(z)2-Konstrukte auf die Augenentwicklung

Durch Betrachtung der adulten Augen und der Oberflächenstruktur mittels Nagellack Abdrucktechnik (Flannery et al., 2006) wurden die Effekte der GMR-Gal4 aktivierten Überexpression aller Su(z)2-Fusionsproteine miteinander verglichen. Hierbei zeigte das *full-length* Konstrukt den stärksten Effekt, indem die konvexe Biegung, hexagonale Form und Abgrenzungen der Einzellinsen vollständig verloren geht wie es bereits in der REM Analyse beobachtet wurde (vgl. Abbildung 3.23 E und F mit A). Die moderate carboxyterminale Verkürzung im N2 Konstrukt führt zu einer leichten Abmilderung der Effekte. Zwar sind die Augen in dieser Überexpressionssituation ähnlich klein wie beim *full-length* Konstrukt, aber die Betrachtung der Oberflächenstruktur zeigt, dass die Abgrenzungen der Einzellinsen weitgehend erhalten bleiben (Abbildung 3.23). Sowohl die variable Größe als auch die Anordnung der Einzellinsen entspricht nicht dem wohlgeordneten Muster des Wildtyps. Ein sehr ähnlicher Effekt zeigt sich für das H-G-Konstrukt, wobei viele Linsen noch kleiner sind als beim N2 Konstrukt und die Anordnung durch eine Vermischung kleiner und großer Linsen insgesamt noch unordentlicher wirkt (Abbildung 3.23 C und D). Auch die fast vollständige Deletion der CTR im N1 Konstrukt zeigt in dieser Betrachtung vergleichbare Effekte, die milder als die Defekte der *full-length* Überexpression sind. Die Gesamtaugen sind nicht so stark verkleinert wie in den oben beschriebenen Fällen und die Anordnung der Einzellinsen wirkt etwas geordneter, da die meisten Linsen gleichmäßig klein sind. Einige Linsen runden sich ab und verlieren den Kontakt zu benachbarten Linsen (Abbildung 3.23 F). Den mildesten Effekt ruft die Überexpression der CTR ohne HR-Anteil hervor (Su(z)2-C-Myc). Die Augen besitzen nahezu wildtypische Größe und auch die Größe und Anordnung der Einzellinsen ist dem Wildtyp vergleichbar. Dennoch ist auch hier das Muster der Einzellinsen durch Verschmelzungen einiger Linsen miteinander und leichter Variationen der Linsengröße etwas gestört (Abbildung 3.23).





**Abbildung 3.23. Veränderungen der Größe und Oberflächenstruktur adulter Augen durch Su(z)2-Überexpression.**

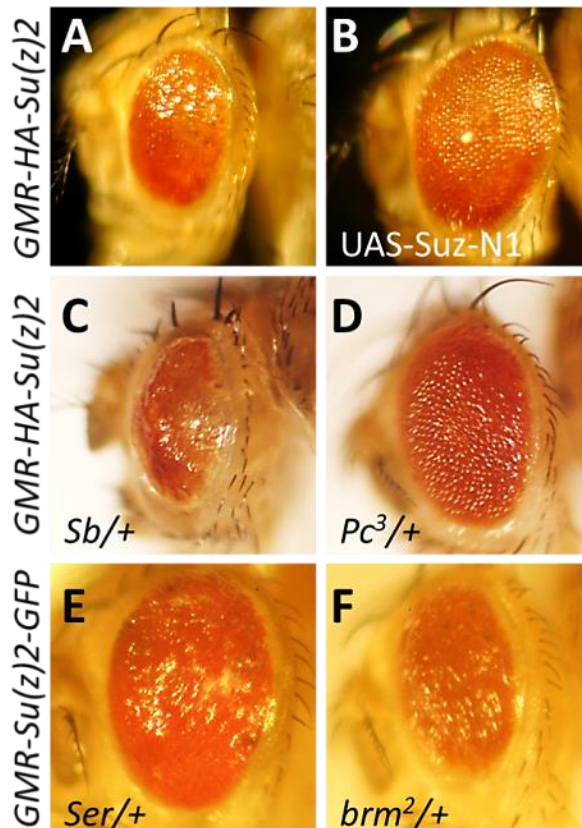
**A.** Kontrollauge einer Wildtyp Fliege. Der Nagellackabdruck zeigt die regelmäßige Größe und Anordnung der Linsen. **B.** Die Überexpression von Su(z)2-FL führt zu glatt erscheinenden, verkleinerten Augen. Die Abgrenzungen der Linsen sind aufgehoben. **C.** Su(z)2-HG und **D.** Su(z)2-N2 haben einen ähnlichen Effekt. Die Augen sind verkleinert. Die Veränderungen der Oberflächenstruktur ist nicht ganz so weitreichend wie bei Su(z)2-FL. Es sind noch abgegrenzte Einzellinsen zuerkennen, deren Muster jedoch ungeordnet ist und die stark unterschiedliche Größen besitzen. **E.** Su(z)2-C Expression verursacht nur sehr milde Defekte. Die Augen sind normal groß und nur vereinzelt ist die Anordnung der Einzellinsen gestört. **F.** Augen der Überexpression der HR (Su(z)2-N1) sind gegenüber dem Wildtyp etwas verkleinert und wirken rau. Die Anordnung der sehr kleinen Einzellinsen ist ungeordnet und einige Linsen haben keinen Kontakt zu Nachbarlinsen.

### 3.4.2 Genetische Interaktionen bestätigen die PcG Funktion von Su(z)2 und zeigen die dominant-negative Wirkung von Su(z)2-N1

Mittels der oben beschriebenen Effekte der Überexpression in der Augenentwicklung kann die genetische Funktion der Konstrukte charakterisiert werden. Hierzu wurde die Überexpression des *full-length* Konstrukts mit der Überexpression des Su(z)2-HR Konstrukts (Su(z)2-N1-Myc) in einer Fliege miteinander kombiniert. Der kleine Augenphänotyp der *full-length* Überexpression konnte hierdurch partiell gerettet werden (Abbildung 3.24 A und B). Da das *full-length* Konstrukt in allen Überexpressionssituationen dominante Wirkung zeigt (s. unten), kann die Wirkweise der HR genetisch als antagonistisch zur dominanten Funktion, also als dominant-negative Wirkung charakterisiert werden.

Dass die Wirkung der *full-length* Überexpression tatsächlich einer dominanten PcG Funktion entspricht, zeigt die genetische Interaktion mit einem mutanten *Pc*, bzw. *brm* Allel. Im heterozygoten *Pc*<sup>3</sup> mutanten Hintergrund wird der kleine Augenphänotyp der Überexpression

partiell gerettet, so dass das mutante *Pc* Allel hier als Suppressor wirkt (Abbildung 3.24 C und D). Eine Verstärkung (*Enhancer*) dieses Phänotyps zeigt sich in der heterozygot mutanten *brm*<sup>2</sup> Situation (Abbildung 3.24 E und F). Auch dieser Befund, dass eine *TrxG* Mutation (*brm*<sup>2</sup>) als *Enhancer* wirkt, bestätigt die dominante PcG Funktion des *Su(z)2* *full length* Transgens.

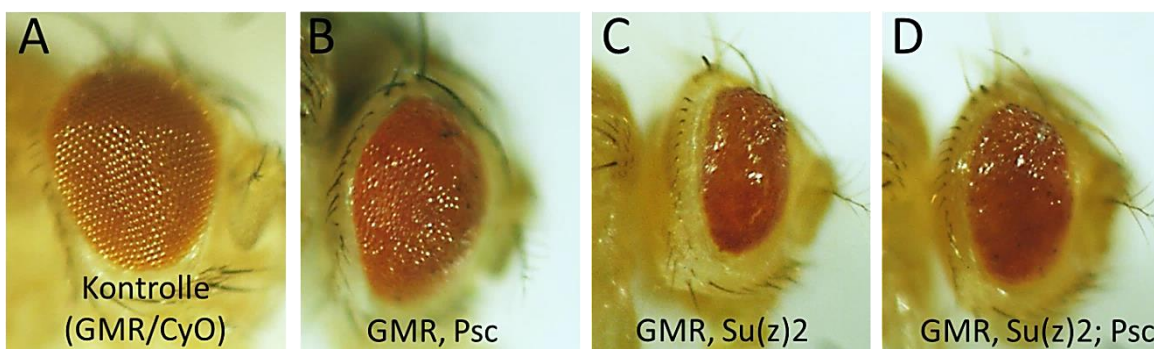


**Abbildung 3.24. Die Überexpression von *Su(z)2* zeigt dominante PcG Effekte.** A. – F. GMR-Gal4 aktivierte Überexpression von *full-length* *Su(z)2* (A. – D. UAS-HA-*Su(z)2*; E. und F. UAS-*Su(z)2*-GFP). Die Überexpression führt zu kleinen Augen (A. und C.). B. Durch die gleichzeitige Expression von UAS-*Su(z)2*-N1-Myc kann dieser Effekt partiell gerettet werden. C. und D. Ein Polycomb mutantes Allel wirkt als Suppressor. Die Schwächung der PcG Funktion im heterozygot mutanten *Pc*<sup>3/+</sup> Zustand rettet partiell den kleinen Augen Phänotyp. E. und F. Ein mutantes *TrxG* Allel wirkt als Verstärker (*enhancer*). Die Überexpression des *Su(z)2*-GFP Transgens führt im Gegensatz zum UAS-HA-*Su(z)2*-Konstrukt zu einer geringen Verkleinerung der Augen, was jedoch im *brm*<sup>2/+</sup> Hintergrund deutlich verstärkt wird. Die Vergrößerung ist in allen Bildern gleich. Abbildung in Zusammenarbeit mit A. Klebes.

### 3.4.3 Die simultane *Su(z)2* und *Psc* Überexpression in der Augenentwicklung wirkt nicht additiv

Aufgrund der Chromatin-Kolokalisation und da die Überexpression von *Psc* ähnliche dominante Effekte wie *Su(z)2* auslöst (s. unten), kann vermutet werden, dass die simultane Überexpression von *Su(z)2*-FL und *Psc*-FL additive Effekte zeigen würde. Die GMR-Gal4-Aktivierung von *full-length* *Psc* alleine zeigt ähnliche Defekte adulter Augen wie die *Su(z)2*-FL Überexpression, die aber insgesamt etwas milder ausgeprägt sind (Abbildung 3.25 B und C). Eine additive Wirkung ist anhand der Betrachtung adulter Augen jedoch nicht festzustellen (Abbildung 3.25 D). Diese

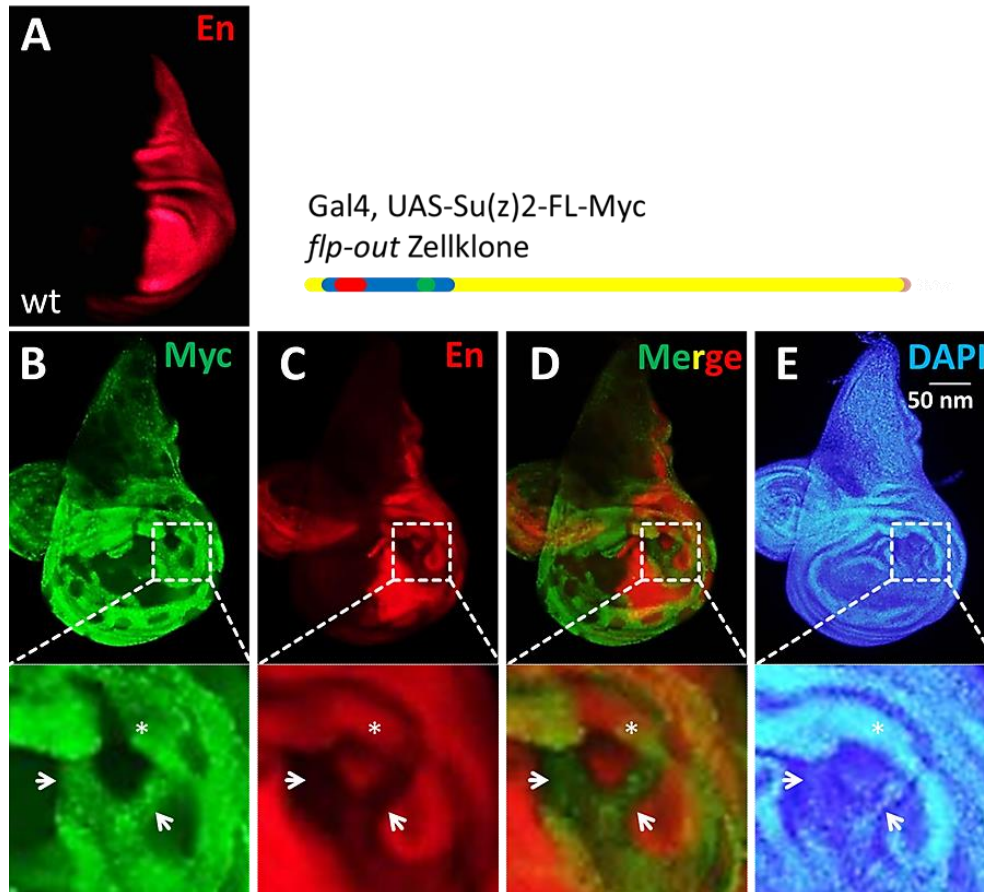
Beobachtung lässt vermuten, dass *Su(z)2* und *Psc* in der Überexpression dieselben Zielgene regulieren, die zu kleineren Augen mit veränderter Oberflächenstruktur führen. Hierbei ist die Expressions-dämpfende Wirkung, welche durch das überexprimierte *Su(z)2* erreicht wird, bereits sättigend, so dass die simultane Überexpression von *Psc* keine weitere Verstärkung bewirkt. Somit unterstützt dieser Befund aus einer Überexpressionssituation die bereits früher beschriebene partiell redundante Funktion beider PcG Faktoren in der Funktionsverlustsituation (Beuchle et al., 2001; Classen et al., 2009).



**Abbildung 3.25. Der Effekt der *Su(z)2*-FL Überexpression kann durch *Psc*-FL nicht verstärkt werden.** A. Kontrollauge (GMR-Gal4, CyO). B. Die Überexpression von *Psc* führt zu kleineren Augen, die in manchen Bereich eine glatte Oberfläche zeigen (GMR-Gal4; UAS-*Psc*-FL-Myc;). C. Die Überexpression von *Su(z)2* (UAS-*Su(z)2*-FL-GFP; GMR-Gal4) zeigt eine noch stärkere Verkleinerung und stärkere Veränderungen der Oberflächenstruktur. D. Die simultane Überexpression beider transgenen Fusionsproteine führt zu keiner Verstärkung des *Su(z)2* Überexpressions-Phänotyps. Sowohl die Größe als auch die Oberflächenstruktur sind den Effekten in C. vergleichbar. Abbildung in Zusammenarbeit mit A. Klebes.

### 3.4.4 *Su(z)2* Überexpression in der Flügelentwicklung

Zur weiteren Analyse wurden mittels der Gal4 *flip-out* Technik zufällig positionierte Überexpressions-Zellklone der verschiedenen Konstrukte in der Flügelentwicklung erzeugt. Zur Markierung der Klone in Flügelimaginalscheiben wurde das transgene Fusionsprotein mit anti-Myc immungefärbt. Als Marker wurde zusätzlich anti-*Engrailed* verwendet. Da das PcG Zielgen *engrailed* (*en*) im P Kompartiment der Flügelimaginalscheiben exprimiert wird (Abbildung 3.26 A), kann in posterioren *Su(z)2* Überexpressionsklonen eine dominante Wirkung durch die Repression von *en* gezeigt werden. Eine dominant-negative Wirkung führt dahingegen in anterioren Zellklonen zur Derepression und somit ektopischen Expression von *en*.



**Abbildung 3.26.** Die *Su(z)2-FL* Überexpression im posterioren Kompartiment unterdrückt *engrailed*. **A.** Normalerweise ist die *en* Expression (rot) auf das P Kompartiment beschränkt. **B.** Die anti-Myc Färbung (grün) markiert Zellen, die *Su(z)2-FL* überexprimieren. **C.** und **D.** In den Bereichen der Überexpression im P Kompartimente ist das *en*-Muster unterbrochen (Pfeile). Myc- und En-Signale sind komplementär, außer an einigen Stellen, wo sich mehrschichtige Strukturen (Sternchen) bilden, in denen Myc- und En-positive Zellen übereinander liegen. **E.** Diese Wulstbildung und Störung der Morphologie im P Kompartiment ist auch in der DAPI Färbung (blau) zu erkennen. Die untere Reihe zeigt Vergrößerungen des markierten Bereichs. Dorsal oben und anterior links in dieser und allen folgenden Abbildungen.

### 3.4.4.1 Die Überexpression von *full length Su(z)2* bewirkt die dominante Repression von PcG Zielgenen

Entsprechend einer dominanten Funktion wird in posterioren Zellklonen, die *Su(z)2-FL* überexprimieren, die *en*-Expression unterdrückt (Abbildung 3.26). Die Schaffung von Zellgruppen, die kein *en* mehr exprimieren in einer ansonsten *en*-positiven Umgebung führt nach der Logik der anterior-posterioren Musterbildung zur Fehlexpression von Entwicklungsgenen wie *decapentaplegic (dpp)* und somit zu Störungen der Proliferationsrate und Musterbildung der Imaginalscheibe (Lawrence und Struhl, 1996). Derartige morphologische Defekte sind z.B. in der Kernfärbung (DAPI, Abbildung 3.26 E) im P Kompartiment zu erkennen.



### 3.4.4.2 Drei Fusionsproteine zeigen dominante Wirkung

Auch die Su(z)2-N2-Myc- und Su(z)2-HG-Myc-Konstrukte verursachen dominante Effekte, die ebenfalls durch die Unterdrückung posteriorer *en*-Expression gekennzeichnet sind (Abbildung 3.27). Ein direkter Vergleich der Potenz der drei Konstrukte ist aufgrund der Positionseffekte der Insertion und der variablen Position und Größe der Zellklone sowie der Variabilität des UAS/GAL4-Systems schwierig. Dennoch lässt sich feststellen, dass alle drei transgene Fusionsproteine bei Überexpression im P Kompartiment ausreichen, um Repression von PcG Zielgenen (z.B. *en*), also dominante Effekte zu erzielen. Das *full-length* Konstrukt wirkt hierbei am stärksten, da kaum posteriore Zellen, die gleichzeitig Myc und *en* exprimieren zu beobachten sind. Bei N2 und HG scheint die repressive Funktion nicht so stark zu sein, da hier etliche posteriore Zellgruppen beide Proteine exprimieren (Abbildung 3.27. A-A'', B-B'').

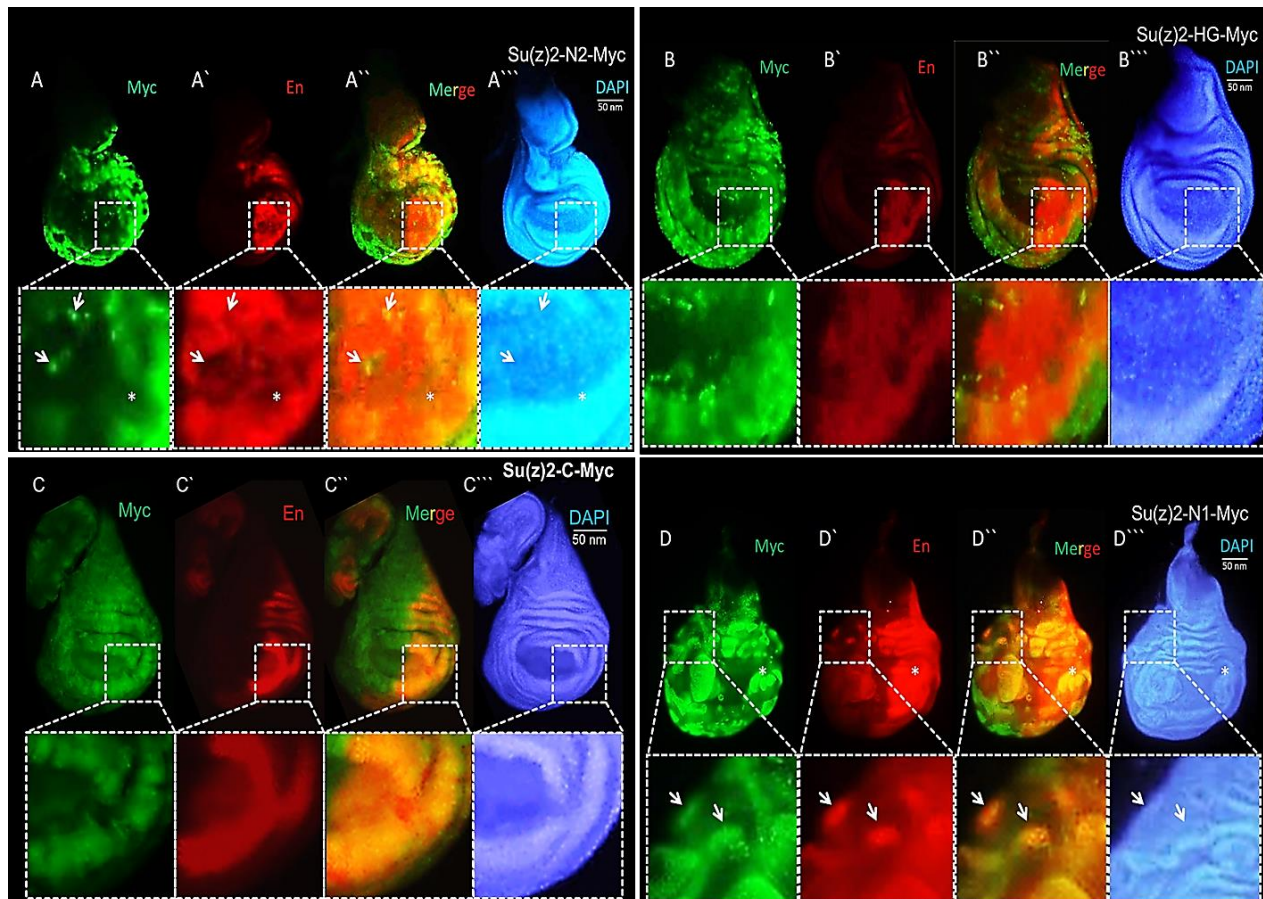
### 3.4.4.3 Die Su(z)2-CTR zeigt keine dominanten oder dominant-negativen Effekte

Die oben beschriebene Unfähigkeit des CTR-Myc Fusionsproteins an Chromatin zu binden, lässt bereits vermuten, dass dieses Transgen keine dominante PcG Funktion besitzt. Entsprechend zeigt die klonale Analyse, dass die posteriore Überexpression keinen Einfluss auf die *en*-Expression ausübt (Abbildung 3.27 C-C''). Auch eine dominant-negative Funktion, etwa die ektopische Expression von *en*, kann im A Kompartiment nicht beobachtet werden. Auch morphologisch zeigen die Flügelimaginalscheiben und adulten Flügel (s. unten) nur sehr milde Abweichung vom Normalzustand, wie es bereits für die Augenentwicklung beschrieben wurde (s. oben). Schlussfolgernd kann die Funktion der CTR als sehr schwach und weder eindeutig dominant noch dominant-negativ beschrieben werden.

### 3.4.4.4 Die Su(z)2-HR besitzt dominant negative Aktivität

Wie bereits durch die genetischen Interaktionsstudien in der Augenentwicklung gezeigt wurde, besitzt die Su(z)2-HR auch in der Flügelentwicklung dominant-negative Funktion. Dementsprechend führen Überexpressionsklone im A Kompartiment zur ektopischen Expression von *en* (Abbildung 3.27 D-D''). Die Überexpression in posterioren Zellen zeigt hingegen keine Wirkung auf die endogene *en* Expression. Besonders auffällig sind die morphologischen Defekte,

wie ein Überwachstum des A Kompartiments, dass durch die Su(z)2-HR-Expressionsklone ausgelöst wird. Dieser Effekt ist durch die ektopische *en* Expression in der *en*-negativen Umgebung des A Kompartiments zu erklären. Durch die Opposition von *en*-postiven und *en*-negativen Zellen werden ektopische Kompartimentsgrenzen induziert, die als Organisationszentren wirken und durch die ektopische Expression von *dpp* auch zur Überproliferation beitragen (Lawrence und Struhl, 1996).



**Abbildung 3.27. Klonale Analyse der Su(z)2-Fusionsproteine.** Gezeigt ist jeweils eine Flüglimaginalscheibe mit Expressionsklonen für **A. – A'''** UAS-Su(z)2-N2-Myc, **B. – B'''** UAS-Su(z)2-HG-Myc, **C. – C'''** UAS-Su(z)2-C-Myc, **D. – D'''** UAS-Su(z)2-N1-Myc. Die anti-Myc-Färbung (grün) markiert die Expression des Transgens (A, B, C, D). Dominante Wirkung führt zur Repression der posterioren *en*-Expression in **A'** und **B'**. Posteriore Zellen mit Myc-Signal sind negativ für oder zeigen eine Reduktion des *En*-Signals (Pfeile in **A-A'''**). Aufgrund von Zellmigration finden sich in posterioren Positionen auch Zellen, die weder das Myc-Epitop noch *en* exprimieren (Stern). **C. – C'''** Die Su(z)2-CTR zeigt keinen Effekt auf das *En*-Muster oder die Morphologie der Scheibe. **D. – D'''** Expressionsklone der Su(z)2-HR führen zum Herauslösen aus dem epithelialen Verband und Abrunden von Zellgruppen im P Kompartiment (Stern) und häufiger im A Kompartiment (Pfeile). In diesen anterioren Zellen wird *en* ektopisch exprimiert. Aufgrund von Überproliferation sind diese Imaginalscheiben oft deutlich vergrößert.

### 3.4.4.5 Auswirkung der Überexpression der Su(z)2-Konstrukte auf die Flügelentwicklung

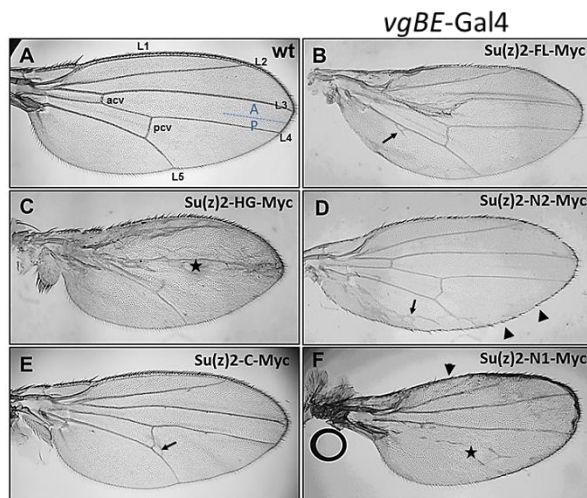
Die Funktion der Su(z)2- und Psc-Fusionsproteine auf die Flügelentwicklung wurde durch Überexpression mit zwei Gal4-Aktivatoren untersucht, *vestigial (vg) boundary enhancer-Gal4* (*vgBE-Gal4*) und C765-Gal4. Der *vgBE-Gal4* aktiviert die Expression früh (2. Larve) im gesamten Flügelbereich und spät (3. Larve) entlang der dorso-ventral-Grenze der Flügelimaginalscheibe, wohingegen C765-Gal4 im gesamten Flügelbereich exprimiert wird (s. Anhang). In beiden Fällen wurden ähnliche Effekte beobachtet. Dargestellt werden jeweils repräsentative Flügel der *vgBE-Gal4*-Überexpression und bei auffälligen Unterschieden wird im Text auch auf die C765-Gal4-Überexpression verwiesen. Die Abbildungen der C765-Gal4-Überexpression befinden sich im Anhang.

Die *vgBE-Gal4*-aktivierte Überexpression des Su(z)2-FL-Myc Konstrukts verursacht Defekte sowohl im A als auch P Kompartiment (Abbildung 3.28 B). Es finden sich ektopische Venen und gelegentliche Blasen zwischen den dorsalen und ventralen Flügelblättern. Die Flügel sind insgesamt etwas kleiner als wildtypische Flügel, wobei besonders das P Kompartiment betroffen ist. Die Defekte, insbesondere die Missbildung und Verschmelzung von Venen sind deutlich stärker in der C765-Gal4-Überexpression (Anhang).

Sehr ähnliche Defekte zeigen sich auch beim Su(z)2-N2-Konstrukt, wobei hier zusätzlich eine Anteriorisierung des posterioren Flügelrandes anhand der Ausbildung mechanosensorischer Borsten zu erkennen ist. Noch stärkere Defekte und Verschmelzungen der Longitudinalvenen treten nach Überexpression des HG-Konstrukts auf, wobei in der *vgBE*-Situation hauptsächlich das anteriore und mit C765-Gal4 beide Kompartimente betroffen sind. In der C765-Gal4-Aktivierung zeigen sich auch Lücken (Einkerbungen) des anterioren Flügelrands (Anhang).

Die Überexpression der CTR zeigt schwache biologische Aktivität. Im Gegensatz zu allen anderen Konstrukten ist hier der Flügel normal groß und lediglich im Bereich der posterioren Quervene kommt es regelmäßig zu ektopischer Venenbildung (Abbildung 3.28 E).

Nach Su(z)2-HR Überexpression sind die Flügel kleiner als im Wildtyp und zeigen Venendefekte (fehlende Quervernen, Lücken in Längsvenen) in beiden Kompartimenten sowie unregelmäßige Anordnung der Borsten des anterioren Flügelrands.



**Abbildung 3.28. Effekte der Su(z)2 Überexpression in der Flügelentwicklung.** **A.** Kontrollflügel einer wildtypischen (wt) Fliege mit den Längsvenen L1 bis L5 sowie der anterioren und posterioren Querverne (acv und pcv). Der anteriore Flügelrand (L1) ist durch eine Dreierreihe mechanosensorischer Borsten geprägt. Die Grenze zwischen A und P Kompartiment zwischen L3 und L4 ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. In dieser wie in allen folgenden Flügelabbildungen ist anterior oben und proximal links. **B. – F.**

Überexpression der UAS-Su(z)2-Myc Konstrukte mit *vgBE-Gal4*. **B.** Su(z)2-FL verursacht Defekte der Venen im A und P Kompartiment, z.B. ektopische Auswüchse von L5 (Pfeil). Der Flügel wirkt deformiert, da das P Kompartiment kleiner ist. Anterior bilden sich Blasen und Falten der dorsalen und ventralen Flügelblätter. **C.** Das HG-Konstrukt betrifft hauptsächlich das A Kompartiment, die Venen zeigen Auswüchse und verschmelzen miteinander, z.B. L3 und L4 (Stern). Der Flügel ist etwas kleiner als beim Wildtyp. **D.** Su(z)2-N2 verursacht posterior ektopische Venenbildung (Pfeil). Auch der posteriore Flügelrand weist ektopische Borsten auf, die denen des anterioren Rands entsprechen (Anteriorisierung, Pfeilköpfe). Das P Kompartiment ist etwas verkleinert. **E.** Die CTR hat nur schwache Effekte im P Kompartiment, die sich in ektopischer Venenbildung manifestieren (Pfeil). **F.** Die Überexpression der HR verursacht anteriore und posteriore Defekte, fehlende Quervernen und unvollständige Ausbildung von L5 (Stern). Der anteriore Rand weist Unregelmäßigkeiten in der Anordnung der Borsten auf (Pfeilköpfe). Der gesamte Flügel ist gegenüber dem Wildtyp verkleinert.

### 3.4.5 Die Effekte der Überexpression von Psc ähneln der von Su(z)2

Insgesamt sind die Defekte, die durch die Überexpression der vier Psc-Myc-Fusionsproteine (FL, N2, N1 und C) hervorgerufen werden, den entsprechenden Su(z)2-Konstrukten sehr ähnlich.

### 3.4.6 Psc Überexpression erzeugt dominante Effekte

#### 3.4.6.1 Psc Überexpression in der Embryogenese

Die ubiquitäre Psc-Expression in der Embryogenese (*daughterless-Gal4*, UAS-Psc-FL-Myc) verursacht vollständig penetrante embryonale Letalität. Ebenso zeigt Psc-N2 100%tige Letalität

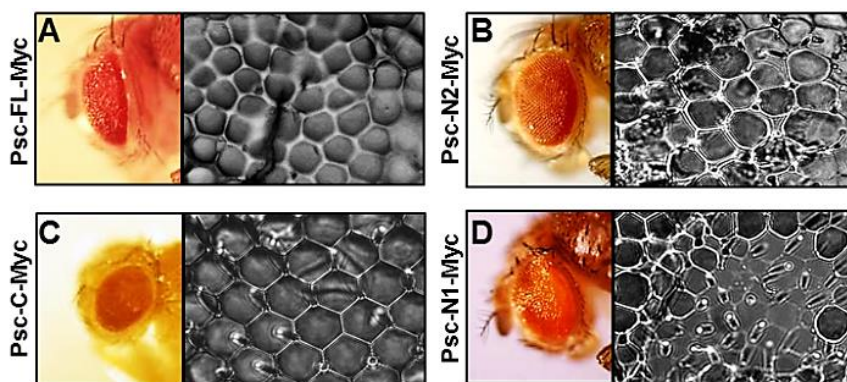


und die Expression der Psc-HR im Psc-N1-Konstrukt mit 40% eine verminderte Letalitätsrate, wie es auch bereits für die Su(z)2-HR beschrieben wurde (30%, s. oben). Die Psc-CTR alleine hat keinen Effekt auf die Letalitätsrate im Vergleich zu Kontrolltieren (*white*<sup>1118</sup>).

### 3.4.6.2 Psc-Expression in der Augenentwicklung

In der Augenentwicklung bewirkt die Psc-Überexpression die Ausbildung von gegenüber dem Wildtyp etwas verkleinerten Augen mit einer leicht rau wirkenden Oberfläche (Abbildung 3.29). Die Größe und Form der Einzellinsen ist variabel, woraus resultiert, dass die Anordnung unregelmäßig ist. Ebenso wie für *Su(z)2* wurde auch hier die Ursache dieses adulten Phänotyps aufgrund der vermuteten pleiotropen Effekte nicht näher untersucht.

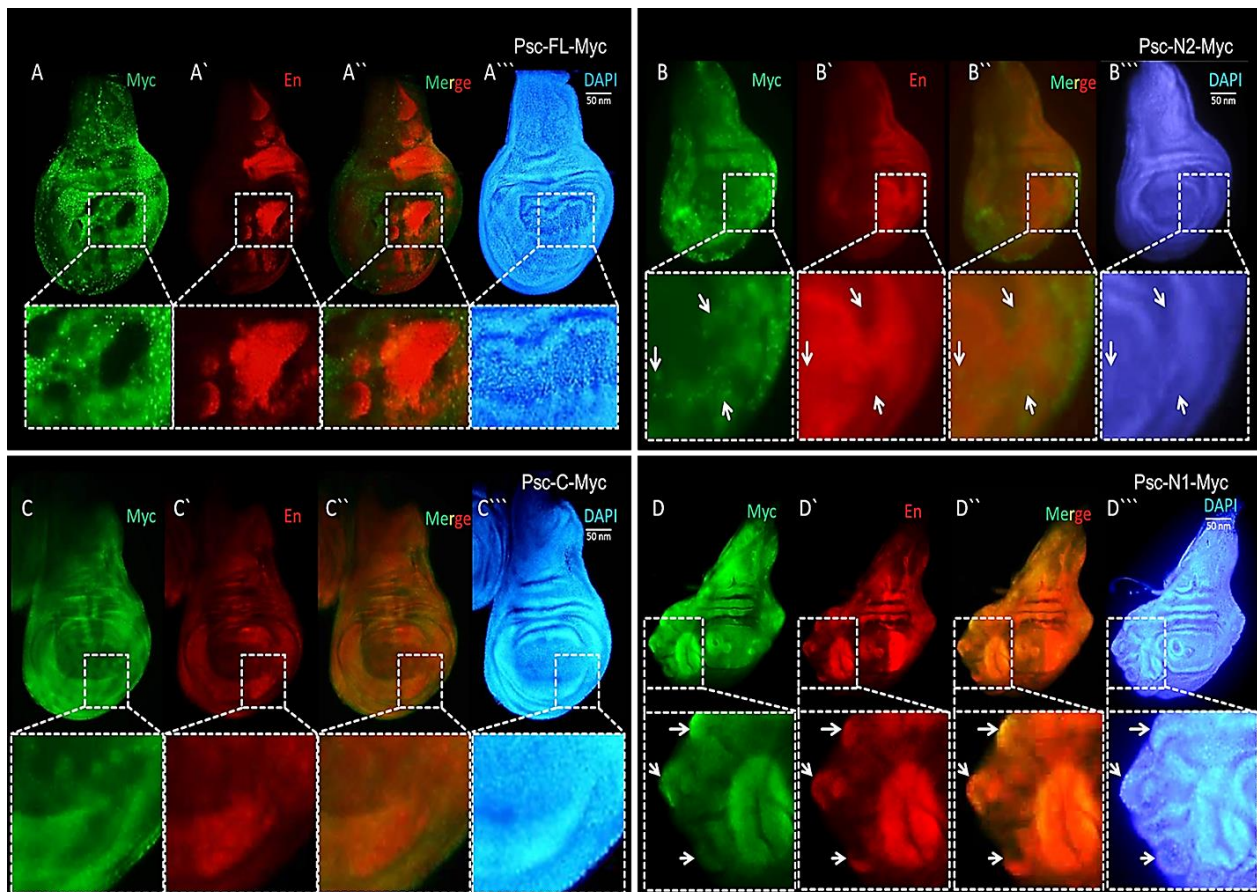
Die Überexpression des Psc-N2-Konstrukts verursacht sowohl in Bezug auf die Größe des Gesamtauges als auch die Größe und Regelmäßigkeit der Anordnung der Einzellinsen etwas mildere Defekte als das *full-length* Konstrukt. Augen, die Psc-C überexprimieren, sind nicht von wildtypischen Augen zu unterscheiden, wohingegen Psc-N1 zur Verkleinerung des Gesamtauges und den bereits beschriebenen Defekten der Oberflächenstruktur führt (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29. Überexpression der Psc-Konstrukte im Auge.** A. Psc-FL führt zu kleinen Augen mit gestörter Oberflächenstruktur. B. Etwas mildere Effekte werden durch Psc-N2 hervorgerufen. C. Psc-C verursacht keine auffälligen Abnormalitäten. D. Psc-N1 überexprimierende Augen sind kleiner als normal und zeigen eine raue Oberfläche mit variabler Größe und gestörter Anordnung der Einzellinsen.

### 3.4.6.3 Analyse der Psc-Überexpression in der Flügelentwicklung

Die klonale Psc-FL Überexpression in Flügelimaginalscheiben zeigt in posterioren Zellen eine deutliche Repression der *en*-Expression, die auch mit morphologischen Störungen der Imaginalscheibe einhergeht (Abbildung 3.30 A-A''). In anterioren Zellklonen ist hingegen keine ektopische *en*-Expression festzustellen. Aufgrund dieser Beobachtung wird die Wirkung der Psc-FL Überexpression als dominant eingestuft.



**Abbildung 3.30. Effekte der Psc-Fusionsproteine auf die Musterbildung.** Zufällig positionierte Gal4-Expressionsklone. Grün – anti-Myc markiert die exprimierenden Zellen. Rot – anti-Engrailed zeigt den Effekt der Überexpression auf das *En*-Muster. Weiterhin gezeigt sind die Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz und die DNA-Färbung mit DAPI (blau). **A.** UAS-Psc-FL-Myc; posterior wird *en* reprimiert. Die Scheibe zeigt morphologische Defekte. **B.** Auch UAS-Psc-N2-Myc vermag posteriores *en* zumindest teilweise zu reprimieren. Die Effekte sind schwächer als für Psc-FL und keine offensichtlichen morphologischen Defekte sind erkennbar. **C.** UAS-Psc-C-Myc; das *En*-Muster und die Morphologie der Imaginalscheibe sind nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. **D.** UAS-Psc-N1-Myc; Posterior ist keine Veränderung der *En*-Expression zu erkennen, aber im A Kompartiment wird in den Expressionsklonen *en* ektopisch exprimiert. Die *En*-positiven Zellgruppen runden sich ab und aufgrund von Überproliferation ist das A Kompartiment deutlich vergrößert.

#### 3.4.6.4 Die Psc-Deletionskonstrukte zeigen dominante, keine oder dominant-negative Funktion

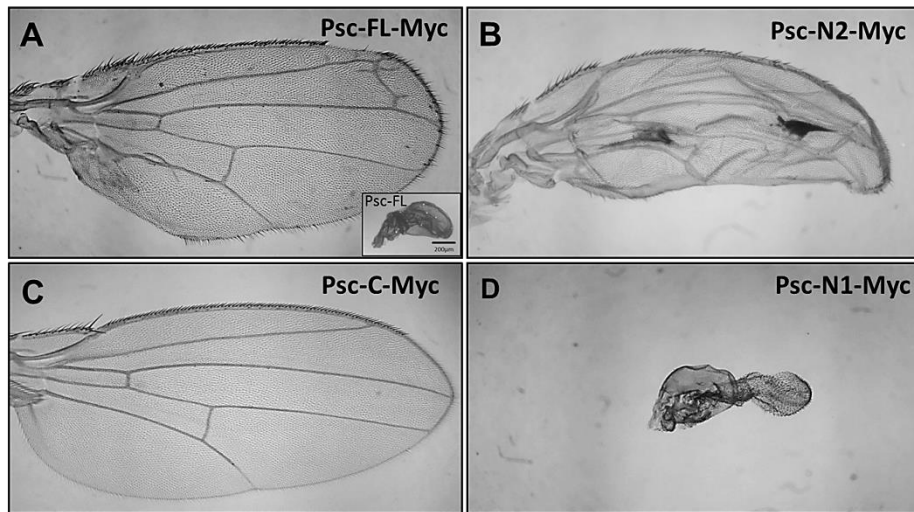
Die moderate Verkürzung der CTR im Psc-N2-Myc Konstrukt schwächt die dominante Funktion wie bereits in der Augenentwicklung beobachtet (s. oben) etwas ab. Ebenso wie das *full length* Konstrukt besitzt Psc-N2 zwar prinzipiell die Fähigkeit posteriores *en* zu reprimieren, jedoch ist diese Repression nicht vollständig und betrifft nicht alle posterioren Zellen, die Psc-N2 exprimieren (Abbildung 3.30 B-B''). Im A Kompartiment findet sich keine ektopische *en*-Expression, so dass anhand dieser Kriterien die Funktion des N2-Transgens als schwach dominant bezeichnet werden kann. Die Psc-CTR hingegen zeigt in Bezug auf die *en*-Expression weder im P, noch im A Kompartiment einen Effekt (Abbildung 3.30 C-C''). Das Psc-N1-Myc-Konstrukt ruft dominant-negative Effekte hervor. Während die posteriore *en*-Expression nicht betroffen ist, wird *en* in anterioren Expressionsklonen ektopisch exprimiert (Abbildung 3.30 D-D''). Die anteriore Deregulation von *en* und möglicherweise anderer Gene verursacht deutliche Überproliferation und somit ein Überwachstum des A Kompartiments, das mit morphologischen Veränderungen verbunden ist. Somit rekapituliert die dominant-negative Funktion von Psc-N1, ebenso wie von Su(z)2-N1, sowohl in Bezug auf die Deregulation von PcG Zielgenen als auch in Bezug auf die deregulierte Zellzykluskontrolle die *Psc/Su(z)2* doppelmutante Situation.

#### 3.4.6.5 Auswirkungen der Psc-Konstrukte auf die Flügelentwicklung

Ebenso wie für die *full-length* Überexpression von *Su(z)2* führt Psc-FL zu Missbildungen/Auswüchsen der Venen. Diese Effekte des Psc-FL-Myc-Konstrukts betreffen hauptsächlich das A Kompartiment (Venendefekte, Einkerbungen des Flügelrands), aber auch auf der posterioren Seite sind Defekte zu beobachten (Abbildung 3.31 A). Das Psc-FL-Konstrukt ohne das Myc-Epitop ruft etwas stärkere Effekte hervor (kleines Bild in Abbildung 3.31 A).

Die Deletion im Psc-N2-Konstrukt führt hingegen zu Schädigungen im P Kompartiment, das deutlich reduziert ist, wodurch der Flügel insgesamt gebogen erscheint. Die Flügel sind faltig, da der Kontakt zwischen dorsalen und ventralen Flügelblättern gestört ist. Aktivierung mit C765-Gal4 führt zu Flügeln, die wie zusammengefaltete puppale Flügel aussehen. Die Defekte beider Überexpressionsansätze ähneln sich demnach in Bezug auf die Entfaltung.

Überexpression der CTR ruft weder mit *vgBE-Gal4*, noch mit *C765-Gal4* erkennbare Defekte der adulten Flügel hervor (Abbildung 3.31). Dahingegen führt die *Psc-HR* mit beiden Treiberlinien zur drastischen Reduktion der Flügel, so dass nur noch kleine Stummelflügel vorhanden sind.



**Abbildung 3.31. Überexpression der Psc-Fusionsproteine mit *vgBE-Gal4*.** **A.** Überexpression von *full-length Psc* verursacht Venendefekte und Defekte des Flügelrands hauptsächlich im A Kompartiment. Das *Psc-FL* Transgen ohne Myc-Epitop verursacht noch stärkere Effekte, die Flügel bleiben klein. Diese Stummelflügel sind becherförmig, weil das dorsale Flügelblatt etwas größer als das ventrale ist (kleines Bild in A.). **B.** Nach Expression des *Psc-N2*-Konstrukts sind die Flügel faltig und das P Kompartiment ist reduziert. Gelegentlich sind dunkle Flecken zu beobachten, die wahrscheinlich durch abgestorbene Zellen verursacht werden (nekrotische Flecken). **C.** Die CTR zeigt keine Effekte. **D.** Nach Expression der HR sind die Flügel stark reduziert. In den Stummelflügeln ist keine Zuordnung von Venen möglich.

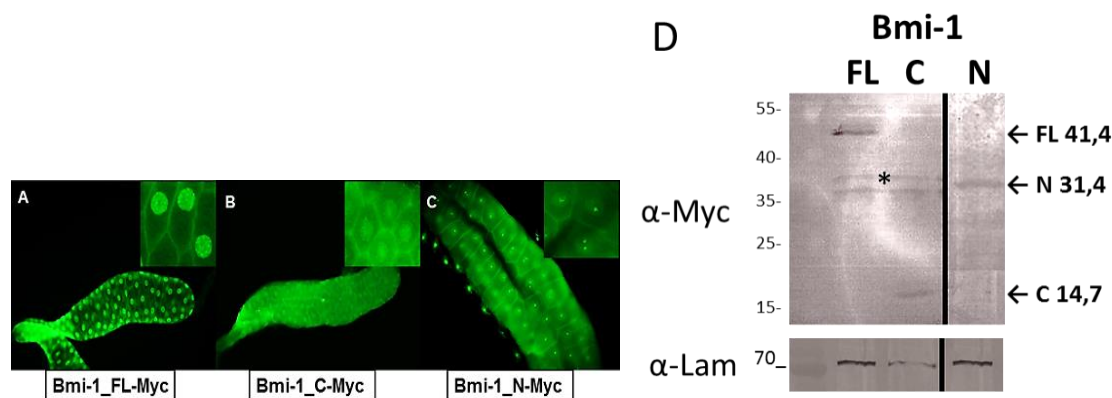
### 3.4.7 Zusammenfassung – Vergleich der *Su(z)2*- und *Psc*-Überexpression unter Berücksichtigung der Chromatinlokalisation

Die entsprechenden transgene Fusionsproteine von *Su(z)2* und *Psc* zeigen jeweils sehr ähnliche Effekte. So verursachen die *full-length* und *N2*-Konstrukte jeweils dominante Effekte, die sich z.B. in der posterioren Repression von *en* äußern. Die carboxy-terminalen Deletionen von 733 (*Su(z)2-N2*), bzw. 703 (*Psc-N2*) Aminosäuren scheinen somit keine Funktionen zu beinhalten, die für diese dominanten Effekte essentiell sind. Da das *Su(z)2-HG*-Konstrukt, in dem das essentielle Histidin der RING-Domäne mutiert ist, ebenfalls dominant wirkt, ist eine intakte RING Domäne für die Erzeugung dominanter Effekte in der Überexpressionssituation nicht notwendig. All diese

Konstrukte zeigten nach Überexpression in Speicheldrüsen unspezifische Chromatinbindung (Su(z)2-N2 deutlich schwächer). Somit korreliert das Bindungsverhalten dieser Konstrukte mit ihrer dominanten Funktion. Da die Chromatin Immunfärbung gezeigt hat, dass die dominant wirkenden Fusionsproteine das gesamte Chromatin binden, könnte die Fehlregulation sowohl von PcG-Zielgenen, als auch von Genen, die normalerweise in diesen Zellen nicht durch die PcG reguliert werden, für die dominanten Effekte verantwortlich sein. Die amino-terminalen Sequenzen, die die HR beinhalten, sind insgesamt für die Funktion nicht entbehrlich, da die C-Konstrukte jeweils keine dominante Wirkung zeigen. Auch hier korreliert die weitgehende Abwesenheit dominanter oder dominant-negativer Effekte mit der Abwesenheit von Chromatinbindung. Dahingegen führt die Deletion der CTR in den HR-Konstrukten beider Proteine zur Umkehr der dominanten in eine dominant-negative Funktion und zum Verlust der expansiven Chromatinbindung. Dementsprechend müssen die funktionellen Bereiche der Proteine, die für die dominante Funktion notwendig sind, innerhalb der 391 (Psc), bzw. 376 (Su(z)2) Aminosäuren, um die sich die N2- von den N1-Konstrukten unterscheiden, lokalisiert sein. Die Beobachtung, dass die HR-Konstrukte (Su(z)2-N1, Psc-N1) jeweils saubere Chromatinbindung in den meisten endogenen Positionen zeigen, weist darauf hin, dass die HR alleine ausreichend für diese Art der Bindung ist und dass die Bindung dieser transgenen Proteine vermutlich zur Deregulation der Zielgene führt. Dieser Befund ist mit der Vorstellung vereinbar, dass durch die Inkorporation der HR-Proteine in die PcG-Multiproteinkomplexe deren Funktion so beeinträchtigt wird, dass sie nicht länger die Repression der Zielgene aufrechterhalten können. Zu den charakterisierten PcG-Zielgenen zählen z.B. *en*, *hedgehog*, *wingless*, *decapentaplegic*, *unpaired* u.v.a.m. Hierdurch wird deutlich, dass eine gleichzeitige Fehlexpression dieser und vieler anderer entwicklungsrelevanter Gene zu pleiotropen Effekten führt, wie sie für die Embryonal-, Augen- und Flügelentwicklung oben postuliert wurden.

### 3.5 Vergleich der Fliegenproteine Su(z)2 und Psc mit dem Säugerprotein Bmi-1

Durch die Herstellung transgener Fliegen und Gal4-vermittelter Expression wurde die Funktion des Vertebraten Orthologs Bmi-1 untersucht. Drei Myc-Fusionsproteine enthalten die vollständige Bmi-1 Sequenz (Bmi-FL-Myc), nur die HR, (Bmi-N-Myc, 98 Aminosäuren Deletion der CTR) und das komplementäre Konstrukt der CTR (Bmi-C-Myc) (Abbildung 3.13). Die Expression und Kernlokalisierung wurde durch Aktivierung in larvalen Speicheldrüsen und anschließender anti-Myc-Immunfärbung sowie Western Blot Analyse bestätigt (Abbildung 3,32). Hierbei ist auffällig, dass das HR-Konstrukt intensive punktförmige Signale innerhalb der Zellkerne liefert.



**Abbildung 3.32. Expression und Kernlokalisierung der drei Bmi-1 Fusionsproteine.** Anit-Myc Immunfärbung (grün) an Speicheldrüsen aus dritten Larven, die die verschiedenen *UAS-Bmi-1-Myc*-Konstrukte mittels Gal4-231.1 exprimieren. **A.** *Full-length* Bmi-1 lokalisiert im Zellkern. **B.** Die Färbung des CTR-Konstrukts zeigt Kernlokalisierung und zytoplasmatisches Signal (s. Inset). **C.** Die Bmi-1-HR (Bmi-1-N-Myc) lässt sich in diskreten Punkten innerhalb der Kerne anfärben. **D.** Western Blot Analyse der Bmi-1-Expression. Das Laufverhalten der *full-length* (FL), CTR- (C) und HR-Fusionsproteine (N) weicht etwas von den errechneten Molekulargewichten (Zahlenangabe rechts) ab. Für jedes Protein wird mit anti-Myc eine Bande detektiert (Pfeile). Zwei unspezifische Signale (Stern) treten auf dem linken Western Blot auf. Die obere Hälfte der beiden Blots wurde mit anti-Lamin als Ladekontrolle geprobt (Lamin, 72kDa).

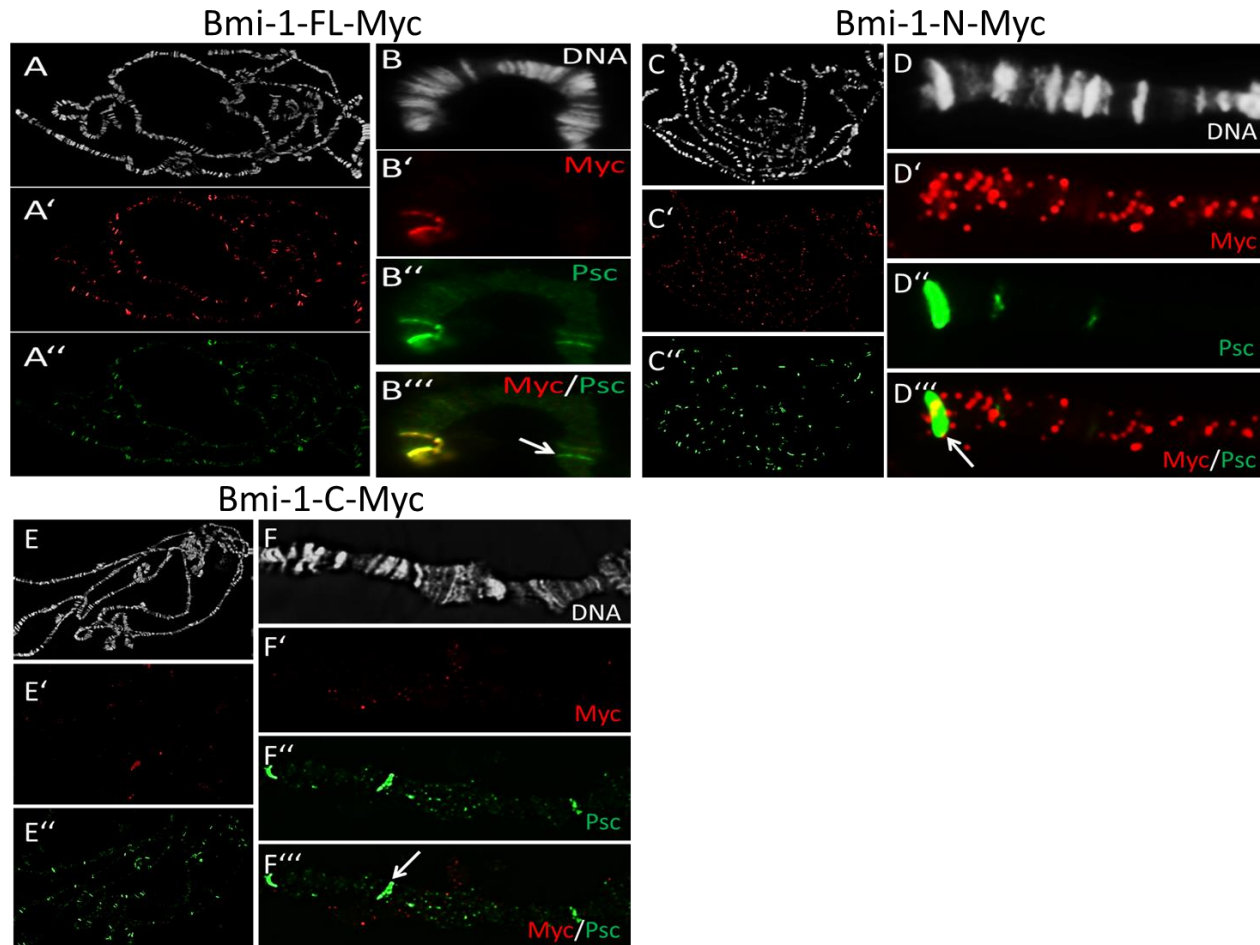
#### 3.5.1 Chromatinlokalisierung der drei Bmi-1 Fusionsproteine

Immunfärbungen an Polytänchromosomen zeigen, dass das *full-length* Maus Bmi-1-Myc Fusionsprotein an die endogenen Su(z)2/Psc Chromatinbindestellen lokalisiert (Abbildung 3.33). Im Gegensatz zu Su(z)2-FL und Psc-FL ist in der Vergrößerung zu erkennen, dass *full-length*



Bmi-1 in dieser Überexpressionssituation nicht expansiv an das gesamte Chromatin bindet und auch nicht alle endogenen Psc Positionen besetzt (Abbildung 3.33 B''').

Wie auch schon für Su(z)2 und Psc beobachtet wurde, kann die CTR von Bmi-1 in der Immunfärbung nicht am Chromatin nachgewiesen werden (Abbildung 3.33 F-F'''). Das endogene Psc-Muster ist gegenüber der Kontrolle unverändert.



**Abbildung 3.33. Chromatinlokalisierung der drei Bmi-1 Fusionsproteine.** A. und B. *Full-length* Bmi-1 bindet an viele endogenen Psc Stellen, aber einige Banden werden nicht erkannt (Pfeil in B'''). C. – D. Die Bmi-1-HR zeigt expansive granuläre Signale, die nicht mit den Psc-Banden übereinstimmen. Die Chromosomen sind etwas dicker als normal. E. – F. Die CTR ohne HR-Anteil bindet nicht an das Chromatin. Die Lokalisation von Psc in diskreten Banden bleibt bestehen (Pfeil in F''').

Das HR-Bmi-1-Konstrukt (Bmi-1-N) ist nicht in diskreten Banden der Psc-Bindestellen lokalisiert, sondern breitet sich granulär über das gesamte Chromatin aus (Abbildung 3.33 D'). In intakten polytären Zellkernen sind in der Immunfärbung jeweils ein oder mehrere Foci intensiven Signals

zu erkennen (Abbildung 3.32), was nahe legt, dass hier Bmi-1-N nicht einfach entlang des Chromatins bindet, sondern in Strukturen höherer Ordnung organisiert ist. In der Übersichtsaufnahme und der vergrößerten Ansicht (Abbildung 3.33 C`) ist keine Kolo-kalisation von HR-Bmi-1 mit Psc zu erkennen. Das endogene Psc Muster ist nicht beeinträchtigt, aber auch in dieser Überexpressionssituation erscheinen die Chromosomen gegenüber normalen Präparaten verdickt.

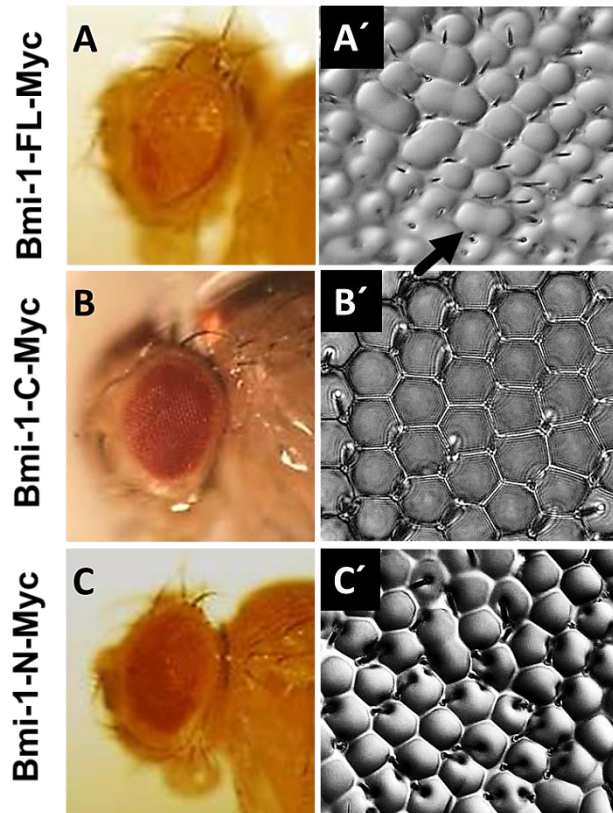
### **3.5.2 Effekt der Bmi-1 Überexpression auf die Embryonalentwicklung**

Wie es bereits schon für die Su(z)2- und Psc-Konstrukte beobachtet wurde, verursachte die *da*-Gal4-aktivierte Expression des Bmi-1-FL-Myc-Transgens vollständig penetrante embryonale Letalität. Durch diese Beobachtung wird die biologische Aktivität dieses Maus Proteins in *Drosophila* gezeigt. Auch die beiden anderen Bmi-1-Konstrukte verhalten sich ähnlich wie die entsprechenden Su(z)2- und Psc-Konstrukte. Bmi-1-N-Myc verursacht embryonale Letalität mit einer verminderten Rate von 60% und Bmi-1-C-Myc überexprimierende Embryonen sind vital mit einer geringen Letalitätsrate von ca. 5% die auch in Kontrolltieren beobachtet wird.

### **3.5.3 Expression der Bmi-1 Konstrukte in der Augenentwicklung**

Die GMR-Gal4-vermittelte Überexpression von *full-length* Bmi-1 in der Augenentwicklung führt zu etwas verkleinerten adulten Augen mit einer rau-wirkenden Oberfläche (Abbildung 3.34 A). Die Analyse der Oberflächenstruktur zeigt, dass die Linsen teilweise etwas kleiner sind und dass nicht immer genau eine Borste pro Einzelaug ausgebildet wird. Einige Einzellinsen verschmelzen miteinander oder haben ein Loch.





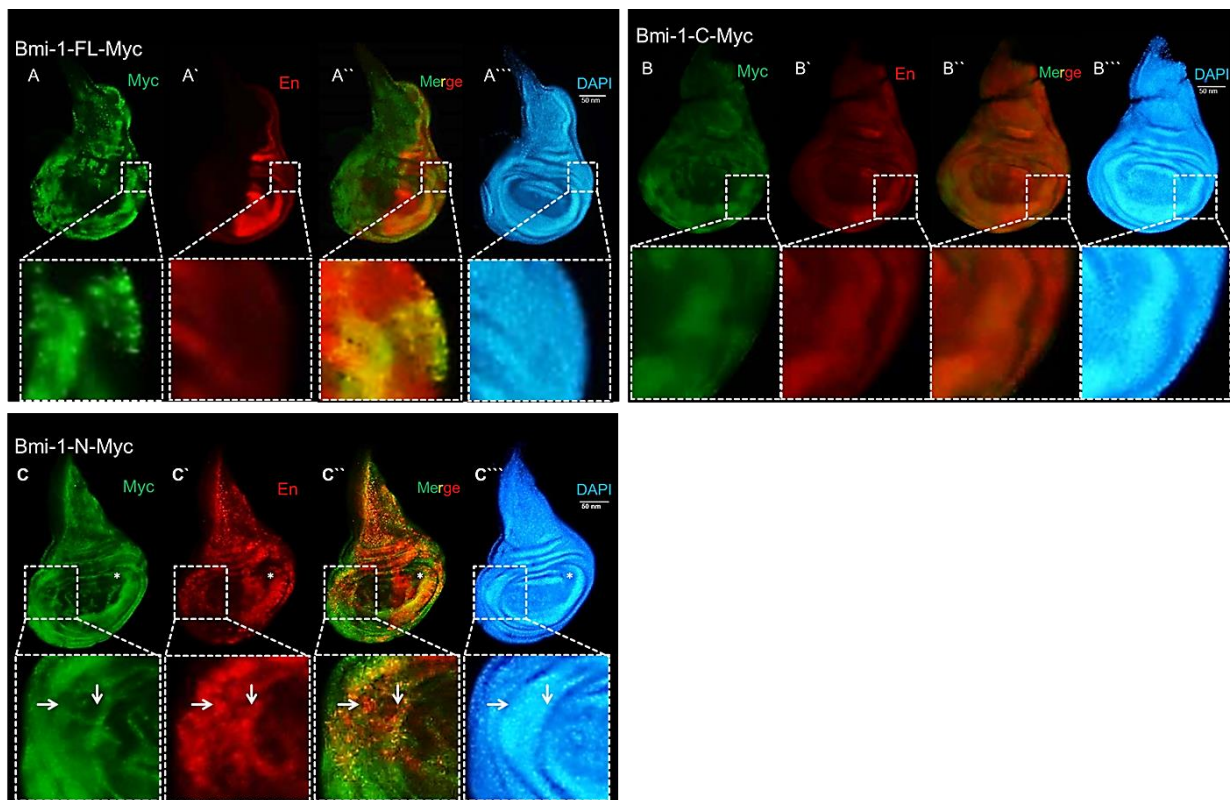
**Abb:3.34. Bmi-1-FL und Bmi-1-N verursachen Defekte in der Augenentwicklung.** A.- A' Überexpression von Bmi-1-FL führt zu verkleinerten Augen mit einer rauen Oberfläche. Einige Einzellinsen sind kleiner als normal, einige verschmelzen miteinander (Pfeil) und es werden teilweise mehr als eine Borste pro Einzelaug ausgebildet. In einigen Linsen sind Löcher zu erkennen. B. – B' Bmi-1-C verursacht keine offensichtlichen Defekte. C. – C' Bmi-1-N Augen sind etwas kleiner und die Oberflächenstruktur ist ungeordnet. Einzellinsen sind verschieden groß, teilweise miteinander verschmolzen oder weisen Löcher auf.

Die Überexpression der Bmi-1-CTR hat keinen Effekt auf die Größe oder Oberflächenstruktur (Abbildung 3.34 B). Dahingegen bewirkt die Bmi-1-HR, dass die adulten Augen etwas kleiner als normal sind und eine raue Oberfläche besitzen. Die regelmäßige Anordnung der Einzellinsen wird durch deren variable Größe und Verschmelzungen gestört und einige Linsen haben ein Loch (Abbildung 3.34 C).

### 3.5.4 Bmi-1 Wirkung auf die Musterbildung in Flügelimaginalscheiben

Die Auswirkung der Bmi-1-Fusionsproteine auf die Musterbildung in der Flügelentwicklung wurde durch Erzeugung von Expressionsklonen (Gal4, UAS-Bmi-1) und anschließender anti-Myc und anti-Engrailed Immundoppelfärbung untersucht. Hierbei zeigten weder das *full-length*, noch das CTR-Konstrukt einen Effekt auf die endogene *en* Expression im P Kompartiment und auch keine ektopische *en*-Expression in anterioren Zellen (Abbildung 3.35). Das um die CTR verkürzte Bmi-1-HR-Konstrukt führte dahingegen zur ektopischen Expression von *en* in anterioren Zellen, also dominant-negative Aktivität. Interessanterweise zeigt die Doppelfärbung, dass Zellen anteriorer *en*-Expression nicht immer deckungsgleich mit den Zellen der Expressionsklone sind

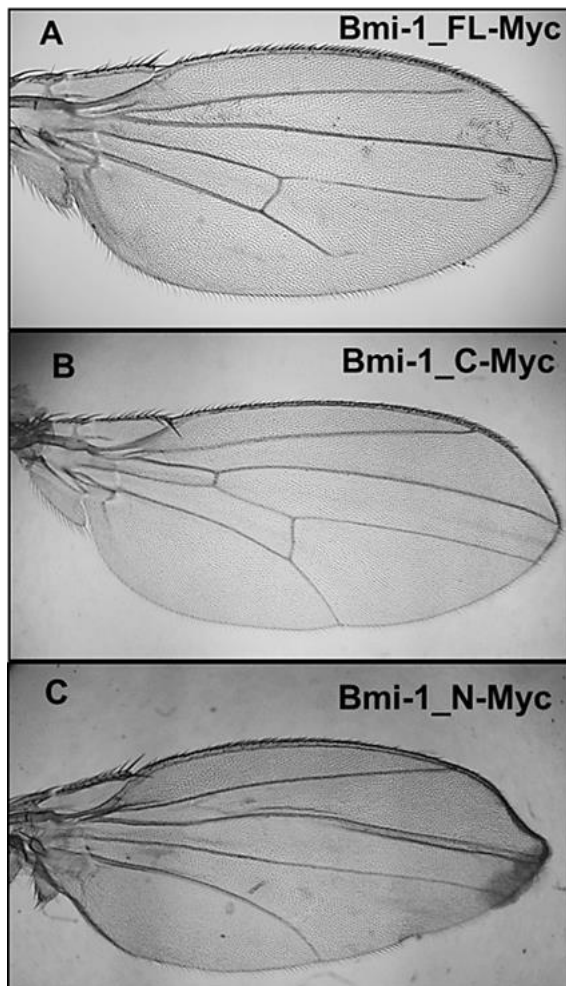
(Abbildung 3.35 C). Dies lässt vermuten, dass die Expression des Transgens selektiv in diesen Zellen herunterreguliert wurde oder dass nicht-zellautonome Mechanismen zur Induktion von *en* beitragen (s. Diskussion). Auch im P Kompartiment zeigen sich einige Lücken der *en*-Expression, wobei auch hier die betroffenen Zellen nicht immer das transgenen Fusionsprotein enthalten. Es kann vermutet werden, dass es sich hierbei um anteriore Zellen handelt, die aufgrund von Migrationsereignissen in posteriore Bereich gelangen, wie es durch die unterschiedliche Zellaffinität *en*-exprimierender und nicht-exprimierender Zellen befördert wird. Eine entsprechende Beobachtung (Myc-negative und *en*-negative Zellen im P Kompartiment) wurde bereits für Su(z)2-N2-Myc Expressionsklone beschrieben (Abbildung 3.27)



**Abbildung 3.35. Effekte der Bmi-1-Konstrukte auf die Musterbildung.** Expressionsklone mit anti-Myc (grün) und anti-Engrailed (rot) Doppelimmunfärbung. DNA Markierung (DAPI, blau). **A – A'''** Bmi-1-FL-Myc zeigt keinen Effekt auf die posteriore *en*-Expression (**A'** und **A''**). **B. – B'''** Auch Bmi-1-C-Myc-Expression ist ohne Auswirkung auf *en*. **C – C'''** Die Bmi-1-N-Myc zeigt dominant-negative Effekte. Im A Kompartiment wird *en* ektopisch exprimiert (Pfeile). Jedoch korreliert das ektopische En-Signal (rot) nicht immer mit der Lokalisation des Fusionsproteins (Myc-Signal, grün). Auch das posteriore En-Muster weist einige Lücken auf (Stern, vgl. mit Su(z)2-N2-Myc, Abbildung 3.27).

### 3.5.5 Auswirkung der Bmi-1 Expression auf die Flügelentwicklung

Wie in der Augenentwicklung verursacht Bmi-1-FL auch Defekte in der Flügelentwicklung, die sich in Verkürzungen der Longitudinalvenen beider Kompartimente und Verlust der anterioren Quervene manifestieren (Abbildung 3.36). Entsprechend der Erwartung hat die Expression von Bmi-1-C auch hier keinen erkennbaren Effekt auf den adulten Flügel. Dahingegen zeigt Bmi-1-N stärkere Effekte, die sich im Verlust beider Quervenen und verkleinerten Flügeln äußern.



**Abbildung 3.36. Bmi-1-FL und N verursachen Defekte in der Flügelentwicklung.** **A.** *VgBE*-aktivierte Expression von Bmi-1-FL führt zur Verkürzung von Longitudinalvenen und dem Verlust der anterioren Quervene. **B.** Bmi-1-C hat keinen erkennbaren Effekt auf die Flügelentwicklung. **C.** Bmi-1-N Expression bewirkt, dass der Flügel etwas kleiner als normal bleibt und keine Quervenen ausbildet.

### 3.6 Zusammenfassung - Vergleich der Funktion der *Drosophila* Proteine Su(z)2 und Psc mit dem Vertebraten Bmi-1

Der Vergleich der Lokalisations- und Funktionsstudien der *Drosophila* Proteine Su(z)2 und Psc und des Maus Orthologs Bmi-1 zeigen, dass einige Funktionen evolutionär konserviert wurden. So sind jeweils Fusionsproteine, die die HR enthalten prinzipiell zur spezifischen Chromatinlokalisierung in den Bereichen (Banden) endogener Psc-Bindung befähigt. Während allerdings das Verhalten der N1-Konstrukte der Fliegenproteine den Schluß zulassen, dass die HR notwendig und ausreichend für diese spezifische Chromatinlokalisierung ist, zeigt Bmi-1-N, dass in diesem Protein die deletierten 98 Aminosäuren der CTR für die Beschränkung auf diskrete Banden notwendig sind, indem sie im Kontext mit der HR eine Ausweitung der Bindung verhindern. Für dominante Effekte, insbesondere die Repression von posterioren *en* ist in den Fliegenproteinen die HR-vermittelte Chromatinbindung im Zusammenhang mit dem N2-Anteil der CTR notwendig. Interessanterweise kann das *full-length* Bmi-1-Konstrukt diese dominante Wirkung nicht entfalten. Ob dies an der Begrenzung der Bindung auf scharfe Banden oder der unzureichenden Funktion der Bmi-1-CTR liegt, kann hier nicht unterschieden werden. Dennoch ist die FL-Version von Bmi-1 keineswegs funktionslos, wie die Effekte in der Augen- und Flügelentwicklung zeigen. Trotz des fehlenden bandenförmigen Lokalisation von Bmi-1-N in den endogenen Psc-Bindestellen, scheint dieses Fusionsprotein ausreichend zu sein, um endogenes Su(z)2 und Psc auszutitrieren, so dass PcG Zielgene- wie *en* dereguliert werden.

Tab.3.5. Vergleich der Funktion der *Drosophila* Proteine Su(z)2 und Psc mit dem Vertebraten Bmi-1

	Su(z)2-FL	Su(z)2-HG	Su(z)2-N2	Su(z)2-N1	Su(z)2-C	Psc-FL	Psc-N2	Psc-N1	Psc-C	Bmi-1 FL	Bmi-1-N	Bmi-1-C
<b>embryonale Letalitätsrate (daG)</b>	100%	100%	100%	30%	0 %	100%	100%	40%	0 %	100%	60%	0 %
<b>Lokalisation am Chromatin</b>	expansiv	expansiv	expansiv	diskrete Banden	keine	expansiv	expansiv	diskrete Banden	keine	diskrete Banden (nicht alle)	granulär, expansiv	keine
<b>Augendefekte (GMR-Gal4)</b>	klein, glatt	klein, rau	klein, rau	etwas kleiner, rau	normal	klein, rau	klein, rau	etwas kleiner, rau	normal	klein, rau	etwas kleiner, rau	normal
<b>Repression posteriores <i>en</i> (dominant)</b>	ja	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein
<b>Induktion anteriores <i>en</i> (DN)</b>	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein
<b>Überproliferation (Flügel IS)</b>	moderat	moderat	moderat	stark	nein	moderat	moderat	stark	nein	nein	moderat	nein
<b>Defekte, adulter Flügel</b>	Venen	Venen	Venen	Venen	acv fehlt	Venen	Blasen, P Seite kleiner, gebogen	nicht entfaltet	normal	Venen	Venen, acv und pcv deletiert	normal

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden *Psc* und *Su(z)2*, zwei strukturell und funktionell verwandter *Drosophila* PcG Proteine, untersucht und mit dem Maus Bmi-1 Protein verglichen. In einem ersten Teil wurden die Folgen von Funktionsverlust Mutationen, die bereits von anderen Autoren beschrieben wurden, neu untersucht und bewertet. Hierbei wurden neuere Beobachtungen aus unserer Arbeitsgruppe bestätigt, wonach morphologische Defekte nicht nur in *Psc/Su(z)2* doppelmutanten Zellen, sondern auch in *Su(z)2*<sup>-</sup>, aber nicht in *Psc*-einzelmutanten Zellklonen zu beobachten sind. Im zweiten Teil wurde eine detaillierte Funktions-Struktur-Analyse der drei Proteine im transgenen System durchgeführt. Durch die Analyse der Chromatinbindung und der Überexpressionsphänotypen der transgenen wildtypischen und mutanten Proteine konnten funktionelle Bereiche in der konservierten *homology region* (HR) und in ihrer divergenten carboxyterminal Region (CTR) eingeeengt werden. In dieser Diskussion werden die Befunde der einzelnen Analysen bewertet und eingeordnet:

- 4.1. Neubewertung der *Su(z)2* Funktionsverlust mutanten Phänotypen.
- 4.2. Befunde der Chromatinbindung und funktionellen Untersuchung, Charakterisierung funktioneller Proteinbereiche.
- 4.3. Vergleich der Fliegen und Vertebraten Proteine.
- 4.4. Potential der neuen Erkenntnisse und Reagentien für weiterführende Analysen.

### 4.1 Bewertung der *Su(z)2* Funktionsverlust mutanten Phänotypen

Die Analyse der mutanten *Su(z)2*<sup>1.b7</sup> und *Psc*<sup>1d20</sup> Funktionsverlustallele hat bestätigt, dass beide Gene essentiell sind und ihr Ausfall embryonale Letalität bedingt. Die einfachste Interpretation dieser Beobachtung ist, dass sowohl *Su(z)2*, wie auch *Psc* distinkte Zielgene regulieren, deren PcG-abhängige Stummschaltung (bzw. Dämpfung der Expression) für eine

normale Entwicklung bedeutsam ist. Bis heute sind keine Zielgene bekannt, die in den beiden Funktionsverlustsituationen in der Embryonalentwicklung fehlreguliert werden und als Effektoren wirken. Meine Analyse der Chromatinlokalisierung beider Proteine hat gezeigt, dass zumindest in immunohistochemisch nachweisbaren Bindestellen auf Polytänchromosomen beide Faktoren nahezu vollständig kolokalisieren. Diese Analyse zeigt allerdings nur "starke" Bindung. Sensitivere Methoden, wie z.B. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit anschließender tiefen Sequenzierung (*next generation sequencing, NGS*) erbrachten in 14-16 Stunden alten wildtypischen Embryonen z.B. 13.747 Bindestellen für Psc und 13.999 Bindestellen für dRing/Sce (Gary Karpen, [www.ModENCODE.org](http://www.ModENCODE.org)). Für Su(z)2 sind solche Daten bislang nicht verfügbar. Hierdurch wird deutlich, dass die Immunfluoreszenz nur die 'Spitze des Eisbergs' darstellt, indem nur solche Positionen sichtbar werden, wo eine Vielzahl von Su(z)2-, bzw Psc-enthaltende PcG-Komplexe gebunden sind. Zukünftig wäre es interessant, Positionen, in denen ausschließlich oder überwiegend einer der beiden Faktoren gebunden ist fein zu kartieren (die Verfügbarkeit von ChIP-seq Daten für Su(z)2 vorausgesetzt). Diese Regionen würden interessante Kandidatengene enthalten, die als Effektoren der embryonalen Letalität in der jeweiligen einzelmutanten Situation und der anderen beschriebenen phänotypischen Effekte in Betracht kämen.

#### **4.1.1 Su(z)2 und Psc unterliegen der PcG Kreuzregulation**

Eine alternative Deutung der embryonalen Letalität in der jeweiligen einzelmutanten Situation baut auf der Beobachtung auf, dass einige PcG Gene durch PcG Faktoren reguliert werden (Ali und Bender, 2004). Auch Beobachtungen in unserer Arbeitsgruppe und von Park und Mitarbeitern (A. Klebes, unveröffentlicht, Park et al., 2012) sprechen dafür, dass sowohl Su(z)2 als auch Psc PcG-abhängiger und auch gegenseitiger transkriptioneller Regulation unterliegen. Somit besteht die Möglichkeit, dass in Su(z)2 einzelmutanten Embryonen die PcG-abhängige negative Regulation von Psc geschwächt wird und somit Psc überexprimiert würde. Das gleiche Szenario wäre auch umgekehrt denkbar, so dass in beiden

einzelmutanten Situationen jeweils ein Funktionsgewinn des anderen PcG Faktors ausgelöst wird, der zu dominanten Effekten und embryonaler Letalität führen könnte. Der Vergleich der Effekte der Funktionsverlustmutationen mit der UAS/Gal4-aktivierten Überexpression (Abbildung 3.1) in der Embryogenese zeigt dahingegen unterschiedliche Phänotypen der betroffenen Embryonen. Dies lässt vermuten, dass die Überexpression eines Faktors aufgrund der Deregulation durch den Verlust des anderen Faktors nicht der alleinige Auslöser der Entwicklungsstörungen und embryonalen Letalität ist. Somit bleibt die erste Hypothese am wahrscheinlichsten, dass *Su(z)2* und *Psc* jeweils eigene Zielgene regulieren, die für die Embryogenese essentiell sind.

#### **4.1.2 Der *Su(z)2* Funktionsverlust zeigt auch in der Imaginalentwicklung Defekte**

Eine solche Annahme wurde bisher in der Literatur für die spätere Entwicklung der Imaginalscheiben ausgeschlossen. Da bislang morphologische Defekte oder Fehlregulationen von Zielgenen nur in doppelmutanten *Su(z)2/Psc* Zellgruppen beobachtet wurden, wurde die Funktion beider Gene als partiell redundant beschrieben (Classen et al., 2001; Beuchle et al., 2009; Scheuermann, 2010). In unserer Arbeitsgruppe wurde jedoch beobachtet, dass *Su(z)2<sup>1.b7</sup>* einzelmutante Zellklone einige Teilaspekte doppelmutanter Zellklone rekapitulieren (A. Klebes, unveröffentlicht, diese Arbeit). So konnten wir Entwicklungsverzögerung der Larven mit morphologischen Veränderungen der Imaginalscheiben beobachten. Diese beinhalten die Überproliferation und ein kugelförmiges Abrunden von Zellgruppen, die sich progressiv aus dem epithelialen Verband herauslösen. Als weiteres Charakteristikum aktivieren diese Zellen das Apoptoseprogramm, weshalb *Su(z)2* in diesen Zellen auch als *survival factor* beschrieben werden könnte. Bislang konnte noch nicht geklärt werden, ob die Hyperaktivierung des Zellzyklus und Induktion der Apoptose in einzelnen Zellen zeitgleich oder nacheinander abläuft. Insgesamt sind aber die Effekte *Su(z)2* einzelmutanter Larven/Imaginalscheiben denen mit doppelmutanten Zellklonen sehr ähnlich. Eine Deregulation der Zielgene *en* und *Abd-B* wurde allerdings in der einzelmutanten Situation



nicht beobachtet, so dass vermutet werden kann, dass es zwei Klassen von  $Su(z)2$  Zielgenen gibt, die *Psc*-abhängig und *Psc*-unabhängig reguliert werden.

Wie schon für die Embryonalentwicklung diskutiert, scheint auch in der Imaginalentwicklung eine *PcG*-autoregulatorische Überexpression von *Psc* wahrscheinlich nicht die Ursache der Entwicklungsstörungen zu sein. Zwar wurde in der Immunfluoreszenz ein Anstieg der  $Su(z)2$  Proteinmenge in *Psc* mutanten Zellen nachgewiesen, aber umgekehrt konnte kein Anstieg der *Psc* Mengen in  $Su(z)2$  mutanten Zellklonen beobachtet werden. Wenn diese Beobachtung bedeutet, dass eine *Psc* Überexpression keine Rolle spielt, sondern alleinige  $Su(z)2$ -Zielgene für die Überproliferation verantwortlich sind, so ist zu fordern, dass sich unter den alleinigen  $Su(z)2$ -Zielgenen auch Regulatoren des Zellzyklus befinden, oder solche sekundär regulieren. Da durch den  $Su(z)2$  Funktionsverlust diese Regulatoren ihrerseits dereguliert würden, sollten sie insgesamt eine aktivierende Wirkung auf den Zellzyklus haben, also ähnlich einem Protoonkogen wirken. Auch die Beobachtung, dass die polytären Chromosomen in den  $Su(z)2$ -N1-, *Psc*-N1- und *Bmi-1*-N-Überexpressionssituationen jeweils dicker als normal erscheinen, spricht dafür, dass die dominant-negative Wirkung dieser Fusionsproteine die Expression eines Aktivators des Zellzyklus befördern. Diese Zellzyklus-aktivierende Funktion äußert sich in polytären Zellen im Gegensatz zur Überproliferation diploider Zellen in den Imaginalscheiben in der zusätzlichen Amplifikation der DNA, was sich in den Quetschpräparaten in verdickten Chromosomen widerspiegelt.

#### **4.1.3 $Su(z)2$ mutante Zellklone ähneln der Fehlexpression von *engrailed***

Das Verhalten der  $Su(z)2/Psc$  doppelmutanten Zellklone und auch der  $Su(z)2$ -einzelmutilanten Zellklone ähnelt sehr dem Verhalten von *en* mutanten Zellklonen im P Kompartiment und *en* Expressionsklonen im A-Kompartiment (Garcia-Bellido, 1975; Dahmann und Basler 1999). Dieses charakteristische Verhalten ist durch Überproliferation, ein Abrunden der Klone zur Minimierung der Kontaktfläche mit umgebenden Zellen und dem Herauslösen aus dem epithelialen Verband gekennzeichnet. Vielfältige klonale Analysen in Flügelimaginalscheiben haben gezeigt, dass ein derartiges Verhalten immer dann auftritt, wenn *en*-exprimierende

Zellen in einer *en*-minus Umgebung erzeugt werden und umgekehrt. Bislang konnten in *Su(z)2/Psc* doppelmutanten Zellklonen das Verhalten der Zellen und die Veränderung des *en*-Expressionsstatus im A Kompartiment nicht voneinander getrennt werden, da *en* als PcG Zielgen hier ektopisch aktiviert wird. Da allerdings der *en*-Status in posterioren Zellen unverändert bleibt, ist ein Abrunden dieser Zellen hierdurch nicht einfach zu erklären. Unsere neuen Befunde legen nahe, dass das zelluläre Verhalten auch im A Kompartiment unabhängig von *en* ist, da dieses Gen in *Su(z)2* einzelmutanten Zellklonen nicht fehlreguliert wird. Es wird also wahrscheinlich ein Zielgen oder mehrere Zielgene durch *Su(z)2* (nicht aber *Psc*) reguliert, die zusätzlich zur Aktivierung des Zellzyklus auch die Zellaffinität beeinflussen, so dass sich Zellgruppen in kugelförmigen Aggregaten zusammenlagern und den epithelialen Verband verlassen. Insofern zeigen sich *Su(z)2* einzelmutante und *Su(z)2/Psc* doppelmutante Zellklone neben dem unkontrollierten Zellzyklus auch Züge einer Epithel zu Mesenchym-Transition (EMT), wie sie auch vielfach in der Tumorgenese beobachtet wird. Dieselben Effekte (Überproliferation, Abrunden, Herauslösen) zeigen sich auch nach Überexpression der *Su(z)2-N1*- und *Psc-N1*-Konstrukte. Im A Kompartiment fällt dieses zelluläre Verhalten mit der ektopischen Expression von *en* zusammen. Im P Kompartiment sind ebenfalls abgerundete Zellaggregate zu beobachten, die allerdings weiterhin *en* exprimieren (Abbildung 3.26. Stern in D). Dieser Befund unterstützt die Charakterisierung der Wirkung dieser Konstrukte als dominant-negativ und ist zudem ein weiterer Hinweis darauf, dass das Abrunden und Migrationsverhalten der betroffenen Zellen unabhängig von Änderungen des *en*-Expressionsstatus ist.

#### **4.1.4 Der *Su(z)2* Funktionsverlust verursacht Entwicklungsverzögerung**

Diese Wirkung von *Su(z)2* wurde bislang übersehen, weil sie erst spät auftritt. Die Larven mit *Su(z)2* mutanten Zellklonen, die im zweiten Larvenstadium induziert wurden, verpuppen sich nicht wie gewöhnlich nach ca. vier Tagen, sondern bleiben ungefähr doppelt so lange in der Larvalentwicklung, bevor sie als Larve oder junge Puppe sterben. Diese Entwicklungsverzögerung wird vermutlich durch die ektopische Expression des Hormons

*Insulin-like peptide 8 (Ilp8, CG14059; Zhang et al., 2009; Garelli et al., 2012; Colombani et al., 2012)* verursacht, dessen ektopische Expression bereits in transdeterminierenden Imaginalscheiben und kürzlich auch in Imaginalscheiben mit dominant-negativer *Su(z)2* Aktivität nachgewiesen wurde (Klebes et al., 2005, A. Klebes unveröffentlicht). Wie die Immunfluoreszenzuntersuchung gezeigt hat, ist das *Su(z)2* Protein verhältnismäßig stabil, so dass in genotypisch homozygot mutanten Zellen vier Tage nach Induktion der mitotischen Rekombination noch annähernd normale Menge nachzuweisen sind. Erst ca. neun Tage nach Induktion zeigt sich eine deutliche Verminderung der *Su(z)2* Proteinmenge. Demnach lassen sich die Effekte des *Su(z)2* Funktionsverlusts nur beobachten, weil die Larven gleichzeitig entwicklungsverzögert sind. Der gleiche Effekt trifft auch auf doppelmutante Zellklone zu, wobei hier sowohl die Reduktion der *Su(z)2*-Proteinmenge als auch die Überproliferation etwas früher eintritt als in der *Su(z)2* einzelmutanten Situation. Dieser Vergleich deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von *Psc* zur Stabilität des *Su(z)2* Proteins beiträgt und somit die Effekte langsamer wirksam werden.

#### **4.1.5 Beitrag des JAK/STAT-Signalwegs zum Überproliferationsphänotyp**

In der Literatur werden verschiedenen *Su(z)2/Psc*-abhängige Kandidatengene als Aktivatoren des Zellzyklus diskutiert. Experimentell konnte jedoch bislang nur ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des JAK/STAT-Signalwegs und dem *Su(z)2/Psc* Überproliferationsphänotyp aufgezeigt werden (Classen et al., 2009). Demnach ist das *unpaired* Gen, das für einen Liganden dieses mitogenen Signalwegs kodiert, ein PcG Zielgen. In der doppelmutanten Situation wird *unpaired* dereguliert und andererseits wirkt die genetische Schwächung dieses Signalwegs schwächend auf den Überproliferationsphänotyp. Ob die ektopische JAK/STAT-Aktivität jedoch alleine ausreichend für den Überproliferationseffekt in doppelmutanten Zellklonen und entsprechend in *Su(z)2* einzelmutanten Zellklonen ist, ist fragwürdig, da *upd*-Überexpressionsexperimente in unserer Arbeitsgruppe nur ein moderates Maß an Überproliferation in Imaginalscheiben auslösen konnten (A. Klebes, unveröffentlicht). Zukünftig wäre es in diesem Zusammenhang

interessant zu klären, ob *upd* ein alleiniges *Su(z)2*-Zielgen ist oder auch *Psc*-abhängig reguliert wird.

#### 4.1.6 *Psc* zeigt auch Transkriptions-unabhängige Funktion

Für *Psc* wurde kürzlich neben der epigenetischen Funktion bei der transkriptionellen Kontrolle von Zielgenen eine weitere, Transkriptions-unabhängige Funktion beschrieben. Demnach ist *Psc* im Kontext des *Anaphase-Promoting Complex (APC)* an der Ubiquitinylierung und somit Degradation von Cyclin-B beteiligt (Mohd-Sarip et al., 2012). Der Abbau von Cyclin-B ist für die G2-M Progression des Zellzyklus notwendig, so dass *Psc* mutante Zellen in dieser Zellzyklusphase verharren. In der frühen Embryogenese führt der Zellzyklusarrest zu mitotischen Segregationsdefekten, die zum hier beschriebenen mutanten Phänotyp und Absterben der *Psc*<sup>1d20</sup> Embryonen (s. oben) beitragen könnten. Ob *Su(z)2* eine ähnliche Funktion hat, wurde in dieser Studie allerdings nicht untersucht. Ebenfalls unklar bleibt, ob die beschriebenen Defekte *bona fide Psc* Effekte sind, da die *in vivo* Funktion lediglich in RNAi-Ansätzen untersucht wurde. Es wäre interessant zu untersuchen, ob eine Stabilisierung von Cyclin B auch in *Psc*-mutanten Zellklonen und *Su(z)2*-mutanten, bzw. doppelmutanten Zellklonen zu beobachten ist. Auch weil der simultane *Su(z)2/Psc* Funktionsverlust zur dramatischen Hyperaktivierung des Zellzyklus führt, bleibt eine Funktion von *Psc* als negativer Regulator von Cyclin-B weitgehend unverstanden.

#### 4.1.7 Kritische Bewertung der RNAi Experimente

Die in dieser hier vorliegenden Arbeit beschriebenen *Psc*-RNAi-Experimente haben nur sehr milde Entwicklungsstörungen erzeugt, was möglicherweise an einer unzureichenden Herunterregulation des jeweiligen Transkripts gelegen haben könnte. Besonders die *Psc*-RNAi zeigte keine deutliche Reduktion der Proteinmengen in den betroffenen Zellen, so dass aufgrund des Ausbleibens deutlicher Effekte hier nicht auf die Funktionslosigkeit eines *Psc*-Verlusts geschlossen werden kann. Andererseits verursachen homozygot mutante *Psc* Zellklone in der Flügelentwicklung auch keine gravierenden Entwicklungsstörungen, wonach

scheinbar in diesen Zellen keine entwicklungsrelevanten Gene in gravierendem Umfang fehlreguliert werden. Der *Su(z)2*-RNAi Ansatz ist ebenfalls problematisch, da Effekte auf zellulärer Ebene schlecht untersucht werden können. Die betroffenen Zellen lösen sich aus dem Verband und induzieren Apoptose. Dieses Verhalten scheint jedoch das Verhalten mutanter Zellen mit *Su(z)2* Funktionsverlust widerzuspiegeln. Zellen solcher mutanter Klone bilden ebenfalls Aggregate und aktivieren das Zelltodprogramm. Die Effekte der doppel-RNAi sind nur unwesentlich stärker als bei der einzel-*Su(z)2*-RNAi, vermutlich weil die unvollständige Herunterregulation der Transkripte und der Proteinmengen nicht ausreichend für die Fehlregulation von Zielgenen ist.

## **4.2 Befunde der Chromatinbindung und funktionellen Untersuchung**

### **Charakterisierung funktioneller Proteinbereiche.**

In Bezug auf die Chromatinbindung und Überexpressionphänotypen können alle transgenen *Su(z)2*- und Psc-Fusionsproteine in drei Gruppen eingeteilt werden:

- 4.2.1. dominant wirkend mit expansiver Chromatinbindung;
- 4.2.2. schwach wirkend ohne deutlicher Chromatinbindung und
- 4.2.3. dominant-negativ wirkende mit diskreter Chromatinbindung.

#### **4.2.1 Dominant wirkende transgene Proteine mit expansiver Chromatinbindung**

Zu dieser Gruppe zählen jeweils die *full-length* und N2-Proteine von *Su(z)2* und Psc sowie *Su(z)2*-HG. Aufgrund der genetischen Interaktion mit mutanten *Pc* und *brm* Allelen sowie der Repression der posterioren *en*-Expression in Flügelimaginalscheiben kann die Wirkung von *Su(z)2*-FL - und damit auch der anderen Konstrukte gleicher Wirkung - als dominant beschrieben werden. All diese transgenen Fusionsproteine lassen sich am Chromatin in diskreten Banden und zudem entlang des gesamten Chromatins in granulärer Verteilung nachweisen. Diese expansive Bindung der drei *Su(z)2*-Proteine führt zur Umverteilung des

endogenen Psc. Es ist wahrscheinlich, dass dieser Effekt auch für die Psc-Proteine zutrifft, kann aber mit dem monoklonalen anti-Psc Antikörper nicht abschließend beurteilt werden. Vorausgesetzt, dass die Überexpression der dominant-wirkenden Su(z)2-Fusionsproteine keinen Effekt auf die endogene Psc Proteinmenge hat, ist es erstaunlich, dass Psc in dieser Situation ebenfalls expansiv am gesamten Chromatin bindet. Da die Fluoreszenzsignale in der doppel-Immunfärbung nicht vollständig kolokalisieren, ist es denkbar, dass endogenes Psc nicht nur durch direkte Interaktion mit den Su(z)2-Fusionsproteinen fehllokalisiert wird, sondern auch ohne direkten Kontakt zu den Su(z)2-Myc-Proteinen am Chromatin bindet, beispielsweise weil es durch große Mengen überexprimierten Su(z)2-Fusionsproteins von endogenen Bindestellen verdrängt wird.

#### **4.2.1.1 Klassifizierung der verschiedenen Konstrukte**

Die Effekte der einzelnen transgenen Proteine auf adulte Strukturen wie Augen oder Flügel lassen sich nur schwer miteinander vergleichen, da sie mutmaßlich jeweils pleiotrope Effekte verursachen und eine Gewichtung der Fehlexpression verschiedener Zielgene durch die äußerliche Betrachtung adulter Strukturen nicht möglich ist. Aus diesem Grund wurden die beiden 'direkten' Wirkungen der Überexpression, nämlich die Chromatinbindung und Effekte auf die *en*-Regulation als wesentliche Kriterien für die Bewertung der verschiedenen transgenen Proteine eingesetzt. Anhand dieser Kriterien lässt sich eine Reihung der Überexpressionseffekte vornehmen. So wirkt Su(z)2-FL etwas stärker als Su(z)2-HG, das wiederum stärker wirkt als Su(z)2-N2 (FL > HG > N2). Für Psc gilt entsprechend FL > N2, wobei insgesamt die Effekte von Psc tendenziell schwächer ausfallen, als bei den Su(z)2-Fusionsproteinen.

#### **4.2.1.2 Eine funktionelle RING Domäne ist für die dominante Funktion nicht essentiell**

Die Beobachtung, dass Su(z)2-HG ähnlich wirkt wie Su(z)2-FL deutet darauf hin, dass ein intakter RING-Finger für die dominante Funktion entbehrlich ist. RING-Finger Motive besitzen häufig E3-Ubiquitinligase Aktivität (Metzger et al., 2012). Weder für Psc noch für Su(z)2 (noch

für Bmi-1) konnte jedoch bislang eigenständige Ubiquitinylierungsaktivität nachgewiesen werden. Somit scheint eine RING-abhängige E3 Ubiquitinligase Aktivität für die dominante Funktion nicht erforderlich zu sein.

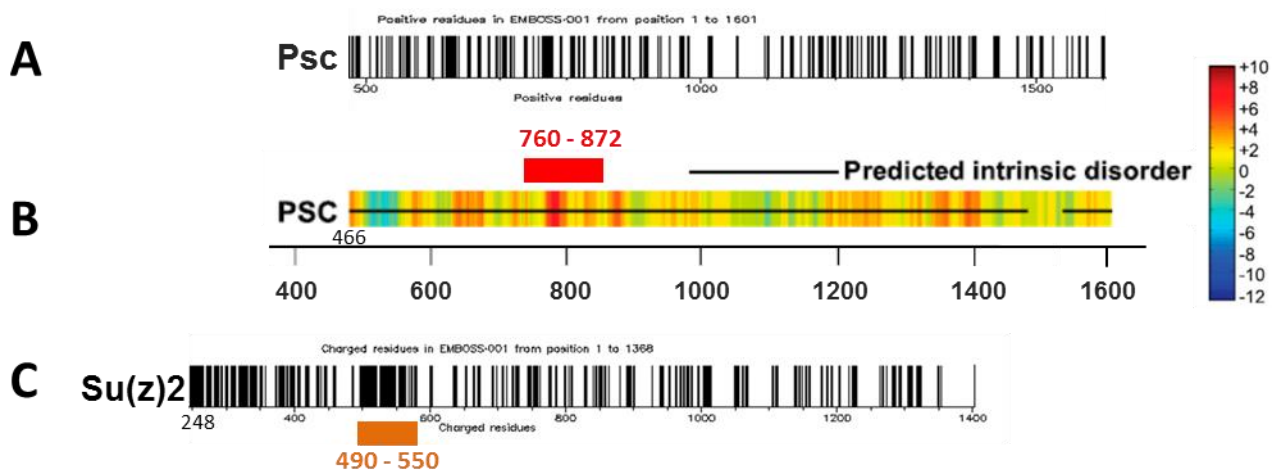
#### **4.2.1.3 Die Su(z)2-N2 und Psc-N2 Proteine zeigen etwas schwächere dominante Funktion als die jeweiligen *full-length* Proteine**

Der direkte Vergleich der Potenz verschiedener Konstrukte anhand von Überexpressions-Effekten ist schwierig, da Positionseffekte der transgenen Insertionen zu unterschiedlichen Expressionslevels führen können und die Effektivität des Kernimports variieren kann. Diese technisch bedingte Variabilität sollte durch die Auswahl von Insertionslinie mittlerer Expressionsstärke anhand von semi-quantitativer Western Blot Analyse sowie durch die Kontrolle des Kernimports mittels Immunfärbungen von Speicheldrüsen kontrolliert werden. Unter Berücksichtigung dieser Problematik zeigen die N2-Konstrukte beider Proteine jeweils schwächere Wirkung als die *full-length* Varianten. Dies äußert sich insbesondere in der schwächeren expansiven Chromatinlokalisation und der schwächeren Repression posteriorer *en*-Expression.

Nach diesen Kriterien wären in den 733 (Su(z)2), bzw. 703 (Psc) carboxyterminalen Aminosäuren, die jeweils in den N2-Konstrukten deletiert sind, funktionelle Bereiche enthalten, die die dominante Funktion unterstützen. *In vitro* Analysen mutanter Psc-Konstrukte mit verschiedenen großen carboxyterminalen Deletionen führten zu der Aussage, dass die Funktion der CTR über die gesamte Sequenz verteilt ist, also ausgehend vom Carboxyterminus progressive Deletionen jeweils die Funktion schwächen (King et al., 2005). Die Funktionalität wurde hierbei u.a. anhand der Fähigkeit zur Inhibition der Transkription und des *Chromatin remodeling* gemessen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass sich auch *in vivo* mutante Psc-Allele mit unterschiedlich großen carboxyterminalen Deletionen in unterschiedlicher Vitalität und Schwere der mutanten Phänotypen äußern, wobei die Größe der Deletion jeweils mit der Schwere der Effekte korreliert. In dieser Studie wurde in Psc eine Region von AS 760 – 872 als besonders bedeutsam für die Funktionen beschrieben. Beh und Kollegen bestätigen diese Befunde

weitgehend, indem sie aufgrund der Korrelation von Ladungsverteilung und funktioneller Studien die Hypothese entwickeln, dass Bereiche positiver Ladungen, die nicht durch Cluster von Aminosäuren mit negativer Ladung unterbrochen sind, die repressive Funktion der CTR vermitteln. In *D. melanogaster* Psc findet sich entsprechend der Befunde von King und Kollegen im Bereich der AS 760 - 872 eine besondere Akkumulation von Clustern positiver Ladung (Abbildung 4.1).

Die Befunde von King und Kollegen und Beh und Kollegen lassen sich demnach so zusammenfassen, dass die Funktion der CTR von Bereichen positiver Ladung abhängt, die über die gesamte Länge der CTR verteilt angeordnet sind und sich in Psc besonders im Abschnitt AS 760 – 872 akkumulieren, der besonders kritisch für die Funktionalität ist. Im Psc-N2 Konstrukt ist dieser Bereich enthalten (Bruchpunkt bei AS 900) und im Su(z)2-N2 Protein (Bruchpunkt AS 635) ist ein auffälliges Cluster positiv geladener Aminosäuren im Bereich 490-550 ebenfalls enthalten (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1. Ladungsverteilung in der CTR von Psc und Su(z)2.** A. und B. Psc-CTR (AS 466 – 1603) mit dargestellten positive geladenen Aminosäuren (schwarze Striche) nach Vorhersage von A. EMBOSS Pepinfo ([www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_pepinfo](http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepinfo)) und B. Beh et al., 2012. Die Ladung ('Q' bei pH 7,9) der Aminosäuren (AS) in Fenstern zu je 25 AS wurden in eine Farbkodierung umgesetzt. Im Abschnitt zwischen AS 760 – 872 (roter Balken) sind besonders viele Bereiche positiver Ladung akkumuliert. (Berechnung:  $Q \frac{1}{4} \Sigma XQX$ , wobei Qx der Ladung jeder AS entspricht. Farbskala der Ladung rechts. Weitere Erläuterungen in Beh et al., 2012). Bereiche vorhergesagter intrinsischer Unordnung (*intrinsic disorder*) sind durch eine schwarze Linie markiert und umfassen nahezu die gesamte CTR. Der aminoterminalen Bereich inklusive HR sind nicht dargestellt. C. EMBOSS Vorhersage der positiven Ladungen der Su(z)2-CTR zeigt mehrere Cluster und eine herausragende Region von AS 490-550. Für *D. melanogaster* Su(z)2 sind keine Daten in Beh et al., 2012 enthalten.



Meine Analysen bestätigen, dass die moderaten carboxyterminale Deletionen der N2-Konstrukte die Funktionalität der Fusionsproteine schwächen, aber nicht wirkungslos werden lassen. Demnach sind wesentliche Element – möglicherweise die o.g. Cluster positiver geladener Aminosäuren – noch in den N2-Konstrukten enthalten, deren maximale Aktivität jedoch abhängig von Proteinbereichen ist, die durch die Deletion entfernt werden.

#### **4.2.2 Schwach wirkende Fusionsproteine ohne deutlicher Chromatinbindung**

Die isolierten CTR-Abschnitte von Su(z)2 und Psc binden in immungefärbten Präparaten polytärer Chromosomen jeweils nur sehr schwach oder nicht nachweisbar an das Chromatin. Dementsprechend sind die Effekte der Überexpression dieser Konstrukte sehr mild. In der Augenentwicklung sowie der Flügelentwicklung werden einige Defekte hervorgerufen, die zeigen, dass beide Konstrukte dennoch biologische Aktivität entfalten können. Es kann spekuliert werden, dass Chromatinbindung unterhalb der Nachweisgrenze stattfindet, die die Funktion der endogenen Proteine beeinträchtigt oder dass die transgenen Proteine unabhängig von einer Chromatinassoziation mit den endogenen Proteinen konkurrieren. Mit den hier eingesetzten Methoden kann der Mechanismus nicht näher aufgeklärt werden, jedoch zeigt die fehlende Wirkung auf die *en*-Expression in Flügelimaginalscheiben, dass diese Konstrukte weder deutliche dominante noch dominant-negative Funktion entwickeln.

##### **4.2.2.1 Die CTR bindet *in vivo* im Gegensatz zu *in vitro* Daten nicht an das Chromatin**

Da die aminoterminaler Deletion der HR die Chromatinbindung vereitelt, werden frühere Befunde bestätigt, wonach die HR für dieses Verhalten notwendig und ausreichend ist (Sharp et al., 1997). Es ist jedoch interessant, dass die CTR beider Proteine alleine in den hier präsentierten *in vivo* Überexpressionen nicht an das Chromatin binden kann. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den publizierten *in vitro* Untersuchungen der CTR (Francis, et al., 2004; Lo et al., 2009; Lo et al., 2010; Beh et al., 2012). In diesen Publikationen wird die

sequenz-unspezifische DNA-Bindung der CTR quantifiziert, die für Psc mit einem  $K_d$  von  $0.17 \pm 0.04$  nM und für Su(z)2 mit einem  $K_d$  von  $1.58 \pm 0.21$  nM angegeben wird (Lo et al., 2009). Eine ausbleibende Chromatinbindung beider CTRs *in vivo* könnte möglicherweise durch Milieufaktoren zu erklären sein, wie z.B. lokalen pH-Werten oder der Interaktion mit anderen Proteinen in einem komplexen Reaktionsraum wie dem Zellkern. Beh et al. (2012) postulieren ein Modell wonach die CTRs mit ihren Clustern positiver Ladung die negativ geladene DNA kontaktieren, kompaktieren und somit für die Transkriptionsmaschinerie und das *Chromatin Remodeling* unzugänglich machen. Unterstützt werden soll diese Funktion *in vitro* durch die intrinsische Fähigkeit zur Homomultimerisierung und Brückenbildung zwischen benachbarten oder weiter entfernten Nukleosomen (Lo et al., 2012). Im Gegensatz zu diesem Modell scheinen die positiven Ladungen der CTR *in vivo* nicht ausreichend zur Chromatinbindung zu sein. Diese lässt sich nur im Zusammenhang mit der HR beobachten, die demnach wie ein Anker wirkt, der das Protein – mutmaßlich über die Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Komponenten des PRC-1 (Pc und Ph) - an das Chromatin rekrutiert.

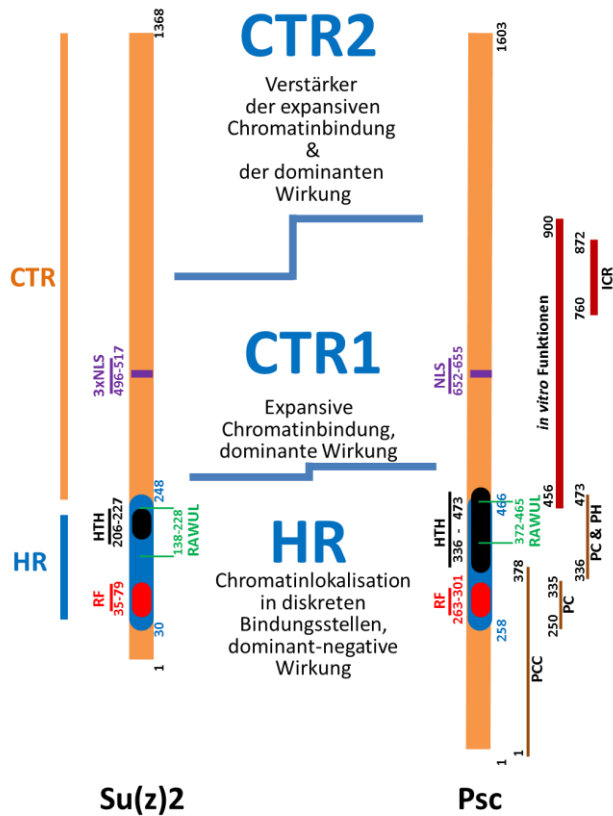
Die CTR - und hier besonders der Bereich, der in den N2-Konstrukten enthalten ist - befördert in der Überexpressionssituation die expansive Bindung an das gesamte Chromatin. Wenn dieser CTR-Abschnitt fehlt – wie in den N1-Konstrukten (s. unten) – geht diese Fähigkeit verloren. Dass die isolierte CTR bei Überexpression in Drosophilazellen jeweils nur sehr schwache Wirkung entfaltet, liegt vermutlich daran, dass sie für die nicht-kovalenten Funktionen in ausreichender lokaler Konzentration gebunden sein muss, was nach meinen und publizierten Befunden (Sharp et al., 1997) durch die Ankerfunktion der HR vermittelt wird. Zusammenfassend befinden sich funktionelle Bereiche im N2-N1 Differenzabschnitt, der für die dominante Funktion und (expansive) Chromatinbindung notwendig ist. Allerdings ist er im Kontext der CTR-Konstrukte nicht ausreichend, um *in vivo* eine deutliche Chromatinbindung zu vermitteln. Entsprechend charakterisiere ich den N2-N1 Differenzabschnitt, der hier als CTR1 benannt wird (vgl. Abbildung 4.2), als notwendig aber nicht ausreichend für expansive Chromatinbindung und dominante Funktion.

### 4.2.3 Dominant-negativ wirkende Fusionsproteine mit diskreter Chromatinbindung

Konsistent mit den o.g. Beobachtungen verlieren die N1-Konstrukte die Fähigkeit zur expansiven Chromatinbindung. Mutmaßlich über die Interaktionen mit Pc und Ph werden diese Konstrukte in PRC-1 Komplexe gebunden und lokalisieren in scharf abgegrenzten (bandenförmigen) Regionen auf polytären Chromosomen. Das endogene Psc Protein wird hierdurch in seiner Verteilung nicht wesentlich beeinträchtigt. Allerdings entfalten diese transgenen Proteine dominant-negative Wirkung, wahrscheinlich durch die Fehlregulation von Su(z)2/Psc Zielgenen. Es ist bemerkenswert, dass die Funktion beider Transgene, also Su(z)2-N1 und Psc-N1, gleichermaßen stark auf die untersuchten Zielgene wirkt. Diese Beobachtung spricht dafür, dass an den PREs der Zielgene PcG-Komplexe aktiv sind, deren Funktion sich durch die überexprimierten HRs des einen oder anderen der beiden Proteine austitrieren lässt. Die einfachste Erklärung hierfür ist ein Modell wonach Su(z)2 und/oder Psc über die HR mit Komponenten der Komplexe interagieren und die CTR die Stummschaltung der Zielgene vermittelt. Das Vorhandensein großer Mengen von HR-Deletionsproteinen, denen mit der CTR der funktionelle Anteil fehlt, verdrängen die endogenen Proteine aus den Komplexen und machen sie somit funktionslos, ohne deren Bindungsverhalten zu beeinträchtigen. Dieses Modell erklärt auch, warum Su(z)2-N1, Psc-N1 und Bmi-1-N1 (s. unten) gleichermaßen dominant-negativ wirken. Die funktionell scheinbar gleichwertige HR vermittelt jeweils die Rekrutierung in die Komplexe. Ob in den endogenen Komplexen allerdings gleichzeitig beide Proteine enthalten sind, oder ob ein Zusammenspiel von getrennten Psc-PRC-1 und Su(z)2-PRC-1 Komplexen für die Repression notwendig ist, kann durch die hier vorgestellten Analysen nicht abschließend beantwortet werden.

Zusammenfassend können mittels der publizierten Daten und der hier dargestellten Analyse drei funktionelle Bereiche der Su(z)2- und Psc-Proteine beschrieben werden. Dies sind: die aminoterminalen HR, die CTR1 - der aminoterminalen Abschnitt der CTR von AS 259 - 635

(Su(z)2), bzw. AS 509 – 900 (Psc) und die CTR2 – der caboyterminale Abschnitt von AS 636 (Su(z)2), bzw. 901 (Psc) bis zum Carboxyterminus (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2. Schematische Darstellung der funktionellen Abschnitte von Su(z)2 und Psc.** Beide Proteine lassen sich in mindestens drei funktionelle Bereiche unterteilen. Die HR ist jeweils für die Chromatinlokalisation in diskreten Positionen notwendig. Diese Aktivität wird wahrscheinlich durch die Interaktion mit verschiedenen PRC-1-Komponenten vermittelt. Die Expression der HR alleine bewirkt dominant-negative Effekte. Die CTR1 wird im Zusammenspiel mit der HR für die expansive Chromatinbindung und dominante Funktion benötigt. Für beide Effekte ist die CTR2 nicht absolut essentiell, wirkt jedoch als Verstärker beider Funktionen. Die gesamte CTR ohne die HR vermag *in vivo* nicht (oder nur sehr schwach) an Chromatin zu binden.

#### 4.2.3.1 Bewertung der pleiotropen dominanten und dominant-negativen Effekte

Die Betrachtung adulter Strukturen wie der Augen und Flügel nach Überexpression lässt keine eindeutige Unterscheidung in dominante oder dominant-negative Funktion erkennen. Die Chromatinbindung der Proteine und ihre Wirkung auf die *en*-Expression legen jedoch nahe, dass im Fall der dominanten Wirkung endogene Zielgene und möglicherweise eine Vielzahl anderer Gene fehlreguliert werden, die außerhalb der normalen Su(z)2/Psc-Bindestellen kartieren und normalerweise in diesen Zellen nicht durch diese und andere PcG Faktoren reguliert werden. Im Gegensatz hierzu sind die dominant-negativ-wirkenden Fusionsproteine auf die endogenen Su(z)2/Psc-Chromatinpositionen begrenzt, so dass wahrscheinlich auch nur echte Zielgene fehlreguliert werden. Zu den charakterisierten Zielgenen zählen neben *en* und den homöotischen Genen wie *Abd-B* andere wichtige Entwicklungsgene wie *hedgehog*, *cubitus interruptus*, *decapentaplegic*, *wingless*, der o.g. Ligand des JAK/STAT Signalweges, *upd*, und viele andere mehr. Es ist leicht nachvollziehbar, dass die Fehlregulation dieser Gene, ob die Expression nun verstärkt oder vermindert wird, zu vielschichtigen Defekten führt, was durch die nachgeschaltete Fehlregulation sekundärer Effektoren noch zusätzlich an Komplexität gewinnt.

### 4.3 Vergleich der Fliegen und Vertebraten Proteine

Bmi-1 wurde als Komponente eines humanen PRC-1 identifiziert, der die Mono-Ubiquitylierung von Histon H2A vermittelt (H2AK119ub, Wang et al., 2004). Die Rolle von Bmi-1 in diesen Komplexen ist jedoch nicht gut verstanden. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass es trotz seiner RING-Domäne selber *in vitro* nicht als E3-Ubiquitinligase wirkt, aber die E3-Aktivität von hRING1B wesentlich befördert (Wang et al., 2004; Cao et al., 2005; Buchwald et al., 2006; Ben-Saadon et al. 2006; Li et al., 2006). Auf diesen Befunden aufbauend wurde die Ubiquitylierungsaktivität des *Drosophila* PRC-1 und später des dRAF-Komplexes beschrieben (Wang et al., 2004, Lagarou et al., 2008). In beiden Komplexen ist jeweils neben der aktiven E3-Ubiquitinligase dRING/Sce auch Psc enthalten, dessen Ubiquitylierungsaktivität auch im Zusammenhang des APC-Komplexes postuliert wurde

(Mohd-Sarip et al., 2012). Diese Befunde legen nahe, dass Bmi-1 und Psc ähnliche Funktionen bei der Ubiquitinylierung ausüben und eine entsprechende Aktivität von Su(z)2 kann aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit angenommen werden. Allerdings konnten die *in vitro* Funktionen (z.B. Inhibition des *Chromatin Remodeling*) der CTR bislang nicht für Bmi-1 nachgewiesen werden (Beh et al., 2012). Die CTR von Bmi-1 ist mit 98 AS wesentlich kürzer als die von Su(z)2 (1120 AS) und Psc (1137) und enthält entsprechend weniger Cluster positiver Ladung, weshalb sie in der Vorhersage und experimentellen Untersuchung von Beh und Kollegen als nicht-repressiv wirkende CTR charakterisiert wurde.

#### **4.3.1 Maus Bmi-1-FL wird an Psc-Bindestellen rekrutiert und zeigt schwache Wirkung**

Meine Untersuchung des transgenen Bmi-1 hat gezeigt, dass die *full-length* Version in diskreten Banden am Chromatin lokalisiert. Diese Positionen entsprechen den endogenen Bindestellen von Psc, wobei allerdings einige Psc Positionen nicht gebunden werden. Eine expansive Bindung ist nicht festzustellen. Somit zeigt Bmi-1-FL ein ähnliches Bindeverhalten wie die Su(z)2- und Psc-N1-Fusionsproteine, wobei bei diesen die Kolo-kalisation mit Psc jedoch nahezu vollständig ist. Eine dominante oder dominant-negative Wirkung in Bezug auf die *en*-Expression in Imaginalscheiben ist für Bmi-1-FL nicht festzustellen. Allerdings zeigt Bmi-1 bei Expression in der Embryonal-, Augen- und Flügelentwicklung jeweils Effekte, die stark im Embryo und Auge und schwächer im Flügel ausfallen. Es kann spekuliert werden, dass die Rekrutierung des transgenen Maus Bmi-1 an einige endogene Psc- und Su(z)2-Bindungsstellen die Repression einiger Zielgene beeinträchtigt, die sich in Entwicklungsstörungen äußert. Ob es sich hierbei um eine Verstärkung der Repression dieser Zielgene (dominant) oder eine Herabsetzung der Su(z)2/Psc-abhängigen Repression (dominant-negativ) handelt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht unterschieden werden. Es kann jedoch geschlussfolgert werden, dass Bmi-1 in unserem Testsystem schwächer wirkt, als die Fliegenproteine, wobei hier ‚schwächer‘ bedeutet, dass nicht alle Positionen gebunden werden und wahrscheinlich nicht alle Zielgene (z.B. *en*) fehlreguliert werden.

### 4.3.2 Maus Bmi-1-N wirkt dominant-negativ mit einigen Unterschieden zu Su(z)2-N1 und Psc-N1

Die Deletion von 97 AS der CTR im Bmi-1-N-Myc-Konstrukt bewirkt, dass dieses Fusionsprotein nicht mehr in diskrete Positionen bindet, sondern granulär auf dem gesamten Chromatin verteilt ist. Diese Lokalisation scheint keinen Effekt auf die Chromatinlokalisierung des endogenen Psc zu haben. In Flügelimaginalscheiben entfalten Expressionsklone von Bmi-1-N dominant-negative Wirkung, die mit der Induktion anteriorer *en*-Expression, Überproliferation und dem Abrunden der Zellklone wesentliche Charakteristika der Su(z)2-N1 und Psc-N1 dominant-negativen Wirkung widerspiegeln. Allerdings sind im Unterschied zu den Fliegenproteinen die anterioren Zellgruppen der Bmi-1-N-Myc-Expression und *en*-Fehlregulation nicht immer deckungsgleich. Es kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, ob es sich um Effekte von Zell-Migration oder nicht-Zell-autonomer Wirkung handelt. Wesentlich ist jedoch, dass Bmi-1 dominant-negativ wirken kann, auch wenn möglicherweise nur eine Teilmenge der Gene fehlreguliert wird, die durch die stärker-wirkenden Su(z)2-N1- und Psc-N1-Transgene fehlreguliert werden, wie es bereits für die dominante Wirkung von Bmi-1-FL diskutiert wurde (s. oben).

### 4.3.3 Unterschiede der Chromatinbindung der Bmi-1-HR zu den Fliegenproteinen

Es ist interessant, dass die isolierte Bmi-1-HR nicht an die endogenen Psc-Bindestellen rekrutiert wird, also diese Fähigkeit in den deletierten 97 AS oder in dem Zusammenspiel der beiden Regionen lokalisiert sein muß. In den Fliegen N1-Fusionsproteinen sind jeweils noch kurze Bereiche der CTR enthalten (Su(z)2: 11 AS; Psc: 43 AS), die möglicherweise relevant für die diskrete Chromatinbindung sein könnten. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, weil angenommen werden kann, dass Su(z)2 und Psc jeweils im Kontext eines Multiproteinkomplexes an das Chromatin rekrutiert werden. Die bisher kartierten Protein-Protein-Interaktionsbereiche beider Proteine mit Komponenten des PRC-1 liegen innerhalb

der HR, insbesondere im Bereich der HTH, der mit der jüngst beschriebenen RAWUL Domäne überlappt. Diese Bereiche sind in Bmi-1 ebenfalls zu finden, so dass ein ähnlicher Mechanismus der Rekrutierung angenommen werden kann. Für die Stabilisierung dieser Interaktionen scheint im Fall von Bmi-1 die CTR erforderlich zu sein. Fehlt diese ist scheinbar eine stabile Interaktion mit Komponenten der Fliegen-PcG-Komplexe geschwächt und eine intrinsische unspezifische DNA-Bindeaktivität kommt zum Tragen.

#### **4.3.4 Funktion der Bmi-1-CTR**

In der Literatur findet sich eine Studie, in der die Wirkung der Bmi-1-CTR anhand von Deletionskonstrukten in humanen Zellkulturzellen untersucht wurde (Yadav et al., 2010). Demnach hat die Deletion der CTR, die ähnlich Prolin- und Serinreich ist wie die Fliegen CTRs, eine Stabilisierung des Restproteins zur Folge. Hierbei erhöht sich die Halbwertszeit des Konstrukts ohne CTR auf 120 Minuten gegenüber der *full length* Version oder endogenem Bmi-1 von 25-30 Minuten. Die daraus resultierenden Effekte werden als Funktionsgewinn gedeutet, insbesondere weil die Bmi-1 Zielgene *p16INK4a/p19ARF* transkriptionell stärker reprimiert werden. Das p16 Protein wirkt als potenter Tumorsuppressor und seine transkriptionelle Repression durch Bmi-1 äußert sich in Hyperproliferation und epithelialer zu mesenchymaler Transition (EMT).

#### **4.3.5 Der RING-Finger ist für die Funktion von Bmi-1 bedeutend**

Hieraus ist auch zu schließen, dass alle relevanten Funktionen, die zur Repression von Zielgenen benötigt werden (i.e. Rekrutierung und Stummschalten) noch in dem Bmi-1-HR-Konstrukt enthalten sein müssen. Deletionsanalysen des RING-Finger Motivs (RF) führten nach Überexpression in Säugerzellen zur dominant-negativen Wirkung. So wird beispielsweise die Repression von *p16INK4a/p19ARF* aufgehoben und die Zellen gehen in die Seneszenz (Itahana et al., 2003). Ich habe keine RF-Deletionskonstrukte von Su(z)2 oder Psc untersucht, aber im Su(z)2-HG-Myc-Konstrukt ist die Struktur der RING-Finger Domäne durch den Austausch des zentralen Histidins gestört, so dass diese mutmaßlich funktionslos ist. Da



dieses Konstrukt weiterhin dominante Aktivität zeigt, ist der RF in *Drosophila* scheinbar für die Funktion entbehrlich. Komplementär ist die CTR in *Drosophila* für die dominante Funktion essentiell, während sie bei Bmi-1 im Säugersystem lediglich die Proteinstabilität zu regulieren scheint. Zusammenfassend leitet sich hieraus die Hypothese ab, dass einige Aspekte der Funktion, insbesondere die Chromatinrekrutierung in diskrete Positionen, zwischen Su(z)2/Psc und Maus Bmi-1 evolutionär konserviert sind, andererseits aber wesentliche funktionelle Aspekte divergieren. Als mögliche Erklärung kann spekuliert werden, dass die repressive Wirkung auf Zielgene in *Drosophila* unabhängig vom RF im Wesentlichen durch die CTR vermittelt wird. Im Fall des Säuger Bmi-1 kartiert diese repressive Funktion in den RF und ist unabhängig von der CTR. Diese Befunde sind weitgehend konsistent mit meinen und den publizierten Daten und lassen vermuten, dass der *modus operandi* von Bmi-1 als wesentliches Element die H2A-Ubiquitylierung beinhaltet (Wang et al., 2004), während die Fliegenproteine hauptsächlich über nicht-kovalente Chromatinmodifikationen wirken, die sich *in vitro* in den beschriebenen Funktionen widerspiegeln (Francis et al., 2004; Lo et al., 2009, 2010; Beh et al., 2012). Entsprechend zeigt Bmi-1 keine nicht-kovalenten *in vitro* Funktionen (Beh et al., 2012).

In Bezug auf die evolutionäre Konservierung würde dieses Modell nahelegen, dass PRC-1-Komplexe in Säugern (kovalente Ubiquitylierung) und *Drosophila* (nicht-kovalente Histonmodifikation) divergente Wirkmechanismen entwickelt haben. Möglicherweise werden diese Funktionen in den unterschiedlichen Spezies jeweils durch alternative PcG-Komplexe komplementiert. So wurde in *Drosophila* der dRAF-Komplex identifiziert, der für den Hauptanteil der H2A-Ubiquitylierung verantwortlich gemacht wird (Lagarou et al., 2008). Da dieser Komplex auch Psc enthält, scheint Psc durch seinen strukturellen oder funktionellen Beitrag in diesem Kontext zur Ubiquitylierung beizutragen. Dies deutet darauf hin, dass *in vivo* mehr Übereinstimmung zwischen Psc und Bmi-1 besteht als in dem transgenen Testsystem ermittelt wurde, also die Funktionen der Säuger- und Fliegen-PRC-Komplexe wahrscheinlich nicht vollständig divergent sind, sondern jeweils unterschiedliche

funktionelle Spezialisierungen darstellen. Ob in Säugern die für  $Su(z)2$  und Psc postulierten nicht-kovalenten Chromatinmodifikationen funktionell überhaupt bedeutsam sind oder ob nicht-charakterisierte PcG-Komplexe diese Funktionen wahrnehmen, ist bislang unklar. Die jüngste Identifizierung von RAWUL Domänen enthaltenden Proteinen mit RING-Finger Motiven in divergenten Spezies, für die bislang keine PRC-1 Komplexe beschrieben wurden, deutet jedoch darauf hin, dass nicht-homologe Proteine in verschiedenen Spezies analog wirken könnten (z.B. das M33 Protein in der Maus oder EMF1 in *Arabidopsis*; Sanchez-Pulido et al., 2008).

#### **4.3.6 Die Ursachen der Überproliferationsphänotypen von *Bmi-1* und $Su(z)2/Psc$ sind unterschiedlich**

Die onkogene Wirkung des *Bmi-1* Funktionsgewinns nach Überexpression und die Hyperproliferation nach  $Su(z)2$ - oder  $Su(z)2/Psc$ -Funktionsverlust ist wahrscheinlich so zu erklären, dass *Bmi-1* direkt den *p16INK4a/p19ARF* Tumorsuppressorloкус reprimiert (Itahana et al., 2003). Das p16 Protein wirkt als Inhibitor von Cyclin dependent kinase 4 und 6 (CDK4 und CDK6), die wiederum das Retinoblastoma Protein phosphorylieren und somit die Zellzyklusprogression von G1 in die S-Phase propagieren. Die Gene des *p16INK4a*-Lokus sind in *Drosophila* nicht konserviert und insgesamt sprechen die Effekte des  $Su(z)2/Psc$  Funktionsverlusts und der Überexpression der dominant-negativ wirkenden Konstrukte dafür, dass ein oder mehrere Zielgene mit der gegensätzlichen Wirkung zu p16, nämlich einer Zellzyklus-stimulierenden (quasi ‚protoonkogenen‘) Wirkung fehlreguliert werden. Konsistent mit diesen Bedingungen korreliert nicht der Funktionsverlust, sondern die Überexpression von *Bmi-1* mit tumorigener Proliferation, weshalb die Quantifizierung von *Bmi-1* in der Klinik als diagnostischer und prognostischer Marker eingesetzt wird (Gunster et al., 1997; Hemenway et al., 1998). Auf der anderen Seite ist es bei  $Su(z)2/Psc$  der Funktionsverlust, der zur Hyperproliferation imaginaler Zellen führt. Es mag ein Zufall sein, dass in beiden Systemen diese strukturell ähnlichen PcG Faktoren auf zellulärer Ebene mit ähnlichen phänotypischen Effekten - Tumorgenese, bzw. Hyperproliferation - assoziiert sind, wenn auch

mit entgegengesetzten Vorzeichen, aber wahrscheinlich ist dies der Ausdruck der Tatsache, dass diese PcG-Faktoren in *Drosophila* wie auch in Säugern ein breites Spektrum entwicklungsrelevanter Zielgene regulieren, unter denen sich auch Regulatoren des Zellzyklus befinden.

#### **4.3.7 *Mel-18* wirkt als Tumorsuppressor**

In dieser Arbeit wurde das zweite Säuger Protein mit Ähnlichkeit zu *Su(z)2* und *Psc*, *Mel-18*, nicht untersucht. *Mel-18* wurde als Tumorsuppressor charakterisiert, weil es die Expression des Protoonkogens *Bmi-1* negativ reguliert (Guo WJ, Datta S, Band V, Dimri GP., 2007; Zhang, et al., 2010). Diese Beziehung zeigt die kreuzweise PcG-abhängige Regulation von PcG Genen, wie wir sie auch bei *Su(z)2* und *Psc* beobachten (A. Klebes, unveröffentlicht; Ali und Bender, 2004; Park et al., 2012). Allerdings scheint in *Drosophila* eine andere Beziehung zwischen diesen beiden Genen zu bestehen, da sie partielle funktionelle Redundanz zeigen, während *Bmi-1* und *Mel-18* antagonistisch wirken. Interessanterweise deuten funktionelle Studien darauf hin, dass *Bmi-1* und *Mel-18* etliche Zielgene gemeinsam regulieren, was ebenfalls für eine partiell redundante Wirkung sprechen würde (Wiederschain et al., 2007). Es wird interessant sein, in zukünftigen Arbeiten das Zusammenspiel dieser beiden Säugerproteine näher zu charakterisieren und mit dem Fliegenpaar zu vergleichen.

#### **4.4 Potential der neuen Erkenntnisse und Reagentien für weiterführende Analysen**

Meine Arbeiten führen zu einer Neubewertung der eigenständigen *Su(z)2* Funktion durch die Analyse der Funktionsverlust Phänotypen, zeigen aber andererseits auch die Vergleichbarkeit der *Su(z)2*- und *Psc*-Funktion in der Überexpressionssituation. Ich konnte drei funktionelle Bereiche beider Proteine charakterisieren und beschreibe Ähnlichkeiten und Unterschiede in der Funktionsweise des Säuger *Bmi-1* Proteins. Insgesamt stellen diese Befunde einen Zwischenschritt in der Analyse dieser PcG-Gene dar. Hierauf aufbauend und mit den von mir

geschaffenen transgenen Linien können in weiterführenden Arbeiten Fragen zur Funktionsweise bearbeitet werden. Hierzu sind neben genetischen Analysen auch ergänzende biochemische und genomische Verfahren geeignet. Im Folgenden werden einige dieser Fragen und eine mögliche Herangehensweise erörtert.

#### **4.4.1 Genetische Interaktionsstudien zur Analysen der Funktionalität**

Mehrere Umstände erschweren die Durchführung von Rettungsexperimenten. Dies sind besonders die partielle Redundanz und die Tatsache, dass beide PcG-Gene sich gegenseitig transkriptionell regulieren, so dass keine hypomorphen Allele sondern nur die doppelmutante Nullsituation für solche Ansätze in Betracht käme. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass die endogenen Regulationselemente beider Gene nicht charakterisiert sind und somit ubiquitäre Promotoren, wie z.B. der Hitzeschockpromoter eingesetzt werden müssten. Diese Vorgehensweise führt jedoch wahrscheinlich zur Expression in anderen Mengen als normal, was bei der dosisabhängigen Funktion von Su(z)2 und Psc zu verminderter Funktion oder zur Überexpression mit den beschriebenen dominanten oder dominant-negativen Effekten führen würde. Als Alternative zu Rettungsexperimenten können jedoch genetische Interaktionsstudien wie z.B. die o.g. Experimente im Augensystem eingesetzt werden. Mittels der genetischen Interaktion konnte ich die Wirkung des Su(z)2-FL Transgens als dominant und die des Su(z)2-N1 Transgens als dominant-negativ charakterisieren. Weitere Interaktionsstudien und ergänzende Rettungsexperimente wären geeignet, um die Wirkweise der übrigen Konstrukte entsprechend zu untersuchen.

#### **4.4.2 Entschlüsselung molekularer Mechanismen**

Um die molekularen Wirkmechanismen besser zu verstehen, könnten zukünftig die transgenen Fliegenlinien eingesetzt werden. Hiermit ließen sich z.B. die Frage nach Su(z)2/Psc-vermittelten Chromatinmodifikationen oder der Zusammensetzung von Su(z)2- und/oder Psc-enthaltenden Multiproteinkomplexen bearbeiten. So könnte die Rolle dieser

Faktoren bei der H2A-Ubiquitylierung und bei nicht-kovalenten Chromatinmodifikationen *in vivo* analysiert werden. Hierzu bieten die mit einem Epitopanteil markierten transgenen Konstrukte einen geeigneten Zugang. Nach Überexpression dominant und dominant-negativ wirkender Transgene ließe sich z.B. mittels CHIP in genomischen Modellregionen bekannter Zielgene die Auswirkung auf kovalente Chromatinmodifikationen sowie die Nukleosomendichte und Rekrutierung von *Chromatin Remodeling* Faktoren untersuchen.

#### 4.4.3 Evolutionäre Unterschiede

Zur Klärung der funktionellen Unterschiede zwischen den Fliegen- und Säugerproteinen könnten transgene Hybridkonstrukte hergestellt werden, die beispielsweise die Bmi-1 HR mit der CTR von Su(z)2- und/oder Psc vereinen und umgekehrt. Hierdurch und durch geeignete Mutationen in der RING-Finger Domäne und Mutationen der CTR, die die *in vitro* Funktion der CTR beeinträchtigen (z.B. Änderungen der Ladungsverteilung, Beh et al., 2009), könnte die o.g. Hypothese der unterschiedlichen Funktion von Bmi-1 und den Fliegenproteinen weiter untersucht werden.

#### 4.4.4 Kompositione der Multiproteinkomplexe

Weiterhin ist die Frage interessant, ob Psc und Su(z)2 *in vivo* miteinander interagieren und möglicherweise gleichzeitig in PcG-Komplexen gebunden sind, wie es durch die Kolo-kalisation nahegelegt wird. Biochemische Methoden haben bislang keine Komplexe aufgedeckt, in denen Su(z)2 und Psc gleichzeitig vorhanden sind. Einen ersten experimentellen Zugang zur Bearbeitung dieser Frage bieten hier die transgenen Fusionsproteine, die Co-Immunpräzipitationsstudien erlauben und die Problematik umgehen, dass die zur Verfügung stehenden anti-Psc und anti-Su(z)2 Antiseren bislang in Western Blot Experimenten in meinen Händen nicht einsetzbar sind. Weiterhin ließen sich biochemische Analysen durchführen, um beispielsweise zu klären, ob Su(z)2 ebenso wie Psc in einem dRAF-ähnlichen und APC Komplex gebunden ist.

#### **4.4.5 Identifizierung relevanter Zielgene**

Auf der Suche nach Su(z)2/Psc-Zielgenen, die beispielsweise als Regulatoren des Zellzyklus wirken, können ebenfalls dominant und dominant-negativ wirkender Konstrukte zur Überexpression gebracht werden, um in anschließenden Expressionsstudien (RT-PCR, Microarray, NGS) nach fehlregulierten Kandidatengenen zu suchen, die anschließend in funktionellen Studien weiter charakterisiert werden müssten.

## 5 Zusammenfassung

Polycomb Gruppen (PcG) Proteine sind epigenetische Regulatoren der Entwicklung von *Drosophila* und anderer Organismen. Sie binden spezifische Chromatinregionen und bewirken durch lokale biochemische Modifikationen der Histonproteine und Veränderung der Chromatinstruktur die dauerhafte Stummschaltung ihrer Zielgene.

Das *Drosophila* PcG Protein Posterior sex combs (Psc) wurde als Kernkomponente von repressiven PcG-Multiproteinkomplexen (PRC-1, dRAF-RC) charakterisiert, allerdings ist die genaue Funktion, möglicherweise bei nicht-kovalenten Chromatinmodifikationen und/oder als Verstärker einer H2A-spezifischen E3 Ubiquitin Ligase Aktivität noch unzureichend verstanden. *In vitro* Studien zeigten, dass die carboxyterminale Region (CTR) Chromatin kompaktieren, und das für die Transkription notwendige *Chromatin Remodeling* verhindern kann. Die CTR ist im paralogen PcG Protein Suppressor of zeste 2 (Su(z)2) zwar nicht in der Primäresequenz, aber in Bezug auf die ungewöhnliche Aminosäurekomposition und Ladungsverteilung in ähnlicher Weise vorhanden. Dementsprechend können alle *in vitro* Funktionen gleichermaßen von Su(z)2, bzw. auch der Su(z)2-CTR alleine ausgeübt werden. Auch das Su(z)2 Protein wurde in einem PRC1-ähnlichen Multiproteinkomplex aufgereinigt, in dem es Psc ersetzt. Im Gegensatz zu früheren Befunden zeige ich eine nahezu vollständige Kolo-kalisation beider Proteine in Immunfärbungen an Polytänchromosomen. Entsprechend wurde mit genetischen Methoden bislang die Wirkung beider essentieller Gene als partiell redundant beschrieben. Durch die Analyse von Su(z)2 Funktionsverlustphänotypen zeige ich in meiner Arbeit eigenständige Funktionen von Su(z)2, insbesondere in der Zellzykluskontrolle, die den doppelmutanten Phänotyp stark ähneln. Somit wird klar, dass Su(z)2 neben der redundanten Funktion mit Psc bei der Repression von Zielgenen, auch eigenständige Funktionen in der späten Entwicklung - beispielsweise die Kontrolle des Zellzyklus - besitzt, die nicht durch Psc ersetzt werden können. Das späte Auftreten dieser Defekte und Beobachtung in Immunfärbungen deuten auf die Stabilität des Su(z)2 Proteins.

In Säugern finden sich zwei strukturell verwandte und ebenfalls partiell redundant wirkende PcG Faktoren, Bmi-1 und Mel-18. Diese spielen bei der Tumorgenese eine wichtige Rolle und *Bmi-1* ist zudem für die Aufrechterhaltung verschiedener somatischer Stammzellpopulationen notwendig. Alle vier Fliegen- und Säugerproteine enthalten jeweils eine etwa 200 Aminosäuren umfassende *Homology Region* (HR), die sehr gut konserviert ist und für die spezifische Chromatinbindung ausreichend und notwendig ist. Um die molekulare Funktion genauer zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine detaillierte Funktions-Struktur-Analyse von Psc, Su(z)2 und Bmi-1 in einem transgenen *in vivo* Ansatz durchgeführt. Die verschiedenen Konstrukte beider Fliegen gene verhalten sich sehr ähnlich, so dass drei funktionelle Bereiche unterschieden werden können: neben der HR, die als Anker bei der Chromatinlokalisierung wirkt, lässt sich innerhalb der CTR jeweils ein für die Funktion notwendiger Bereich – CTR1 – und eine Vertärkerregion – CTR2 – unterscheiden. In Übereinstimmung mit der Kartierung der dominanten Funktion in den CTR1-Bereichen sind die RING-Finger Motive weder für die Chromatinbindung noch für die getestete dominante Funktion notwendig. Dies steht im Gegensatz zu der Funktionsweise des Säuger Bmi-1 Proteins, dass in unserem transgenen Testsystem nur einige Aspekte der Su(z)2- und Psc-Funktion teilt. So zeigt Bmi-1 spezifische Chromatinlokalisierung in endogenen Psc Bindestellen und die Wirkung der isolierten HR ist ebenso wie bei Su(z)2 und Psc dominant-negativ. Das deutet darauf hin, dass Sequenzen, die die Interaktion mit anderen PcG Faktoren vermitteln, evolutionär konserviert sind und mutmaßlich die Bindung im Komplex ausreichend ist, um endogenes Su(z)2 und Psc auszutitrieren. Allerdings zeigt Bmi-1 keine dominante Repression von *engrailed*. In Säugierzellen ist interessanterweise das RING-Finger Motiv und nicht die CTR für die dominante Funktion notwendig, wodurch unterschiedliche Wirkmechanismen zwischen Fliegen Su(z)2 und Psc und Säuger Bmi-1 weiterhin verdeutlicht werden.



## Summary

Polycomb group (PcG) proteins function as epigenetic regulators of development in *Drosophila* and other organisms. They target specific chromatin regions and permanently silence the associated genes by local biochemical modifications of the histone proteins and by alterations of the chromatin structure.

The *Drosophila* Posterior Sex Combs (Psc) protein has been identified as a core component of repressive PcG multi-protein complexes (PRC-1, dRAF-RC). Yet, its molecular function is not completely understood. It is believed to enhance the histone H2A-specific E3 ubiquitin ligation function and/or contribute to non-covalent histone modifications. *In vitro* studies demonstrated that the carboxyterminal region (CTR) is competent to compact chromatin and inhibit chromatin remodeling. The paralogous PcG protein Suppressor of zeste 2 (Su(z)2) contains a similar CTR that resembles the Psc CTR in respect of its unusual amino acid composition and arrangement of clusters of positive charge but not in primary sequence. Accordingly, the Su(z)2 protein or its CTR alone are competent to perform all *in vitro* functions. Su(z)2 has been identified as a component of a PRC1-like complex where it replaces Psc. In contrast to previous reports I show a close to complete co-localization of Psc and Su(z)2 on polytene chromosomes. In good agreement with this observation genetic analysis point at a partial redundant function of these two genes. However, my analysis of Su(z)2 loss of function mutant phenotypes uncovers unique Su(z)2 functions that closely resemble the double mutant Su(z)2/Psc mutant phenotype, especially in respect to cell cycle control. Thus, in addition to its redundant function with Psc in the repression of target genes Su(z)2 exerts unique functions in late development, e.g. cell cycle control. These latter functions cannot be compensated for by Psc. Together, the fact that Su(z)2 phenotypes occur late in development and observations from immun-stainings suggest that the Su(z)2 protein is stable.

Mammals have two structurally related PcG proteins, Bmi-1 and Mel-18, that likewise show partial redundant function. Both are implicated in tumorigenesis and additionally Bmi-1 is

required for the maintenance of different somatic stem cell populations. All four fly and mammalian proteins share a well conserved homology region (HR) of app. 200 amino acid residues that is necessary and sufficient for specific chromatin binding. In order to further analyse the molecular mechanisms I conducted a detailed structure-to-function analysis of Psc, Su(z)2 and mouse Bmi-1 following a transgenic *in vivo* approach. The different constructs of the two fly proteins behaved similar and uncovered three functional sections: the HR that serves as an anchor to recruit the protein to specific chromatin sites, and two areas within the carboxy-terminal region (CTR); CTR1 that is necessary for the dominant function and CTR2 that acts as an enhancer for these dominant functions. Consistent with the mapping of the dominant function to the CTR the RING-finger motif seems to be dispensable for the tested dominant functions. This mode of action contrasts the mechanism of mammalian Bmi-1 that recapitulates only some aspects of the fly protein in our transgenic system. Bmi-1 binds to specific chromatin positions that also recruit Psc protein and the isolated HR also shows dominant-negative activity. This suggests that sequences for the interaction with other PcG proteins and incorporation in the multi-protein complexes are evolutionary conserved. This binding activity appears to be sufficient to compete out endogenous Su(z)2 and Psc. However, transgenic Bmi-1 is not sufficient to dominantly suppress *engrailed*. In mammalian cells the RING-finger motif of Bmi-1 and not the CTR is necessary for dominant functions exemplifying differences in the mode of action between mammalian Bmi-1 and Su(z)2 and Psc from the fly.

## 6 Literaturverzeichnisse

- Alfieri, C., Gambetta, M. C., Matos, R., Glatt, S., Sehr, P., Fraterman, S., Müller, C. W. (2013). Structural basis for targeting the chromatin repressor Sfmtb to Polycomb response elements. *Genes and Development*, 27(21), 2367–79.
- Ali, J. Y., Bender, W. (2004). Cross-regulation among the polycomb group genes in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7737–47.
- Alkema, M. J., van der Lugt, N. M., Bobeldijk, R. C., Berns, A., Van Lohuizen, M. (1995). Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice. *Nature*, 374(6524), 724–7.
- Alkema, M. J., Wiegant, J., Raap, A. K., Berns, A., Van Lohuizen, M. (1993). Characterization and chromosomal localization of the human proto-oncogene BMI-1. *Human Molecular Genetics*, 2(10), 1597–603.
- Baig, J. (2010). Polycomb and Trithorax group chromatin regulators control cell proliferation and differentiation in *Drosophila* eye development. Dissertation an der Freie Universität Berlin.
- Beh, L. Y., Colwell, L. J., Francis, N. J. (2012). A core subunit of Polycomb repressive complex 1 is broadly conserved in function but not primary sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(18), E1063–71.
- Ben-Saadon, R., Zaaroor, D., Ziv, T., Ciechanover, A. (2006). The polycomb protein Ring1B generates self atypical mixed ubiquitin chains required for its in vitro histone H2A ligase activity. *Molecular Cell*, 24(5), 701–11.
- Beuchle, D., Struhl, G., Müller, J. (2001). Polycomb group proteins and heritable silencing of *Drosophila* Hox genes. *Development (Cambridge, England)*, 128(6), 993–1004.
- Brameier, M., Krings, A., MacCallum, R. M. (2007). NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(9), 1159–60.
- Brand, A. H., Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401–15.
- Brown, J. L., Fritsch, C., Mueller, J., Kassis, J. A. (2003). The *Drosophila* pho-like gene encodes a YY1-related DNA binding protein that is redundant with pleiohomeotic in homeotic gene silencing. *Development (Cambridge, England)*, 130(2), 285–94.
- Brown, J. L., Mucci, D., Whiteley, M., Dirksen, M. L., Kassis, J. A. (1998). The *Drosophila* Polycomb group gene pleiohomeotic encodes a DNA binding protein with homology to the transcription factor YY1. *Molecular Cell*, 1(7), 1057–64.

- Brunk, B. P., Martin, E. C., Adler, P. N. (1991). *Drosophila* genes Posterior Sex Combs and Suppressor two of zeste encode proteins with homology to the murine bmi-1 oncogene. *Nature*, 353(6342), 351–3.
- Buchwald, G., van der Stoop, P., Weichenrieder, O., Perrakis, A., van Lohuizen, M., Sixma, T. K. (2006). Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *The EMBO Journal*, 25(11), 2465–74.
- Cao, R., Tsukada, Y.-I., Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Molecular Cell*, 20(6), 845–54.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., ... Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5595), 1039–43.
- Chan, L. N., Gehring, W. (1971). Determination of blastoderm cells in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9), 2217–21.
- Chan, S. K., Mann, R. S. (1993). The segment identity functions of Ultrabithorax are contained within its homeo domain and carboxy-terminal sequences. *Genes and Development*, 7(5), 796–811.
- Classen, A.-K., Bunker, B. D., Harvey, K. F., Vaccari, T., Bilder, D. (2009). A tumor suppressor activity of *Drosophila* Polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling. *Nature Genetics*, 41(10), 1150–5.
- Colombani, J., Andersen, D. S., Léopold, P. (2012). Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6081), 582–5.
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., Pirrotta, V. (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell*, 111(2), 185–96.
- Dahmann, C., Basler, K. (1999). Compartment boundaries: at the edge of development. *Trends in Genetics : TIG*, 15(8), 320–6.
- Déjardin, J., Rappailles, A., Cuvier, O., Grimaud, C., Decoville, M., Locker, D., Cavalli, G. (2005). Recruitment of *Drosophila* Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature*, 434(7032), 533–8.
- Djurdjevic, Z. (2009). Untersuchung eines transgenen Suppressor of zeste 2 -Konstruktes in *Drosophila melanogaster* Selbständigkeitserklärung. Diplomarbeit an der Freien Universität Berlin.
- Duncan, D. M., Burgess, E. A., Duncan, I. (1998). Control of distal antennal identity and tarsal development in *Drosophila* by spineless-aristopedia, a homolog of the mammalian dioxin receptor. *Genes and Development*, 12(9), 1290–303.

- Enderle, D., Beisel, C., Stadler, M. B., Gerstung, M., Athri, P., Paro, R. (2011). Polycomb preferentially targets stalled promoters of coding and noncoding transcripts. *Genome Research*, 21(2), 216–26.
- Faucheux, M., Roignant, J.-Y., Netter, S., Charollais, J., Antoniewski, C., Théodore, L. (2003). batman Interacts with polycomb and trithorax group genes and encodes a BTB/POZ protein that is included in a complex containing GAGA factor. *Molecular and Cellular Biology*, 23(4), 1181–95.
- Fauvarque, M. O., Dura, J. M. (1993). polyhomeotic regulatory sequences induce developmental regulator-dependent variegation and targeted P-element insertions in *Drosophila*. *Genes and Development*, 7(8), 1508–20.
- Field, L. M., Lyko, F., Mandrioli, M., Prantero, G. (2004). DNA methylation in insects. *Insect Molecular Biology*, 13(2), 109–15.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. A., Kim, Y., Allis, C. D., Khorasanizadeh, S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes and Development*, 17(15), 1870–81.
- Flannery, Rubin, Fortini, Sang, Ready .(2006). A simple nail polish imprint technique for examination of external morphology of *Drosophila* eyes.
- Francis, N. J., Kingston, R. E. (2001). Mechanisms of transcriptional memory. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(6), 409–21.
- Francis, N. J., Kingston, R. E., Woodcock, C. L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5701), 1574–7.
- Franke, A., DeCamillis, M., Zink, D., Cheng, N., Brock, H. W., Paro, R. (1992). Polycomb and polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*. *The EMBO Journal*, 11(8), 2941–50.
- García-Bellido, A. (1975). Genetic control of wing disc development in *Drosophila*. *Ciba Foundation Symposium*, (29), 161–82.
- Garelli, A., Gontijo, A. M., Miguela, V., Caparros, E., Dominguez, M. (2012). Imaginal discs secrete insulin-like peptide 8 to mediate plasticity of growth and maturation. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6081), 579–82.
- Gil, J., Bernard, D., Peters, G. (2005). Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer. *DNA and Cell Biology*, 24(2), 117–25.
- Gindhart, J. G., Kaufman, T. C. (1995). Identification of Polycomb and trithorax group responsive elements in the regulatory region of the *Drosophila* homeotic gene *Sex combs reduced*. *Genetics*, 139(2), 797–814.
- Golic, K. G. (1991). Site-specific recombination between homologous chromosomes in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5008), 958–61.

- Grinstein, E., Wernet, P. (2007). Cellular signaling in normal and cancerous stem cells. *Cellular Signalling*, 19(12), 2428–33.
- Gunster, M. J., Satijn, D. P., Hamer, K. M., den Blaauwen, J. L., de Bruijn, D., Alkema, M. J., ... Otte, A. P. (1997). Identification and characterization of interactions between the vertebrate polycomb-group protein BMI1 and human homologs of polyhomeotic. *Molecular and Cellular Biology*, 17(4), 2326–35.
- Guo, W.-J., Zeng, M.-S., Yadav, A., Song, L.-B., Guo, B.-H., Band, V., Dimri, G. P. (2007). Mel-18 acts as a tumor suppressor by repressing Bmi-1 expression and down-regulating Akt activity in breast cancer cells. *Cancer Research*, 67(11), 5083–9.
- Hadorn, E. (1968). Transdetermination in cells. *Scientific American*, 219(5), 110–4 passim.
- Hemenway, C. S., Halligan, B. W., Levy, L. S. (1998). The Bmi-1 oncoprotein interacts with dinG and MPh2: the role of RING finger domains. *Oncogene*, 16(19), 2541–7.
- Hodgson, J. W., Argiropoulos, B., Brock, H. W. (2001). Site-specific recognition of a 70-base-pair element containing d(GA)(n) repeats mediates bithoraxoid polycomb group response element-dependent silencing. *Molecular and Cellular Biology*, 21(14), 4528–43.
- Horard, B., Tatout, C., Poux, S., Pirrotta, V. (2000). Structure of a polycomb response element and in vitro binding of polycomb group complexes containing GAGA factor. *Molecular and Cellular Biology*, 20(9), 3187–97.
- Horn, C., Jaunich, B., Wimmer, E. A. (2000). Highly sensitive, fluorescent transformation marker for Drosophila transgenesis. *Development Genes and Evolution*, 210(12), 623–9.
- Irminger-Finger, I., Ortega Perez, R. (1998). Analysis of structure and microtubule assembly activity of the Drosophila 205K MAP. *Biological Chemistry*, 379(11), 1381–6.
- Ishida, A., Asano, H., Hasegawa, M., Koseki, H., Ono, T., Yoshida, M. C., ... Kanno, M. (1993). Cloning and chromosome mapping of the human Mel-18 gene which encodes a DNA-binding protein with a new “RING-finger” motif. *Gene*, 129(2), 249–55.
- Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., Martinez, J.-L., Beausejour, C., Jacobs, J. J. L., ... Dimri, G. P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Molecular and Cellular Biology*, 23(1), 389–401.
- Jenuwein, T., Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1074–80.
- Kahn, T. G., Schwartz, Y. B., Dellino, G. I., Pirrotta, V. (2006). Polycomb complexes and the propagation of the methylation mark at the Drosophila *ubx* gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 29064–75.

- Kallin, E. M., Cao, R., Jothi, R., Xia, K., Cui, K., Zhao, K., Zhang, Y. (2009). Genome-wide uH2A localization analysis highlights Bmi1-dependent deposition of the mark at repressed genes. *PLoS Genetics*, 5(6), e1000506.
- Kassis, J. A. (1994). Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila* engrailed gene: three "pairing-sensitive" sites within a 1.6-kb region. *Genetics*, 136(3), 1025–38.
- Kassis, J. A. (2002). Pairing-sensitive silencing, polycomb group response elements, and transposon homing in *Drosophila*. *Advances in Genetics*, 46, 421–38.
- Ketel, C. S., Andersen, E. F., Vargas, M. L., Suh, J., Strome, S., Simon, J. A. (2005). Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 25(16), 6857–68.
- Kim, S. Y., Paylor, S. W., Magnuson, T., Schumacher, A. (2006). Juxtaposed Polycomb complexes co-regulate vertebral identity. *Development (Cambridge, England)*, 133(24), 4957–68.
- King, I. F. G., Emmons, R. B., Francis, N. J., Wild, B., Müller, J., Kingston, R. E., Wu, C.-T. (2005). Analysis of a polycomb group protein defines regions that link repressive activity on nucleosomal templates to in vivo function. *Molecular and Cellular Biology*, 25(15), 6578–91.
- Klebes, A., Sustar, A., Kechris, K., Li, H., Schubiger, G., Kornberg, T. B. (2005). Regulation of cellular plasticity in *Drosophila* imaginal disc cells by the Polycomb group, trithorax group and lama genes. *Development (Cambridge, England)*, 132(16), 3753–65.
- Klymenko, T., Papp, B., Fischle, W., Köcher, T., Schelder, M., Fritsch, C., ... Müller, J. (2006). A Polycomb group protein complex with sequence-specific DNA-binding and selective methyl-lysine-binding activities. *Genes and Development*, 20(9), 1110–22.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes and Development*, 16(22), 2893–905.
- Kyba, M., Brock, H. W. (1998). The *Drosophila* polycomb group protein Psc contacts ph and Pc through specific conserved domains. *Molecular and Cellular Biology*, 18(5), 2712–20.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–5.
- Lagarou, A., Mohd-Sarip, A., Moshkin, Y. M., Chalkley, G. E., Bezstarosti, K., Demmers, J. A. A., Verrijzer, C. P. (2008). dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes and Development*, 22(20), 2799–810.
- Lawrence, P. A., Struhl, G. (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *drosophila*. *Cell*, 85(7), 951–61.

- Levine, S. S., Weiss, A., Erdjument-Bromage, H., Shao, Z., Tempst, P., Kingston, R. E. (2002). The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Molecular and Cellular Biology*, 22(17), 6070–8.
- Lewis, E. B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276(5688), 565–70.
- Lewis, R. A., Wakimoto, B. T., Denell, R. E., Kaufman, T. C. (1980). Genetic Analysis of the Antennapedia Gene Complex (Ant-C) and Adjacent Chromosomal Regions of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. II. Polytene Chromosome Segments 84A-84B1,2. *Genetics*, 95(2), 383–97.
- Lewis, P. H. (1947). New mutants report. *Drosophila Information Service*, 21, 69.
- Li, X., Han, Y., Xi, R. (2010). Polycomb group genes Psc and Su(z)2 restrict follicle stem cell self-renewal and extrusion by controlling canonical and noncanonical Wnt signaling. *Genes and Development*, 24(9), 933–46.
- Li, Z., Cao, R., Wang, M., Myers, M. P., Zhang, Y., Xu, R.-M. (2006). Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20643–9.
- Lo, S. M., Ahuja, N. K., Francis, N. J. (2009). Polycomb group protein Suppressor 2 of zeste is a functional homolog of Posterior Sex Combs. *Molecular and Cellular Biology*, 29(2), 515–25.
- Lo, S. M., Francis, N. J. (2010). Inhibition of chromatin remodeling by polycomb group protein posterior sex combs is mechanistically distinct from nucleosome binding. *Biochemistry*, 49(44), 9438–48.
- Lo, S. M., McElroy, K. A., Francis, N. J. (2012). Chromatin modification by PSC occurs at one PSC per nucleosome and does not require the acidic patch of histone H2A. *PLoS One*, 7(10), e47162.
- Martin, E. C., Adler, P. N. (1993). The Polycomb group gene Posterior Sex Combs encodes a chromosomal protein. *Development (Cambridge, England)*, 117(2), 641–55.
- Metzger, M. B., Hristova, V. A., Weissman, A. M. (2012). HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 3), 531–7.
- Min, J., Zhang, Y., Xu, R.-M. (2003). Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes and Development*, 17(15), 1823–8.
- Mlodzik, M., Hiromi, Y., Goodman, C. S., Rubin, G. M. (1992). The presumptive R7 cell of the developing *Drosophila* eye receives positional information independent of sevenless, boss and sina. *Mechanisms of Development*, 37(1-2), 37–42.
- Mohd-Sarip, A., Lagarou, A., Doyen, C. M., van der Knaap, J. A., Aslan, Ü., Bezstarosti, K., ... Verrijzer, C. P. (2012). Transcription-independent function of Polycomb group protein PSC in cell cycle control. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6082), 744–7.



- Müller, J., Bienz, M. (1991). Long range repression conferring boundaries of Ultrabithorax expression in the Drosophila embryo. *The EMBO Journal*, 10(11), 3147–55.
- Müller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., ... Simon, J. A. (2002). Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell*, 111(2), 197–208.
- Müller, J., Verrijzer, P. (2009). Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(2), 150–8.
- Nekrasov, M., Klymenko, T., Fraterman, S., Papp, B., Oktaba, K., Köcher, T., ... Müller, J. (2007). Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *The EMBO Journal*, 26(18), 4078–88.
- Nekrasov, M., Wild, B., Müller, J. (2005). Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of Drosophila PRC2. *EMBO Reports*, 6(4), 348–53.
- Oktaba, K., Gutiérrez, L., Gagneur, J., Girardot, C., Sengupta, A. K., Furlong, E. E. M., Müller, J. (2008). Dynamic regulation by polycomb group protein complexes controls pattern formation and the cell cycle in Drosophila. *Developmental Cell*, 15(6), 877–89.
- Pankratz, M. J., Jäckle, H. (1990). Making stripes in the Drosophila embryo. *Trends in Genetics : TIG*, 6(9), 287–92.
- Park, S. Y., Schwartz, Y. B., Kahn, T. G., Asker, D., Pirrotta, V. (n.d.). Regulation of Polycomb group genes Psc and Su(z)2 in Drosophila melanogaster. *Mechanisms of Development*, 128(11-12), 536–47.
- Pietersen, A. M., Evers, B., Prasad, A. A., Tanger, E., Cornelissen-Steijger, P., Jonkers, J., Van Lohuizen, M. (2008). Bmi1 regulates stem cells and proliferation and differentiation of committed cells in mammary epithelium. *Current Biology : CB*, 18(14), 1094–9.
- Pirrotta, V. (1997). Chromatin-silencing mechanisms in Drosophila maintain patterns of gene expression. *Trends in Genetics : TIG*, 13(8), 314–8.
- Poux, S., Kostic, C., Pirrotta, V. (1996). Hunchback-independent silencing of late Ubx enhancers by a Polycomb Group Response Element. *The EMBO Journal*, 15(17), 4713–22.
- Rajasekhar, V. K., Begemann, M. (2007). Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(10), 2498–510.
- Rastelli, L., Chan, C. S., Pirrotta, V. (1993). Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste and Polycomb group proteins in Drosophila and their dependence on Enhancer of zeste function. *The EMBO Journal*, 12(4), 1513–22.

- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Jenuwein, T. (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), 593–9.
- Ringrose, L., Paro, R. (2004). Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annual Review of Genetics*, 38, 413–43.
- Ringrose, L., Paro, R. (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development (Cambridge, England)*, 134(2), 223–32.
- Ringrose, L., Rehmsmeier, M., Dura, J.-M., Paro, R. (2003). Genome-wide prediction of Polycomb/Trithorax response elements in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Cell*, 5(5), 759–71.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Sung, Z. R., Calonje, M. (2008). RAWUL: a new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC Genomics*, 9, 308.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Hrsg.) 2. edition, Cold Spring Harbor University Press.
- Sangiorgi, E., Capecchi, M. R. (2008). Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Genetics*, 40(7), 915–20.
- Saurin, A. J., Shao, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Kingston, R. E. (2001). A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature*, 412(6847), 655–60.
- Scheuermann, J. C., de Ayala Alonso, A. G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R. K., Fraterman, S., ... Müller, J. (2010). Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*, 465(7295), 243–7.
- Schuettengruber, B., Cavalli, G. (2009). Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development (Cambridge, England)*, 136(21), 3531–42.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, 128(4), 735–45.
- Schuettengruber, B., Ganapathi, M., Leblanc, B., Portoso, M., Jaschek, R., Tolhuis, B., Cavalli, G. (2009). Functional anatomy of polycomb and trithorax chromatin landscapes in *Drosophila* embryos. *PLoS Biology*, 7(1), e13.
- Schwartz, Y. B., Pirrotta, V. (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(3), 266–73.
- Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J. R., Wu, C. T., Bender, W., Kingston, R. E. (1999). Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell*, 98(1), 37–46.

- Sharp, E. J., Abramova, N. A., Park, W. J., Adler, P. N. (1997). The conserved HR domain of the *Drosophila* suppressor 2 of zeste [Su(z)2] and murine bmi-1 proteins constitutes a locus-specific chromosome binding domain. *Chromosoma*, 106(2), 70–80.
- Simon, J. A., Kingston, R. E. (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(10), 697–708.
- Simon, J. A., Tamkun, J. W. (2002). Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(2), 210–8.
- Sing, A., Pannell, D., Karaiskakis, A., Sturgeon, K., Djabali, M., Ellis, J., Cordes, S. P. (2009). A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell*, 138(5), 885–97.
- Sparmann, A., Van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(11), 846–56.
- Spradling, A. C., Rubin, G. M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 218(4570), 341–7.
- St Johnston, D., Driever, W., Berleth, T., Richstein, S., Nüsslein-Volhard, C. (1989). Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development (Cambridge, England)*, 107 Suppl, 13–9.
- Struhl, G., Basler, K. (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell*, 72(4), 527–40.
- Van Lohuizen, M., Frasch, M., Wientjens, E., Berns, A. (1991). Sequence similarity between the mammalian bmi-1 proto-oncogene and the *Drosophila* regulatory genes Psc and Su(z)2. *Nature*, 353(6342), 353–5.
- Vazquez, J., Farkas, G., Gaszner, M., Udvardy, A., Muller, M., Hagstrom, K., Galloni, M. (1993). Genetic and molecular analysis of chromatin domains. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 58, 45–54.
- Wang, J., Zhao, H.-P., Xie, C.-Q., Lin, G., Yang, S., Nie, D.-S., Lu, G.-X. (2005). [Differentiation from human embryonic stem cells to hematopoietic cells and endothelial cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi / Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui = Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology*, 13(2), 222–8.
- Weake, V. M., Lee, K. K., Guelman, S., Lin, C.-H., Seidel, C., Abmayr, S. M., Workman, J. L. (2008). SAGA-mediated H2B deubiquitination controls the development of neuronal connectivity in the *Drosophila* visual system. *The EMBO Journal*, 27(2), 394–405.
- Weake, V. M., Workman, J. L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Molecular Cell*, 29(6), 653–63.

- Wiederschain, D., Chen, L., Johnson, B., Bettano, K., Jackson, D., Taraszka, J., ... Benson, J. D. (2007). Contribution of polycomb homologues Bmi-1 and Mel-18 to medulloblastoma pathogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 27(13), 4968–79.
- Wu, C. T., Howe, M. (1995). A genetic analysis of the Suppressor 2 of zeste complex of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 140(1), 139–81.
- Yadav, A. K., Sahasrabudde, A. A., Dimri, M., Bommi, P. V., Sainger, R., Dimri, G. P. (2010). Deletion analysis of BMI1 oncoprotein identifies its negative regulatory domain. *Molecular Cancer*, 9, 158.
- Zhang, X.-W., Sheng, Y.-P., Li, Q., Qin, W., Lu, Y.-W., Cheng, Y.-F., ... Guo, W.-J. (2010). BMI1 and Mel-18 oppositely regulate carcinogenesis and progression of gastric cancer. *Molecular Cancer*, 9, 40.
- Zink, D., Paro, R. (1995). *Drosophila* Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA. *The EMBO Journal*, 14(22), 5660–71.

## Internetseite

A Database of *Drosophila* Genes and Genomes ([www.flybase.org](http://www.flybase.org)).

Multiple sequence alignment by Florence Corpet (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

NucPred analyses a eukaryotic protein sequence and predicts  
(<http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>).

Model Organism ENCyclopedia Of DNA Elements (<http://www.modencode.org/>).

# Anhang

## 1. Transgene Fliegen

**Tab.5.1.** Liste der transgenen Su(z)2-Stämme mit Angabe der chromosomalen Lokalisation.

Transgene Su(z)2-Konstrukte					
Nr.	Transgen	Lokalisation	Nr.	Transgen	Lokalisation
<b>Su(z)2-FL-Myc</b>			<b>Su(z)2-C-Myc</b>		
1	Su(z)2-FL-11	X-Ch	16	Su(z)2-C-Myc-1M	II-Ch
2	Su(z)2-FL-GFP-9	II-Ch	17	Su(z)2-C-Myc-2M	II-Ch
3	HA-Su(z)2-FL-27.2	II-Ch	18	Su(z)2-C-Myc-3M	III-Ch
4	HA-Su(z)2-FL-27.3	II-Ch	19	Su(z)2-C-Myc-4M	II-Ch
5	Su(z)2-FL-Myc-12	II-Ch	20	Su(z)2-C-Myc-5M	X-Ch
6	Su(z)2-FL-Myc-15	II-Ch	21	Su(z)2-C-Myc-6M	II-Ch
7	Su(z)2-FL-Myc-19	II-Ch	<b>Su(z)2-N2-Myc</b>		
<b>Su(z)2-HG-Myc</b>			22	Su(z)2-N2-Myc-1M	II-Ch
8	Su(z)2-HG-Myc-1M	III-Ch	23	Su(z)2-N2-Myc-3M	III-Ch
9	Su(z)2-HG-Myc-2M	III-Ch	24	Su(z)2-N2-Myc-4M	III-Ch
10	Su(z)2-HG-Myc-3M	II-Ch	25	Su(z)2-N2-Myc-5M	II-Ch
11	Su(z)2-HG-Myc-4M	X-Ch	26	Su(z)2-N2-Myc-6M	II-Ch
12	Su(z)2-HG-Myc-5F	III-Ch	27	Su(z)2-N2-Myc-7M	II-Ch
<b>Su(z)2-N1-Myc</b>			28	Su(z)2-N2-Myc-8M	II-Ch
13	Su(z)2-N1-Myc-9	X-Ch	29	Su(z)2-N2-Myc-9M	III-Ch
14	Su(z)2-N1-Myc-36	II-Ch			
15	Su(z)2-N1-Myc-43	X-Ch			

**Tab.5.2.** Liste der transgenen Psc-Stämme mit Angabe der chromosomalen Lokalisation.

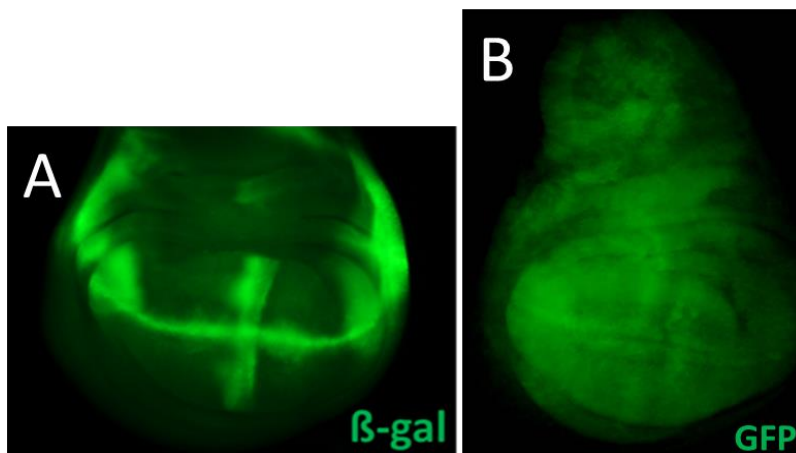
Transgene Psc-Konstrukte					
Nr.	Transgen	Lokalisation	Nr.	Transgen	Lokalisation
<b>Psc-FL</b>			<b>Psc-C-Myc</b>		
1	Psc-FL-Myc	II-Ch	18	Psc-C-Myc-7M	II-Ch
2	Psc-FL-1M	II-Ch	19	Psc-C-Myc-8M	III-Ch
3	Psc-FL-2M	III-Ch	20	Psc-C-Myc-9M	II-Ch
4	Psc-FL-3M	III-Ch	<b>Psc-N2-Myc</b>		
5	Psc-FL-4M	III-Ch	21	Psc-N2-Myc-L1	III-Ch
6	Psc-FL-5M	III-Ch	22	Psc-N2-Myc-L2	II-Ch
7	Psc-FL-6M	II-Ch	23	Psc-N2-Myc-L3	II-Ch
8	Psc-FL-7M	III-Ch	<b>Psc-N1-Myc</b>		
9	Psc-FL-8M	II-Ch	24	Psc-N1-Myc-1M	II-Ch
10	Psc-FL-9M	II-Ch	25	Psc-N1-Myc-2M	II-Ch
11	Psc-FL-10M	III-Ch	26	Psc-N1-Myc-3M	II-Ch
<b>Psc-C-Myc</b>			27	Psc-N1-Myc-4M	II-Ch

12	Psc-C-Myc-1M	II-Ch	28	Psc-N1-Myc-5M	II-Ch
13	Psc-C-Myc-2M	III-Ch	29	Psc-N1-Myc-6M	III-Ch
14	Psc-C-Myc-3M	III-Ch	30	Psc-N1-Myc-7M	II-Ch
15	Psc-C-Myc-4M	II-Ch	31	Psc-N1-Myc-8M	III-Ch
16	Psc-C-Myc-5M	III-Ch	32	Psc-N1-Myc-9M	II-Ch
17	Psc-C-Myc-6M	III-Ch	34	Psc-N1-Myc-10M	II-Ch

**Tab.5.3.** Liste der transgenen Bmi-1-Stämme mit Angabe der chromosomalen Lokalisation.

Transgene Bmi-1-Konstrukte					
Nr.	Transgen	Lokalisation	Nr.	Transgen	Lokalisation
<b>Bmi-1-FL</b>			<b>Psc-C-Myc</b>		
1	Bmi-1-FL-1	X-Ch	12	Bmi-1-C-Myc-4M	III-Ch
2	Bmi-1-FL-9	X-Ch	13	Bmi-1-C-Myc-5M	III-Ch
3	Bmi-1-FL-Myc-1M	II-Ch	14	Bmi-1-C-Myc-6M	II-Ch
4	Bmi-1-FL-Myc-2M	II-Ch	15	Bmi-1-C-Myc-7M	X-Ch
5	Bmi-1-FL-Myc-3M	III-Ch	<b>Bmi-1-N-Myc</b>		
6	Bmi-1-FL-Myc-4M	II-Ch	16	Bmi-1-N-Myc-1M	II-Ch
7	Bmi-1-FL-Myc-5F	III-Ch	17	Bmi-1-N-Myc-2M	II-Ch
8	Bmi-1-FL-Myc-6M	III-Ch	18	Bmi-1-N-Myc-3M	III-Ch
<b>Bmi-1-C-Myc</b>			19	Bmi-1-N-Myc-4M	II-Ch
9	Bmi-1-C-Myc-1M	II-Ch	20	Bmi-1-N-Myc-5M	II-Ch
10	Bmi-1-C-Myc-2M	III-Ch	21	Bmi-1-N-Myc-6M	II-Ch
11	Bmi-1-C-Myc-3M	II-Ch	22	Bmi-1-N-Myc-7M	II-Ch

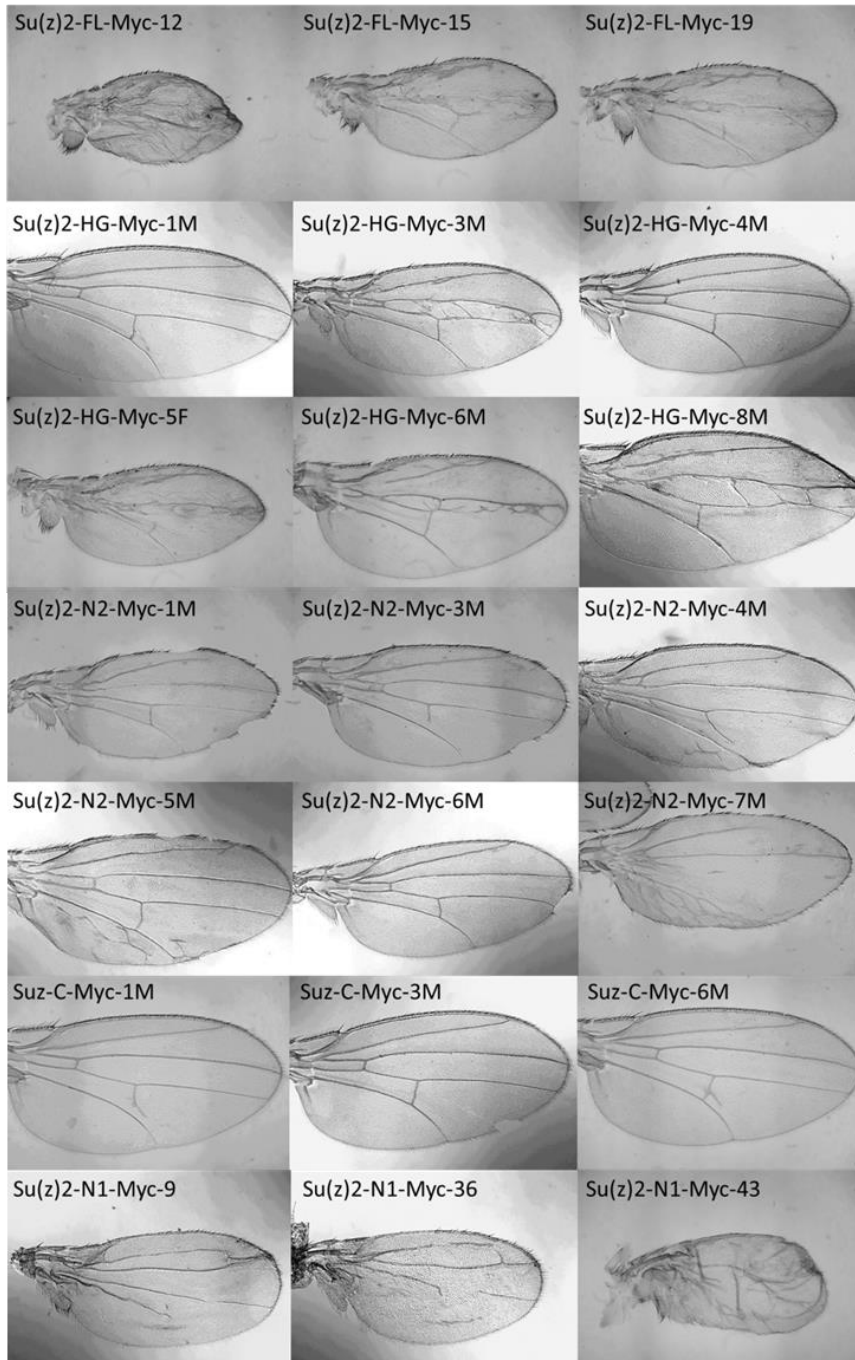
## 2. vgBE-GAL4-, und C765-Gal4-Expressionsmuster



**Abbildung 5.1.** *vgBE-GAL4-* und *C765-Gal4-Expressionsmuster.*

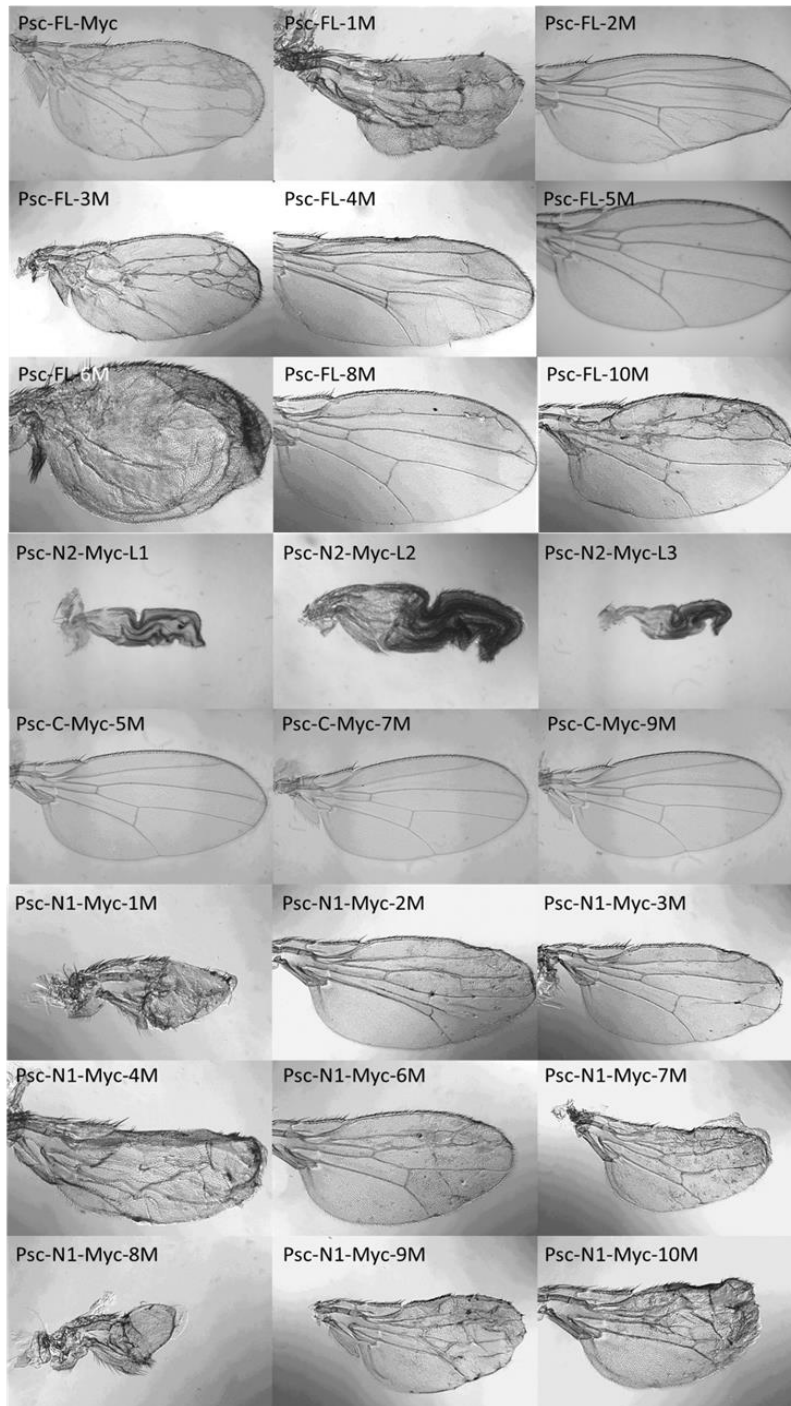
**A.** *vgBE-Gal4* exprimiert spät (*vgBE-Gal4, UAS-lacZ* 3. Larve) entlang der dorso-ventral-Grenze der Flügelimaginalscheibe (grün:  $\alpha$ - $\beta$ -gal Antikörperfärbung). **B.** *C765-Gal4* exprimiert im gesamten Flügelbereich (GFP Signal, grün(*C765-Gal4, UAS-GFP*)).

### 3. Adulte Flügelphänotypen und C765-Gal4-Überexpression der Su(z)2-Konstrukte



**Abbildung 5.2. Effekte der Su(z)2-Überexpression mit C765-Gal4 auf die Flügelentwicklung.** Die Su(z)2-FL-, Su(z)2-HG-, Su(z)2-N2- und Su(z)2-N1-Konstrukte zeigen Defekte in adulten Flügeln, insbesondere Missbildung und Verschmelzung von Venen. Die Überexpression der CTR weist nur schwache biologische Aktivität auf.

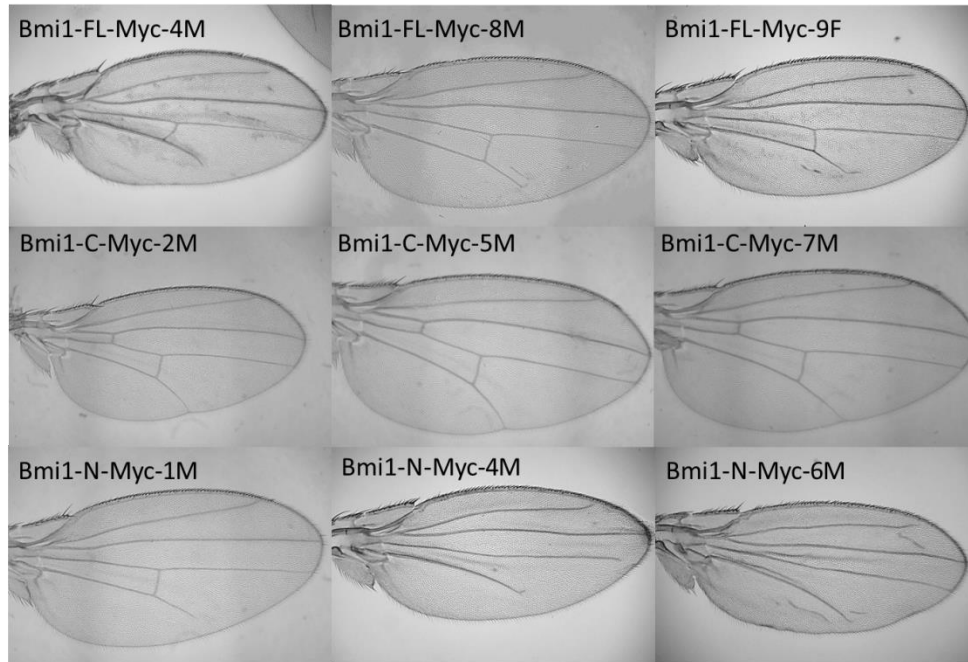
#### 4. Adulte Flügelphänotyp und C765-Gal4-Überexpression der Psc-Konstrukte



**Abbildung 5.2. Überexpression der Psc-Fusionsproteine mit C765-Gal4.** Überexpression von *full-length* Psc zeigt Venendefekte (das Psc-FL Transgen ohne Myc-Epitop verursacht stärkere Effekte als Psc-FL-Myc). Nach Expression von Psc-N2 sind die Flügel faltig und bei HR stark reduziert. Die CTR zeigt keine Effekte.



## 5. Adulte Flügelphänotypen und C765-Gal4-Überexpression der Bmi-1-Konstrukte



**Abbildung 5.3.** Überexpression der Bmi-1-Konstrukte mit C765-Gal4. Überexpression von *full-length* Bmi-1 zeigt Verkürzungen der Longitudinalvenen und den Verlust der anterioren Quervene. Bmi-1-N Expression bewirkt den Verlust der Quervenen. Die CTR zeigt keine Effekte.

## 6. Vergleich meiner klonierten Psc-cDNA mit publizierten Sequenzen (NCBI)

Multalin version 5.4.1  
 Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996  
 Published research using this software should cite  
 Multiple sequence alignment with hierarchical clustering  
 F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890  
 Symbol comparison table: blosum62  
 Gap weight: 12  
 Gap length weight: 2  
 Consensus levels: high=90% low=50%

MSF:	6332	Check:	0	..	
Name:	variant-A,	Len:	6332	Check:	1177 Weight: 0.73
Name:	variant-C,	Len:	6332	Check:	6994 Weight: 0.73
Name:	variant-B,	Len:	6332	Check:	28 Weight: 1.00
Name:	Psc-cDNA,	Len:	6332	Check:	823 Weight: 1.53
Name:	Consensus	Len:	6332	Check:	28 Weight: 0.00



## 7. Proteinsequenzen von Su(z)2, Psc, und Bmi-1

### 7.1. Su(z)2-FL (Flybase)

MHLQNTHTNTMESNAAMDAASPASRDVRQFHDLITCRLCRGYMIDPTTVDY  
 CYHTYCRSCILKHLRAVYCPECKASGGKEINELNLKSDDTLRSLIYKLV  
 PGLYQRECKELADFKEQHDLVDEQTTDEPEFFTTTELISLSLEYHPAMLH  
 QCGPGEVPPTIYLQCAAGLPVELLKRFLCSKYNIETDNGLVEVEVTYKDE  
 VLPTNFTLMDVAYCYNWSRESPMAFCYRILLYDNEQTKNDENNLSRINQD  
 IEPHSVRRSKSAKSVTFAEDLESEIDSGSPRSKVRCKTPPKVSPSSKNK  
 RLTSKREAEPEPVSNFKSLRSNDMRYSDYAVSKVKSEPEQEQLPRE  
 REQQPLEANTNIVVSI PPSQLRKSIVDAEDFELKTANRKGVGHLPKLEIE  
 LNSMKSLSMPLSAGPRLEDTSCSLSCSAQQLDLETYAKNIGLKPIEQPL  
 QQSASNPDSKYSPNASPMSSCSSSTNGSSSSSLGTADASTSTSTSSSHRKR  
 KKKHSKEPKDANGKRKKLHAEISSQTDGKMKVKITAKPNHKLDFKRSHSL  
 ASGELDLQKLKLDSTSTSEALNRTLGEARSINSLVVGAPTPPPTPTAE  
 PEQQQQQQQQQQQQPQQQQQQQQQQQQQQQQQFVVLPKIKDLTLPTSPPLPPS  
 LFKAYTPSTTPTAPHTVAGGKPKQQQQQMPQQPQAVLQQSLAKTNPAPPP  
 LSSNNNRKPNNGHFAVPQAPTHRNMYHMORYQSTPSSIASAANKMPKRSM  
 SLDESHPAKQARLSQAQAMASSYAAKLHMQTSNQAQAAAFQAAFLPNPQMRS  
 YGLPDLGSKPTLPMLCPASSSSQVTITPRPRATPSIYSFSEPNIHVPAL  
 IVRLPVNKQSAGGKGLTMPPLSPPATSSARLMGPPAALPKHAGHGHGAAK  
 RSCQMPMPMPLPLPLPMPMTTIPAIVKSPPLSVALSGQRNNKGNSSNSN  
 AYRTSPPALINLRNTAAPQHSFSPKSSPKVEANSKKSPPAAGCQKGTNGT  
 AALDKSKTSLREFRPAVQSAVTATATTSVTTAAGAGAGAGTGTGTALAKD  
 ADILDLSANPGRSNNDAKLAPNSPPAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNS  
 TSNSLEAALNKIKQNI SANSNGGPSTTSGSNSNGTTNGDDLQNLHMLSES  
 ATAREKISIKAASSGNGSGSTSSSSAKPKNANALVRPQNASVRSIPNPSA  
 LAFRNQPAAASTAASISKPLTVRAEEKPKVSTSNPGSLSPTNTSSSSSSSS  
 SSGSSGCSAATSPRAMTKKPTTIDQVAANLNIRAEAKAAALAEAPVLS  
 SNAAKSPELAKTTTAVALRPEPKETPITVSAASTLLTIPSAVSSVSAVPE  
 TMAKPPVQIANAPVASSA

### 7.2. Psc-FL (Flybase)

MMTPESKAIQPAAATTKQTAEATATTTMAHTQQKSQQLSTLAKTTTTTTATN  
 KAAKSVVSNANSSGNNSSKLLALSQSQKTTTTTTTPPTTTTTTTTAAAAEA  
 TTNADKMOKQQQLKQQLFAACSIKVKSENTLATTANAALAAATTTTTTTAT  
 PALATGKAAKTILENGIKKESTPPAVESVEASSSSSSSSSSSSSSSSSSSWP  
 TTRRATSEDASSNGGASADEEKSEEDPTAAVAASSTATTTSDLATTSRPR

PVLLTAVNPHI ICHLCQGYLINATTIVECLHSFCHSCLINHLRKERFCPR  
 CEMVINNAKPNIKSDTTLQAIIVYKLVPGLYERELMRKRAFYKDRPEEAAL  
 ATPEQRGDDTEHLIFSPSDDMSLSLEYAELGELKTDSEPELVDTLRPRYL  
 QCPAMCRVSHLKKFVYDKFEIDAQRFSIDIMYKVKTIIVLLDYITLMDIAY  
 IYTWKRDAPMRFYRKYVYESPQPLVKPAPRRVLPKLEKQERENQEQQQLAV  
 EVASSKVEPVSLPEDQKAEASIKVEEQESTREIVKEVIKDVAATPPTETL  
 KLVINRNMLDKREKSHSPQMSSKSSSKSSPCTPVSSPSEPNIKKIDLSK  
 QNSVTIIDMSDPERREIVKPLKPEKESRSKKKDKDGSPKSSSSSSSSSSSG  
 ERKRKSPSPLTVPPLTIRTERIMSPSGVSTLSPRVTSGAFSEDPKSEFLK  
 SFALKPIKVKVESPERTLNRAITPPSPSVQQSASPKSKGNNLDDSILMK  
 PPSCMPPKSIASSKRKSKEPVKAVSKKQKLS PPLPTVDFKIRLPVTNGNS  
 SGTASPKIEKPLMPPPAKPPMLAPRKLOPSAQFAPPPSPIHHHAGVQMSA  
 PGNRTPIAKRYQPILPKASRPNPFANIPNDVNRLKLDAGTEIKSIGGGSV  
 ENNSNAAQKPHLYGPKGESKMGPPALPATTPSQGNKNVGKQAGNLPMSAP  
 PNKGNSNNYLNALFNSSKCKGKEAPPGCRTPMYTPNSPIYSPSSPQYV  
 PSYNIPTMPTYKYTPKPTPNSGSGNGGSGSYLQNMMLGGGNGGSLGGLFPS  
 PPTKSDQNTNPAQGGGGSSSATQSGGNNGIVNNNIYMPNEDAPEKQQVKV  
 KSLNNSCNINIPSSLSITISRDNQDSSSPNNGQHPKHKSPVNNYIEIVKL  
 PDQPQDQVQAAKEAQKRQSPPAAVPGHLAAKLPPPPPSKAI PSPQHLVSR  
 MTPPQLPKVATPPPPSSPRVITPPKTSPPANAAKVTPLKPVLTPTQVDKK  
 TPSPEKRATAQMGSHTPTASENKSPKGGPAGVANSTGGAQNGDPAAKKFR  
 PILPRQNGMPELAPKLPTLAPFVGFNPLQNPAAAGKKVPPSKKSPNAGAAA  
 HQSGQQKLVNGGQSQPAQQKTSPPAQKNQQQVKKVSKNPTPPPPSLPAVG  
 KMMPHPVMHSQNAPLSIASSASAAAVASGQLDLSNFLKENLRRVHAAQAA  
 QAAQVAAAANQSNMMYNLAQMGMTPAMYNYQQAYFREQLSRMQRVGNEV  
 FNDYLQKCLKTAAATGGGGPVEGELKPMLPTVTLPSPGATPPAASPKTSPL  
 PAGKLTAAATAPQTKGNSSSGAANARQQTAAATGNNGATVPAASLPPATKS  
 K

### 7.3. Bmi1-FL (Genatlas)

MHRTRIKITELNPHLMCVLCGGYFIDATTIECLHSFCKTCIVRYLETS  
 KYCPICDVQVHKTRPLLNIRSDKTLQDIVYKLVPGLFKNEMKRRRDFYAA  
 HPSADAANGSNEDRGEVADEEKRIITDDEIISLSIEFFDQSRLLDRKVNKE  
 KPKEEVNDKRYLRCPAAMTVMHLRKFLRSKMDIPNTFQIDVMYEEEPLKD  
 YITLMDIAYIYTWRRNGPLPLKYRVRPTCKRMKMSHQRDGLTNAGELES  
 SGSDKANS PAVGVPSTSSCLPSPSTPVQSPHPQFPHISSSTMNGTSNSPSA  
 NHQSSFASRPRKSSSLNGSSATSSG

## 8. Su(z)2- und Psc-Kernlokalisierungssignal

### 8.1. Su(z)2-Kernlokalisierungssignal

The NucPred score for your sequence is 0.99 (see [score help](#) below)

```

 1  MHLQNTHTMTESNAAMDAASPASRDVRQFHDLIICRLCRGYMIDPTTVDY      50
51  CYHTYCRSCILKHLRLAVYCPECKASGGKEINELNLKSDDTLRS LIYKLV      100
101 PGLYQRECKELADFKEQHDLVDEQTTDEPEFFTTTELISLSLEYHPAMLH      150
151 QCGPGEVPPPTIYLQCAAGLPVELLKRFLCSKYNIETDNLVEVEVYKDE      200
201 VLPNTFTLMDVAYCYNWSRESPMAFCYRILLYDNEQTKNDENNLSRINQD      250
251 IEPESHVRRS KSAKSVTFAEDLESEIDSGSPRSKVRCKTPPKVSPSSKNK      300
301 RLTSSKREAEPESPVSNFKSLRSNDMRYSDYAVSKVKSEPEQEQLPRE      350
351 REQQPLEANTNIVVSIPPSQLRKS YVDAEDFELKTANRKG VGHLPK LKIE      400
401 LNSMKS KLSMPLSAGPRLEDTSCSLSCSAQQLDLETYAKNIGLKPIEQPL      450
451 QQSASNPDSKYS PNASPMSSCSSSTNGSSSLGTADASTSTSTSSSHRKR      500
501 KKKHSKEPKDANGKRKLLHAEISSQTDGKMKVKITAKPNHKLDFKRSHSL      550
551 ASGELDLQK LKLDSTSTSEALNRTLGEARSINSLVVGGAAPT PPTPTAE      600
601 PEQQQQQQQQQQQQPQQQQQQQQQQQQQQFVVL PKIKDLTLPTSPPLPPS      650
651 LFKAYTPSTTPTAPHTVAGGKPKQQQQQMPQQPQAVLQQSLAKTNP AKPP      700
701 LSSNNNRKPN SGHFVAVPQAPTHRNM YHMQR YQSTPSSIASAANKMPKRSM      750
751 SLDESHPAKQARLSQAQAMASSYAAKLHMQTSNQAQSQA AAF LPNPQMRS      800
801 YGLPDLGSKPTLPMLCPASSSSQVTITPRPRATPSIYSFSEPNIHVPALE      850
851 IVRLPVNKQSAGGKGLTMPPLSPPATSSARLMGPPAALPKHAGHG HGAAK      900
901 RSCQMPMPMPLPLPLPMPMTTIPAI VKSPPLSVALSGQRNNKGNSSNSN      950
951 AYRTSPPALINLRNTAAPQHSFPSKSSPKVEANSKKSPPAAGCQGKTNGT      1000
1001 AALDKSKTSLREFRPAVQSAVTATATTSVTTAAGAGAGAGTGTGTALAKD      1050
1051 ADILDL SANPGRSNNDAKLAPNSPPAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNS      1100
1101 TSNSLEAALNKIKQNISANSNGGPSTTSGSNSNGTTNGDDLQNLHMLSES      1150
1151 ATAREKISIKAASSGNGSGSTSSSSAKPKNANALVRPQNASVRSIPNPSA      1200
1201 LAFRNQPAAASTAASISKPLTVRAEEKPKVSTSNPGSLSPTNTSSSSSSS      1250
1251 SSGSSGCSAATSPRAMTKKPTTIDQVAANLNIRAEAKAAALAE EAPPVLS      1300
1301 SNAAKSPELAKTTTAVALRPEPKETPI TVSAASTLLTIPSAVSSV SAVPE      1350
1351 TMAKPPVQIANAPVASSA      1368

```

Positively and negatively influencing subsequences are coloured according to the following scale:

(non-nuclear) negative ||||| positive (nuclear)

Abbildung 5.5. Kernlokalierungssequenz von Su(z)2 mit Farbkodierung für putative NLS Sequenzen mit Bereichen positiver Ladung. Vorhersage durch NucPred ([www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/](http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/)).



## 8.2. Psc-Kernlokalisierungssignal

The NucPred score for your sequence is 0.99 (see [score help](#) below)

```

1  MMTPEKSKAIQPAAAATTKQTAEATATTTMAHTQQKSQSLSTLAKTTTTTATN      50
51  KAAKSVVSNANSSGNNSSKLLALSQSQKTTTTTTTTPTTTTTTAAAAAEA      100
101 TTNADKMQKQQQLKQQLFAACSIKVKSENTLATTANAALAAATTTTTTAT      150
151 PALATGKAAKTILENGIKKESTPPAVESVEASSSSSSSSSSSSSSSSSSSWP      200
201 TTRRATSEDASSNGGASADEEKSEEDPTAAVAASSTATTTSDLATTSRPR      250
251 PVLLTAVNPHIICHLCQGYLINATTIVECLHSFCHSCLINHLRKERFCPR      300
301 CEMVINNAKPNIKSDTTLQAIIVYKLVPGLYERELMRKRAFYKDRPEEAAL      350
351 ATPEQRGDDTEHLIFSPSDDMSLSLEYAELGELKTDSEPELVDTLRPRYL      400
401 QC PAMCRVSHLKKFVYDKFEIDAQRFSIDIMYKVKTI VLLDYITLMDIAY      450
451 IYTWKRDA PMRFYR VYESPQPLVKPAPRRVLPLKLEKQERENQEQQQLAV      500
501 EVASSKVEPVSLPEDQKAEASIKVEEQESTREIVKEVIKDVAATPPTETL      550
551 KLVINRNMLDKREKSHSPQMSKSSKSSPCTPVSSPSEPNIKLKIDLSK      600
601 KNSVTIIDMSDPERREIVKPLKPEKESRSKKKDKDGSPKSSSSSSSSSSSG      650
651 ERKRKSPSPLTVPPLTIRTERIMSPSGVSTLSPRVTSGAFSEDPKSEFLK      700
701 SFALKPIKVKVESPERTLNNRAITPPSPSVQQSASPKSKGNNLDDSI LMK      750
751 PPSCMPFKSIASSKRKSKPEVKAVSKKQKLS PPLPTVDFKIRLPVTNGNS      800
801 SGTASPKIEKPLMPPPAPKPPMLAPRKLQPSAQFAPPPSPIHHHAGVQMSA      850
851 PGNRTPIAKRYQPILPKASRPNPFANI PNDVNRL LK DAGTEIKSIGGGSV      900
901 ENNSNAAQKPHLYGPKGESKMGPPALPATTSPSQGNKNVGKQAGNLPMSAP      950
951 PNKGNSSNNYLNLALFNSSKCKGKEAPPGCRTPMYTPNSPIYSPSSPQYV      1000
1001 PSYNIPTMPTYKYTPKPTPNSGSGNGGSGSYLQNNMLGGNGGSLGGLFPS      1050
1051 PPTKSDQNTNPAQGGGGSSSATQSGGNGGIVNNNIYMPNEDAPEKQQVKV      1100
1101 KSL LN SCNINIPSSLSITISRDN G DSSSPNNGQHPKHKS FVN NYIEIVKL      1150
1151 PDQPQDQVQA AKEAQRQSP PAAVPGHLAAKL P P P P S K A I P S P Q H L V S R      1200
1201 MTPPQLPKVAT P P P P S S P R V I T P P K T S P P A N A A K V T P L K P V L T P T Q V D K K      1250
1251 T P S P E K R T A A Q M G S H S P T A S E N K S P K G G P A G V A N S T G G A Q N G D P A A K K F R      1300
1301 P I L P R Q N G M P E L A P K L P T L A P F V G F N P L Q N P A A G K K V P P S K K S P N A G A A A      1350
1351 H Q S G Q Q K L V N G G Q S Q P A Q Q K T S P P A Q K N Q Q Q V K V S K N P T P P P P S L P A V G      1400
1401 K M M P H P V M H S Q N A P L S I A S S A S A A A V A S G Q L D L S N F L K E N L R R V H A A Q A A      1450
1451 Q A A Q V A A A A N Q S N M M Y N L A Q M G H M T P A M Y N Y Q Q A Y F R E Q L S R M Q R V G N E V      1500
1501 F N D Y L Q K L K T A A A T G G G G P V E G E L K P M L P T V T L P S P G A T P P A A S P K T S P L      1550
1551 P A G K L T A A A T A P Q T K G N S S G A A N A R Q Q T A A T G N N G A T V P A A S L P P A T K S      1600
1601 K                                                                 1601

```

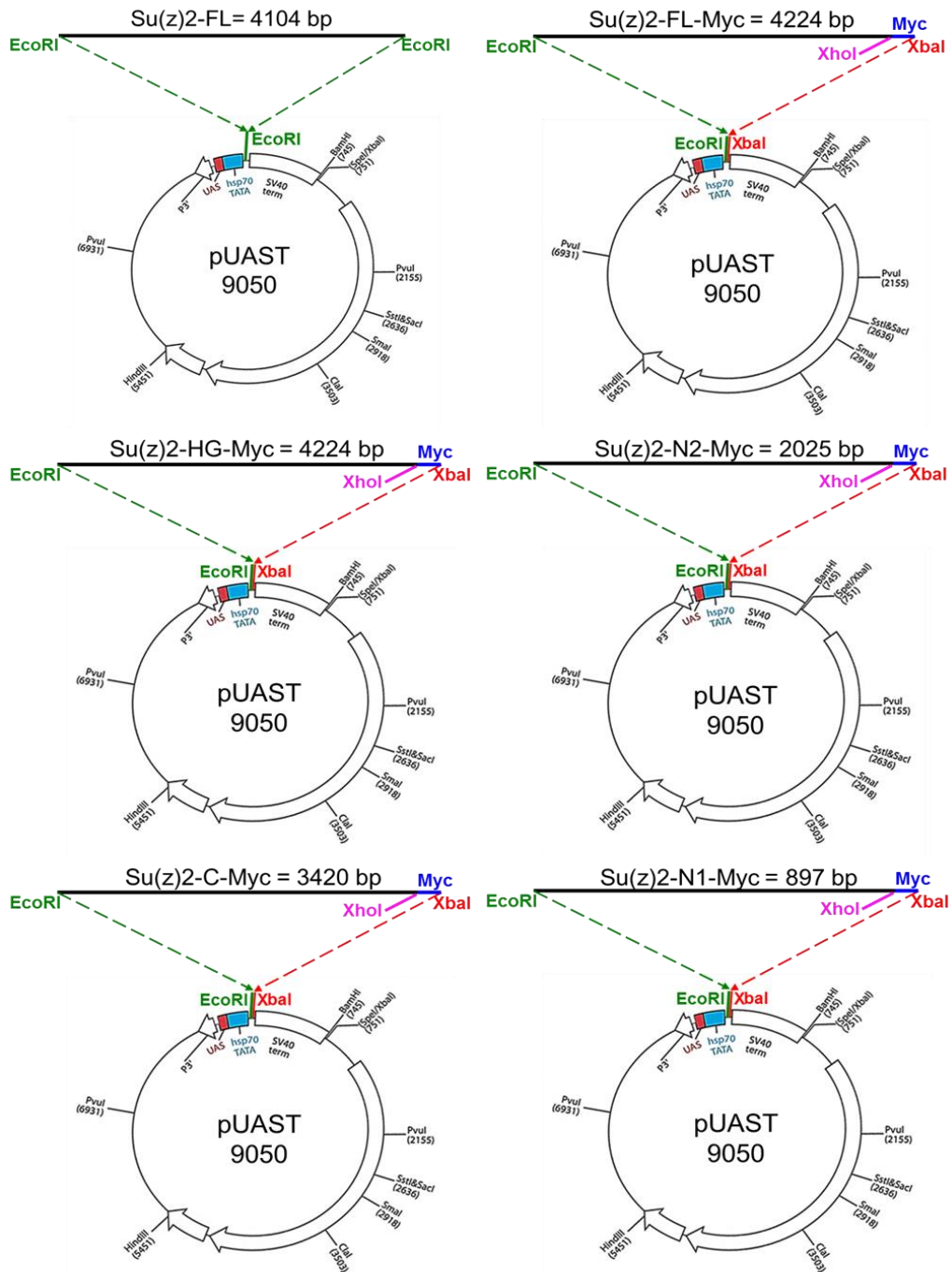
Positively and negatively influencing subsequences are coloured according to the following scale:

(non-nuclear) negative ||||| positive (nuclear)

Abbildung 5.6. Kernlokalisierungssequenz von Psc mit Farbkodierung für putative NLS Sequenzen mit Bereichen positiver Ladung. Vorhersage durch NucPred ([www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/](http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/)).

## 9. Vektoren

### 9.1. Su(z)2-Vektorkarten



**Abbildung 5.7. Su(z)2 Konstrukte in pUAST.** Su(z)2-Vektoren mit und ohne Wiederholungen Myc-Epitop-Sequenz am Carboxyterminal für die Herstellung transgener Fliegen.

## 9.2. Psc- Vektorkarten

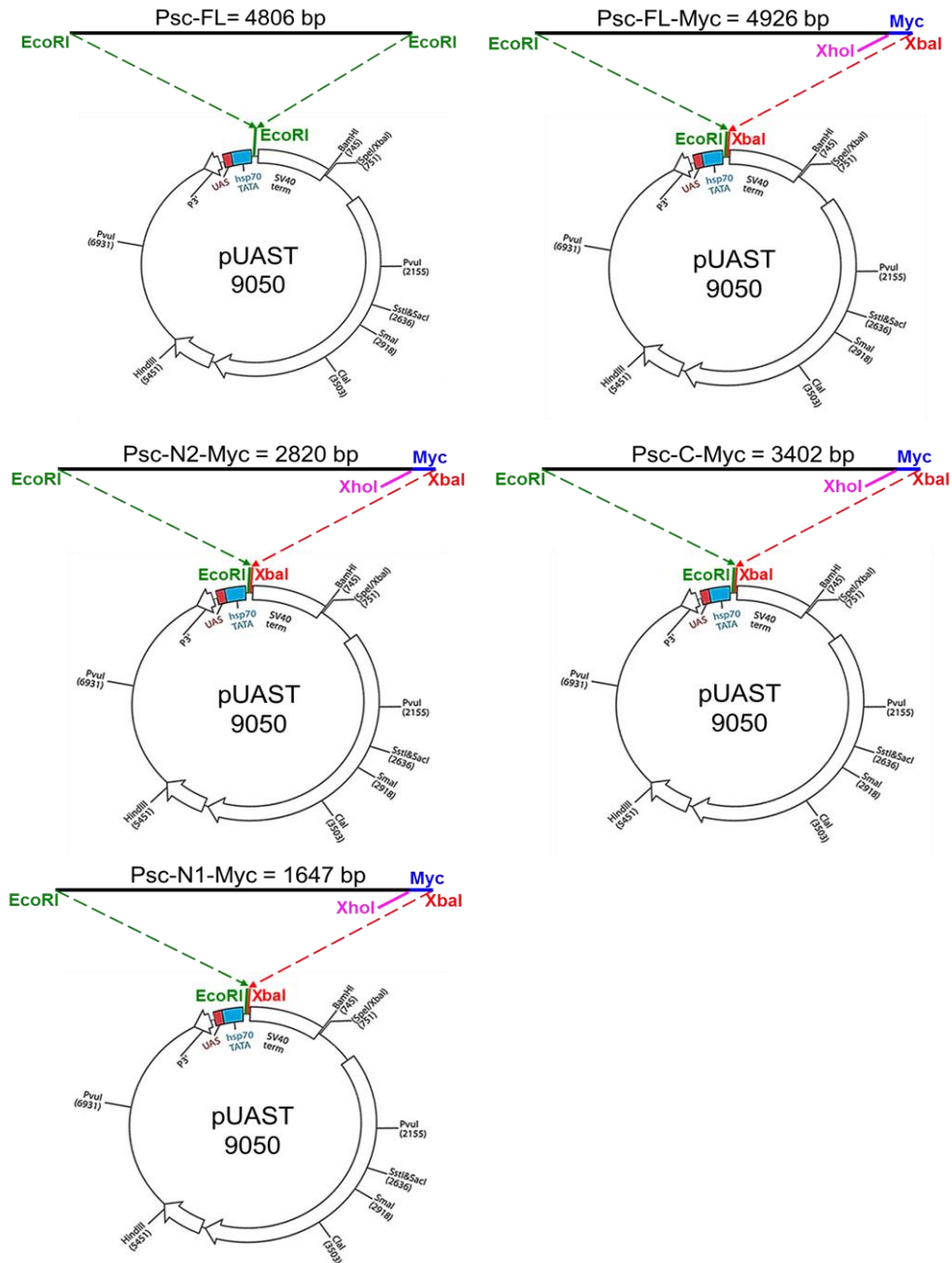


Abbildung 5.8. Psc Konstrukte in pUAST. Psc-Vektoren für die Herstellung transgener Fliegen.



### 9.3. Bmi-1- Vektorkarten

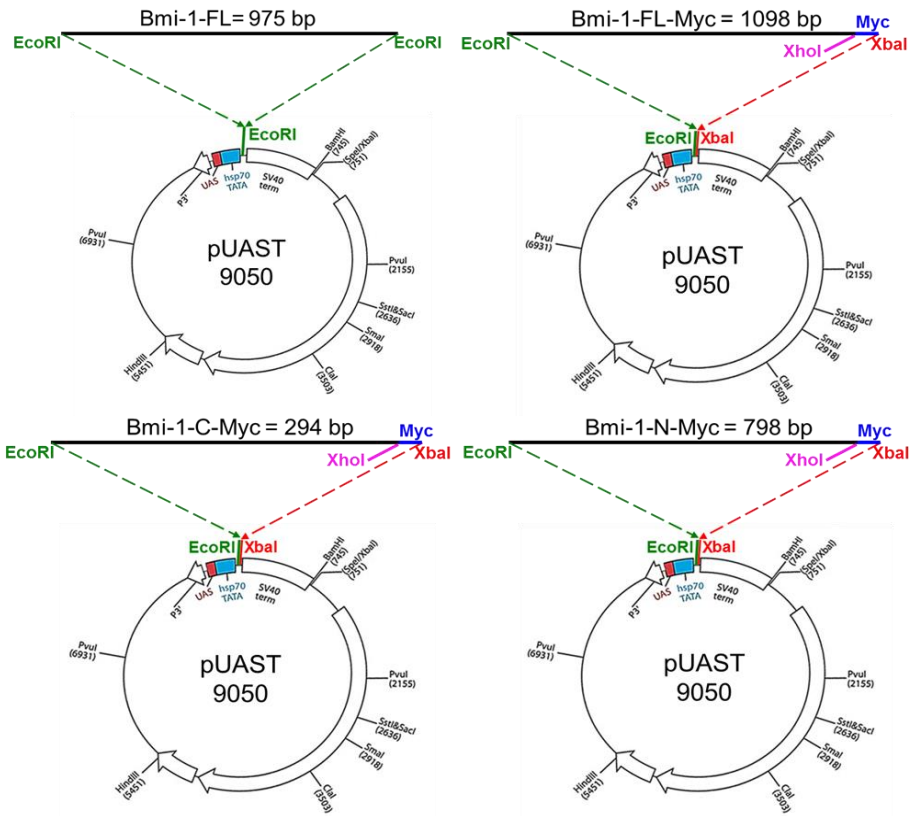


Abbildung 5.9. Bmi-1 Konstrukte in pUAST. Bmi-1-Vektoren für die Herstellung transgener Fliegen.

### 9.4. pGEM-T-Easy-Vektorkarte

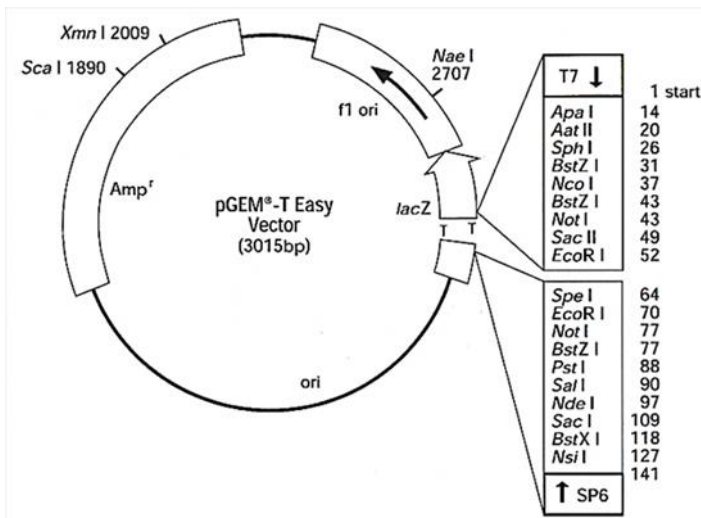


Abbildung 5.10. Schematische Übersichtskarte des pGEM-T-Easy-Vektors (Promega GmbH, Mannheim).

### 9.5. pUAST-Vektorkarte

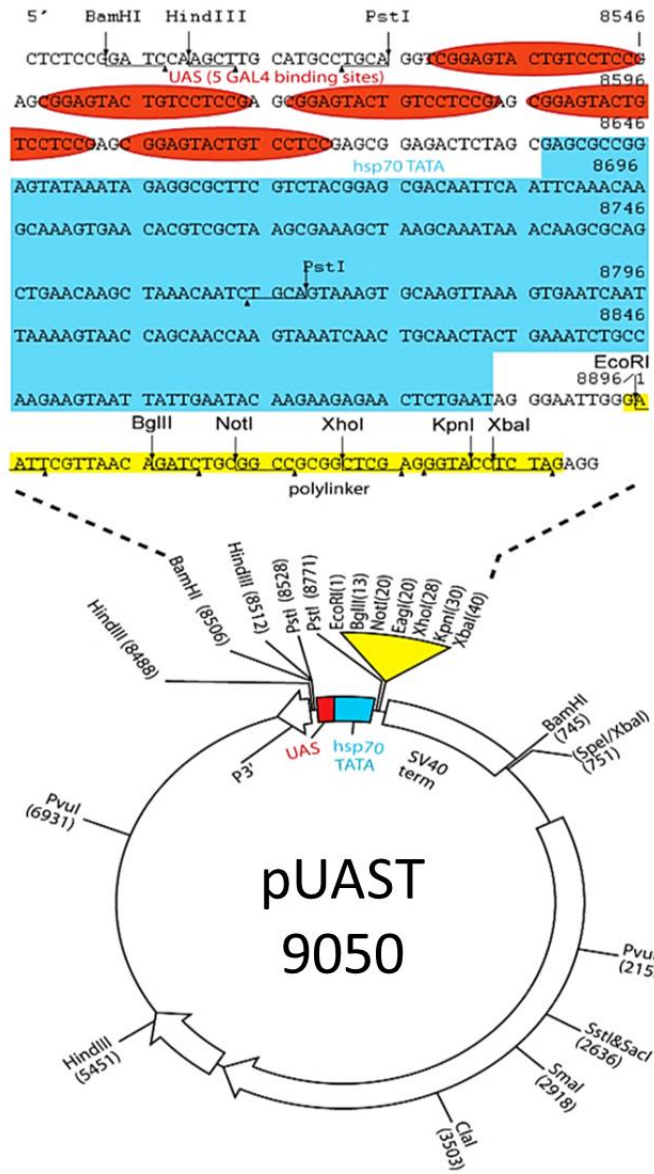


Abbildung 5.11. Schematische Darstellung des pUAST-Vektors (Brand und Perrimon, 1993).

## 10. Abkürzungsverzeichnis

acv	anterior cross vein
AP	Alkalische Phosphatase
ASXL1	Additional sex combs like 1
HA	Hämmagglutinin
L1–L5	longitudinal veins
NBT	Nitroblau-Tetrazoiumchlorid
NGS	Normal goat serum/ und Next generation Sequencing
PBS	Phosphate buffered saline
PBT	PBS + Tween20
pcv	posterior cross vein
SAM	domains Sterile alpha motif
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sfmbt	Scm-related gene containing four mbt domains
TBS	Tris buffered saline
UAS	Upstream Activating Sequence
Zn-finger	Zinc- finger