

Analysen zur Transkriptionsregulation und
zum *trans*-Spleißen am *mod(mdg4)*-Locus von
Drosophila melanogaster

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Michael Volkmar

geb. am: 21. Juni 1976 in: Bad Langensalza

Gutachter

1. Dr. Rainer Dorn
2. Prof. Dr. Harald Saumweber
3. Prof. Dr. Klaus Humbeck

Verteidigung: Halle (Saale), den 11. August 2010

Das Unverständnis der Menschen
war für die Natur noch nie ein Anlaß,
an ihren Methoden etwas zu ändern.

Matt Ridley
(übersetzt von Sebastian Vogel)

Abkürzungs- und Fremdwortverzeichnis

AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
cDNA	<i>copy</i> -DNA, einzel- oder doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
Ct	<i>threshold cycle</i> , PCR-Zyklus, bei dem eine gewählte Fluoreszenzintensität (SYBR Green in Real-time qRT-PCRs dieser Arbeit) überschritten wird
DAPI	4,6-Diaminino-2-phenylindol
<i>Df</i>	Defizienz
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
E(var)	<i>enhancer of variegation</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FRT	<i>Flip recombinase</i> („ <i>Flippase</i> “) <i>recombination target</i>
g	Äquivalent einer Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m s}^{-2}$)
kb	Kilobase(n) (1.000 Basenpaare)
kD	Kilodalton
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molekulargewicht (M_{app} : apparentes Molekulargewicht)
Mb	Megabase ($1,0 \times 10^6$ bp)
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
<i>nested</i> PCR	„verschachtelte“ PCR, bei der das Amplifikat einer vorangegangenen PCR als <i>template</i> dient, mit Primern, deren Bindestelle im Originalamplifikat liegt
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
rpm	<i>rotations/revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	reverse Transkription; Raumtemperatur
<i>second site</i>	Mutation außerhalb des untersuchten Bereichs bzw. ungleich der untersuchten Mutation
Su(var)	<i>suppressor of variegation</i>
Su(Hw)	<i>suppressor of hairy wing</i>
Target-ID	entspricht Teilsequenz einer mRNA, 100 bis 400bp, setzt sich zusammen aus einer Gruppe von ≈ 25 bp-Oligonukleotiden, immobilisiert auf Affymetrix-Microarrays, deren Hybridisierungssignale zusammengefaßt werden
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität

Bemerkungen zur Rechtschreibung und Grammatik in dieser Arbeit:

Generell wurde die „alte“ deutsche Rechtschreibung (dt. Orthographiekonferenz, 1901) verwendet. In Genetik, Molekularbiologie und verwandten Gebieten etablierte englische Fachbegriffe (z.B. *upstream*: in Transkriptionsrichtung vor ... bzw. auf dem codierenden DNA-Strang 5' von ... gelegen) wurden nicht ins Deutsche übertragen; sie sind kursiv gesetzt und wurden teilweise, zu Gunsten besseren Sprachverständnisses, gebeugt.

Zur besseren Handhabung von Sequenzen wurde eine locusinterne Skalierung festgelegt. Zur Umrechnung zwischen dieser und der annotierten *Drosophila melanogaster*-Genomsequenz sei angemerkt, daß Position 1 auf der *mod(mdg4)*-Skala der *D. melanogaster*-Genomposition 3R:17.205.907 (Release 5, entspricht. Position 10.001 korrespondiert zu 3R:17.195.907, Position 20.001 3R:17185.907 und Position 30.001 entspricht 3R:17.175.907. ‚Proximal‘ bedeutet in Richtung der gemeinsamen Exons 1-4, und ‚distal‘ weist in Richtung des 3’Endes des Gens. ‚upstream‘ und ‚downstream‘ beziehen sich auf eine – in Transkriptionsrichtung vor (5’) bzw. hinter (3’) einer bezeichneten Position gelegene – Stelle auf dem codierenden DNA-Strang.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gegenstand der Arbeit	7
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Genetische Methoden.....	10
2.1.1 Anzucht und Haltung der Fliegen.....	10
2.1.2 Keimbahntransformation.....	10
2.1.3 Verwendete Mutationen in und außerhalb von <i>mod(mdg4)</i>	10
2.1.4 <i>P</i> -Element-Mobilisierung und -Reversion	13
2.1.5 Erzeugung chromosomaler Umbauten und einer Defizienz mittels der DrosDel- <i>P{RS}</i> -Elemente.....	14
2.1.6 Knock out der Isoform <i>mod(mdg4)</i> -64.2 – „Ends-in gene targeting“	17
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	19
2.2.1 DNA-Isolation aus Fliegen.....	20
2.2.2 Inverse PCR.....	20
2.2.3 Southern Blot	21
2.2.4 Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme	22
2.2.5 Real-time quantitative RT-PCR.....	22
2.3 Statistische Ergebnisbewertung bei genetischen Experimenten.....	25
2.3.1 Test binominal verteilter Gesamtheiten	25
2.3.2 Fisher-Irwin-Test	25
3. Ergebnisse	27
3.1 Generierung und Analyse isoformspezifischer <i>mod(mdg4)</i> -Mutanten	27
3.1.1 Mobilisierung der <i>P</i> -Elemente <i>P{RS5}-5-HA-1224</i> und <i>P{KG}08515</i>	27
3.1.2 Molekularbiologische Analysen der Revertanten.....	29
3.1.2.1 Bestimmung der Deletionsbruchpunkte	29
3.1.2.2 Expressionstests & Promotorenidentifizierung.....	32
3.1.3 Genetische Analysen der Revertanten.....	41
3.1.3.1 Rezessive Letalität.....	42
3.1.3.2 Koordinationsphänotyp	44
3.1.3.3 Weibliche Sterilität.....	45
3.1.3.4 <i>stuck-like</i> -Phänotyp	47
3.1.3.5 Homöotische Transformation	49
3.1.3.6 Suppression des <i>Bar-Stone</i> -Phänotyps von <i>YB^S</i>	50
3.1.3.7 <i>Enhancer</i> der Positionseffektvariegation (PEV).....	52
3.1.4 Phänotypen und immuncytologische Untersuchung der Revertante Rev31	54
3.1.4.1 Mißbildung der posterioren Flügelquerader und ektopische Scutellarborsten.	54
3.1.4.2 Komplementation von Mutationen des gemeinsamen <i>mod(mdg4)</i> -Teils durch Revertante Rev31.....	56
3.1.4.3 Immuncytologische Untersuchungen an Polyänchromosomen der Revertante Rev31	57
3.1.5 Funktionelle Analyse der Isoform <i>mod(mdg4)</i> -64.2.....	59

3.1.5.1	Nachweis der Mod(<i>mdg4</i>)-64.2-Assoziation an <i>HeT-A</i> , ChIP- <i>on-membrane</i> ..	59
3.1.5.2	Deletion des spezifischen Exons/ <i>Knock out</i> der Isoform <i>mod(mdg4)</i> -64.2	61
3.1.5.3	Microarray-Analyse der Δ 64.2-Mutation Δ 13 85c V I und weiterer ausgewählter <i>mod(mdg4)</i> -Mutationen.....	66
3.1.5.3.1	Analyse der Microarray-Expressionsdaten von GG295 und Rev31	72
3.2	Analyse des <i>trans</i> -Spleißens am Beispiel <i>mod(mdg4)</i>	75
3.2.1	Verlust der Fähigkeit zum <i>trans</i> -Spleißern in Revertante Rev31	75
3.2.2	Konservierung des <i>mod(mdg4)</i> -Locus zwischen <i>Drosophila melanogaster</i> und <i>D. virilis</i>	79
3.2.2.1	Nachweis chimärer <i>D. virilis/D. melanogaster-mod(mdg4)</i> -mRNAs.....	79
3.2.2.2	Genetische Analysen zum nachweis von mRNA- <i>trans</i> -Spleißern am <i>mod(mdg4)</i> -Locus mit <i>D. virilis</i> - und <i>D. melanogaster</i> -Transgenen	85
3.2.3	Molekularbiologische Analyse des <i>trans</i> -Spleißens an <i>D. virilis mod(mdg4)</i> -h64.2	88
3.2.3.1	Genomische Transgene von <i>D. virilis mod(mdg4)</i> -h64.2-Mutationen.....	88
3.2.4	Etablierung eines Systems zur <i>in vivo</i> -Analyse des <i>trans</i> -Spleißprozesses	93
3.2.4.1	EGFP- <i>trans</i> -Spleißern	93
3.2.5	Teilung von <i>mod(mdg4)</i> durch induzierte chromosomale Umbauten und funktionelle Analyse des geteilten Locus	97
3.2.5.1	Etablierung, Verifizierung und molekularbiologische Analyse der chromosomalen Rearrangements.....	97
3.2.5.2	Funktionelle Untersuchung der Isoform <i>mod(mdg4)</i> -56.3 in den chromosomalen Rearrangements	101
3.2.5.3	<i>T(2;3)26A,mod(mdg4)</i> als Testsystem für Effektoren des <i>trans</i> -Spleißens	105
4.	Diskussion.....	107
5.	Zusammenfassung	127
6.	Literaturliste	129
Anhang 1	141
Anhang 2	145

1. Einleitung

Bei höheren Organismen besteht eine Diskrepanz zwischen Anzahl der Gene und der Größe ihres Proteoms. Beim Menschen zum Beispiel sind, nach anfänglichen Schätzungen von 100.000, heute etwa 21.000 Gene annotiert (Imanishi *et al.*, 2004). Demgegenüber stehen ca. eine Million Proteine (ebd.), die von diesen Genen produziert werden. Es bedarf also Mechanismen, die es ermöglichen, aus einer relativ kleinen Anzahl von Genen eine sehr viel größere Anzahl Proteine zu erhalten. Diese Mechanismen und ihre weit verbreitete Anwendung sind es, die die Komplexität des menschlichen Organismus aus nur 21.000 Genen ermöglichen, und die z.B. *Caenorhabditis elegans* mit 18.000 Genen und *Drosophila melanogaster* mit 14.600 Genen nicht erreichen. Aber wie werden aus wenigen Genen viele Proteine? Die genetische Information durchläuft auf ihrem Weg von der DNA-Sequenz zur dreidimensional gefalteten, eventuell posttranslational modifizierten Aminosäuresequenz mehrere Ebenen, auf denen – fein reguliert – Komplexität „erzeugt“ wird. Die Rekombination auf DNA-Ebene z.B. bei B-Lymphocyten generiert zwar pro Zelle/Klon nur eine Genversion, doch trägt jeder Klon, der eine Antikörpervariante produziert, zur Komplexität und damit zur Wirksamkeit des Immunsystems bei. Bei der Transkription sind es die Nutzung alternativer Promotoren und Transkriptionsstoppsignale, die es ermöglichen, aus einem Gen verschiedene prä-mRNAs zu transkribieren. Die vielfältigen Möglichkeiten des alternativen Spleißens ermöglichen verschiedene Exonkombinationen und die Aufnahme von Intronsequenz in die reife mRNA (*exon extension*, *intron retention*). Das RNA *editing* verändert sogar die genetische Information der mRNA. Aus einer mRNA können während der Translation durch Nutzung von IRES(*internal ribosome entry site*)-Sequenzen und sogenannter nicht-kanonischer Start- und Stopcodons mehrere Proteine entstehen. Phänomene wie das *programmed frame-shifting* und *bypassing* (Chandler und Fayet, 1993; Pel *et al.*, 1992; Ivanov *et al.*, 1998; Maldonado und Herr, 1998) können während der Translation andere Proteine entstehen lassen, als sie im genetischen Code der mRNA festgelegt sind. tRNAs, deren Anticodon komplementär zu einem Stopcodon in der mRNA ist, können das entstehende Protein C-terminal verlängern.

Unter all diesen Mechanismen trägt das alternative (RNA)-Spleißen am meisten zur Proteinviefalt bei. Während bei einzelligen Eukaryonten die Anzahl der Gene, die mehr als ein Intron besitzen – eine Voraussetzung für das alternative Spleißen –, stark schwankt (nur sechs *Saccharomyces cerevisiae*-Gene besitzen mehr als ein Intron, wohingegen mehr als

30% der Gene von *Schizosaccharomyces pombe* mehrere Introns enthalten), wurde bei diesen Organismen bisher kein alternatives Spleißen beobachtet (Ast, 2004; Wood *et al.*, 2002). Bislang konnte alternatives Spleißen ausschließlich in mehrzelligen Eukaryonten nachgewiesen werden. So werden bei *Drosophila melanogaster* 50% der Gene alternativ gespleißt und 92 – 94% aller menschlichen Gene weisen in ihren mRNAs mehr als eine Exon-Kombination auf (Wang *et al.*, 2008).

Das *trans*-Spleißen ist ein Sonderfall des Spleißens: Mindestens zwei unabhängige prä-RNAs werden zu einer reifen RNA zusammengefügt. Aus allen Reichen sind Genprodukte belegt, bei denen Exons aus verschiedenen prä-(m)RNAs kombiniert werden: tRNAs aus Archaea (Randau *et al.*, 2005), die *nad5*-Gene in den Mitochondrien von *Oenothera* und *Arabidopsis*, (Knoop *et al.*, 1991), die *spliced leader*-Sequenzen und der RNAi-Regulator ERI-6/7 aus *C. elegans* (Blumenthal, 1998; Liang *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2008), ein Skorpion-Giftpeptid (Zeng *et al.*, 2006), Carnitinoctanoyltransferase (Caudevilla *et al.*, 2001), Östrogenrezeptor α (Flouriot *et al.*, 2002) und *ACAT1* aus dem Menschen (Li *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004) sind einige Beispiele für Gene, deren Produkte via *trans*-Spleißen entstehen.

Konkurrieren mehrere *trans*-Spleißakzeptoren um einen *trans*-Spleißdonor oder umgekehrt, spricht man von alternativem *trans*-Spleißen. Beim Menschen wurde alternatives, interchromosomales *trans*-Spleißen am Beispiel des Gens *CDC2L2* nachgewiesen (Jehan *et al.*, 2007). Ähnlich den SL-RNAs der Trypanosomen (Blumenthal, 2005), wird bei diesem Gen eine 67 Basen lange, nichtcodierende, von der *male-specific region of the Y chromosome* (MSY)-Region transkribierte RNA zur *CDC2L2*-prä-mRNA (codierender Locus auf Chromosom 1p36) *trans*-gespleißt. Die Yq12 benannte RNA enthält keine proteincodierende Sequenz, sondern bildet die 5'UTR (*untranslated region*) der entstehenden mRNA. Sie enthält ein CCAAT-Motiv, das eine testisspezifische Expression der dieser *CDC2L2*-Isoform ermöglicht.

Die *Drosophila melanogaster*-Gene *modifier of midget4* und *longitudinals lacking* (*lola*, Horiuchi *et al.*, 2003) sind die einzigen bekannten Gene, deren Isoformen durch alternatives *trans*-Spleißen generiert werden, und die dabei codierende Sequenzen miteinander verknüpfen. Am komplexen Genlocus *mod(mdg4)* gelang Dorn *et al.* (2001) der erste Nachweis des *trans*-Spleißens in *Drosophila* und den Arthropoden überhaupt. *mod(mdg4)* und *lola* besitzen auch eine ähnliche Struktur: Im 5'Bereich beider Loci finden sich vier gemeinsame, in jeder gebildeten mRNA enthaltene, Exons gefolgt vom *trans*-Spleißdonor.

Hier werden die isoformspezifischen Exons (*trans*-Spleißakzeptoren) angefügt, die die variablen C-Termini der Mod(mdg4)- bzw. Lola-Proteine codieren.

Der *mod(mdg4)*-Locus codiert auf rund 27kb eine Familie von 31 Chromatinproteinen. Jedes der 31 Proteine besteht aus einem gemeinsamen N-Terminus von 402 Aminosäuren, codiert von Exons 1-4 im 5' Bereich des Gens, und einem isoformspezifischen C-Terminus, der von einem Exon 5 (bzw. 5 und 6) codiert wird. Neun der isoformspezifischen Exons werden vom antiparallelen DNA-Strang transkribiert (Abb. 1.1) – ein erster Hinweis auf die Komplexität des Locus und die Notwendigkeit des *trans*-Spleißens zur Generierung der Isoform-mRNAs. Der gemeinsame N-Terminus enthält im vorderen Teil die circa 100 Aminosäuren große BTB/POZ-Domäne (Broad-complex, Tramtrac, Brick-á-brac / Pox virus and Zinc finger; Bardwell und Treisman, 1994; Dorn *et al.*, 1993b). Diese in Transkriptionsfaktoren häufig vorkommende Domäne vermittelt eine Homo- oder Heterodimerisierung von Proteinen (Ahmad *et al.*, 1998; Read *et al.*, 2000; Mazur *et al.*, 2005), für einige BTB/POZ-Proteine wurde auch eine Homotetramerisierung und Oligomerisierung postuliert (Espinás *et al.*, 1999; Stogios *et al.*, 2005).

Die variablen C-Termini der Mod(mdg4)-Proteine enthalten je nach Isoform 71 bis 208 Aminosäuren. Der variable Teil des Proteins ist auch für die Namensgebung der Isoformen verantwortlich – sie werden nach dem aus der cDNA-Sequenz berechneten Proteinmolekulargewicht benannt. So codiert die Isoform *mod(mdg4)*-64.2 für das Protein Mod(mdg4)-64.2 mit einem abgeleiteten Molekulargewicht von 64,2kD. 28 der 31 Mod(mdg4)-Proteine enthalten in ihrem C-Terminus die nach konservierten Aminosäuren benannte FLYWCH-Domäne, eine ein C₂H₂-Motiv enthaltende Untergruppe der WRKY-Domäne (Babu *et al.*, 2006). Die FLYWCH-Domäne vermittelt wahrscheinlich eine sequenzspezifische Protein-DNA-Interaktion (Beaster-Jones und Okkema, 2004; Babu *et al.*, 2006)¹. Der C-Terminus der Proteinisoform Mod(mdg4)-58.0 enthält eine BEN-Domäne (Abhiman *et al.*, 2008), während die Isoform Mod(mdg4)-65.0 im spezifischen Teil eine BED-Domäne besitzt (Labrador *et al.*, 2003). Im C-Terminus der Isoform Mod(mdg4)-55.1 konnten keine bekannten Domänen nachgewiesen werden.

¹ Die Protein-Protein-Interaktion von Mod(mdg4)-67.2 und Su(Hw) geht nicht, wie in anderen Arbeiten diskutiert, auf die FLYWCH-Domäne sondern auf den C-Terminus zurück. Die Aberration *mod(mdg4)*⁷⁶ produziert ein verkürztes Protein Mod(mdg4)-67.2 mit einer Länge von 567 statt 610 Aminosäuren. Dieses verkürzte Protein enthält die vollständige FLYWCH-Domäne (Positionen 451-512), ist jedoch nicht in der Lage, Su(Hw) zu binden (Gause *et al.*, 2001).

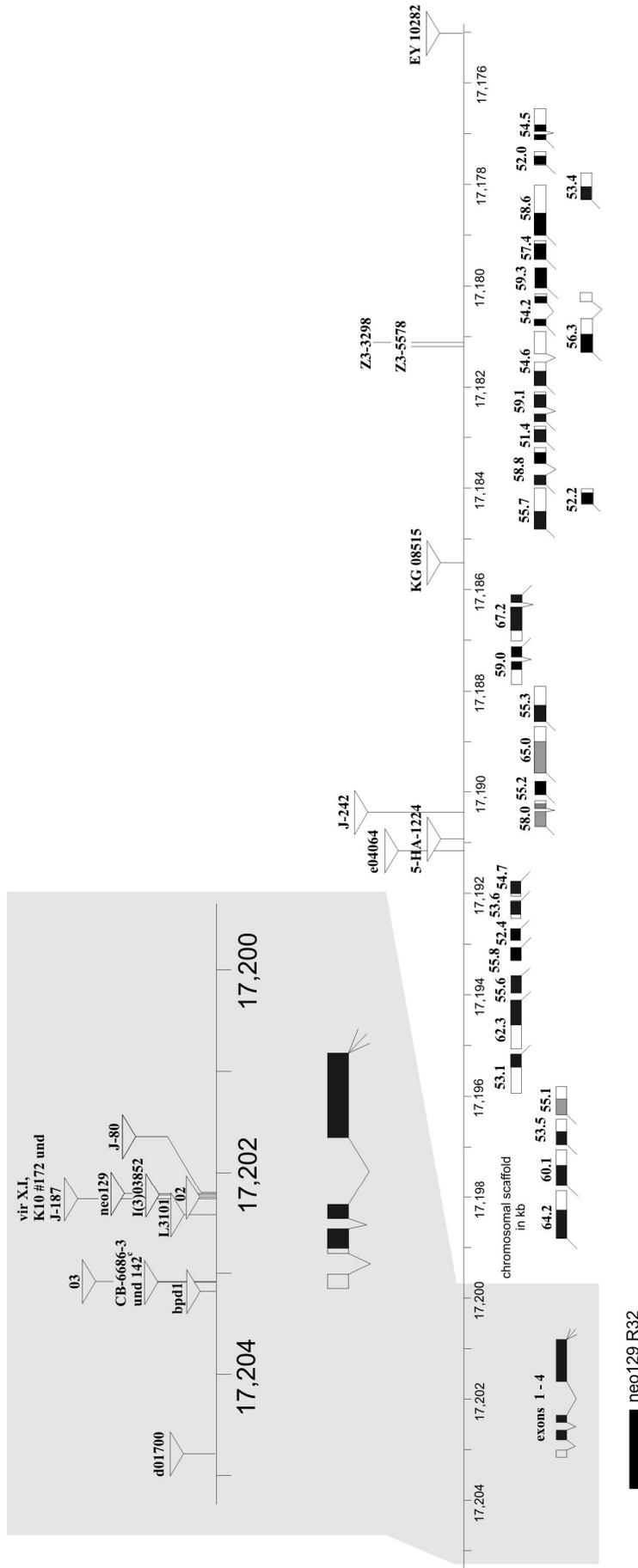


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der genomischen Region des komplexen *mod(mdg4)*-Locus und der bekannten insertionellen Mutationen im Locus. Die gemeinsamen Exons 1-4 sind links im grau unterlegten Bereich unterhalb der Skala dargestellt. *Downstream* davon, im spezifischen Teil des Gens sind 31 isoformspezifische Exons 5 (bzw. 5 und 6) aufgeführt. Sie sind nach dem theoretischen Molekulargewicht der codierten Proteinisoformen in kD bezeichnet. Gefüllte Boxen stehen für codierende Sequenz, leere für 5' - bzw. 3'UTR. Die *trans*-Spleißakzeptoren sind durch Aufstriche gekennzeichnet. Neun isoformspezifische Exons werden vom Gegenstrang codiert, sie sind nach oben versetzt dargestellt und ihre *trans*-Spleißakzeptoren weisen in Bezug auf den Locus Richtung *downstream* (rechts). Die insertionellen Mutationen sind durch Dreiecke dargestellt, die beiden mit Z3 bezeichneten Mutationen sind EMS-induzierte Mutationen im codierenden Bereich des spezifischen Exons der Isoform *mod(mdg4)*-56.3 (Koundakjian *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006). Der schwarze Balken unterhalb der Exons 1-3 markiert die Deletion *mod(mdg4)^{neo129 R32}*. Die Karte ist nach Dorn *et al.* (2001) modifiziert.

Der komplexe *mod(mdg4)*-Locus wurde unabhängig in mehreren Experimenten identifiziert, darunter als *modifier of midget4* (Georgiev und Gerasimaova, 1989) bei der Suche nach *Enhancer*- und *Suppressor*-Mutationen für den y^2 -Phänotyp (Biessmann, 1985 und 1986; Geyer *et al.*, 1986), als *Enhancer* für Positioneffektvariegation (Dorn *et al.*, 1993a), bei der Suche nach Mutanten mit veränderter Synapsenmorphologie (Gorczyca *et al.*, 1999) und als Effektor der *nondisjunction* in der männlichen Meiose I (Thomas *et al.*, 2006).

Viele der bekannten *mod(mdg4)*-Mutationen liegen im Bereich der gemeinsamen Exons. Mutationen des gemeinsamen Teils sind spätestens im Puppenstadium rezessiv letal und weisen damit *mod(mdg4)* als ein essentielles Gen für *Drosophila melanogaster* aus. Die rezessive Letalität geht entweder auf eine einzelne, essentielle Isoform zurück oder sie ist ein additiver Effekt, der sich um so stärker ausprägt, je mehr *mod(mdg4)*-Isoformen nicht mehr gebildet werden können. In unserer Arbeitsgruppe wurde der *mod(mdg4)*-Locus unter der Bezeichnung *E(var)3-93D* als ein starker dominanter *Enhancer* der Positioneffektvariegation (PEV) im w^{m4h} -System identifiziert (Dorn *et al.*, 1993a). Desweiteren zeigen homozygote *Escaper*-Männchen der gleichen Mutation (*E(var)3-93D^{neo129}*, siehe 2.1.3) eine homöotische Transformation des fünften ins vierte Abdominalsegment, die in transheterozygoten Tieren mit einer *Trithorax*-Defizienz und Mutationen anderer Gene der *trx*-Gruppe weiter verstärkt wird. Gleiches gilt für das PEV-*Enhancement* (Dorn *et al.*, 1993b; Gerasimova und Corces, 1998; Büchner *et al.*, 2000). *mod(mdg4)* wird daher der *trx*-Gengruppe zugeordnet. Bei der Untersuchung einer Mutation des *mod(mdg4)*-Exon 1 beobachteten Gorczyca *et al.* (1999) sogenanntes *back-branching*, die fehlerhafte Verzweigung von Motoneuronen und die Innervierung der falschen Muskeln.

Die beschriebenen Phänotypen werden von Mutanten des gemeinsamen Teils des Locus hervorgerufen, die alle gebildeten Isoformen betreffen. Neben diesen Mutationen, die alle die erwähnten pleiotropen Effekte aufweisen, wurden auch Mutationen der spezifischen Exons von *mod(mdg4)* identifiziert. Mit Hilfe dieser Mutanten läßt sich die Funktion der betreffenden *mod(mdg4)*-Isoform analysieren. Zum Beispiel handelt es sich bei der Isoform, die das *yellow*-Allel y^2 (*gypsy*-Retrotransposoninsertion im 5' regulatorischen Bereich des *yellow*-Gens) beeinflusst, um die Isoform *mod(mdg4)*-67.2. Sie ist neben Su(Hw), CP190, dTopors, CP60 und EAST am Aufbau des *gypsy-insulator* beteiligt, einem Chromatinisolator, der *Enhancer*-Wirkung auf die Promotoren von Nachbargenen unterbindet durch Ausbildung von Chromatindomänen und als *chromatin boundary* Eu- von Heterochromatin trennt (Pai *et al.*, 2004; Capelson und Corces, 2005; Georgiev *et al.*, 2008). Eine Funktion der Isoform *mod(mdg4)*-56.3, aufgeklärt durch Untersuchung einer Mutation im spezifischen Exon dieser

Isoform, besteht in der Vermittlung der Paarung homologer Chromosomen in der Prophase I der männlichen Meiose von *Drosophila*, bei der kein synaptonemaler Komplex gebildet wird. Thomas *et al.* (2006) beschreiben die Isoform als essentiell für die korrekte Segregation der homologen Chromosomen. Die Bindestelle von Mod(mdg4)-56.3 an die Chromosomen ist wahrscheinlich das 240bp-Repeat in den intergenischen Bereichen zwischen den ribosomalen Genen (*internal/external transcribed spacer*, ITS/ETS; McKee *et al.*, 1992 und 2000). Eine Mutation der Isoform führt zu *nondisjunction*, der ungleichen Verteilung von Chromosomen auf die Tochterzellen.

Die Aufklärung zweier Funktionen des Genlocus *mod(mdg4)*, die von zwei Isoformen erfüllt werden, wirft die Frage nach Redundanz auf: Kann eine *mod(mdg4)*-Isoform den Ausfall einer anderen komplementieren? Einen Hinweis geben immunocytoologische Untersuchungen der Verteilungsmuster einzelner Mod(mdg4)-Proteine an Polytänychromosomen aus larvalen Speicheldrüsen. Hierbei wurden keine Übereinstimmungen oder Überlappungen gefunden (Gabler, 2003). Es ist also möglich, daß jede Proteinisoform eine separate Funktion hat und die Isoformen untereinander nicht redundant sind (Dorn und Krauss, 2003; Thomas *et al.*, 2006, Georgiev und Gerasimova, 1989). Die Auswirkung auf PEV, die homöotische Transformation und die Sterilität, die bei *E(var)3-93D^{neo129}-Escaper*-Weibchen auftritt, könnten also ihre Ursachen im Ausfall von drei verschiedenen *mod(mdg4)*-Isoformen haben.

Während der immunocytoologischen Untersuchungen an Polytänychromosomen konnte für die Isoform Mod(mdg4)-64.2 eine Assoziation mit den Telomeren nachgewiesen werden, wahrscheinlich mit dem Retrotransposon *HeT-A* (M. Gabler, pers. Mitteilung). In *Drosophila* werden die Telomere nicht mittels Transposase in ihrer Länge erhalten, sondern es transponieren drei verschiedene Retrotransposons, *HeT-A*, *TART* und *TAHRE* an die Chromsomenenden, sodaß dort *head-to-tail*-Wiederholungen vollständiger und partieller Elemente als Telomer vorliegen (Abad *et al.*, 2004a,b, George *et al.*, 2006). Alle Telomere außer 3L wiesen ein deutliches Signal auf. Am Telomer dieses Chromsomenarms befindet sich im Referenzstamm des Genomprojekts kein *HeT-A*-Element (Abad *et al.*, 2004a).

Betrachtet man die Bindungsstellen der Isoformen Mod(mdg4)-64.2, -67.2 und -56.3, so wird als Muster die Assoziation mit – unter anderem – repetitiven Sequenzen im *Drosophila*-Genom ersichtlich.

1.1 Gegenstand der Arbeit

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war nur für eine Isoform eine spezifische Mutation bekannt: $mod(mdg4)^{ul}$ (Georgiev und Gerasimaova, 1989). Vor kurzem konnten von Thomas *et al.* (2006) Mutationen im isoformspezifischen Exon von $mod(mdg4)$ -56.3 (Z-Allele, siehe Abb. 1.1) identifiziert werden. Diese spezifischen Mutationen haben in beiden Fällen die Funktionsaufklärung für die betroffene Isoform erst ermöglicht.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war daher die systematische Isolation von Mutationen im spezifischen Bereich des Locus sowie deren molekularbiologische und funktionelle Charakterisierung. Durch Mobilisierung von *P*-Elementen in dem Teil des Gens, der die isoformspezifischen Exons beherbergt, sollten einander überlappende Deletionen erzeugt werden. Diese Deletionen sollten es ermöglichen, Phänotypen, die anhand von Mutationen des gemeinsamen Teils dem Gen $mod(mdg4)$ zugeordnet wurden, auf den Ausfall bestimmter Isoformen zurückzuführen. Zudem sollte nach Phänotypen gesucht werden, die durch die rezessive Letalität der Mutationen des gemeinsamen Teils eventuell überdeckt werden bzw. sich in den *Escaper*-Tieren nicht manifestieren.

Die Mutationen sollten auch dazu genutzt werden, im spezifischen Teil des Locus vermutete intragenische Promotoren zu identifizieren und die Regulation des Locus aufzuklären. Hierbei sollte die am weitesten *upstream* codierte Isoform $mod(mdg4)$ -64.2, deren isoformspezifisches Exon sich den gemeinsamen $mod(mdg4)$ -Exons in gleicher Orientierung anschließt, mit Hilfe verschiedener Transgene eingehend molekularbiologisch untersucht werden. Neben der Wirkung eines putativen Promotorelements unmittelbar *upstream* des isoformspezifischen Exons sollte der Einfluß eines *exonic splice enhancer* (ESE) auf die Expression der Isoform untersucht werden.

Die Isoform $mod(mdg4)$ -64.2 ist jedoch nicht nur wegen der Position ihres spezifischen Exons sondern vor allem wegen ihres Bindemusters an Polyänchromosomen interessant. Neben zwölf reproduzierbaren Signalen in euchromatischen Bereichen (Wagner, 2007) ist $mod(mdg4)$ -64.2 vor allem mit den Enden der Chromosomen assoziiert. Dies läßt eine Funktion im Zusammenhang mit den Telomeren vermuten, die durch eine gezielte Deletion des isoformspezifischen Exons (*Ends-in gene targeting*; Xie und Golic, 2004), als Nullmutante für die Isoform, untersucht werden sollte. Die angewandte Methode erlaubt es, trotz der Komplexität und Verschachtelung des Locus, $mod(mdg4)$ -64.2 zu deletieren, ohne die Bildung der anderen 30 Isoformen des Locus zu beeinflussen.

Die Generierung der 31 *mod(mdg4)*-Isoformen mittels *trans*-Spleißens ist zwar ausführlich belegt (Dorn *et al.*, 2001; Gabler *et al.*, 2005), auch können *in vitro trans*-Spleiß-Experimente in gewissem Maße den Prozeß nachbilden, doch ein Testsystem zur *in vivo*-Analyse des *trans*-Spleißens sollte wesentlich zum besseren Verständnis z.B. beteiligter Faktoren oder kritischer Parameter wie räumliche Entfernung der Spleißpartner und eventuelle Transportprozesse beitragen. Das System sollte einen einfach detektierbaren und quantifizierbaren Marker (EGFP) generieren. Da *mod(mdg4)* das am intensivsten erforschte Beispiel für *trans*-Spleißen in *D. melanogaster* darstellt, ist seine Sequenz das beste Vorbild für ein rationales Design der *trans*-Spleißpartner, auch wenn bei Verwendung von *mod(mdg4)*-Outronsequenzen¹² eine gewisse Kreuzreaktion mit prä-mRNAs des endogenen Locus zu erwarten ist (Dorn *et al.*, 2001). Die beiden Teile des Markers sollen mittels *trans*-Spleißen zu einer reifen mRNA zusammengefügt werden. Sie sollten, als induzierbare Transgene in großer Zahl und verschiedenen Kombinationen ins *D. melanogaster*-Genom eingebracht, es ermöglichen, Distanzeffekte auf die Effizienz des *trans*-Spleißen messen, denn nach der Transkription müssen die beiden prä-mRNAs des Markergens den räumlichen Abstand zwischen den Transgeninsertionsstellen per Diffusion überwinden, ehe sie mittels Spliceosom zu einer reifen mRNA verknüpft werden. Eine weitere Anwendung des Systems wäre das Einbringen von Spleißfaktormutationen, um ihren Einfluß auf den *trans*-Spleißprozeß zu untersuchen. Dies ließe sich auch ausweiten als systematische, genomweite Suche nach Effektoren des *trans*-Spleißens, z.B. mittels der Defizienzen des DrosDel-Projekts (Ryder *et al.*, 2004 und 2007).

Aus den Ergebnissen dieser Experimente und der Tatsache, daß es Gene gibt, deren Exons an verschiedenen Stellen in Genomen von Archaea und Pflanzen codiert sind (Randau *et al.*, 2005; Knoop *et al.*, 1997), ergibt sich die Frage nach der Notwendigkeit der physischen Integrität von *mod(mdg4)*. Falls alle Isoformen des Gens durch *trans*-Spleißen synthetisiert werden, ist die konservierte Struktur des Locus in verschiedenen *Drosophila*-Arten und *Anopheles gambiae* (Krauss und Dorn, 2004) dann nicht obsolet? Kann der Locus auch im zerteilten Zustand noch funktionieren, d.h. ausreichende Mengen mRNA durch *trans*-Spleißen bilden? Um dies zu untersuchen, sollten mit Hilfe der DrosDel-Elemente (Ryder *et al.*, 2004) definierte chromosomale Rearrangements induziert werden, deren einer Bruchpunkt sich etwa in der Mitte des *mod(mdg4)*-Locus befindet (*P{RS5}5-HA-1224*), und die die beiden Teile des Locus unterschiedlich weit voneinander entfernen. Im Hintergrund

² Outron: keine genetische Information enthaltende Sequenz, die im Gegensatz zum Intron nur einseitig von einer Spleißstelle (Spleißdonor oder -akzeptor) flankiert ist; das jeweils andere Ende wird vom Transkriptionsstart (TSS) oder Transkriptionsstoppsignal definiert.

der etablierten Chromosomenmutationen sollten die molekulare und physiologische Konzentration von *mod(mdg4)*-Isoformen untersucht werden, deren Transkriptionseinheiten (gemeinsamer Teil, isoformspezifischer Teil) voneinander weg verlagert sind. Soweit möglich sollte in diesem System außerdem getestet werden, ob *mod(mdg4)*-prä-mRNAs ausschließlich miteinander *trans*-spleißen, oder ob sie „promiskuitiv“ (Kikumori *et al.*, 2001 und 2002) heterologe *trans*-Spleißreaktionen mit den prä-mRNAs anderer Gene eingehen, was zu intergenisch-chimären mRNAs führen würde.

2. Material und Methoden

2.1 Genetische Methoden

2.1.1 Anzucht und Haltung der Fliegen

Anzucht und Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgten auf Standardmedium (alle Bestandteile, wenn nicht anders angegeben in w/v: 1% Agar-Agar; 4% Grieß; 5% Zuckerrübensirup; 1,33% Bierhefe; 1,33% Maismehl; 4% Rosinenbrei; 0,167% (v/v) Propionsäure), das zur Vermeidung von Schimmelbildung und Bakterienwachstum mit 0,67% (v/v) Nipagin ($150\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Methylhydroxibenzoat; $50\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Propylbenzoat in 90% Ethanol) sowie abwechselnd mit $143\mu\text{M}$ Ampicillin bzw. $33,75\mu\text{M}$ Tetracyclin versetzt wurde. Stämme wurden bei 18°C gehalten, Kreuzungen bei 25°C durchgeführt. Für Ablagen zum Sammeln von Embryonen wurde ein Medium aus 2,2% Agar, 10% Zucker und Aktivkohle (nach Bedarf) verwendet. Zur Stimulation der Eiablage wurde das Medium mit Bäckerhefe, auf die Oberfläche gegeben, supplementiert.

2.1.2 Keimbahntransformation

Um transgene *Drosophila melanogaster* zu erzeugen, wurde die Methode von Rubin und Spradling (1982) angewendet und wie folgt abgewandelt: Alle Transgene waren w^+ -markiert. Abhängig von der Transgengröße wurden 300 bis 700ng Transformationsvektor mit 150ng Transposasequelle gemischt (in $V=10\mu\text{l}$; Robertson *et al.*, 1988) und mittels einer Glaskapillare in den apikalen Pol 0-40min alter, dechorionisierter Embryonen w^{118}_{iso} injiziert.

2.1.3 Verwendete Mutationen in und außerhalb von *mod(mdg4)*

Die ausführliche Beschreibung der verwendeten Mutationen und *Balancer*-Chromosomen inklusive cytologisch bestimmter Inversionsbruchpunkte sowie dominanter und rezessiver Mutationen kann Lindsley und Zimm (1992) bzw. FLYBASE (www.flybase.bio.indiana.edu) entnommen werden.

Zur besseren Handhabung von Sequenzen wurde eine locusinterne Skalierung festgelegt. Zur Umrechnung zwischen dieser und der annotierten *Drosophila melanogaster*-Genomsequenz sei

angemerkt, daß Position 1 auf der *mod(mdg4)*-Skala der *D. melanogaster*-Genomposition 3R:17.205.907 entspricht; Position 10.001 korrespondiert zu 3R:17.195.907 und Position 30.001 entspricht 3R:17.175.907.

Tabelle 2.1 In dieser Arbeit verwendete *mod(mdg4)*-Mutationen.

Mutation	Eigenschaften
<i>mod(mdg4)</i> ⁰²	Insertion eines <i>gypsy</i> -Retrotransposons in drittes Intron von <i>mod(mdg4)</i> (3R:17.202.239) (alias: 71-4)
<i>mod(mdg4)</i> ^{neo129}	<i>P</i> -Elementinsertion (pUCHsneory ⁺) in drittes Intron von <i>mod(mdg4)</i> (3R:17.202.202)
<i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	Revertante von <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129} , Deletion der ersten drei gemeinsamen Exons von <i>mod(mdg4)</i> , 205bp <i>P</i> -Elementrest an Insertionsstelle verblieben (M. Gabler, persönliche Mitteilung); <i>P</i> -Elementrest besitzt Promotoraktivität; 5' verkürzte mRNAs entstehen, deren codierte Mod(mdg4)-Proteine nicht funktionell sind
<i>Df(3R)GC14</i>	Defizienz 93D6-7 bis 93E1 (Mohler und Pardue, 1982), die den kompletten <i>mod(mdg4)</i> -Locus deletiert, umfaßt mindestens 13 weitere Gene inkl. <i>ebony</i>
<i>mod(mdg4)</i> ^{L3101}	Revertante von <i>mod(mdg4)</i> ^{L3101} , resultiert in 56bp-Einschub im ORF von <i>mod(mdg4)</i> (M. Gabler, persönliche Mitteilung) (alias: 8-6)
<i>mod(mdg4)</i> ⁰⁴	EMS-induzierte Mutationen D35S D93N innerhalb der BTB-Domäne im gemeinsamen Teil von <i>mod(mdg4)</i> (alias: A I 351)
<i>mod(mdg4)</i> ⁰⁷	insertionelle Mutation in den Bereich der gemeinsamen Exons 1-4 (alias: 70II; R. Dorn, persönliche Mitteilung)
<i>mod(mdg4)</i> ⁰³	γ -strahleninduzierte Defizienz der cytologischen Bereiche 93D6 bis 93E1 (Mohler und Pardue, 1982; Walldorf <i>et al.</i> , 1984), Bruchpunkt wurde im Rahmen dieser Arbeit 18.701 (3R:17.187.207) bis 18.782 (3R:17.187.125) eingegrenzt; distaler Teil von <i>mod(mdg4)</i> deletiert; Isoformen <i>downstream</i> von <i>mod(mdg4)</i> -55.3 werden nicht mehr gebildet
<i>Df(3R)eGp4</i>	<i>P</i> -Element-Revertante einer Insertion in <i>tinman</i> (laut Gerasimova <i>et al.</i> , 1995), Deletion schließt proximal <i>ebony</i> ein, distaler Bruchpunkt (<i>P</i> -Elementinsertionsstelle, 15bp <i>P</i> -Sequenz sind erhalten) 14.935 (3R:17.190.971); Isoformen ab <i>mod(mdg4)</i> -58.0
<i>Df(3R)eB2</i>	

	werden nicht mehr gebildet
<i>P{RS5}5-HA-1224</i>	<i>P</i> -Elementinsertion bei 3R:17.191.073
	<i>P</i> -Elementinsertion bei 3R:17.203.088 in <i>mod(mdg4)</i> -Exon 1; Transkription: Promotoren von <i>white</i> und/oder CG32795 und
<i>P{RS3}CB-6686-3</i>	<i>P{RS3}</i> -3' <i>P</i> -Elementende; ausgewählte Isoformen wurden nachgewiesen; komplementiert andere Mutationen des gemeinsamen Teils vollständig (ausführliche Daten: siehe Anhang 2 A2.1)
<i>P{KG}08515</i>	<i>P</i> -Elementinsertion bei 3R:17.185.384, exakte Bezeichnung: <i>P{SUPor-P}mod(mdg4)^{KG 08515}</i>
<i>P{EY}10282</i>	<i>P</i> -Elementinsertion bei 3R:17.175.340
Z3-5578	EMS-induziert; Allel aus Zuker-Kollektion (Koundakjian <i>et al.</i> , 2004); Mutation W ₄₄₉ Stop in Mod(mdg4)-56.3

Tabelle 2.2 In dieser Arbeit verwendete *Drosophila melanogaster*-Linien mit Mutationen und/oder Transgenen außerhalb von *mod(mdg4)*.

Linie	Mutationen
<i>Dr</i> , $\Delta 2$ -3 / TM6C, <i>Sb</i>	Transposasequelle, regulatorisches zweites Intron deletiert ($\Delta 2$ -3), in der Keimbahn aktiv; <i>Dr</i> -Marker
a-31	<i>y</i> ¹ <i>ac sc pn</i> (keine Mutation in <i>mod(mdg4)</i>)
e-27	<i>w</i> ^{m4h} ; <i>se ss e ro</i>
<i>YB</i> ^S <i>y</i> ⁺	Y-Chromosom mit dominanter <i>Bar-Stone</i> -Mutation und <i>y</i> ⁺ -Marker, vermutlich aus <i>T(1;Y)</i> nicht invertierter Sequenz (<i>l(1)JI</i> ⁺ <i>y</i> ⁺ <i>ac</i> ⁺) mit <i>In(1)sc</i> ⁸ entstanden (Brosseau und Lindsley, 1958; Brosseau <i>et al.</i> , 1961)
Bloomington #2057	<i>y</i> ¹ <i>oc</i> ^{R3.2} ; <i>Gr22b</i> ¹ <i>Gr22d</i> ¹ <i>cn</i> ¹ CG33964 ^{R4.2} <i>bw</i> ¹ <i>sp</i> ¹ ; <i>LysC</i> ¹ <i>lab</i> ^{R4.2} <i>MstProx</i> ¹ <i>GstD5</i> ¹ <i>Rh6</i> ¹ <E>; Referenzstamm des <i>Drosophila melanogaster</i> -Genomprojekts
<i>da</i> -Gal4	<i>P{GAL4-da.G32}UHI/TM6C</i> , Nummer der Linie im Bloomington Stock Centre: 5460; Gal4-Expression unter <i>daughterless</i> -Promotor
Actin-Gal4 (2. Chr.)	<i>P{Act5C-GAL4}25F01/SM6</i> , Nummer der Linie im Bloomington Stock Centre: 4414; Gal4-Expression unter Actin-Promotor
Actin-Gal4 (3. Chr.)	<i>P{Act5C-GAL4}17bF01/TM6C</i> , Nummer der Linie im Bloomington Stock Centre: 3954; Gal4-Expression unter Actin-Promotor
T80-Gal4	<i>P{GawB}T80/SM6</i> , Nummer der Linie im Bloomington Stock Centre: 1878; Gal4-Expression in Imaginalscheiben des 3. Larven-

stadiums

Spleißfaktormutationen

Bloomington #635	<i>heph</i> ² , <i>P</i> -Elementinsertion in <i>hephaestus</i> (3R: 27.763.903), alle <i>heph</i> -Isoformen außer <i>heph</i> -PM (FBpp0111778) betroffen
Bloomington # 11589	<i>heph</i> ⁰³⁴²⁹ , <i>P</i> -Elementinsertion in <i>hephaestus</i> (3R:27.756.268), alle <i>heph</i> -Isoformen betroffen
Bloomington #12759	<i>P</i> -Elementinsertion <i>P{GT1}l(2)37Cb</i> ^{BG01776} in <i>CG10689</i> , alias <i>lethal (2) 37Cb</i>
Bloomington #675	<i>tra</i> ¹ , ca. 1kb große Deletion in <i>transformer</i>
Bloomington #12346	<i>P{PZ}Prp19</i> ⁰⁷⁸³⁸ <i>cn</i> ¹ , <i>P</i> -Elementinsertion in <i>Prp19</i>
Bloomington #10214	<i>P{lacW}noi</i> ^{i3E} , <i>P</i> -Elementinsertion in <i>noisette</i>
Bloomington #10265	<i>P{lacW}B52</i> ^{s2249} , <i>P</i> -Elementinsertion in <i>B52</i>
Bloomington #12904	<i>P{SUPor-P}SC35</i> ^{KG02986} , <i>P</i> -Elementinsertion in <i>SC35</i>
Bloomington #10879	<i>P{lacW}snRNA:U4:39B</i> ^{k09410} , <i>P</i> -Elementinsertion in Gene für U4 snRNA in Region 39B und <i>CG8678</i>
Bloomington #12323	<i>P{PZ}U2af38</i> ⁰⁶⁷⁵¹ , <i>P</i> -Elementinsertion in <i>U2af38</i>

2.1.4 *P*-Element-Mobilisierung und -Reversion

Das zu mobilisierende *P*-Element tragende Tiere wurden mit einer Transposasequelle ($\Delta 2$ -3 ohne regulatorisches zweites Intron, in Keimbahn aktiv, dominant *Dr*-markiert) gekreuzt, die transheterozygoten F1-Tiere (*Dr* und *w*⁺) selektiert und weiter gekreuzt. Im Falle einer beabsichtigten Mobilisierung vom X-Chromosom wurden männliche F1-Tiere selektiert, mit *w*⁻-Weibchen gekreuzt und in der F2-Generation wiederum *w*⁺-markierte männliche Tiere selektiert. Da das männliche X-Chromosom ausschließlich an weiblichen Nachwuchs weitergegeben wird, muß das *P*-Element mobilisiert worden sein. In *P*-Elementausbauexperimenten wurde wiederum mit der Transposasequelle (*Dr*, $\Delta 2$ -3/TM6C, *Sb*; in einem Fall *Dr*, $\Delta 2$ -3 Rev31/TM6C, *Sb*) gekreuzt und *Dr w*⁺ doppelt markierte Tiere selektiert. Diese wurden mit einem Balancerstamm für das dritte Chromosom (*w*⁻; TM6C, *Sb eb* / TM2, *Ubx eb*) gekreuzt. In der F2-Generation wurden Tiere selektiert, die den *w*⁺-Marker verloren hatten und ein Balancer-Chromosom trugen (d.h. *eb*⁺-Phänotyp). Nach Aufbau einer heterozygoten, stabilen Linie mit einem Balancerchromosom als Homologen wurde aus einem Tier per *single fly prep* genomische DNA extrahiert und für die PCR-Analyse der Mutation

eingesetzt. Für weiterführende Untersuchungen wurden homozygote oder transheterozygote Tiere (Ausgangs-*P*-Element oder definierte Deletionen) verwendet.

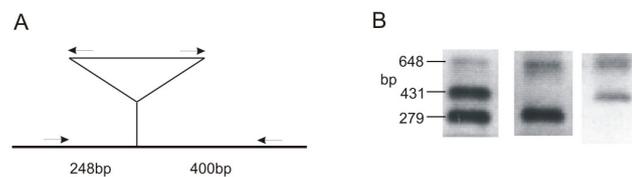


Abbildung 2.1 (A) Position und Orientierung der Primer für die PCR zur Gruppierung der Revertanten. (B) Typische PCR-Ergebnisse mit genomischer DNA heterozygoter Revertanten bei internem Umbau des *P*-Elements (links) und einseitigen Ausbauten bzw. einseitigen Deletionen (Mitte und rechts).

Engels *et al.* (1990) beschreiben eine bessere deletionserzeugende Mobilisierung von *P*-Elementen, wenn sich an der Position der Insertionsstelle auf dem homologen Chromosom eine Defizienz befindet. Daher wurden für das *P{KG}08515*-Mobilisierungsexperiment Transposasequelle und *P{RS5}-5-HA-1224*-Revertante Rev31 (siehe Abb. 3.1) rekombiniert und *P{KG}08515* mit diesem Chromosom als Homologem mobilisiert, wie im folgenden Kreuzungsschema dargestellt.

$$P: \frac{P\{KG\}08515}{TM6C, Sb} \times \frac{Dr, \Delta 2-3 \text{ Rev31}}{TM6C, Sb}$$

$$F1: \frac{P\{KG\}08515}{Dr, \Delta 2-3 \text{ Rev31}} \times \frac{TM6C, Sb}{TM2, Ubx}$$

F2: Selektion $w^- Dr^+ Sb$ oder $w^- Dr^+ Ubx$ und Linienaufbau

2.1.5 Erzeugung chromosomaler Umbauten und einer Defizienz mittels der *DrosDel-P{RS}*-Elemente

Zur Etablierung der chromosomalen Umbauten (Chromosomenmutationen) mit einem Bruchpunkt in *mod(mdg4)* wurde das *P*-Element *P{RS5}5-HA-1224* (siehe Tabelle 2.1 und 2.3) in Kombination mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten *P{RS}*-Elementen (*rearrangement screen*, Golic und Golic, 1996) verwendet.

Tabelle 2.3 Für chromosomale Umbauten verwendete $P\{RS\}$ -Elemente und erzeugte Chromosomenmutationen. Die Orientierung des P -Elements besagt, wie es 5'→3' relativ zum annotierten *Drosophila melanogaster*-Genom ausgerichtet ist.

P-Element	Eigenschaften	Umbau /Defizienz
<i>5-HA-1224</i>	$P\{RS5\}$ -Elementinsertion bei 3R:17.191.073 (cytologische Region 93D8; Orientierung vorwärts)	alle
<i>CB-0716-3</i>	$P\{RS3\}$ -Elementinsertion bei 2L:5.949.427 (cytologische Region 26A3; Orientierung vorwärts)	$T(2;3)26A,mod(mdg4)$
<i>CB-6279-3</i>	$P\{RS3\}$ -Elementinsertion bei 3R:12.260.706 (cytologische Region 89B16; Orientierung vorwärts)	$In(3R)89C,mod(mdg4)$
<i>CB-5827-3</i>	$P\{RS3\}$ -Elementinsertion bei 3R:18.552.029 (cytologische Region 94C4; Orientierung vorwärts)	$In(3R)mod(mdg4),94C$
<i>CB-6403-3</i>	$P\{RS3\}$ -Elementinsertion bei 3R:17.122.251 (cytologische Region 93D4; Orientierung rückwärts)	$Df(3R)ED6050$

Die verwendeten $P\{RS3\}$ -Elemente wurden nach ihrer Position und Orientierung im Genom so gewählt, daß ihre Kombination mit $P\{RS5\}$ -*5-HA-1224* in den gewünschten chromosomalen Umbauten resultierte. Die Kreuzungen wurden wie in Ryder *et al.* (2004) beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurde bei allen P -Elementen das FRT (*flippase recombination target*)-flankierte Exon des *white*-Markers durch hitzeschockvermittelte Expression der FLP-Rekombinase entfernt (Abb. 2.2 A); es entstand ein *remnant*-Element, das ein Exon des Markergens besitzt, also im w^{118}_{iso} -Hintergrund zu weißäugigen Tieren führt. Durch FLP-vermittelte Rekombination von *5-HA-1224r* mit einem $P\{RS3r\}$ -Element entstanden zwei verschiedene Elemente, eines, das den wiederhergestellten *white*-Marker enthält (w^+), und eines, das zwischen den P -Elementenden lediglich ein FRT enthält. Während bei entgegengesetzter Orientierung der Ausgangselemente (entspricht gleicher Orientierung der FRTs) Deletionen und Duplikationen entstehen, kommt es bei gleicher Orientierung der P -Elemente (entspricht entgegengesetzter Orientierung der FRTs) je nach Insertionsort zu Inversionen bzw. Translokationen, wobei die Elemente die Bruchpunkte der chromosomalen Umbauten darstellen. So wurde zum Beispiel bei der Inversion $In(3R)89C,mod(mdg4)$ die Sequenz zwischen 3R:12.260.706, was dem Insertionsort von $P\{RS3\}$ -*CB-6279-3* entspricht, und $P\{RS5\}$ -*5-HA-1224* an Position 3R:17.191.073 invertiert (siehe Tab. 2.3).

Die Rekombination zwischen *5-HA-1224r* und *CB-6403-3r* führt zu der 68,8kb großen Defizienz $Df(3R)ED6050$, die w^+ markiert ist und einer entsprechenden Duplikation (w^-). Hier wurde das w^+ -Element mit TM6C, *Sb* balanciert; das das w^- -Element enthaltende

Duplikationschromosom wurde nicht selektiert. Die Defizienz *Df(3R)ED6050* umfaßt den distalen Teil von *mod(mdg4)* (20 isoformspezifische Exons *mod(mdg4)*-58.0 bis -54.5), *CG16791* und das Gen für die Hitzeschock-RNA ω (*CR31400*), und endet ca. 2kb vor dem folgenden Gen *SIFR* (*CG10823*).

Alle chromosomalen Umbauten und die Defizienz *Df(3R)ED6050* wurden per PCR und Sequenzierung bestätigt. Dazu wurde eine das w^+ -Element überspannende PCR mit Primern aus den flankierenden genomischen Regionen durchgeführt (grüne Pfeile in Abb. 2.2 A), das PCR-Produkt mittels pGEM-T Cloning Kit (Promega) in pGEM[®]-3Zf(+) ligiert und sequenziert (5,7kb w^+ -Element plus flankierende genomische Bereiche, „one step confirmation“, www.drosdel.co.uk). Eine PCR über das w^- -Element hinweg ist nicht möglich, da die 5' P -Elementenden in einem DNA-Einzelstrang eine stabile Haarnadelstruktur mit einem Stamm von ca. 580bp ausbilden, während das FRT den *loop* des *hairpins* (ca. 200bp) formt.

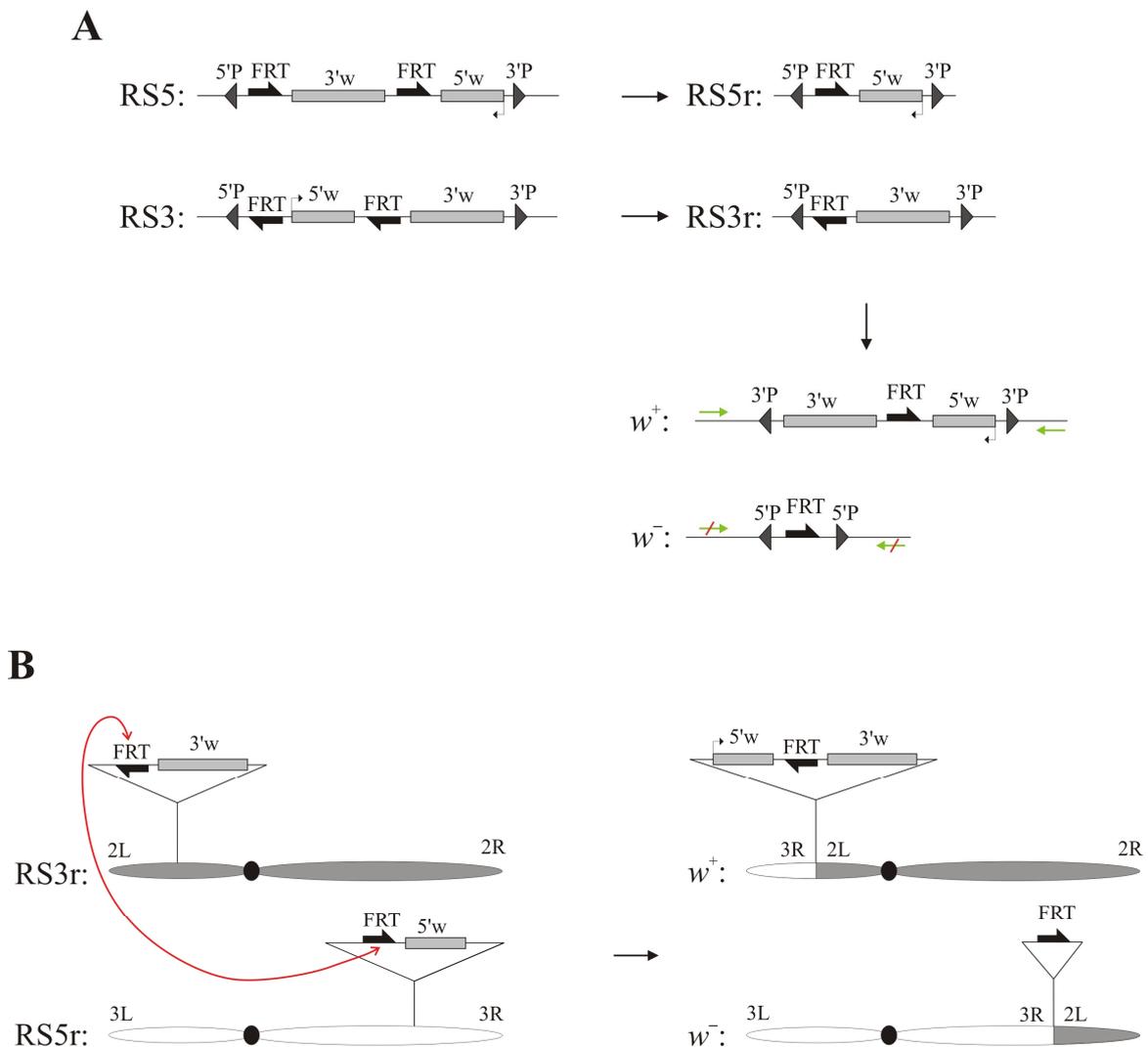


Abbildung 2.2 Generierung chromosomaler Umbauten mittels $P\{RS\}$ -Elementen. **(A)** FLP-Rekombinase-vermittelter Ausbau des von zwei FRTs (*flippase recombination targets*) flankierten *white*-Exons, Entstehung von $P\{RSr\}$ -Elementen. Durch FLP-vermittelte Rekombination eines $P\{RS5r\}$ - und eines $P\{RS3r\}$ -Elements entstehen je ein w^+ - und w^- -Element, die die Bruchpunkte der chromosomalen Umbauten markieren. grüne Pfeile: Position der Primer zur überspannenden PCR („one step confirmation“), durchgestrichene Pfeile: PCR nicht möglich **(B)** Schema der FLP-Rekombinase-vermittelten Rekombination eines drittsomalen $P\{RS5r\}$ - und eines $P\{RS3r\}$ -Elements auf dem zweiten Chromosom, wobei eine reziproke $T(2;3)$ -Translokation entsteht.

2.1.6 Knock out der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 – „Ends-in gene targeting“

Die Methode des „Ends-in gene targeting“ (Xie und Golic, 2004) wurde angewendet, um das isoformspezifische Exon der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 zu deletieren, ohne daß nach erfolgter Deletion Fremdsequenz am Mutationsort zurückbleibt. Dazu wurden zunächst die sogenannten Donorkonstrukte, die die gewünschte Mutation sowie beidseitig flankierend 3kb der endogenen *mod(mdg4)*-Sequenz enthielten, erstellt. Die verwendeten PCR-Primer sind in Anhang 1 unter „für Ends-in-Konstrukte“ aufgelistet. In Abb. 2.3 sind die Transgene für die Deletion des isoformspezifischen Exons ($\Delta 64.2$) sowie für den Austausch der 404. Aminosäure der Proteinisoform (T_{404}) gegen ein Stopcodon und nachfolgend einer *KpnI*-Schnittstelle zur Nachweisbarkeit der Mutation (64.2Stop) schematisch dargestellt. Die Vorgehensweise beim Zusammenfügen der Teilamplifikate und Ligation in den Transformationsvektor pTV2 ist analog der in Xie und Golic (2004) beschriebenen und wird darum hier nicht detailliert beschrieben. Die Konstrukte wurden anschließend in den Transformationsvektor pTV2 (von K. Golic zur Verfügung gestellt) kloniert und mittels Keimbahntransformation in w^{1118}_{iso} (Rubin und Spradling, 1982) eingebracht (1.200 Embryos je Konstrukt ergaben eine Linie 64.2Stop und 16 Linien $\Delta 64.2$).

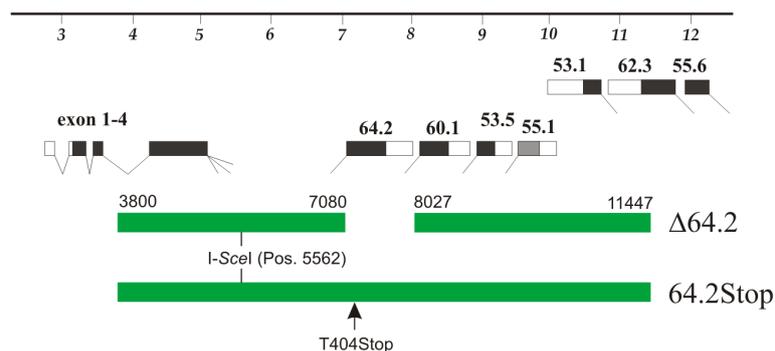


Abbildung 2.3 Transgene/Donorkonstrukte für Ends in-vermittelten *Knock out* der Isoform *mod(mdg4)-64.2*. Beide Transgene reichen von Position 3.800 bis 11.447 (locusinterne Skala), das $\Delta 64.2$ -Konstrukt enthält eine Deletion von 7.081 bis 8.026, während bei 64.2Stop ein Threonincodon (T_{404} in *Mod(mdg4)-64.2*) gegen ein Stopcodon ausgetauscht wurde. Beide Transgene besitzen an Position 5.562 eine *I-SceI*-Restriktionsschnittstelle.¹³

Die Mobilisierung und Linearisierung der Donor-DNA erfolgte durch Einkreuzung und hitzeschockvermittelte Expression der FLP-Rekombinase und *I-SceI*. Da nur das $\Delta 64.2$ -Konstrukt mobilisiert werden konnte, sind die weiteren Schritte für dieses Konstrukt/Experiment beschrieben:

$$P: \frac{P\{\text{Donor } \Delta 64.2\}}{\text{homozygot bzw. SM6, Cy}} \times y^1 w^*; \frac{P\{ry^{+17.2} = 70\text{FLP}\} 11 P\{ry^{+11.8} = 70\text{I-SceI}\} 2B \text{noc}^{\text{Sco}}}{\text{CyO } S^2}$$

(Hitzeschock 60min 37°C bei 0 bis 48h)

F1: w^{mosaik} und $w^- \text{CyO}^+$ selektiert, Einzeltier $\times w^{1118}_{iso}$

F2: $w^+ \times w^-; \frac{\text{TM6C, Sb}}{\text{TM2, Ubx}}$

Drei bis fünf Tage nach Beginn der F2-Kreuzung wurde die DNA der w^+ -Fliegen nach der *single fly prep*-Methode isoliert und mittels PCR getestet, ob die FLP-vermittelte Mobilisierung der Donor-DNA erfolgreich war. Zeitigte diese PCR das gewünschte Ergebnis, also ein „leeres“ Donorelement, wurde in einer zweiten PCR das Vorhandensein der Mutation $\Delta 64.2$ überprüft. War auch dieser Test erfolgreich, wurden aus den entsprechenden Kreuzungen balancierte Linien aufgebaut und diese auf den korrekten Insertionsort der Donor-DNA hin getestet.

Bei Integration des Donorkonstrukts in den endogenen *mod(mdg4)*-Locus kommt es zu einer partiellen Duplikation, die im nächsten Schritt der „*Ends-in gene targeting*“-Mutagenese aufgelöst wurde. Dabei ist abhängig von der Position des Rekombinationsereignisses innerhalb des duplizierten Bereichs ob Wildtyp- oder mutierte Sequenz zurückbleiben.

³ Auf eine Darstellung der für die Keimbahntransformation verwendeten Plasmide wurde aufgrund eines „CONFIDENTIAL!“-Aufdrucks auf den Dokumentationen der pTV2-Plasmidsequenz und MCS verzichtet.

$$P: \frac{\text{partielle Duplikation (z.B. } \Delta 1385c)}{\text{homozygot bzw. TM6C, Sb}} \times w^{1118}; \frac{P\{v^{+1.8} \text{ hs-I-CreI.R}\} 1A Sb^1}{\text{TM6 Hn, Ubx}}$$

(Hitzeschock 60min 37°C bei 0 bis 48h)

$$F1: w^{\text{mosaik}} Sb \text{ und } w^- Sb \text{ selektiert; Einzeltier} \times w^{1118}_{iso}$$

$$F2: w^- \text{ selektiert} \times w^-; \frac{\text{TM6C, Sb}}{\text{TM2, Ubx}}$$

Nach Expression der I-CreI-Restriktionsendonuklease kam es bei den F1-Tieren zu teils extremen körperlichen Mißbildungen, unabhängig, ob das Duplikations- oder Balancer-Chromosom vererbt worden waren (siehe Anhang 2 als Dokumentation). Aus der F2-Kreuzung wurden balancierte und später homozygote Linien mit deletiertem spezifischen Exon der Isoform *mod(mdg4)-64.2* aufgebaut und die Mutation mittels PCR, Southern Blot und Sequenzierung (Position 2.000 bis 13.000 locusinterne Skala) analysiert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie z.B. PCR, Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Inoue-Methode) oder Trennung von Restriktionsfragmenten in Agarosegelen wurden nach Sambrook und Russell (Hrsg., 2001) bzw. nach Protokollen und Empfehlungen der Hersteller verwendeter Reagenzien und Kits durchgeführt. Genutzte Kits werden bei ihrer ersten Erwähnung in dieser Arbeit namentlich mit Hersteller angegeben.

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach der *boiling prep*-Methode (Holmes und Quigley, 1981), Präparationen größeren Maßstabs mittels Plasmid-Mini- (MBI Fermentas) oder, für Keimbahntransformationen, Plasmid-Midi-Kit (Macherey&Nagel). Nucleinsäureverdaus wurden mit Restriktionsendonucleasen der Firma MBI Fermentas durchgeführt. DNA-Elution aus Agarosegelen erfolgte mittels *freeze & squeeze*-Technik oder Nucleobond II-Kit (Macherey&Nagel) bzw. Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Ligationen von DNA-Fragmenten wurden über Nacht bei 18°C oder nach Lund *et al.* (1996) inkubiert.

PCRs wurden nach den in Kleppe *et al.* (1971) dargelegten Prinzipien geplant. Die Amplifikation der Zielsequenzen erfolgte mittels der thermophilen DNA-Polymerasen (Saiki *et al.*, 1986) *Taq* (Invitrogen), *Pfu*, *Pfu*-Turbo (beide Stratagene) oder iProof (Bio-Rad). Eine Liste der verwendeten Primer ist aufgrund ihres Umfangs dieser Arbeit als Anhang 1 beigefügt.

Die Klonierung von PCR-Amplifikaten erfolgte in pGEM[®]-3Zf(+). DNA-Sequenzreaktionen wurden mit BigDye[®] Terminator v1.0 bzw. v1.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt und die Reaktionsgemische mit ABI Prism[®] 377 bzw. ABI Prism[®] 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) aufgetrennt.

Die Auswertung der Sequenzdateien erfolgte mit Chromas Lite 2.01 (Technelysium, Ltd.) und Generunner 3.05 (Hastings, Ltd.). Sequenzvergleiche wurden mittels nblast (Altschul *et al.*, 1990 und 1997) unter Verwendung des annotierten *Drosophila melanogaster*-Genoms bzw. *Drosophila virilis*-BAC-Sequenz (v3.x bis v5.2 www.ncbi.nlm.nih.gov und www.flybase.bio.indiana.edu/blast) durchgeführt.

Als Transformationsvektoren für Transgene wurden pW8 (Klemenz *et al.*, 1987) und die pUAST-Variante pCaSpeR3 (Duffy *et al.*, 2002) verwendet.

2.2.1 DNA-Isolation aus Fliegen

Um geringe Mengen genomischer DNA aus einzelnen adulten Tieren zu isolieren, fand die *single fly prep*-Methode (abgewandelt nach Gloor *et al.*, 1991) Anwendung. Für die Isolation großer Mengen genomischer DNA erwiesen sich die Methoden nach Brandstädter *et al.* (1994) und Jowett *et al.* (1986) als erfolgreich.

2.2.2 Inverse PCR

Die inverse PCR diente der Ermittlung von unbekanntem *P*-Elementinsertionsorten. Nach Isolation der genomischen DNA des zu untersuchenden Genotyps wurde diese mit einem Restriktionsenzym mit 4bp Erkennungssequenz verdaut und anschließend unter Bedingungen religiert, die bevorzugt zu einer Zirkularisierung der Restriktionsfragmente führen. Die Ligationreaktion diente anschließend als *PCR-template*. Zunächst erfolgte eine Amplifikation mit 5'P_forw-1 und 5'P_rev-1 (siehe Anhang 1), dann schloß sich eine *nested PCR* mit 5'P_forw-2 und 5'P_rev-2 an. Die PCR-Produkte wurden nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel eluiert und $\leq 5\mu\text{l}$ Eluat mit 8pmol 5'P_rev-2 je 20 μl -Reaktion sequenziert. Die exakte Insertionsstelle wurde durch Abgleich (nblast) der Sequenzdaten mit der *Drosophila*-Genomdatenbank identifiziert.

2.2.3 Southern Blot

Genomische DNA des zu untersuchenden, homozygoten Genotyps wurde über Nacht (16h) mit ausgewählten Restriktionsenzymen (1U/ μ g DNA) verdaut. Die elektrophoretische Auftrennung der Verdauung erfolgte bei 1V/cm in 0,8% Agarose in 1 \times TAE für mindestens 12h. Nach alkalischer Behandlung des Gels (45min in 1M NaOH, 1,5M NaCl) und anschließender Neutralisierung (45min in 1M Tris/HCl; 1,5M NaCl; pH7,4) wurden die Restriktionsfragmente mittels Kontaktblot auf eine Nylonmembran übertragen. Der Blotpuffer war 20 \times SSC. Die DNA wurde durch UV-Lichtexposition mit der Membran quervernetzt. Anschließend wurde die Membran in Hybridisierungspuffer (0,1ml/mm²; MRC, GB) überführt und \geq 1h vor Zugabe der radioaktiven Sonde präinkubiert.

Herstellung der Sonden: Ausgangsmaterial für die Herstellung der Sonden für den Southern Blot waren die pBluescript-Plasmide ‚pBS+0-7,5Bam‘ und ‚pBS+7,2 aus 480‘ welche beide genomische *mod(mdg4)*-Sequenz enthalten. Je 1 μ g Plasmid wurde \geq 2h mit 10U *Bam*HI verdaut und anschließend die Fragmente in einem 0,8%igen Agarosegel getrennt. Die ca. 7kb großen Banden wurden ausgeschnitten und die DNA aus den Agaroseblöcken eluiert. Diese Vorgehensweise wurde angewandt um die Menge pBluescript in der radioaktiv zu markierenden DNA zu verringern, da ein starkes Signal aus der Kreuzhybridisierung von pBluescript mit dem eingesetzten DNA-Größenstandard (DNA Ladder Mix, MBI Fermentas) erwartet wurde. Eine geringe Menge des Vektors wurde jedoch in den Geleluaten beibehalten durch eine verkürzte Auftrennung im Agarosegel; somit konnte eine Markierung der aus den Restriktionsverdauungen entstandenen Banden wie auch des DNA-Größenstandard sichergestellt werden. Die DNA-Konzentration der Geleluate wurde spektrophotometrisch bestimmt und beide äquimolar gemischt. 50ng des Gemischs wurden nach Empfehlung des Herstellers mit dem Megaprime DNA Labeling Kit (Amersham; 25 μ Ci α -[³²P]-dATP) radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983 und 1984). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltrationschromatographie mit ProbeQuant® G-50 Micro Columns (Amersham) entfernt. Das Filtrat wurde direkt in den Hybridisierungspuffer gegeben und bei 65°C über Nacht (\geq 10h) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mehrfach für je 30min mit 2 \times SSC, 0,1% (w/v) SDS bei Raumtemperatur gewaschen, bis im Puffer keine Radioaktivität mehr nachweisbar war. Der Blot wurde aus der Inkubationsröhre genommen und nach Entfernung überschüssiger Feuchtigkeit in Haushaltsfrischhaltefolie eingeschlagen. Zur Detektion der radioaktiven Signale erfolgte die Exposition mit einer BAS-MS *imaging plate* (Fujifilm) für unterschiedliche Zeiten um ggf. unterschiedliche Signalintensitäten ausgleichen zu können.

2.2.4 Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Arbeiten wurde zum Teil der *E. coli*-Stamm DH5 α (Invitrogen, als *subcloning efficiency* chemisch kompetente Zellen) verwendet. Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen mit höheren Transformationsraten ($\leq 1 \cdot 10^9$ cfu/ μ g; Inoue-Methode), Expansion schwieriger Klone und Kultivierung für Plasmidpräparationen im Mini- und Midi-Maßstab wurden XL1-Blue MRF' (Stratagene) genutzt. Genetische Marker der verwendeten *E. coli*-Stämme:

DH5 α : \square F- ϕ 80dlacZM15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r k-, m k+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -

XL-1Blue MRF': Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn5 (Kan^r)]

2.2.5 Real-time quantitative RT-PCR

Die Real-time RT-qPCR wurde zur absoluten und relativen Quantifizierung von mRNA-Mengen aus isolierter Gesamt-RNA angewendet. Um Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten wurde das Quantitect Real-time RT-PCR-Kit (Qiagen) wie folgt benutzt: Es wurden zwischen 0,1 und 100ng Gesamt-RNA je 25 μ l-Reaktion eingesetzt. Für jede mRNA wurden vier Konzentrationen jeweils als Duplett analysiert. Die Primerkonzentration betrug 250nM wobei der *reverse*-Primer gleichzeitig als Primer für die reverse Transkription genutzt wurde. Die eingesetzten Primer sind intron- bzw. outronspondend abgeleitet und schlossen zugunsten einer möglichst hohen PCR-Effizienz einen Bereich ≤ 180 bp ein. Als *housekeeping*-Gen wurde *rp49* gewählt, *mod(mdg4)*-mRNAs wurden quantifiziert mit einem *forward*-Primer aus dem gemeinsamen Exon 4 und einem *reverse*-Primer aus dem isoformspezifischen Exon 5. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang 1 aufgeführt. Bei relativer Quantifizierung einer *mod(mdg4)*-mRNA dienten als Standard entweder *rp49* oder die Summe aller *mod(mdg4)*-mRNAs, indem eine Amplifikation innerhalb des gemeinsamen Teils (*mel-ex2-fwd* & *mel-ex3-rev*) durchgeführt wurde. Im Falle einer absoluten Quantifizierung wurde für das jeweilige Transkript eine cDNA synthetisiert, ein Fragment bekannter Größe dieser cDNA in pGEM[®]-3Zf(+) kloniert, das Plasmid in einer Midi-Präparation isoliert (spektrophotometrische

Konzentrationsbestimmung) und in einer Verdünnungsreihe als externer Standard eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem iCycler (Bio-Rad) durchgeführt nach folgendem Reaktionsschema:

50°C	30min	reverse Transkription
95°C	15min	<i>hotstart</i> -Enzymaktivierung
danach 40 Zyklen:		
94°C	10s	Denaturierung
64°C	30s	<i>annealing</i>
72°C	10s+7s	Elongation & Datenerfassung, 1. Temperatur
80°C	7s	Datenerfassung, 2. Temperatur
83°C	7s	Datenerfassung, 3. Temperatur

danach Schmelzpunktbestimmung der Amplifikate durch Temperaturinkremente von $1\text{K}\times\text{min}^{-1}$ im Bereich 60 bis 95°C und Fluoreszenzmessung in Abständen von 30s

Dieses Programm wurde für sämtliche Real-time RT-qPCRs verwendet. Die Datenerfassung bei drei verschiedenen Temperaturen wurde durchgeführt für den Fall, daß während der PCR Primeroligomere entstehen, deren Schmelztemperatur höher als 72°C ist und in die SYBR-Green interkalieren kann, was zu einer Verfälschung der Fluoreszenzmessung zur Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA führen würde. In einem solchen Fall wäre die RT-qPCR mit neu abgeleiteten Primern wiederholt worden. Untereinander verglichen wurden immer Meßwerte, die bei gleicher Temperatur, z.B. 72°C, gewonnen wurden. Der Programmablauf mit Datenerfassung bei drei Temperaturen, als Sicherheitsmerkmal bei der Etablierung der Technik eingeführt, wurde beibehalten, da keine Beeinträchtigung der PCR-Effizienz festgestellt wurde. Im Anschluß an die PCR wurde der Schmelzpunkt der Amplifikate bestimmt, um zu testen ob während der PCR nur ein oder mehrere Amplifikate (Primeroligomere) entstanden. Vor Verwendung eines Primerpaares in der Real-time RT-qPCR wurde das PCR-Produkt im Agarosegel aufgetrennt um zu verifizieren, daß das Primerpaar nur ein Amplifikat generiert. Dieses Amplifikat wurde außerdem sequenziert um sicherzustellen, daß damit die korrekte mRNA vervielfältigt wird.

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels der iCycler iQ v3.1-Software (Bio-Rad) und Microsoft Excel. Es wurden **ausschließlich** Reaktionen ausgewertet, deren lineare Regression einen Korrelationskoeffizienten $R\geq 0,98$ bei halblogarithmischer Auftragung der PCR-Zyklen versus Ct (*threshold cycle*: PCR-Zyklus während dessen die SYBR Green-Fluoreszenz den gewählten *threshold* übersteigt) zeigte. Es wurden ausschließlich Reaktionen verglichen, deren

apparente PCR-Effizienz (lineare Regression der ΔCt der verschiedenen Verdünnungen einer RNA) ähnliche Werte zeigten.

Nach Auswertung der Daten wurden die mRNA-Konzentrationen bei absoluter Quantifizierung in Kopien je μg Gesamt-RNA angegeben. Kenntnis der Größe und Konzentration des externen Plasmidstandards erlauben die Berechnung der molekularen Konzentration. Bei gleichem *threshold* (meist 150 RFU, *relative fluorescence units*) in parallelen RT-qPCR-Reaktionen von Plasmidstandard und RNAs sind deren Ct-Werte vergleichbar, was die Berechnung der molekularen Konzentration der *mod(mdg4)*-mRNAs erlaubt.

Bei relativer Quantifizierung von mRNAs wird neben der zu bestimmenden *mod(mdg4)*-mRNA entweder das *housekeeping*-Gen *rp49* oder ein Amplicon im gemeinsamen Teil von *mod(mdg4)* bestimmt. Die Differenz der Ct-Werte beider Reaktionen (ΔCt) ist ein Maß für den Konzentrationsunterschied der *mod(mdg4)*-mRNA zur Menge aller *mod(mdg4)*-mRNAs (siehe Anmerkung unten) bzw. zu *rp49*. Beim Vergleich zweier Proben kann dieser Konzentrationsunterschied unterschiedlich groß sein. Die Differenz dieser Unterschiede, mit $\Delta\Delta\text{Ct}$ bezeichnet, ist ein Maß für die Hoch- bzw. Herunterregulation der zu bestimmenden *mod(mdg4)*-mRNA im untersuchten Genotyp. Wenn z.B. im Wildtyp der ΔCt 5 beträgt und im untersuchten Genotyp 3 ($\Delta\Delta\text{Ct}=-2$), dann zeigt dies eine Hochregulation der entsprechenden mRNA an, während ein Wert von z.B. $\Delta\text{Ct}=8$ ($\Delta\Delta\text{Ct}=3$) eine im Vergleich geringere mRNA-Menge anzeigen würde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ΔCt -Wert des Vergleichsgenotyps, meist w^{1118}_{iso} , als Null definiert um die Differenz des ΔCt der untersuchten Genotypen ($\Delta\Delta\text{Ct}$) deutlicher herauszustellen, z.B. wurde statt $\Delta\text{Ct}(w^{1118}_{\text{iso}})=5$ und $\Delta\text{Ct}(\text{Mut})=7,5$ der Term $\Delta\Delta\text{Ct}(\text{Mut}-w^{1118}_{\text{iso}})=2,5$ angegeben. Dies erübrigt normalerweise die Angabe des $\Delta\Delta\text{Ct}$ für w^{1118}_{iso} ($\Delta\Delta\text{Ct}(w^{1118}_{\text{iso}}-w^{1118}_{\text{iso}})=0$). Zugunsten der Angabe einer Standardabweichung wurde der Wert jedoch mit angeführt (z.B. $0\pm 0,1$; siehe Tab. 3.3).

Anmerkung zum Gebrauch des Amplifikats aus dem gemeinsamen Teil von *mod(mdg4)* als Referenz zur Quantifizierung von mRNAs des Locus: Durch Positionierung des *forward*-Primers in Exon 2 und des *reverse*-Primers in Exon 3, wird mit diesem Amplifikat die Summe aller *mod(mdg4)*-mRNAs und evtl. vorhandene *cis*- aber noch nicht *trans*-gespleißte prä-mRNA des gemeinsamen Teils nachgewiesen. Für diesen Nachweis (*cis*- aber noch nicht *trans*-gespleißte prä-mRNA) gibt es keine experimentellen Belege. Untersuchungen an *Euglena gracilis* zeigen entgegen der Lehrmeinung, daß *trans*- zeitlich vor *cis*-Spleißen erfolgen kann (Canaday *et al.*, 2001). Die Mengen der mit diesem Primerpaar nachgewiesenen

RNA-Spezies wurde als konstant angenommen oder mit dem *rp49*-Amplifikat als Referenz quantifiziert (siehe z.B. Tab. 3.15)

2.3 Statistische Ergebnisbewertung bei genetischen Experimenten

Die Korrelation eines bestimmten Phänotyps mit einer Mutation erfolgte mittels statistischer Testverfahren. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, daß der Phänotyp zufällig ausgewählter Tiere unabhängig von der Mutation auftritt (Nullhypothese). Ist diese Wahrscheinlichkeit p kleiner als die Signifikanzgrenze (z.B. $p < 0,01$), so kann die Nullhypothese abgelehnt werden, d.h. das gemeinsame Auftreten von Mutation und Phänotyp ist statistisch signifikant belegt. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeit p erfolgte mittels zweier verschiedener Testverfahren (Ross, 2006).

2.3.1 Test binominal verteilter Gesamtheiten

Beim (t-)Test von binominal verteilten Gesamtheiten (TbvG) testet man die Nullhypothese, daß die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten des Phänotyps in der Kontrolle (meist w^{1118}_{iso}) identisch zur Wahrscheinlichkeit des Auftretens in der Mutante ist. Dabei fließt das Auftreten in der Referenz als Konstante p_0 in die unten stehende Gleichung ein, während n die Gesamtzahl der untersuchten Tiere und i die Anzahl der phänotypausprägenden Mutanten ist.

Die Wahrscheinlichkeit, daß die Nullhypothese korrekt ist, berechnet sich wie folgt:

$$p = 1 - \sum_{i=x}^n \binom{n}{i} p_0^i \cdot (1-p_0)^{n-i} \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

2.3.2 Fisher-Irwin-Test

Eine Alternative zum Test von binominal verteilten Gesamtheiten ist der Fisher-Irwin-Test, bei dem die Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese mit dem Test der Erwartungswerte in zwei Bernoulli-verteilten Gesamtheiten auf Gleichheit berechnet wird. Im Gegensatz zur binominal

verteilten Gesamtheit wird hier berücksichtigt, daß das Auftreten des Phänotyps im Wildtyp (im Experiment: Referenzstamm w^{118}_{iso}) keine Konstante ist, sondern lediglich anhand einer Stichprobe abgeschätzt wurde. Die zu testende Nullhypothese lautet, daß die Wahrscheinlichkeiten für die Ausprägung des Phänotyps in Wildtyp und Mutante gleich sind. Hierbei wird mit Hilfe folgender Gleichung die Wahrscheinlichkeit p der Nullhypothese getestet.

$$p = \left(\frac{P\{X = b+1\}}{P\{X = b\}} \right) = \frac{\binom{a+b}{a} \cdot \binom{c+d}{c}}{\binom{n}{a+c}} = \frac{(a+b)! \cdot (c+d)! \cdot (a+c)! \cdot (b+d)!}{n! \cdot a! \cdot b! \cdot c! \cdot d!} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

n = Anzahl Tiere in beiden Kreuzungen

a = Anzahl Tiere Mutante mit Phänotyp

b = Anzahl Tiere Mutante ohne Phänotyp

c = Anzahl Tiere Wildtyp mit Phänotyp

d = Anzahl Tiere Wildtyp ohne Phänotyp

3. Ergebnisse

3.1 Generierung und Analyse isoformspezifischer *mod(mdg4)*-Mutanten

Der Locus *modifier of mdg4* wurde in zahlreichen genetischen Assays anhand von Mutationen identifiziert (siehe Einleitung). Meist handelt es sich dabei um Mutanten des gemeinsamen Teils des Gens, die sich auf alle Isoformen auswirken. Eine Zuordnung der Funktion einzelner Isoformen ist so nicht möglich. Mutationen im spezifischen Teil des Gens, die einzelne oder Gruppen von Isoformen betreffen, sind nötig, um dieses Ziel zu erreichen. Die Analyse von spezifischen Mutationen für zwei Isoformen (*mod(mdg4)*-67.2 und *mod(mdg4)*-56.3; Gerasimova *et al.*, 1995; Gause *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2006), führte zur Aufklärung der Funktion der betreffenden Isoformen. Da die Funktion der anderen Isoformen unbekannt ist bzw. aus den pleiotropen Phänotypen der Mutationen des gemeinsamen Teils nicht zugeordnet werden kann, sollte ein phänotypunabhängiger genetischer Ansatz zur funktionellen Analyse des Locus gewählt werden. Durch die Mobilisierung von zwei im spezifischen Teil des *mod(mdg4)*-Locus inserierten *P*-Elementen sollte eine Serie überlappender Deletionen isoliert und molekularbiologisch charakterisiert werden. Die anschließenden genetischen Analysen des Mutantenmaterials sollten Rückschlüsse auf die Funktion und funktionelle Differenzierung zwischen den Isoformen (und eventuelle Redundanzen) ermöglichen.

3.1.1 Mobilisierung der *P*-Elemente *P{RS5}-5-HA-1224* und *P{KG}08515*

Das *P*-Element *P{RS5}-5-HA-1224* ist an Position 14.834 (3R:17.191.073) des *mod(mdg4)*-Locus inseriert, zwischen den isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-54.7 und -58.0. *P{RS5}-5-HA-1224* ist homozygot lebensfähig und w^+ -markiert; der genetische Hintergrund ist w^{1118}_{iso} .

Wegen seines Insertionsortes wurde das *P*-Element mehrfach mit dem Ziel mobilisiert, Deletionen im Bereich der isoformspezifischen Exons zu erzeugen (siehe 2.1.4). Durch Einwirkung einer eingekreuzten Transposase auf das *P*-Element wird dieses (auch) in Keimbahnzellen ausgeschnitten und an anderer Position wieder eingefügt. Der Ausbau, die Mobilisierung des *P*-Elements geschieht dabei nicht immer exakt, sodaß es zu genomischen Deletionen und anderen Mutationen kommen kann. Durch Kreuzung mit einem Balancer-Stamm für das dritte Chromosom, auf dem der *mod(mdg4)*-Locus liegt, können die

Chromosomen stabilisiert werden, von denen das *P*-Element erfolgreich mobilisiert wurde und die nun keinen w^+ -Marker mehr tragen. Hierzu wurden unter den aus der Mobilisierung hervorgehenden weißäugige bzw. w^- -Tiere, Revertanten, selektiert.

Desweiteren wurde das *P*-Element *P{KG}08515* – an Position 20.524 des *mod(mdg4)*-Locus (3R:17.185.383) – in einem umfangreichen Experiment mobilisiert. Das *P*-Element ist zwischen den isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-67.2 und *mod(mdg4)*-55.7 lokalisiert. Vor der Mobilisierung wurden Rekombinationskreuzungen durchgeführt mit dem Ziel, eine stark ausgeprägte, *second site*-bedingte, rezessiv semiletale Mutation vom Chromosom zu entfernen.

Die aus den Mobilisierungen erhaltenen Revertanten wurden durch eine PCR mit flankierenden genomischen und *P repeat*-Primern (siehe 2.1.4) in vier Gruppen eingeteilt: Als (1) Umbau im Element wurde definiert, wenn beide *P*-Elementenden mittels PCR nachweisbar waren. Bei einem (2) einseitigen Ausbau bleiben 5'- oder 3'-*P*-Elementende erhalten. Auf der jeweils anderen Seite des *P*-Elements erfolgt ein exakter Ausbau ohne Deletion angrenzender genomischer Sequenz. Nach einem (3) exakten Ausbau ist in homozygoten Tieren dem Element unmittelbar benachbarte genomische Sequenz nachweisbar. Eine (4) Deletion liegt vor, wenn mit den verwendeten Primern kein oder ein kleineres PCR-Produkt erhalten wurde.

Anschließend wurden für Revertanten mit Deletion und, da mit dieser PCR (siehe 2.1.4) eine Deletion genomischer Sequenz bei gleichzeitigem Erhalt eines *P*-Elementfragments nicht ausgeschlossen werden kann, mit einseitigem Ausbau stabile Linien etabliert und im homozygoten Zustand genauer molekular charakterisiert. Nach ausführlicheren PCR-Analysen wurden Revertanten mit erhalten gebliebenen *P*-Elementresten und gleichzeitiger Deletion genomischer Sequenz ebenfalls in die Kategorie Deletion eingruppiert.

Umfang und Ergebnisse dieser *Jump out*-Experimente sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1 (nächste Seite) Ergebnisse der Mobilisierungsexperimente von *P{RS5}-5-HA-1224* und *P{KG}08515*. Revertanten: fertile w^- -Tiere; Umbau: beide *P*-Elementenden erhalten; einseitiger Ausbau: ein *P*-Ende bleibt erhalten, auf anderer Seite exakter Ausbau; exakter Ausbau: bei Mobilisierung Wiederherstellung der Wildtypsequenz; Deletion: unexakte Mobilisierung, die in ein- oder beidseitiger Deletion genomischer Sequenz resultiert, ein *P*-Ende kann erhalten geblieben sein; Bezeichnung: experimentspezifische Bezeichnung der Revertanten (siehe Abb. 3.1). In Klammern: Prozent Ausnahmetiere, die in die entsprechende Gruppe fallen und in letzter Spalte relative Ausbeute von Deletionen relativ zur Anzahl Revertanten.

Bezeichnung des Experiments	Revertanten / Kreuzungen gesamt	Umbau	Art der Mutation		
			exakter Ausbau	einseitiger Ausbau	Deletion (und Bezeichnung)
<i>P{RS5}-5-HA-1224</i>					
März 2003	131/200	46 (35%)	69 (53%)	11 (8%)	5 (Rev...; 4%)
Dezember 2003	521/750	233 (45%)	239 (46%)	40 (8%)	9 (mit Zahl bezeichnet; 2%)
R-Stämme (Okt. 2005)	348/350	153 (44%)	162 (47%)	26 (7%)	7 (R ...; 2%)
<i>P{KG}08515</i>					
GG-Experiment Sommer 2006	281/938	196 (70%)	35 (13%)	32 (11%)	18 (GG ...; 6%)

Die Mobilisierung von *P{KG}08515* wurde mit einer Defizienz des *P*-Element-Insertionsortes auf dem homologen Chromosom durchgeführt (siehe 2.1.4). Nach Engels *et al.* (1990) sollte dabei ein höherer Anteil von deletionserzeugenden Mobilisierungsereignissen auftreten. Zwar ist die Anzahl der durchgeführten Mobilisierungsexperimente nicht ausreichend für belastbare statistische Aussagen, jedoch fällt im Vergleich zu den Experimenten mit *P{RS5}-5-HA-1224* die höhere Ausbeute von Deletionen auf. Gleichzeitig steigt der Prozentsatz von Umbauten bei weniger exakten Ausbauten (siehe Tabelle 3.1). Ein daraufhin eingeleitetes Experiment mit *P{RS5}-5-HA-1224* ergab jedoch keine Deletion genomischer Sequenz (200 Kreuzungen, „Z-Stämme“, Daten nicht gezeigt).

In den folgenden Kapiteln wird die molekularbiologische Analyse der erzeugten Revertanten beschrieben. Zugunsten besserer Übersicht und Verständlichkeit werden die Mutationen in Kurzform benannt, z.B. Rev31 statt *mod(mdg4)^{P{RS5}-5-HA-1224} Rev31* und GG295 statt *mod(mdg4)^{P{KG}08515} Rev GG295*.

3.1.2 Molekularbiologische Analysen der Revertanten

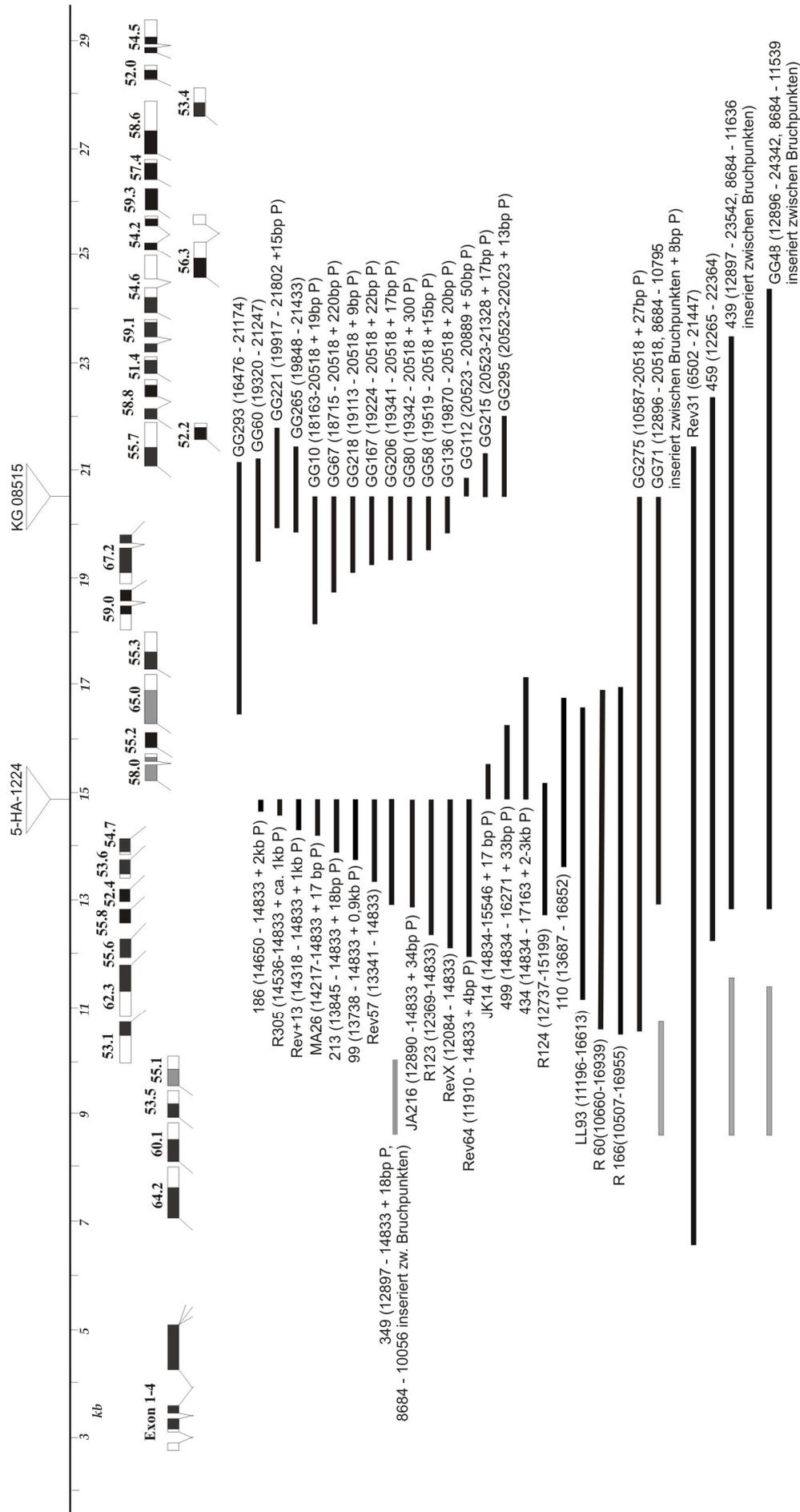
3.1.2.1 Bestimmung der Deletionsbruchpunkte

Von Revertanten, bei denen infolge unexakten *P*-Elementausbaus genomische Sequenz deletiert worden war, wurden balancierte Linien aufgebaut und diese auf das Auftreten homozygoter Tiere hin untersucht. Zur Charakterisierung der Deletionen wurde genomische

DNA der homozygoten Revertanten bzw., bei rezessiver Letalität der zu analysierenden Mutation, DNA transheterozygoter Tiere als *template* für PCR-Analysen eingesetzt. Zunächst wurden kleine Sequenzabschnitte in verschiedenen Abständen zur ursprünglichen *P*-Elementinsertionsstelle amplifiziert um herauszufinden, ob die jeweiligen Primerbindestellen innerhalb oder außerhalb des deletierten Bereichs liegen. Im Anschluß wurden Primer aus den der Insertionsstelle nächstliegenden Amplicons, bei denen die PCR erfolgreich war, für eine deletionsüberspannende PCR verwendet. Das PCR-Produkt wurde kloniert und sequenziert. Durch einen Vergleich mit der Wildtypsequenz von *mod(mdg4)* (blast2seq; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) konnten die exakten Bruchpunkte der jeweiligen Deletion bestimmt werden. In Abbildung 3.1 sind die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Deletionen abgebildet. Die ebenfalls in der Abbildung aufgeführten Revertanten MA26, LL93, JA und JK wurden im Rahmen eines unabhängigen Experiments (Studentenpraktikum) erzeugt, aber im Rahmen dieser Arbeit molekular charakterisiert.

In 27 der 41 Revertanten konnten noch Reste des ursprünglichen *P*-Elements nachgewiesen werden. Bei sieben dieser Revertanten ist ausreichend *P*-Elementsequenz vorhanden, daß diese als Promotor wirken kann (vgl. Abb. 3.2, Tab. 3.3 und Anhang A2.1), was bei der funktionellen Analyse der locusinternen Transkriptionseinheiten berücksichtigt werden muß. Bei zwei *P{RS5}-5-HA-1224*-Revertanten (349, 439) und zwei *P{KG}08515*-Revertanten (GG48, GG71) kam es zu einer partiellen Duplikation des *mod(mdg4)*-Locus (graue Balken in Abb. 3.1). Die duplizierte Sequenz, die in allen drei Fällen mit Base 8684 beginnt, ist zwischen den Bruchpunkten der Deletionen eingefügt. Aufgrund der veränderten Struktur des Locus und der Duplikation von zwei bzw. drei isoformspezifischen Exons in den vier betroffenen Genotypen wurden diese nicht für weitere Analysen im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Abbildung 3.1 (folgende Seite) Durch Mobilisierung von *P{RS5}-5-HA-1224* und *P{KG}08515* entstandene Revertanten mit genomischen Deletionen. Die schwarzen Balken verdeutlichen die Ausdehnung der Deletionen, deren Bruchpunkte (locusinterne Skala) und ggf. die Länge zurückgebliebener *P*-Elementsequenz in Klammern hinter der Bezeichnung der Revertanten angegeben sind. Die grauen Balken geben duplizierte Sequenz an.



3.1.2.2 Expressionstests & Promotorenidentifizierung

Sowohl die Struktur des *modifier of mdg4*-Locus (siehe Abb. 3.1) als auch Transgenanalysen deuten darauf hin, daß die Transkription der Isoformen des Locus durch multiple Promotoren reguliert wird (Dorn *et al.*, 2001; Gabler *et al.*, 2005). Die mittels der *P*-Elementmobilisierungen erhaltenen Revertanten erlauben den funktionellen Nachweis der Promotorelemente. Auf Basis der exakt bestimmten Deletionsbruchpunkte der Revertanten sollte untersucht werden, welche Isoformen außerhalb der deletierten Bereiche ebenfalls nicht mehr exprimiert wurden. Der Ausfall der Isoformen und die erhaltenen Expressionsmuster können auf die Deletion des Promotors der Transkriptionseinheit zurückgeführt werden. Dessen Position kann durch konservierte DNA-Motive – in der Regel zwei CAAT-Motive, gefolgt von einer TATA-Box (T A T A A/T) – bestimmt werden.

Von je ca. 20 5-7 Tage alten, homozygoten Weibchen wurde Gesamt-RNA isoliert. Rezessiv letale Mutationen wurden gekreuzt, um transheterozygote Tiere zu erhalten, deren Genotyp Analysen zur Position und Funktion der (im Überlappungsbereich beider Allele vermuteten) Promotoren zuläßt. Mittels RT-PCRs wurde die Expression der die Deletion umgebenden *mod(mdg4)*-Isoformen in den Revertanten untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.2 und 3.3 zusammengefaßt.

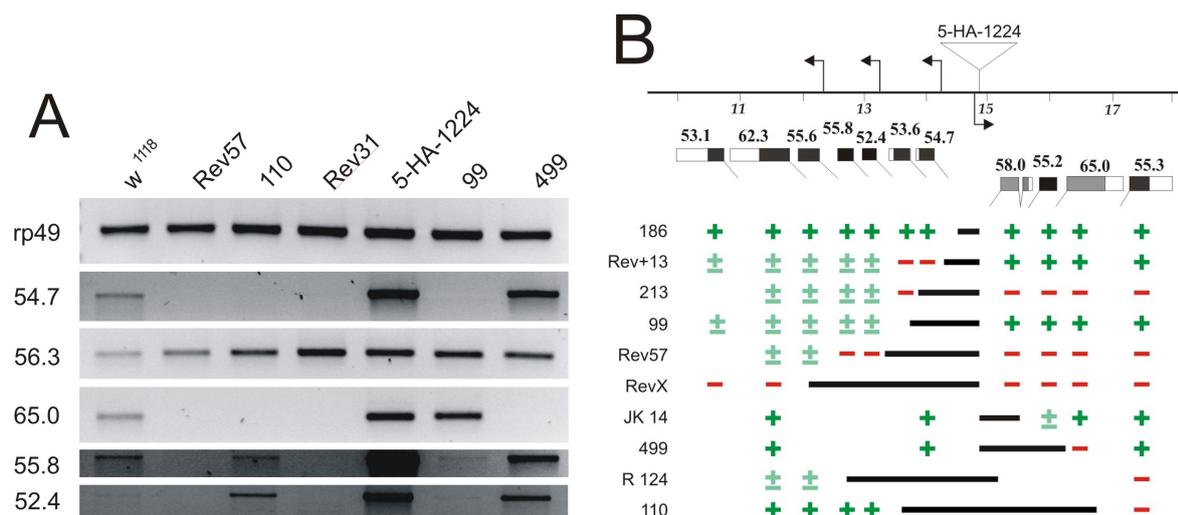


Abbildung 3.2 (A) Semiquantitativer Nachweises von *mod(mdg4)*-Isoform-mRNAs in homozygoten Revertanten von *P{RS5}-5-HA-1224* mittels RT-PCR. Die Positionen der isoformspezifischen Exons sind in Abbildungsteil B dargestellt. *mod(mdg4)*-56.3 liegt außerhalb des untersuchten Bereichs und diente neben *rp49* (*housekeeping*-Gen) als Kontrolle. (B) Zusammenfassung der Expressionsanalyse +: Amplifikat vergleichbar Kontroll-RNA; ±: Bande

deutlich schwächer im Vergleich zu Kontroll-RNA; -: kein Amplifikat in RT-PCR; auf der Skala (in kb, locusinterne Positionen) über der Exon-Intron-Struktur des betreffenden Bereichs im *mod(mdg4)*-Locus sind die Positionen der vier identifizierten Promotorelemente als abgeknickte Pfeile dargestellt.

Vergleicht man die RT-PCR-Ergebnisse der Isoformen *mod(mdg4)*-58.0 bis -55.3 in den Revertanten JK14 und 499 (Spleißakzeptor von *mod(mdg4)*-65.0 ist deletiert) einerseits mit denen der Revertanten 213, Rev57 und RevX andererseits, kann man die Position des Promotors, der die Transkription der vier betroffenen Isoformen treibt, *upstream* des Insertionsortes von *P{RS5}-5-HA-1224* eingrenzen (Promotor #7, siehe Tab. 3.3).

Ein Vergleich der Expressionsmuster von *mod(mdg4)*-58.0 bis -55.3 in verschiedenen Revertanten mit gleichem distalen Bruchpunkt (=Insertionsort von *P{RS5}-5-HA-1224*) – Promotor #7 ist in allen betrachteten Revertanten deletiert – zeigt einen diametralen Unterschied: Die Revertanten 186, Rev+13 und 99 einerseits bilden die Isoformen mindestens auf Wildtypniveau während die Revertanten 213, Rev57 und RevX keine Expression zeigen. Der Grund hierfür ist *P*-Elementsequenz, die bei der Mobilisierung von *5-HA-1224* zurückgeblieben ist. Sie beinhaltet im Fall der Revertanten 186, Rev+13 und 99 das 5' *P*-Elementende und einen Teil des 3'Exons des *white*-Markers (Golic und Golic, 1996), jedoch nicht den im *P*-Element enthaltenen Hitzeschock-Promotor. Trotzdem kann diese Sequenz in Richtung *P*-Element → 31bp-TIR (*terminal inverted repeat*) → isoformspezifisches Exon von *mod(mdg4)*-58.0 als Promotor wirken. Damit stehen die Isoformen *mod(mdg4)*-58.0 bis -55.3 nicht mehr unter der Kontrolle des endogenen Promotors, sondern werden im Falle des intakten *P{RS5}-5-HA-1224* und in Revertanten, bei denen das 5'Ende des *P*-Elements erhalten blieb, ektopisch transkribiert. Obwohl die RT-PCRs zur Promotoridentifikation die Expression der untersuchten *mod(mdg4)*-Isoformen nur semiquantitativ darstellen, läßt sich eine im Vergleich zur Kontrolle stärkere Expression beobachten (vgl. Abb. 3.2 (A), RT-PCRs für *mod(mdg4)*-65.0). In die entgegengesetzte Richtung ist diese Wirkung noch wesentlich deutlicher (siehe Abb. 3.2 (A): *P{RS5}-5-HA-1224* und Revertante 499 im Vergleich mit w^{1118}_{iso} bei den Isoformen *mod(mdg4)*-54.7, -52.4 und -55.8). Die Promotorwirkung eines *P{RS}*-Elements konnte auch in *CB-6686-3* belegt werden, einer Insertion (*P{RS3}*) in das erste Exon von *mod(mdg4)* (siehe Anhang A2.1).

Der zweite identifizierte Promotor befindet sich in Transkriptionsrichtung *upstream* des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-54.7 (Promotor #6, siehe Tab. 3.3). Der Promotor bzw. essentielle Bestandteile desselben befinden sich zwischen den proximalen Bruchpunkten

der Revertanten Rev+13 und 186, also zwischen den Positionen 14.536 und 14.650 (siehe Abb. 3.2 (B)).

Der dritte Promotor (#5) befindet sich zwischen den isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-53.6 und -52.4. Seine Aktivität wird durch den Vergleich der RT-PCR-Ergebnisse der Revertanten 99, 213 und 110 einerseits und Rev57 andererseits belegt.

Der vierte mit diesen Experimenten identifizierte Promotor (#4) befindet sich in Transkriptionsrichtung *upstream* des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-55.6, wie die Gegenüberstellung der Resultate der RT-PCRs von Rev57 und RevX (Abb. 3.2 (B)) zeigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in der Umgebung des Insertionsortes von *P{RS5}-5-HA-1224* vier Promotorelemente identifiziert wurden, die sich bezogen auf die jeweilige Transkriptionsrichtung 5' seits der Isoformen *mod(mdg4)*-55.6, -52.4, -54.7 und -58.0 befinden (Promotoren #4, 5, 6 und 7 in Tab. 3.3). Die Deletion eines Promotorelements führt zum Expressionsverlust der spezifischen Exons, die von diesem Promotor ausgehend transkribiert werden, auch wenn die Exons physisch intakt sind.

Die Promotoren #6, 5 und 4, die jeweils 5' der *trans*-Spleißakzeptoren von *mod(mdg4)*-54.7, -52.4 und -55.6 identifiziert wurden, könnten Haupt- (#6) und interne Promotoren einer Transkriptionseinheit sein, oder es handelt sich um drei unabhängige Transkriptionseinheiten mit Transkriptionsstopsignal am jeweiligen 3'Ende. Dies wurde mittels Real-time RT-qPCR untersucht (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2 Real-time RT-qPCR-Analyse ausgewählter *mod(mdg4)*-Isoformen an homozygoten Revertanten von *P{RS5}-5-HA-1224*. Angegeben sind $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Isoform-mRNA mit Standardabweichung (siehe 2.2.5). Je größer die Zahlen, desto geringer die mRNA-Menge im Vergleich zum Standard, der Summe aller *mod(mdg4)*-mRNAs (Amplifikat im gemeinsamen Teil). n.b.: nicht bestimmt

Genotyp	Isoform		
	<i>mod(mdg4)</i> -53.6	<i>mod(mdg4)</i> -52.4	<i>mod(mdg4)</i> -62.3
<i>w¹¹¹⁸_{iso}</i>	0 ± 0,47	0 ± 0,17	0 ± 0,47
186	0 ± 0,48	-0,3 ± 0,12	n.b.
99	n.b.	>13 ¹	3,2 ± 0,52
213	n.b.	>13 ¹	6,9 ± 0,45
Rev57	n.b.	>13 ¹	5,8 ± 0,33
110	n.b.	2,2 ± 0,68	n.b. ²

¹ Aufgrund geringer Expression dieser Isoform in Kombination mit starker Herunterregulation war eine Quantifizierung mittels Real-time RT-qPCR bei diesen Revertanten nicht möglich, da Ct-Werte >35 ermittelt wurden bzw. die Änderung der Ct-Werte nur gering mit der Variation der RNA-Menge korrelierte ($R \ll 0,98$).

² experimentell mehrfach mißglückt, nicht nochmals wiederholt

Die Untersuchung der Revertante 186 zeigte, daß sich die mRNA-Mengen der untersuchten *mod(mdg4)*-Isoformen nicht von denen im verwendeten Referenzstamm w^{1118}_{iso} unterscheiden. Real-time RT-qPCRs zur Quantifizierung der mRNA-Mengen von *mod(mdg4)*-52.4 und *mod(mdg4)*-55.8 (nicht gezeigt) waren bei Revertanten, deren Deletion größer war als bei 186, nicht erfolgreich (kein nachweisbares Amplifikat; außer Revertante 110). So kann lediglich die Aussage getroffen werden, daß beide Isoformen in ihrer Expression stark herunterreguliert wurden. In nichtquantitativen RT-PCRs konnten die mRNAs der Isoformen nur mittels *nested* PCR nachgewiesen werden (insgesamt 70 Zyklen), was für einen schwachen oder nur in wenigen Geweben aktiven Promotor #5 (in Transkriptionsrichtung 5' des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-52.4) spricht.

Die Revertanten 99 und 213 mit deletiertem Promotor *upstream* des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-54.7 zeigen keine Expression von *mod(mdg4)*-54.7 und -53.6 sowie eine stark verminderte Expression von *mod(mdg4)*-52.4 und -55.8. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich bei den vier isoformspezifischen Exons um eine einzige Transkriptionseinheit handelt. Die Alternative, eine Deletion einer wichtigen regulatorischen Sequenz für den Promotor #5 *upstream* von *mod(mdg4)*-52.4 im Falle der Revertanten 99 und 213 ist unwahrscheinlich, zieht man auch die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCRs von Revertante Rev+13 heran (siehe Abb. 3.2 (B)). Bei dieser Mutante ist lediglich die erste CAAT-Box des Promotors #6 *upstream* von *mod(mdg4)*-54.7 deletiert (zweite CAAT- und TATA-Box blieben erhalten) was zum Ausfall dieser und der folgenden Isoform *mod(mdg4)*-53.6 führt. Die Expressionshöhen von *mod(mdg4)*-52.4 und -55.8 sind gleich den bei den Revertanten 99 und 213 ermittelten.

Die gemessene *mod(mdg4)*-52.4-mRNA-Menge der Revertante 110 ist trotz ähnlichem proximalen Bruchpunkt und größerer distaler Ausdehnung der Deletion viel höher als bei den Revertanten 99, 213 und Rev57. Damit korreliert die Nicht-Ausprägung von Phänotypen, die sich bei den genannten Vergleichsrevertanten zeigen und die auf den Ausfall bzw. verringerte Expression der Isoformen *mod(mdg4)*-54.7 bis -53.1 eingegrenzt wurden (siehe 3.1.3). Als Ursache kommen die Deletion einer negativ regulatorischen Sequenz im Bereich zwischen dem Insertionsort von *P{RS5}-5-HA-1224* an Position 14.834 (3R:17.191.073) und dem distalen Bruchpunkt (Pos. 16.852) der Revertante oder eine partielle Duplikation des Locus in Frage.¹⁴ Da eine in Ausdehnung, Position der Bruchpunkte und Expressionsmuster

¹⁴ Hier sind nicht partielle Duplikationen zwischen den Deletionsbruchpunkten wie in den Revertanten 349, 439, GG71 und GG48 gemeint. Alle Deletionen wurden sequenziert und mehrfach durch PCR mit deletionsüberspannenden Primern überprüft. Vermutet wird stattdessen die Insertion der entsprechenden isoformspezifischen Exons an anderer Stelle im Genom wie in Dörfel (2007) beschrieben.

vergleichbare Revertante fehlt, sind die mit dieser Revertante erhaltenen Daten nicht unabhängig überprüfbar.

Aus den Real-time RT-qPCRs zur Bestimmung der *mod(mdg4)*-62.3-Transkriptmenge in den Revertanten 99, 213 und Rev57 (Tab. 3.2) lassen sich keine Erkenntnisse gewinnen, ob die isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-55.6, -62.3 und -53.1 eine separate Transkriptionseinheit bilden oder ob sie Teil der oben beschriebenen sind, die dann die fünf isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-52.4 bis -53.1 enthielte. Auffällig ist jedoch, daß bei Revertante 99 – obwohl in ihrer Ausdehnung größer als 213 – mehr mRNA der analysierten Isoform gebildet wird. Vermutlich ist hierfür wiederum der Rest des *P*-Elements verantwortlich was auch den etwas erhöhten Wert für *mod(mdg4)*-52.4 bei Revertante 186 erklären würde, die ebenfalls einen *P*-Elementrest enthält (siehe Abb. 3.1). Damit ist für *P{RS5}*-5'-Fragmente eine Promotor- bzw. transkriptionsaktivierende Aktivität bestätigt. Diese wirkt aus dem *P*-Elementrest in Richtung über den deletierten Bereich hinweg in die dahinter liegende genomischen Sequenz (31bp-TIR → *P*-Elementrest → Sequenz „jenseits“ der Deletion).

Mit Hilfe der *P{RS5}*-5-*HA-1224*-Revertanten ließen sich vier intragenische Promotoren im Bereich um den Insertionsort des *P*-Elements identifizieren. Dagegen wurden die bei der Mobilisierung von *P{KG}08515* entstandenen Revertanten zur Identifizierung von intragenischen Promotoren im 3' Bereich des Locus genutzt. Die Ergebnisse dieser RT-PCRs zur Promotoranalyse sind im folgenden dargestellt (Abb. 3.3).

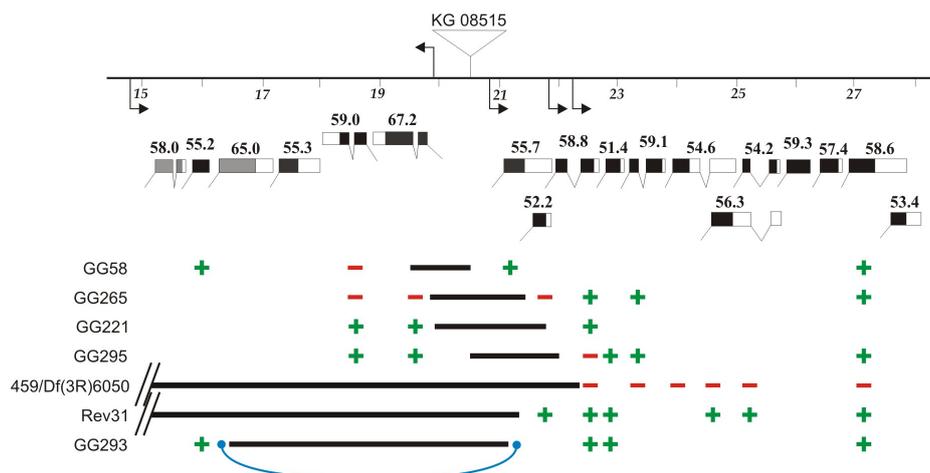


Abbildung 3.3 Semiquantitativer Nachweis von *mod(mdg4)*-mRNAs mittels RT-PCR in ausgewählten Revertanten von *P{KG}08515*, in Revertante Rev31 und in transheterozygoten *459/Df(3R)ED6050-Escapern*. Zusammenfassung der Expressionsanalyse +: Amplifikat ähnlich stark wie bei Kontroll-RNA; -: kein Amplifikat in RT-PCR; Auf der Skala (in kb, locusinterne Positionen) über der Exon-Struktur des betreffenden Bereichs im *mod(mdg4)*-Locus sind die

Positionen der vier neu identifizierten Promotorelemente als abgeknickte Pfeile dargestellt. blaue Klammer: fusionierte spezifische Exons von *mod(mdg4)*-65.0 und -55.7.

In der Umgebung der Insertionsstelle von *P{KG}08515* konnten ebenfalls vier Promotorelemente identifiziert werden (Promotoren #8, 9, 10 und 11; siehe Tab. 3.3).

Mittels der RT-PCR-Ergebnisse von GG58, GG221 und GG265 konnte der Promotor für die isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-67.2 und -59.0 (Promotor #8) identifiziert werden. Bei GG58 sind der komplette Promotor und das erste isoformspezifische Exon (Exon 5) von *mod(mdg4)*-67.2 deletiert, was zum Ausfall der Transkriptionseinheit führt, die die spezifischen Exons der Isoformen *mod(mdg4)*-67.2 und -59.0 enthält. Die Revertante GG265 weist in Bezug auf diese Transkriptionseinheit ein identisches Expressionsmuster auf. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das erste C einer CCAAT-Sequenz an Position 19.848 der locusinternen Skala im deletierten Bereich liegt. Die CAAT-Box verliert dadurch ihre Funktion (Lewin, 2000) und konnte, wegen des Ausfalls beider Isoformen, als essentiell für die Funktion des Promotors identifiziert werden.

Für den Promotor #8 konnte keine TATA-Box bestimmt werden. Die CAAT-Boxen des Promotors befinden sich bei 19.847 und 19.806. Die CCAAT-Sequenz bei Position 19.919 hat keinen Einfluß auf die Transkription der spezifischen Exons von *mod(mdg4)*-67.2 und -59.0, wie mit den RT-PCRs an GG221 (Deletion 19.917-21.802) belegt wurde.

Der Vergleich der Expressionsmuster der Revertanten GG58 und GG265 bestätigt einen Promotor *upstream* des Exons 5 von *mod(mdg4)*-55.7 (Promotor #9). Durch den Vergleich von GG265 und GG221, bei denen eine Expression der Isoform *mod(mdg4)*-58.8 nachweisbar ist, mit GG295 (siehe Abb. 3.3) konnte ein weiterer Promotor *upstream* des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-58.8 (Promotor #10) identifiziert werden.

Von GG295, deren distaler Bruchpunkt im Exon 5 der Isoform *mod(mdg4)*-58.8 liegt, wird keine *mod(mdg4)*-58.8-mRNA mehr gebildet (siehe Abb. 3.3), wohl aber mRNAs der weiter distal codierten Isoformen, was auf einen weiteren Promotor in diesem Bereich schließen läßt. Dieser Promotor (#11) befindet sich im Exon 5 und Intron zwischen Exon 5 und 6 von *mod(mdg4)*-58.8. Er wird in Revertante 459 deletiert, was zum Ausfall aller getesteten Isoformen bis hin zum 3'Ende des Locus führt. Da Revertante 459 rezessiv letal ist, wurde für die RT-PCRs Gesamt-RNA von transheterozygoten *459/Df(3R)ED6050*-Tieren verwendet (in der Defizienz *Df(3R)ED6050* werden die 20 distalen isoformspezifischen *mod(mdg4)*-Exons deletiert; siehe auch 2.1.5).

Eine Besonderheit der vom Promotor #11 ausgehenden Transkriptionseinheit ist, daß der erste in der prä-mRNA vorhandene Spleißakzeptor der des Exons 6 von *mod(mdg4)*-58.8 ist.

Mittels RT-PCR wurde nachgewiesen, daß es an dieser Position nicht zum *trans*-Splicing mit den gemeinsamen Exons 1-4 kommt (,-' am 3'Ende der Deletion von GG295 in Abb. 3.3). Die Festlegung dieser Splice-Akzeptor-Site auf *cis*-Splicing bzw. ihre Unfähigkeit, *in trans* zu spleißen, konnte aufgrund des Mangels vergleichbarer molekularer Situationen nicht eingehender untersucht werden.

Aus der Position des Promotors #11 innerhalb des spezifischen Teils der Isoform *mod(mdg4)*-58.8 kann abgeleitet werden, daß es sich hier um einen internen Promotor handelt, dem kein Transkriptionsstoppsignal vorausgeht. Die Transkriptionseinheit, in der er sich befindet, beginnt *upstream* von *mod(mdg4)*-55.7 oder -58.8 (Promotoren #9 oder #10). Die Funktion des Promotors #11 liegt demzufolge in einer Verstärkung der Transkription der isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-51.4+folgende oder in der Expression dieser Isoformen in Geweben, in denen die Promotoren #9 und/oder #10 nicht aktiv sind.

Die Analyse der Mutante GG293 zeitigte keine Information über intragenische Promotoren im spezifischen Teil des *mod(mdg4)*-Locus, ist jedoch in anderer Hinsicht interessant: Die Deletion in dieser Revertante erstreckt sich vom spezifischen Exon der Isoform *mod(mdg4)*-65.0 bis in das von -55.7, was zu einer Fusion beider Exons führt. Der *trans*-Spleißakzeptor des Fusionsexons wurde um 7bp in Richtung gemeinsamer Exons 1-4 verschoben, vermutlich aufgrund der Deletion einer regulatorischen Sequenz, die die korrekte Position der *trans*-Splice-Site beeinflusst. Als Ergebnis ist der Leserahmen der Isoform verschoben, wie in Abb. 3.4 gezeigt.

398 (aa)	...	N	T	E	A	Q	E	S	R	S	K
1192 (nt)	...	AAC	ACA	GAG	GCT	CAA	GAG	TCA	AGA	TCA	AAA
408		W	S	L	R	R	R	L	G	T	H
1222		TGG	AGC	CTT	CGC	CGA	CGC	CTG	GGC	ACT	CAT
418		R	M	L	L	W	P	P	L	P	S
1252		CGG	ATG	CTG	CTG	TGG	CCG	CCC	TTG	CCG	TCA
428		P	T	.							
1282		CCT	ACT	TAA	GCG	ACG	AGG	...			

Abbildung 3.4 Ausschnitt der mRNA-Sequenz (nt) mit Aminosäure-Übersetzung (aa) der Fusionsisoform aus *mod(mdg4)*-65.0 und -55.7 der Revertante GG293 N: Exon 4; N: 7bp-Einschub in die mRNA nach Änderung der *trans*-Spleißakzeptorposition; N: Sequenz isoformspezifisches Fusionsexon; .: Stopcodon

Neben der Entstehung einer neuen, wahrscheinlich nicht funktionellen Isoform ist auch die Regulation des Locus in dieser Mutante verändert. Mindestens das spezifische Exon der Isoform *mod(mdg4)*-52.2 steht nun unter der transkriptionellen Kontrolle des Promotors #7

statt des Promotors #9. Wenn die 14 distalen isoformspezifischen Exons (ab *mod(mdg4)*-55.7 bzw. *downstream* von Promotor #9) eine Transkriptionseinheit bilden, es also *upstream* des Exons 5 von *mod(mdg4)*-58.8 keinen Transkriptionsstop gibt, dann werden in GG293 alle distalen Exons zwar immer noch dort transkribiert, wo die Promotoren #10 und #11 aktiv sind, stehen aber nun nicht mehr unter Kontrolle des Promotors #9 sondern statt dessen unter der Kontrolle des Promotors #7. Da beide Promotoren vermutlich nicht zur gleichen Zeit in den gleichen Geweben aktiv sind, ist die Folge eine ektopische Expression aller Isoformen ab *mod(mdg4)*-52.2.

Mit Hilfe der Revertanten, die bei den Mobilisierungen von *P{RS5}-5-HA-1224* und *P{KG}08515* erzeugt wurden, konnten insgesamt acht intragenische Promotoren identifiziert werden. Transkriptionseinheiten, die zwei (Promotor #8) bis zu 14 isoformspezifische Exons codieren (Promotor #9), stehen unter ihrer Kontrolle. Tabelle 3.3 faßt die wichtigsten Informationen über die identifizierten Promotoren zusammen.

Zwei weitere intragenische Promotoren *upstream* des isoformspezifischen Exons der Isoformen *mod(mdg4)*-64.2 und -60.1 waren mit den vorhandenen Revertanten experimentell nicht zugänglich. Ihre Funktionalität im *D. melanogaster-mod(mdg4)*-Locus konnte darum bisher nicht dokumentiert werden. Sie wurden mit Hilfe von *D. virilis*-Transgenen nachgewiesen (siehe 3.2.3.1). Sie sind der Übersichtlichkeit halber auch in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Die identifizierten Promotoren weisen meist (9 von 11) zwei CAAT-Boxen und eine TATA-Box (Ausnahme Promotor #8) auf. Ein *downstream promoter element* (DPE; Büchner *et al.*, 2000) konnte lediglich bei dem Promotor des gemeinsamen Teils nachgewiesen werden, bei den intragenischen Promotoren von *mod(mdg4)* ist dieses Element nicht vorhanden. In der rechten Spalte der Tabelle 3.3 sind bei einigen Transkriptionseinheiten Spannen angegeben. Diese entsprechen der genauestmöglichen Angabe zur Anzahl der isoformspezifischen Exons in der jeweiligen Transkriptionseinheit, die anhand der vorliegenden experimentellen Daten möglich war.

Tabelle 3.3 Identifizierte intragenische Promotorelemente in *mod(mdg4)*, geordnet nach Position der TATA-Box (locusinterne Skala). Die Promotoren wurden nummeriert, wobei Promoter 1 der gemeinsamen Exons ist. Relative Transkriptionsrichtung vorwärts: Transkription erfolgt in der gleichen Richtung wie die der gemeinsamen Exons 1-4; rückwärts: isoformspezifische Exons sind auf dem Gegenstrang codiert, Transkription erfolgt antiparallel zu den gemeinsamen Exons 1-4. Die Größe der Transkriptionseinheiten (Anzahl Exons 5) wurde abgeleitet aus den Ergebnissen der semiquantitativen RT-PCRs und Real-time RT-qPCRs.

Promotor (Isoformen)	Position TATA-Box	relative Transkriptionsrichtung	Anzahl Exons 5 in Transkriptionseinheit
1 <i>mod(mdg4)</i> gemeinsame Exons 1-4	2.715	vorwärts	-
2 (<i>mod(mdg4)</i> - 64.2+folgende)	7.055	vorwärts	4
3 (<i>mod(mdg4)</i> - 60.1+folgende)	7.749	vorwärts	3
4 (<i>mod(mdg4)</i> - 55.6+folgende)	12.366	rückwärts	3
5 (<i>mod(mdg4)</i> - 52.4+folgende)	13.409	rückwärts	2-5
6 (<i>mod(mdg4)</i> - 54.7+folgende)	14.272	rückwärts	2-7
7 (<i>mod(mdg4)</i> - 58.0+folgende)	14.762	vorwärts	4
8 (<i>mod(mdg4)</i> - 67.2+folgende)	-	rückwärts	2
9 (<i>mod(mdg4)</i> - 55.7+folgende)	20.969	vorwärts	2-14
10 (<i>mod(mdg4)</i> - 58.8+folgende)	21.920	vorwärts	12
11 (<i>mod(mdg4)</i> - 51.4+folgende)	22.197	vorwärts	11

Die durchgeführten Experimente waren auf die Identifikation der intragenischen Promotorelemente ausgelegt, Aufschluß über Gewebespezifität bzw. temporale Aktivität der Promotoren geben sie nicht. Für einige *mod(mdg4)*-mRNAs aus verschiedenen Transkriptionseinheiten wurde gezeigt, daß sie während der Embryonalentwicklung und Puppenphase/Metamorphose überproportional gebildet werden (siehe Anhang A2.2; Costello *et al.*, 2008; Arbeitman *et al.*, 2002).

Öffentlich zugängliche und im Rahmen dieser Arbeit aufbereitete Daten anderer Experimente (Flyatlas; Chintapalli *et al.*, 2007; siehe Abb. 3.5 und Anhang A2.2) bieten einen ersten Zugang zur Gewebespezifität der intragenischen *mod(mdg4)*-Promotoren, was für funktionelle

Analysen der Isoformen von Bedeutung sein kann. Sie belegen für adulte Tiere eine relative Überexpression aller untersuchten *mod(mdg4)*-Isoformen im Gehirn und den Ovarien. Einige Isoformen sind auch z.B. im Thorax-Abdomen-Ganglion oder den männlichen akzessorischen Drüsen hoch exprimiert.

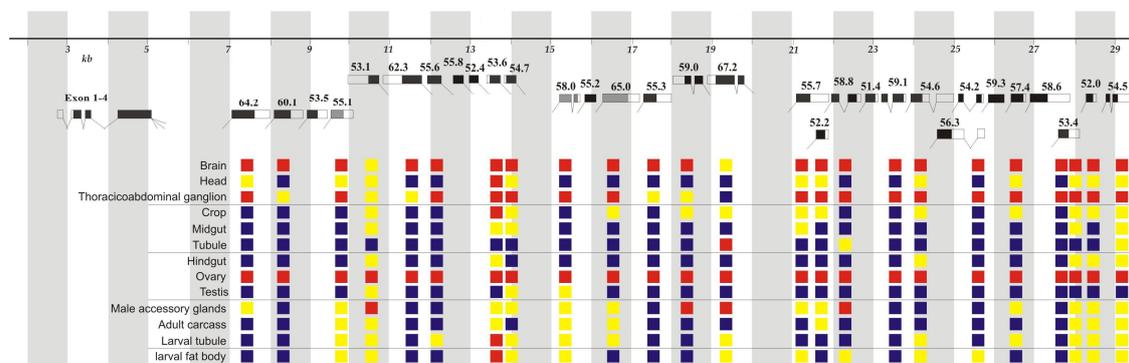


Abbildung 3.5 Übersicht der relativen *mod(mdg4)*-mRNA-Mengen in verschiedenen *Drosophila melanogaster*-Geweben. ■: hochreguliert (proportional hoher Anteil in aus Gewebe isolierter RNA gegenüber dem Anteil in RNA, die aus dem Gesamtorganismus isoliert wurde), ■: nicht-verändertes mRNA-Level, ■: herunterreguliert; zum besseren Vergleich mit den ausgewerteten Originaldaten (siehe Anhang A2.2) wurden die englischen Gewebebezeichnungen beibehalten.

3.1.3 Genetische Analysen der Revertanten

Die überwiegende Zahl bisher analysierter und publizierter *mod(mdg4)*-Mutationen betrifft den gemeinsamen Teil des Locus. Der gemeinsame Teil des Locus codiert die Exons 1-4, die in allen *mod(mdg4)*-mRNAs enthalten sind. Eine Mutation in diesem Bereich betrifft alle Isoformen und sollte sozusagen alle Phänotypen auslösen, die bei Mutationen beliebiger isoformspezifischer Exons auftreten würden. Ausnahmslos alle *loss of function*-Mutationen des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)* sind rezessiv letal. Die Letalitätsphase erstreckt sich vom Larven- bis ins Puppenstadium, was wahrscheinlich auf die maternale Komponente des Locus zurückzuführen ist (Büchner *et al.*, 2000; siehe auch Anhang A2.2, Abb. A2).

Daraus läßt sich allerdings nur ableiten, daß eine oder mehrere Isoformen des *mod(mdg4)*-Locus für die Lebensfähigkeit von *Drosophila melanogaster* essentiell ist. Genetische Analysen von Mutationen des spezifischen Teils des Gens sollten es ermöglichen, die Isoform(en) zu identifizieren bzw. einzugrenzen, deren Ausfall die rezessive Letalität verursacht.

An männlichen, adulten, homozygoten *Escaper*-Tieren von $mod(mdg4)^{neo129}$ wurde eine homöotische Transformation des Abdominalsegments A5 in A4 beobachtet (Dorn *et al.*, 1993b; Büchner *et al.*, 2000). Mit Mutationen im spezifischen Teil des Gens, die nicht die Isoform(en) betreffen, die die rezessive Letalität bedingen, sollte es möglich werden, andere Funktionen des Gens zu untersuchen, die bisher nicht entdeckt bzw. charakterisiert werden konnten. Außerdem kann die funktionelle Differenzierung der $mod(mdg4)$ -Isoformen auf diese Weise untersucht werden. Haben verschiedene Isoformen auch verschiedene, abgegrenzte Funktionen? Oder besteht zwischen ihnen eine funktionelle Redundanz, sodaß bei Ausfall einer Isoform eine andere ihre Funktion teilweise oder vollständig übernehmen kann? Hinweise auf eine Differenzierung ohne Redundanz gaben bereits immunologische Untersuchungen (Gabler, 2003 und pers. Mitteilung), entsprechende funktionelle Untersuchungen werden aber erst durch die etablierten und in ihren Expressionsmustern charakterisierten Revertanten möglich.

Zunächst wurden die *P*-Elementstämme $P\{RS5\}$ -5-HA-1224 und $P\{KG\}$ 08515 auf phänotypische Auffälligkeiten untersucht. $P\{RS5\}$ -5-HA-1224 zeigt keine erkennbaren Abnormitäten. Die Deregulation der von den Promotoren #4 bis #7 ausgehend transkribierten spezifischen Exons (siehe 3.1.2.2, Abb. 3.2 Teil A) führt demnach nicht zu sichtbaren Phänotypen. $P\{KG\}$ 08515 zeigt, abgesehen von der *second site*-bedingten, rezessiven Semiletalität (siehe 3.1.2.1), ebenfalls keine Phänotypen im Vergleich mit der Referenz (w^{118}_{iso}).

Danach wurden Komplementationen verschiedener $mod(mdg4)$ -Allele mit den Revertanten aus beiden Mobilisierungen durchgeführt um homozygot/transheterozygot auftretende Phänotypen zu identifizieren. Die bekannte Größe der Deletionen und Expressionsmuster lassen dabei Schlüsse auf die verantwortliche Isoform bzw. Transkriptionseinheit, in der sich diese Isoform befindet, zu.

3.1.3.1 Rezessive Letalität

Die rezessive Letalität als Phänotyp von Mutationen im gemeinsamen Teil des $mod(mdg4)$ -Locus (Dorn *et al.*, 1993a; Büchner *et al.*, 2000) sollte mit Hilfe des Revertantenmaterials analysiert werden. Ziel war es, herauszufinden, ob die Nicht-Expression aller $mod(mdg4)$ -Isoformen der rezessiven Letalität zugrunde liegt oder ob sich dieser Phänotyp auf eine bzw. eine Gruppe von $mod(mdg4)$ -Isoformen eingrenzen läßt. Zu diesem Zweck wurden zunächst Revertanten mit möglichst großen Deletionen untersucht.

Tabelle 3.4 Komplementation von Revertante Rev31 im Stamm und mit zwei Defizienzen *Df(3R)GC14* (Deletion des kompletten *mod(mdg4)*-Locus, für Beschreibung siehe 2.1.3) und *Df(3R)ED6050* (20 distale spezifische Exons deletiert, siehe 2.1.5). Angegeben sind homozygote bzw. transheterozygote Tiere im Verhältnis zur Gesamtzahl F1-Tiere. Die Komplementationen wurden nach Geschlechtern getrennt ausgewertet. +: $\geq 85\%$; sv: subvital, 50-85%; sl: semiletal, 5-50%; -: letal (<5%) (nach Hadorn, 1955)

Rev31 mit Allel	Komplementation ♂	Komplementation ♀
Rev31	sl 101/1040 (29%)	sl 177/1138 (47%)
<i>Df(3R)GC14</i>	sl 44/486 (27%)	sl 67/529 (38%)
<i>Df(3R)ED6050</i>	+ 98/319 (92%)	+ 105/358 (88%)

Die Revertante Rev31 (siehe auch 3.1.4), deren Deletion die 18 proximal codierten isoformspezifischen Exons umfaßt, zeigt eine starke rezessive Semiletalität, die im transheterozygoten Genotyp mit der Defizienz des gesamten *mod(mdg4)*-Locus, *Df(3R)GC14*, bestätigt wird. Die Defizienz *Df(3R)ED6050*, bei der die 20 distalen isoformspezifischen Exons deletiert sind, kann jedoch fast vollständig komplementiert werden. Damit lassen sich die Isoformen zwischen *mod(mdg4)*-58.0 und -55.7, die sowohl in Rev31 wie auch in *Df(3R)ED6050* deletiert sind, als Ursache der rezessiven Letalität ausschließen.

Ein Ausfall der Isoformen von *mod(mdg4)*-64.2 bis -55.7 (entspricht Umfang der Deletion von Rev31, siehe Abb. 3.1) verursacht eine starke Semiletalität, sodaß anhand dieser Daten allein nicht unterschieden werden kann zwischen einem additiven Effekt, bei dem die Lebensfähigkeit mit steigender Zahl ausgefallener Isoformen sinkt, und einer Isoform/Isoformengruppe im distalen Teil des Gens, die (bei Nicht-Expression) für die rezessive Letalität verantwortlich ist.

Darum wurde im weiteren die rezessiv letale Revertante 459 untersucht, bei der die distal codierten Isoformen aufgrund der Deletion des Promoters #11 nicht mehr gebildet werden können (siehe Abb. 3.3). Aus Komplementationen im Stamm und mit der *mod(mdg4)*-Defizienz *Df(3R)GC14* konnten keine homozygoten bzw. transheterozygoten Tiere erhalten werden (je ca. 400 F1-Tiere). Die Komplementation von Revertante 459 mit *Df(3R)ED6050* ergab eine Rettung von weniger als 2% (6 von 1061 F1-Tieren). Anhand der Ergebnisse dieser Kreuzungsauswertung kann die rezessive Letalität auf die Isoformen zwischen *mod(mdg4)*-58.0 und -54.5, der am weitesten distal codierten, eingegrenzt werden. Bezieht man die Resultate der Komplementation Rev31/*Df(3R)ED6050* mit ein, bleiben noch 13 Isoformen

zwischen *mod(mdg4)*-52.2 und -54.5, von denen eine oder eine Kombination mehrerer Isoformen bei funktionellem Ausfall die rezessive Letalität verursacht.

3.1.3.2 Koordinationsphänotyp

Während der Experimente zur Eingrenzung der potentiell für die rezessive Letalität verantwortlichen *mod(mdg4)*-Isoform wurde ein bisher für *mod(mdg4)* nicht beobachteter Phänotyp identifiziert: Bei den Revertanten Rev57, RevX und Rev64 war der Aufbau einer homozygoter Linien nicht erfolgreich. Wurden mehr als zehn homozygote Tiere selektiert und untereinander gekreuzt, ließ sich die Linie maximal eine Generation erhalten. Die homozygoten Tiere starben teils schon vor den Kreuzungen, weshalb zunächst eine rezessive Letalität (<5% Überlebensrate nach Hadorn, 1955) angenommen wurde (Balschun, 2006; Dörfel, 2007).

Die Ergebnisse eines Komplementationsexperiments der genannten Revertanten mit *Df(3R)GC14*, einer Defizienz des gesamten *mod(mdg4)*-Locus, lassen jedoch lediglich eine Subvitalität (50-85% nach Hadorn, 1955) erkennen (Tabelle 3.5). Die früheren Ergebnisse, die zur Annahme der rezessiven Letalität führten, liegen wahrscheinlich in einer weniger häufigen Auszählung der schlüpfenden F1-Generation begründet (einmal täglich), da die transheterozygoten Tiere eine ausgeprägte Koordinationsschwäche ihrer Bewegungen aufweisen. Ihre Bewegungen waren langsamer und unsicherer als die der Kontrolltiere. Als Folge ihrer Unfähigkeit, sich auf dem Futter zu bewegen bzw. sich ggf. daraus zu befreien und die Gefäßwand zu erklettern, starben die Tiere letztlich an Erschöpfung (vermutlich) und versanken im Futter. Der Effekt war bei homozygoten und *Df(3R)GC14*-transheterozygoten Tieren zu beobachten. Bei der Revertante 110, die als Kontrolle diente, trat dieser Phänotyp nicht auf.

Tabelle 3.5 Komplementation der *mod(mdg4)*-Defizienz *Df(3R)GC14* mit verschiedenen *P{RS5}-5-HA-1224*-Revertanten. Gekreuzt wurden TM6C-balancierte Männchen der Revertantenlinien mit Weibchen der TM6C-heterozygoten Defizienz. Als Zahlenwerte festgehalten sind: transheterozygote Tiere/Gesamtzahl F1-Tiere. +: $\geq 85\%$; sv: subvital, 50-85%; sl: semiletal, 5-50%; -: letal (<5%) (nach Hadorn, 1955)

Revertante	Komplementation mit ♀ <i>Df(3R)GC14</i>
110	+ 208/602 (104%)
Rev57	sv 449/1700 (79%)

RevX	sv 127/490 (78%)
Rev64	sv 594/2162 (82%)

Der beobachtete Effekt auf die Bewegungskoordination war zu 100% penetrant, ließ sich in seiner Schwere aber nicht mittels Klettertest (*climbing assay*) bzw. Lauftests quantifizieren, da keines der beobachteten Tiere in der Lage war, eine senkrechte Gefäßwand zu erklimmen (gestörter Haftreflex) bzw., auf ein Gitter zur Distanzmessung gesetzt, sich kaum bewegte.

Die Lebensspanne scheint bei den untersuchten Revertanten nicht beeinträchtigt zu sein. Wurden die homozygoten bzw. *Df(3R)GC14*-transheterozygoten Tiere nach Geschlechtern getrennt in liegenden statt stehenden Röhrchen gehalten, war die Lebensspanne mit der Kontrolle w^{1118}_{iso} vergleichbar. Die Trennung der Tiere nach Geschlecht war notwendig, da bei Haltung homozygoter Tiere beider Geschlechter in einem Röhrchen mit einiger Penetranz der *stuck-like*-Phänotyp (siehe 3.1.3.4) auftrat, was zu einer verkürzten Lebensdauer führte.

Des Weiteren zeigten mit *Df(3R)GC14* transheterozygote Männchen der Revertanten in Kreuzungen mit w^{1118}_{iso} normale Fertilität, Weibchen jedoch eine stark verminderte Fertilität. Die gleichen Effekte traten bei Kreuzung homozygoter Tiere auf. Aus Abbildung 3.5 geht hervor, daß die für die Auslösung der Phänotypen (beidgeschlechtliche) Bewegungskoordinationsschwäche und weibliche Sterilität in Frage kommenden Isoformen zwischen *mod(mdg4)*-54.7 und -53.1 sowohl im Gehirn wie auch in den Ovarien stark, in den Hoden aber wenig exprimiert sind. Dies könnte ein Indiz dafür sein, daß der Ausfall der entsprechenden Isoformen bzw. ihre geringere Expression in Weibchen neben der gestörten Bewegungskoordination zusätzlich die verminderte Fertilität auslöst, während in Männchen zwar auch die Bewegungen beeinträchtigt sind, die Fruchtbarkeit aber erhalten bleibt, da die genannten Isoformen keine essentielle Funktion bei der männlichen Reproduktion spielen.

Unklar ist jedoch, ob die Phänotypen durch die Deletion eines spezifischen Exons ausgelöst werden, oder ob verschiedene *mod(mdg4)*-Isoformen betroffen sein müssen, damit beide Phänotypen auftreten. Die Untersuchung von Revertanten mit kleineren Deletionen könnte dies klären.

3.1.3.3 Weibliche Sterilität

Zu Beginn der Analyse weiblicher Fertilität war bekannt, daß homozygote *mod(mdg4)^{neo129}*-Weibchen (*Escaper*) steril sind (Dorn *et al.*, 1993a). Zudem wurde mittels Northern Blot eine starke maternale Komponente von *mod(mdg4)* nachgewiesen (Büchner *et al.*, 2000).

Neben den in 3.1.3.2 beschriebenen Linien (Rev64, Rev57 und RevX) wurde auch bei den Revertanten 213, R124 und MA26 eine starke Semisterilität festgestellt, wenn homozygote oder transheterozygote Tiere miteinander gekreuzt wurden. Obwohl Revertante 99, deren Fertilität nicht eingeschränkt ist, eine ausgedehntere Deletion als 213 und MA26 aufweist, wird hier, vermittelt durch den verbliebenen *P*-Elementrest, unter anderem die Transkriptionseinheit des Promotors #7 (isoformspezifische Exons von *mod(mdg4)*-58.0 & folgende) transkribiert, bei 213 und MA26 nicht. Um festzustellen, ob ein Ausfall dieser vier isoformspezifischen Exons als Ursache des Phänotyps in Frage kommt, wurden weitere Revertanten getestet. In den Mutanten 434 und 499, die die Isoformen *mod(mdg4)*-58.0 bis -65.0 nicht mehr bilden können (Abb. 3.2), tritt der Phänotyp nicht auf. Allerdings wird in beiden *mod(mdg4)*-55.3 noch exprimiert. Weiterhin zeigt die Revertante GG293, deren Deletion das spezifische Exon der Isoform *mod(mdg4)*-55.3 einschließt und zum Ausfall von *mod(mdg4)*-65.0 führt (Deletionsbruchpunkt in codierender Sequenz, siehe Abb. 3.3 und 3.4), normale homozygote Fertilität. Die Revertante 110, bei der die komplette Transkriptionseinheit des Promotors #7 ausfällt (Abb. 3.2), ist ebenfalls homozygot lebensfähig und fertil⁵. Somit kann die Transkriptionseinheit *mod(mdg4)*-58.0+folgende (Promotor #7) bzw. ihr Ausfall nicht Ursache der homozygoten weiblichen Semisterilität sein.

Die Deletion der Transkriptionseinheit unter Kontrolle des Promotors #6, die die spezifischen Exons der Isoformen *mod(mdg4)*-54.7 und -53.6 umfaßt, ist den semisterilen Revertanten, aber auch den Revertanten 99 und 110, die in ihrer Fertilität nicht eingeschränkt sind, gemein. Die Unterschiede, die letztlich zur Ausprägung des Phänotyps führen, müssen demnach in der Expressionshöhe der fünf Isoformen liegen, deren spezifische Exons *downstream* des Promotors #5 liegen (*mod(mdg4)*-52.4+folgende; siehe auch Tab. 3.3 und Abb. 3.2).

Die verminderte Expression einer oder mehrerer der fünf Isoformen zwischen *mod(mdg4)*-52.4 und -53.1 führt zur beobachteten Semisterilität. Die Revertanten, die diese Isoformen vermehrt exprimieren (99, 110; siehe auch Tab. 3.2), zeigen normale Fertilität.

Der funktionelle Ausfall mindestens einer weiteren Isoform läßt die homozygoten Weibchen **vollständig** steril werden läßt: Die einzige Revertante, bei der homozygote weibliche Sterilität (wie bei homozygoter *mod(mdg4)^{neo129}*) festgestellt wurde, ist Revertante Rev31. Während sich Kreuzungen homozygoter Rev31-Männchen mit *w¹¹¹⁸_{iso}*-Jungfrauen normal entwickeln, konnten im reziproken Fall nur mit sehr geringer Frequenz Eier mit erkennbar beginnender Embryonalentwicklung identifiziert werden. Eine mikroskopische Untersuchung der Ovarien

⁵ Die Revertanten 99, 434, 499 und 110 werden seit über 20 Generationen als homozygote Linien im Labor gehalten, ohne daß Auffälligkeiten oder Beeinträchtigungen in Bezug auf die Fertilität zu beobachten sind.

homozygoter Rev31-Weibchen zeigte keine auffälligen morphologischen Veränderungen (Dorn, pers. Mitteilung).

In Rev31 unterliegen alle gebildeten *mod(mdg4)*-Isoformen einer moderaten Überexpression (siehe 3.2.1). Diese Überexpression führt nicht zur Sterilität, wie mit Tieren des Genotyps Rev31/*Df(3R)ED6050* (vgl. 3.1.3.1) belegt wurde, die eine normale Fertilität aufweisen (Erhalt als Linie seit >30 Generationen). Die Isoform(en), deren Ausfall zur Sterilität in homozygoten Weibchen führt, liegt also im Bereich der 18 proximal codierten isoformspezifischen Exons (zwischen *mod(mdg4)*-64.2 und -55.7). Wird wiederum der Genotyp Rev31/*Df(3R)ED6050* einbezogen, kann der Bereich auf die proximalen 11 spezifischen Exons eingegrenzt werden (*mod(mdg4)*-64.2 bis -54.7).

3.1.3.4 *stuck-like*-Phänotyp

Bei der Kreuzungsauswertung zur Analyse homozygoter Fertilität der Revertanten fiel auf, daß die gekreuzten Tiere bestimmter Linien oft während der Kopulation starben bzw. am Futter festklebten und verendeten ohne sich voneinander zu lösen. Der zuerst von A. Dörfel (pers. Mitteilung) beobachtete Effekt besitzt Ähnlichkeit mit den Kopulationsphänotypen *stuck* (*sk*: Hall *et al.*, 1980; Yamamoto *et al.*, 1997) und *lingerer* (*lig*: CG8715; Kuniyoshi *et al.*, 2002), ist jedoch wesentlich stärker ausgeprägt. So ließen sich die Fliegen weder durch Vortexen (*sk*: Yamamoto *et al.*, 1997) noch Auseinanderziehen voneinander lösen, auch wurde nur selten beobachtet, daß sich die Tiere selbständig voneinander lösen konnten, mitunter durch Abriß von Teilen des weiblichen Abdomens. Das Männchen war in den beobachteten Fällen nicht in der Lage, sich der abgerissenen Terminalia zu entledigen.

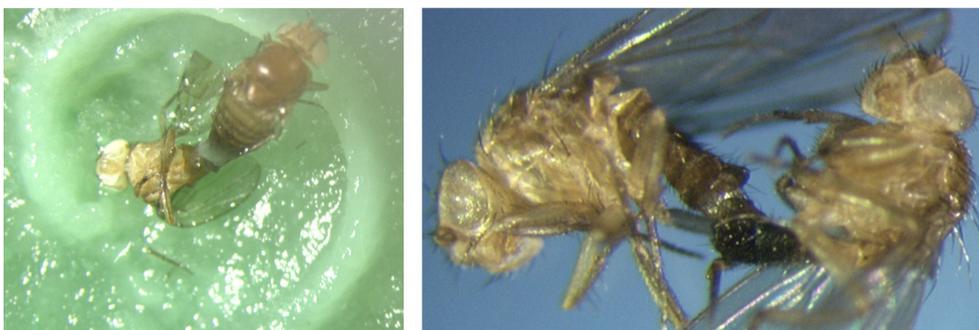


Abbildung 3.5 Ausprägung des *stuck-like*-Phänotyps bei Kreuzung homozygoter Tiere von Revertante R124 (links) und Revertante 213 (rechts). Das linke Bild zeigt typische, im Futter entstehende, kreisförmige bis ovale Muster, die beim Versuch des Weibchens entstehen, sich vom bereits am Futter festgeklebten/verendeten Männchen zu befreien. Meist starben beide Tiere, während sie noch verbunden waren (rechtes Bild).

Um die *mod(mdg4)*-Isoform, deren Ausfall den *stuck-like*-Phänotyp hervorruft, zu identifizieren, wurden je 20 Kreuzungen verschiedener Kombinationen analysiert. Neben der Kreuzung homozygoter Revertantentiere untereinander wurden homozygote Männchen und Weibchen auch mit w^{1118}_{iso} gekreuzt um geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausprägung des Phänotyps festzustellen (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7 Kreuzungen zur Eingrenzung der für den *stuck-like*-Phänotyp verantwortlichen *mod(mdg4)*-Isoform: Anzahl der Kreuzungen mit Manifestation des Phänotyps/Anzahl Kreuzungen für diese Kombination.

Revertante	homozygote ♂ × ♀	hom. ♂ × ♀ w^{1118}_{iso}	♂ w^{1118}_{iso} × hom. ♀
MA26	8/20	2/20	1/20
R124	13/20	1/20	1/20
213	5/20	3/20	0/20
499	1/20	0/20	0/20
JK14	3/20	1/20	0/20
GG293	1/20	0/20	0/20
w^{1118}_{iso}	0/20		

Nach 24 Stunden wurden die ersten zusammenhängenden Paare beobachtet; die in Tabelle 3.7 angegebenen Zahlen wurden nach 6-7 Tagen erreicht, was auf eine verzögerte Paarung hindeutet. Der *stuck-like*-Phänotyp prägt sich nur dann deutlich aus, wenn homozygote Männchen und Weibchen der jeweiligen Linie miteinander gekreuzt werden. In den Kontrollkreuzungen homozygoter Tiere mit w^{1118}_{iso} tritt er weniger häufig oder nicht auf. Damit kann *stuck-like* nicht die Ursache der weiblichen Semisterilität (siehe oben) sein.

Die Verteilung von *stuck-like* in den Kreuzungen schließt eine Isoform in der Transkriptionseinheit *mod(mdg4)*-58.0+folgende (Promotor #7) als verursachend aus, da deren partielle Deletion (in 499, JK14 und GG293) kaum zu einer Manifestation des Phänotyps führt (der erhöhte Wert von 3/20 bei JK14 wird als Ausreißer angesehen, da die Deletion in dieser Revertante kleiner ist als die in Revertante 499). Die verantwortliche Isoform muß daher eine der sieben zwischen *mod(mdg4)*-54.7 und -53.1 sein. Anhand der durchgeführten Kreuzungen läßt sich keine sichere, weitere Eingrenzung erreichen. Schließt man jedoch indirekt von der normalen Fertilität der Linien Revertante 99 und 110, scheint dem Phänotyp *stuck-like* ebenso wie der weiblichen Semisterilität ein Dosisseffekt zugrunde zu liegen, hervorgerufen durch die verminderte Expression der von den Promotoren #4 und #5 kontrollierten

Transkriptionseinheiten (*mod(mdg4)*-52.4+folgende, *mod(mdg4)*-55.6+folgende). Mit Hilfe des Revertantenmaterials läßt sich weiterhin nicht ausschließen, daß mehr als eine Isoform an der Ausprägung des Phänotyps beteiligt ist.

Lichtmikroskopische Untersuchungen des Abdomens homozygoter Revertanten zeigten keine offensichtlichen morphologischen Auffälligkeiten der äußeren Geschlechtsorgane. Sie erschienen im direkten Vergleich mit w^{1118}_{iso} normal ausgebildet und ohne anatomische Abweichungen. Subtile Veränderungen können aber nicht ausgeschlossen werden.

Vermutlich ist ein Verlust der neuromuskulären Kontrolle der Grund für die tödlich endende Kopulation. Gorczyca *et al.* (1999) beschrieben eine insertionelle Mutation in den Promotor der gemeinsamen Exons 1-4: *branch point disrupted (bpd)*; siehe auch Abb. 1.1). Die Phänotypen dieser Mutation wurden in Larven untersucht und äußern sich in einer veränderten Synapsenmorphologie und einer fehlerhaften Verzweigung von Motoneuronen, in dessen Folge die falschen Muskeln innerviert werden. Da *bpd*, wie alle Mutationen des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)*, in späten Larven- bzw. in Puppenstadien rezessiv letal ist, ist der mögliche Zusammenhang zwischen den in Larven beobachteten Veränderungen und den in Adulten auftretenden Störungen der Kopulation bzw. Bewegungskoordination nur ein Indiz.

3.1.3.5 Homöotische Transformation

Homozygote *Escaper*-Männchen von *mod(mdg4)*^{neo129} zeigen eine partielle Transformation des Abdominalsegments A5 in A4, was sich in einer gestörten Pigmentierung des Segments äußert. Dorn *et al.* (1993b) ordneten *mod(mdg4)* daraufhin der *trithorax*-Gruppe zu. Mit Hilfe der verfügbaren Revertanten sollte die Isoform identifiziert werden, deren Ausfall zur beobachteten homöotischen Transformation führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die semiletale Revertante Rev31 untersucht, bei der 18 isoformspezifische Exons deletiert sind. Diese zeigte einen signifikanten Transformationsphänotyp (Abb. 3.6). Von diesem Ergebnis ausgehend wurden Revertanten mit kleineren Deletionen untersucht. MA26, deren Deletion das isoformspezifische Exon von *mod(mdg4)*-54.7 umfaßt, in der aber weitere Isoformen nicht oder nur in geringem Maße transkribiert werden (Abb. 3.2), zeigt ebenfalls eine homöotische Transformation, Revertante 99 (nicht gezeigt) aber nicht. Der Phänotyp kann also auf Dosiseffekten der Isoformen unter Kontrolle von Promotor #5 (*mod(mdg4)*-52.4+folgende) oder auf dem Ausfall der Transkriptionseinheit von Promotor #6 (*mod(mdg4)*-58.0+folgende) beruhen. Daher wurden die Revertanten 499 und JK14 auf Veränderungen der Pigmentierung männlicher Abdomen untersucht.

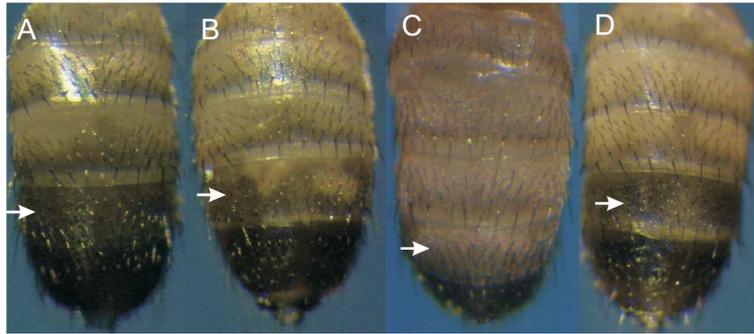


Abbildung 3.6 Homöotische Transformation des Abdominalsegments A5 in A4 in vier bis sechs Tage alten, homozygoten Männchen folgender Genotypen: (A) w^{118}_{iso} ; (B) Rev31; (C) MA26; (D) JK14

Bei JK14, der kleinsten Mutation in diesem Bereich (Deletion der spezifischen Exons von *mod(mdg4)*-58.0), ist eine deutliche Fehlpigmentierung des betreffenden Abdominalsegments zu beobachten. Die für die homöotische Transformation verantwortliche Isoform kann mit Hilfe von JK14 auf den Ausfall der Isoform *mod(mdg4)*-58.0 und/oder die abgeschwächte Expression von *mod(mdg4)*-55.2, die in dieser Revertante festgestellt wurde, eingegrenzt werden. Allerdings ist hier der Phänotyp nicht so stark ausgeprägt, wie zum Beispiel bei Rev31. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß andere Isoformen bzw. deren funktioneller Ausfall an der Ausprägung der homöotischen Transformation beteiligt sind bzw. diese verstärken.

Zudem wurde mittels des Antikörpers anti-Mod(mdg4)-58.0^{BTB-534} (detektiert alle Mod(mdg4)-Proteine) polytäre Speicheldrüsenchromosomen von Revertanten untersucht, deren Deletionen in der Region des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-58.0 liegen. Dabei wurde eine Bande in der cytologischen Region, in der sich auch der *Ubx*-Locus befindet (cytolog. Region 89D6-9; Gabler *et al.*, 2005 und pers. Mitteilung), nicht mehr detektiert. Dies ist ein weiteres Indiz, daß die Isoformen *mod(mdg4)*-58.0 oder -55.2 an den Ultrabithorax-Locus binden und so die Segmentierung beeinflussen. Eine immuncytologische Analyse von transgenen Fusionsproteinen, z.B. Mod(mdg4)-58.0-EGFP, die eine eindeutige Zuordnung der Isoform ermöglichen, wird derzeit in der Arbeitsgruppe durchgeführt (Gabler, pers. Mitteilung).

3.1.3.6 Suppression des *Bar-Stone*-Phänotyps von *YB^S*

Im Rahmen von Kreuzungen zur Rolle der Isoform *mod(mdg4)*-56.3 bei *nondisjunction* von

Geschlechtschromosomen bei der Meiose I in *Drosophila melanogaster*-Männchen (Thomas *et al.*, 2006) wurde von der Arbeitsgruppe um Bruce McKee ein dominant *Bar-Stone*-markiertes Y-Chromosom eingesetzt (YB^S ; siehe 2.1.3; Brosseau, 1958; Brosseau *et al.*, 1961), das in einem senkrecht spaltförmigen Augenphänotyp und einer verringerten Ommatidienzahl resultiert, wie in Abbildung 3.7 C-E zu sehen. Bei weiterführenden Untersuchungen stellte sich heraus, daß Mutationen im spezifischen Teil von *mod(mdg4)* rezessiv Einfluß auf die Ausprägung des *Bar-Stone*-Phänotyps von YB^S haben (B. McKee, pers. Mitteilung). Die Revertanten sollten genutzt werden, um die für diesen Phänotyp verantwortliche *mod(mdg4)*-Isoform einzugrenzen.

In den getesteten Mutanten nimmt die Anzahl der Ommatidien je Auge im Vergleich zu B^S stark zu und die senkrecht schlitzartige Form rundet sich ab, proximal bleibt eine deutliche Indentierung („Delle“, Abb. 3.7 A und B) erhalten, der B^S -Phänotyp wird nicht vollständig supprimiert. Um die verantwortliche Isoform einzugrenzen, wurden Jungfrauen der zu testenden Linien mit Männchen, die sowohl das mutierte YB^S -Chromosom wie auch eine Defizienz der infrage kommenden spezifischen Exons aufweisen, $YB^S y^+; Df(3R)GC14/TM6C$, *Sb* bzw. $YB^S y^+; 459/TM6C$, *Sb*, gekreuzt und balancerfreie, transheterozygote F1-Männchen selektiert. In Abbildung 3.7 sind repräsentative Augenphänotypen abgebildet.

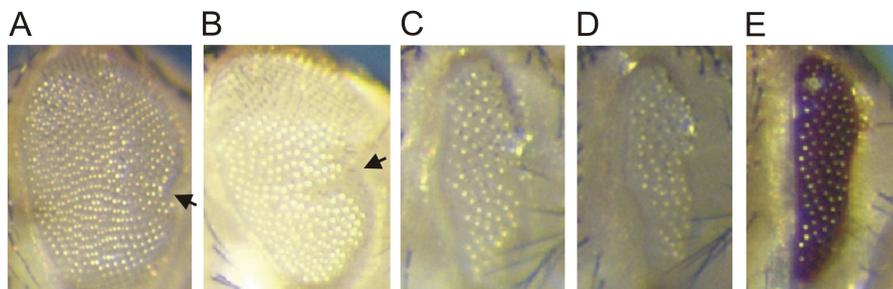


Abbildung 3.7 Suppression des *Bar-Stone*-Phänotyps von YB^S in transheterozygoten Revertanten. (A) $YB^S y^+; MA26/Df(3R)GC14$, (B) $YB^S y^+; 213/Df(3R)GC14$, (C) $YB^S y^+; 186/459$, (D) $YB^S y^+; 499/Df(3R)GC14$, (E) $YB^S y^+; 213/Df(3R)GC14$ nach Kreuzung mit rotäugiger Linie a-31 ($w^+ y^1$, für *mod(mdg4)* Wildtyp). Die Pfeile in (A) und (B) weisen auf die Indentierung („Delle“), die bei Suppression des B^S -Phänotyps erhalten bleibt.

Bei den Revertanten MA26 und 213 (A und B in Abb. 3.7) zeigt sich eine deutliche Suppression des *Bar-Stone*-Phänotyps, die nach Kreuzung der transheterozygoten Tiere mit der Linie ($w^+ y^1$, für *mod(mdg4)* Wildtyp) nicht mehr auftritt (Abb. 3.7, E). Weder die Revertante 186 noch 499 (C, D in Abb. 3.7) zeigen eine Suppression des *Bar-Stone*-Phänotyps, woraus abgeleitet werden kann, daß entweder die Isoform *mod(mdg4)*-55.3 (funktionell in Revertante 499, siehe Abb. 3.2, B) oder ein Ausfall bzw. eine physiologisch zu geringe Transkriptmenge

der Isoformen zwischen *mod(mdg4)*-54.7 und -53.1 für die Suppression des YB^S -Phänotyps verantwortlich ist.

3.1.3.7 *Enhancer* der Positionseffektvariegation (PEV)

Mutanten im gemeinsamen Teil des *mod(mdg4)*-Locus zeigen ein dominantes *Enhancement* der Positionseffektvariegation im w^{m4h} -System (Dorn *et al.*, 1993a, Büchner *et al.*, 2000 und unveröffentlicht).

Durch Inversion auf dem X-Chromosom *In(1)w^{m4h}* wird der *white*-Locus in die Nähe eines heterochromatischen Bereichs gebracht. Gleichzeitig wird die Chromatinbarriere (*chromatin boundary*), die Hetero- von Euchromatin trennt, durch die Inversion wegverlagert. Die daraufhin erfolgende, zufällige Ausbreitung bzw. Zurückziehen des Heterochromatins bedingt in den Augen eine mosaikartige Verteilung von weißen und normal pigmentierten Ommatidien, je nachdem, ob das *white*-Gen in der jeweiligen Zelle vom Heterochromatin eingeschlossen wird oder nicht.

Dieser sogenannte *white mottled*-Phänotyp (Muller, 1930; Tartof *et al.*, 1984; Weiler und Wakimoto, 1995 und 2002) bietet eine Möglichkeit, die Funktion von Chromatinproteinen *in vivo* zu untersuchen. Mutationen von Proteinen, die wie *mod(mdg4)* an der Etablierung oder Aufrechterhaltung von Euchromatin beteiligt sind, führen zu einer verstärkten Ausbreitung des Heterochromatins über das *white*-Gen hinaus – in den Komplexaugen treten mehr weiße, d.h. nicht pigmentierte, Facetten auf. Diese Proteine werden als *Enhancer of variegation*, *E(var)*, klassifiziert. Die Mutation von Heterochromatinproteinen (*suppressor of variegation*, *Su(var)*) hingegen führt zu einem Zurückweichen des Heterochromatins, sodaß das *white*-Gen von Euchromatin umgeben ist, transkribiert werden kann und die Ommatidien rot pigmentiert sind.

Durch Kreuzung verschiedener *mod(mdg4)*-Allele mit $w^{m4h}; Cy/T(2;3)ap^{Xa} Su(var)2-I^{01}/TM3$ sollte die *mod(mdg4)*-Isoform, die den *E(var)*-Effekt hervorruft, eingegrenzt werden. *Su(var)2-I⁰¹* (Dorn *et al.*, 1986) als starker dominanter Suppressor ruft eine fast vollständige Wildtyp-Pigmentierung hervor (siehe Abb. 3.8). Die Mutation wurde eingekreuzt um signifikante *Enhancer of PEV*-Effekte der *mod(mdg4)*-Mutationen eindeutig identifizieren zu können (Dorn *et al.*, 1993a,b; Büchner *et al.*, 2000; Laible *et al.*, 1997).

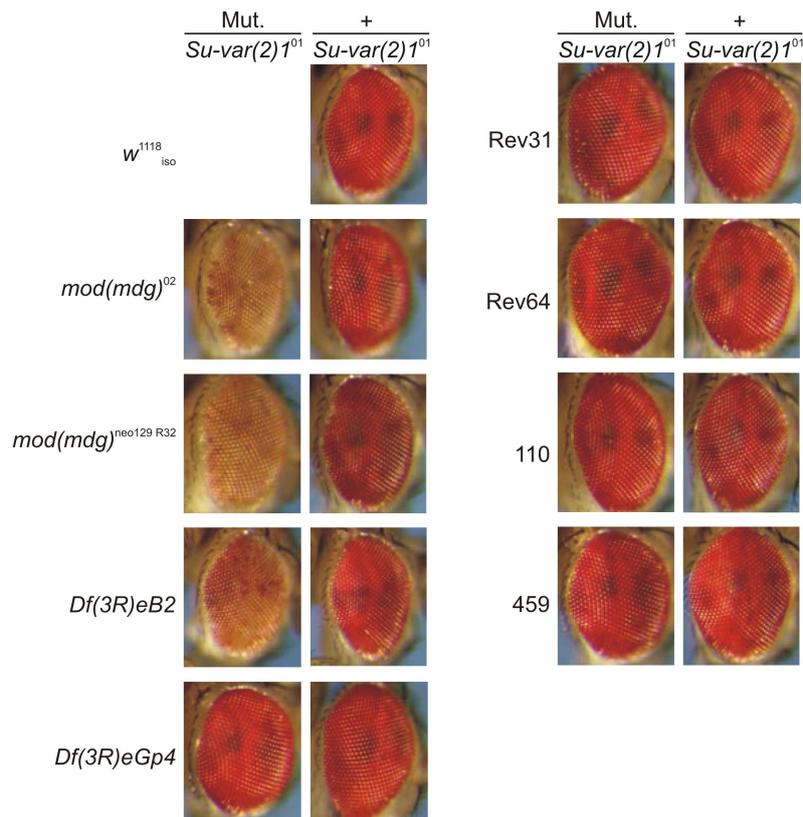


Abbildung 3.8 Genetische Interaktion verschiedener *mod(mdg4)*-Allele mit *Su-var(2)I⁰¹*. *Enhancer of variegation* resultieren mit *In(1)w^{mdh}* in einem *white mottled*-Phänotyp – die Mutationen in *mod(mdg4)* sind epistatisch (Bateson und Saunders, 1902) über *Su-var(2)I⁰¹*. Jeweils links ist ein repräsentatives Facettenauge der untersuchten F1-Männchen *w^{mdh}; +IT(2;3)ap^{Xa} Su-(var)2-I⁰¹/mod(mdg4)*-Allel dargestellt. Als Vergleich ist jeweils rechts das Auge eines aus der gleichen Kreuzung hervorgegangenen Kontrolltiers (*mod(mdg4)⁺*) abgebildet.

mod(mdg4)⁰² (*gypsy*-Insertion in drittes Intron) und *mod(mdg4)^{neo129 R32}* (Exons 1-3 deletiert, alle *mod(mdg4)*-mRNAs sind 5' verkürzt und nicht funktionell; siehe auch 2.1.3) als Mutationen des gemeinsamen Teils des Locus zeigen den erwarteten dominanten *Enhancer of variegation*-Phänotyp und dienten als Kontrolle und Referenz für die Stärke der Phänotypausprägung. Von den übrigen getesteten Allelen zeigte lediglich *Df(3R)eB2* einen *Enhancer*-Phänotyp. Da diese Defizienz aber neben dem distalen Teil des *mod(mdg4)*-Locus noch mindestens 12 weitere Gene umfaßt und der noch vorhandene Teil des *mod(mdg4)*-Locus in dieser Mutante nicht ausreichend molekular charakterisiert ist (siehe 2.1.3; alle spezifischen Exons ab *mod(mdg4)*-58.0 deletiert; wird andererseits von Gerasimova *et al.*, 1995 als Revertante eines *P*-Elements in *tinman* beschrieben), läßt sich die Ausprägung des Phänotyps nicht sicher auf den Ausfall der 20 distal codierten Isoformen zurückführen.

Obwohl die getesteten Revertanten und die Defizienz *Df(3R)eGp4* einander überlappen und so jedes isoformspezifische Exon von *mod(mdg4)* abdecken, wurde bei keiner Mutante der für

eine *Enhancer*-Wirkung charakteristische *white mottled*-Phänotyp beobachtet. Demnach ist entweder der Ausfall mehrerer Isoformen, wie er in keiner der getesteten Revertanten als Kombination vorkommt, notwendig um den *Enhancer of variegation*-Phänotyp hervorzurufen, oder eine Mutation der gemeinsamen Exons ist für die dominante Ausprägung des *Enhancer*-Phänotyps verantwortlich (Dorn *et al.*, 1993a).

3.1.4 Phänotypen und immuncytologische Untersuchung der Revertante Rev31

Im Gegensatz zu anderen *P{RS5}-5-HA-1224*-Revertanten mit großen Deletionen, wie z.B. 439, 459 und GG48, zeigt die Revertante Rev31 keine rezessive Letalität sondern lediglich Semiletalität (siehe Tab. 3.4). Dies ermöglicht die Analyse mehrerer Phänotypen an adulten Tieren, die in dieser Kombination nicht bei Revertanten mit kleineren Deletionen auftreten. Darüber hinaus manifestieren sich in adulten homozygoten Rev31-Tieren einige Phänotypen, die in kleineren/überlappenden Revertanten nicht beobachtet werden konnten. Diese Phänotypen und die Ergebnisse genetischer Untersuchungen an Rev31 werden im Weiteren beschrieben.

Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, daß die beschriebenen Phänotypen dem Ausfall der proximalen 18 Isoformen oder der Überexpression der verbleibenden Isoformen zugeordnet werden müssen (siehe 3.1.3.1).

3.1.4.1 Mißbildung der posterioren Flügelquerader und ektopische Scutellarborsten

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung homozygoter Rev31-Tiere fielen zwei Besonderheiten auf. Zum einen eine manchmal nicht ausgebildete Querverbindung der vierten und fünften Flügel-Longitudinaladern (posteriore Flügelquerader) und die Ausbildung ektopischer Scutellarborsten. Da in w^{118}_{iso} , dem verwendeten Referenzstamm (alle *P{RS5}-5-HA-1224*-Revertanten wurden in diesem Hintergrund erzeugt), ebenfalls ektopisch Scutellarborsten gebildet werden, wurde die Penetranz dieses Phänotyps in beiden Linien untersucht. Um eine natürliche Varianz auszuschließen, wurden die erhaltenen Ergebnisse mittels zweier statistischer Verfahren (siehe 2.3) untersucht, dem p-Test für binominal verteilte Gesamtheiten und dem Fisher-Irwin-Test. p-Werte $<0,05$ wurden in beiden Tests (p-Test für binominal verteilte Gesamtheiten – TbvG, Fisher-Irwin-Test – FI) als signifikant angesehen.

$p < 0,05$ bedeutet, daß eine zufällige Ausprägung des Phänotyps unabhängig vom Genotyp mit einer Wahrscheinlichkeit von $< 5\%$ auftritt.

Die Kontrolllinie w^{1118}_{iso} sowie die Parentalgeneration der untersuchten Rev31-Tiere wurden zeitgleich im gleichen Brutschrank gehalten, was Temperatureinflüsse auf die Anzahl gebildeter Scutellarborsten ausschließt.

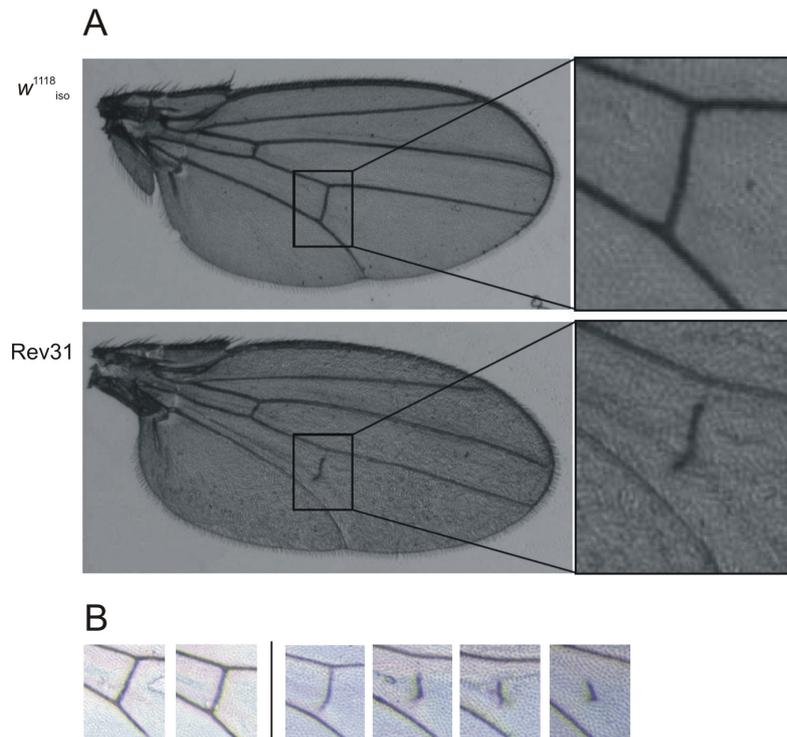


Abbildung 3.9 (vorige Seite) (A) Vergleich repräsentativer posteriorer Flügelqueradern in w^{1118}_{iso} und Revertante Rev31. (B) Detailansichten der normal ausgebildeten (zweimal w^{1118}_{iso} , links) und mißgebildeten (viermal Rev31, rechts) posterioren Flügelquerader

Tabelle 3.8 Phänotypen der homozygoten Revertante Rev31 im Vergleich mit w^{1118}_{iso} . Mißgebildete oder unvollständig ausgebildete posteriore Flügelquerader und die Verdopplung und ektopische Ausbildung von Scutellarborsten wurden für beide Genotypen erfaßt. Dabei sind vor dem Schrägstrich die Tiere mit ausgeprägtem Phänotyp, dahinter die Gesamtzahl der untersuchten Tiere dargelegt.

Phänotyp	w^{1118}_{iso}	Rev31	p (TbvG)	p (FI)
defekte posteriore Flügelquerader	♂ 0 / 270 ♀ 0 / 317	♂ 48 / 110 (43%) ♀ 242 / 275 (88%)	$p < 1 \cdot 10^{-63}$ $p = 0$	$p = 0$ $p = 0$
defekte Scutellarborsten	♂ 17 / 273 (6%) ♀ 57 / 319 (18%)	♂ 12 / 114 (10%) ♀ 129 / 274 (47%)	$p < 0,022$ $p < 1 \cdot 10^{-27}$	$p < 0,21$ $p = 0$

Die Penetranz beider Phänotypen ist in Weibchen höher als in Männchen. Da sowohl die Anzahl untersuchter männlicher Tiere der Revertante Rev31 wie auch der relative Unterschied

in der Ausbildung ektoischer Scutellarborsten bei w^{1118}_{iso} und Rev31 mit 17/273 gegenüber 12/114 zu klein sind, liegt der berechnete p-Wert im Fisher-Irwin-Test nicht im Signifikanzbereich. Für die Weibchen von Rev31 ist hingegen statistisch abgesichert, daß Scutellarborsten vermehrt ektoisch gebildet werden.

Der Ausfall einer oder mehrerer der 18 proximal codierten Isoformen führt mit einer 43- bzw. 88%-igen Penetranz zur Fehlbildung der posterioren Flügelquerader. Eine Funktion des *mod(mdg4)*-Locus bei der Organogenese der Flügel kann somit als gesichert gelten. Dansereau *et al.* (2002) beschreiben für das Gen *hephaestus* somatische Klone, die neben zahlreichen anderen Phänotypen auch Defekte der posterioren Flügelquerader aufweisen. Allerdings tritt bei den betreffenden Klonen der gegenteilige Phänotyp auf: Der Mittelteil der Ader fehlt, während die Verbindungen zu den Longitudinaladern intakt sind. Gegen eine genetische Interaktion (einer von Rev31 in ihrer Expression veränderten *mod(mdg4)*-Isoform) mit *hephaestus* spricht außerdem die unveränderte Expression des Gens in der homozygoten Revertante Rev31 (Daten nicht gezeigt).

3.1.4.2 Komplementation von Mutationen des gemeinsamen *mod(mdg4)*-Teils durch Revertante Rev31

Rev31 weist eine ausgeprägte rezessive Semiletalität auf (siehe Tab. 3.4). Die gemeinsamen Exons 1-4 liegen jedoch nicht im deletierten Bereich der Revertante. Demnach geht die Semiletalität auf das Fehlen isoformspezifischer Exons zurück und die Revertante Rev31 sollte in der Lage sein, rezessiv letale Mutationen des gemeinsamen Teils des Locus zu retten. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden Komplementationskreuzungen mit einigen Mutantenallelen (siehe 2.1.3) ausgewertet.

Tabelle 3.9 Komplementationen von Rev31 mit Mutationen des gemeinsamen Teils des *mod(mdg4)*-Locus. Eine Beschreibung der verwendeten *mod(mdg4)*-Mutationen findet sich unter 2.1.3. Angegeben sind transheterozygote Tiere im Verhältnis zur Gesamtzahl F1-Tiere. Die Komplementationen wurden nach Geschlechtern getrennt ausgewertet. +: $\geq 85\%$; sv: subvital, 50-85%; sl: semiletal, 5-50%; -: letal (<5%) (nach Hadorn, 1955)

Allel	♂	♀
<i>mod(mdg4)</i> ⁰⁴	+ 372/1138 (98%)	+ 405/1192 (102%)
<i>mod(mdg4)</i> ⁰²	+ 67/183 (110%)	+ 61/217 (85%)
<i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	+ 153/434 (106%)	+ 182/539 (101%)

$mod(mdg4)^{07}$	+ 65/157 (124%)	+ 58/160 (109%)
$mod(mdg4)^{03}$	+ 44/141 (94%)	+ 60/165 (109%)
$mod(mdg4)^{L3101}$	+ 208/582 (107%)	+ 210/549 (115%)
$mod(mdg4)^{28-4}$	+ 35/121 (87%)	+ 35/119 (88%)

Die transheterozygoten F1-Tiere wurden auf Phänotypen untersucht, die bei homozygoten Rev31-Tieren auftraten. Die transheterozygoten Tiere bildeten nicht vermehrt ektopische Scutellarborsten aus, die posteriore Flügelqueradern (siehe 3.1.4.1) war bei allen untersuchten Tieren intakt und die Bewegungskoordination (siehe 3.1.3.2) schien ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die transheterozygoten Männchen waren normal fertil. Die transheterozygoten Weibchen hingegen wiesen eine ebenso ausgeprägte rezessive Sterilität auf wie homozygote Rev31-Weibchen (siehe 3.1.3.3). Zur quantitativen Analyse der weiblichen Sterilität wurden Weibchen des Genotyps $Rev31/mod(mdg4)^{neo129 R32}$ mit w^{1118}_{iso} -Männchen gekreuzt und die Entwicklung der Embryonen über 96h verfolgt. Aus 4851 Eiern schlüpften innerhalb von 36h sechs Larven, von denen keine das Puppenstadium erreichte (Beobachtungszeitraum der Larven: 14d).

Da die Analysen der sterilen Weibchen $Rev31/mod(mdg4)^{neo129 R32}$ neue Erkenntnisse zum Mechanismus des *trans*-Spleißens in $mod(mdg4)$ erbrachten, sind sie im zweiten Ergebnisteil dieser Arbeit, in Kapitel 3.2.1, aufgeführt.

3.1.4.3 Immuncytologische Untersuchungen an Polytäanchrosomen der Revertante Rev31

Der $mod(mdg4)$ -Locus codiert eine Familie von Chromatinproteinen. Immuncytologische Analysen mit einem Antikörper, der alle Isoformen erkennt (anti-Mod(mdg4)-58.0^{BTB-534}) zeigen mehrere hundert Banden an Polytäanchrosomen aus larvalen Speicheldrüsen (Büchner *et al.*, 2000; Gabler *et al.*, 2005), darunter z.B. auch Signale an den Telomeren.

Immuncytologische Untersuchungen an Polytäanchrosomen aus Revertante Rev31 zeigen ein deutlich reduziertes Bandenmuster. Gegenüber entsprechenden Analysen an der Referenz w^{1118}_{iso} ist bei homozygoter Rev31 auch kein Signal an den Telomeren der Polytäanchrosomen erkennbar. Zudem erscheinen die Telomere im Vergleich mit korrespondierenden Chromosomen von w^{1118}_{iso} verkürzt (Abb. 3.10). Der Ausfall einer oder mehrerer Isoformen führt in Rev31 also zu einer Erosion der Chromosomenenden, was auf eine Funktion des $mod(mdg4)$ -Locus in der *telomere maintenance* hindeutet.

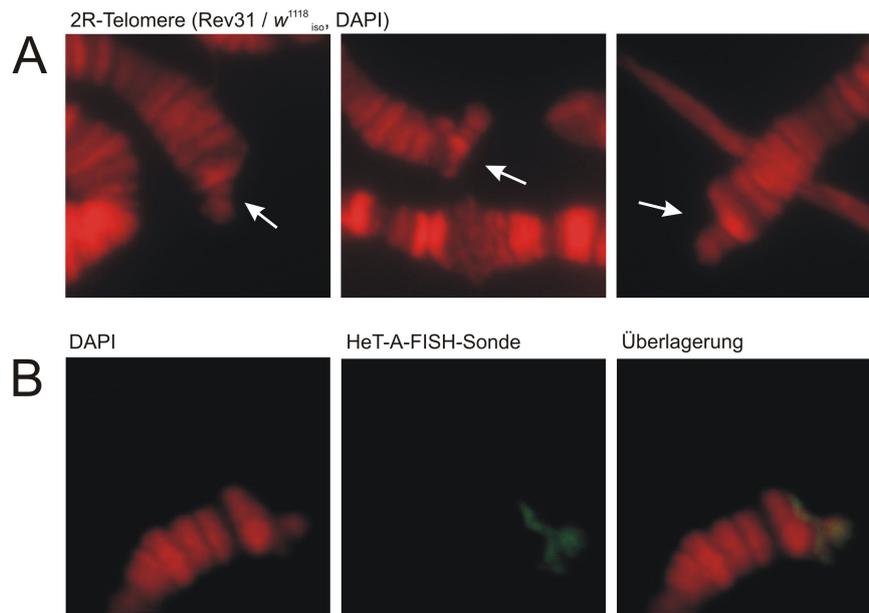


Abbildung 3.10 (vorige Seite) (A) Unterschiedlich lange Telomere an Chromosomenarm 2R an Polytänchromosomen aus larvalen Speicheldrüsen in heterozygoten Rev31-Larven (Rev31/ w^{1118}_{iso}). (B) Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit *HeT-A*-Sonde (grün) am 2R-Telomer von Rev31/ w^{1118}_{iso} . Die DNA ist mit DAPI gefärbt (rot).

Gleichzeitig konnte Manuela Gabler in ihrer Diplomarbeit (2003) mit Hilfe eines *mod(mdg4)*-64.2-cDNA-EGFP-Transgens nachweisen, daß die Isoform Mod(*mdg4*)-64.2 neben zahlreichen euchromatischen Bindungsstellen mit allen Telomeren außer dem des 3L-Chromosoms assoziiert ist. Ein Bestandteil aller Telomere, an denen das Protein nachgewiesen wurde, ist das Retrotransposon *HeT-A*. Das Telomer des 3L-Chromosoms ist in w^{1118}_{iso} , dem genetischen Hintergrund aller erzeugten Revertanten, neben der TAS (*telomere associated sequence*) ausschließlich aus *TART* aufgebaut (Abad *et al.*, 2004). Daraus ergibt sich eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß Mod(*mdg4*)-64.2 an *HeT-A* bindet. Eine Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an Polytänchromosomen aus heterozygoten Rev31-Larven mit einer *HeT-A*-Sonde zeigt neben der Verkürzung der Telomere auch eine Abnahme des *HeT-A*-Signals (Abb. 3.10 (B)).

Geht die in Rev31 beobachtete Telomerverkürzung auf den Ausfall der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 zurück? Eine definierte Mutation, die ausschließlich das spezifische Exon dieser Isoform deletiert, sollte die funktionelle Analyse der Isoform Mod(*mdg4*)-64.2 ermöglichen und ein Vergleich mit Rev31 ergeben, ob der an der Revertante beobachtete Telomerphänotyp auf den Ausfall der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 beruht. Zur Beantwortung (unter anderem) dieser Fragestellung sollte gezielt das isoformspezifische Exon von *mod(mdg4)*-64.2 deletiert werden (siehe 3.1.5.2).

3.1.5 Funktionelle Analyse der Isoform *mod(mdg4)*-64.2

3.1.5.1 Nachweis der Mod(mdg4)-64.2-Assoziation an *HeT-A*, ChIP-on-membrane

In verschiedenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde eine Assoziation der Proteinisoform Mod(mdg4)-64.2 mit den Telomeren von Polytäanchrosomen beobachtet. Ein Mod(mdg4)-64.2-EGFP-Fusionsprotein konnte an allen außer dem 3L-Telomer nachgewiesen werden (Gabler, 2003; Brückner, 2007; Wagner, 2007). Abad *et al.* (2004) zeigten, daß das Telomer des 3L-Chromosoms des Stammes, der für das *Drosophila*-Genomprojekt sequenziert wurde, kein *HeT-A*-Retrotransposon enthält. Dies läßt vermuten, daß Mod(mdg4)-64.2 mit *HeT-A* assoziiert ist. Desweiteren konnte EGFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins reproduzierbar an zwölf Stellen im Euchromatin von Polytäanchrosomen der Speicheldrüse nachgewiesen werden (Wagner, 2007).

Zum Nachweis der endogenen Proteinisoform Mod(mdg4)-64.2 wurde ein anti-Peptid-Antikörper gegen die 15 C-terminalen Aminosäuren generiert. Sollte das Protein an das Retrotransposon *HeT-A* binden, ließe sich diese Assoziation mittels Chromatinimmunopräzipitation belegen, wobei *HeT-A*-DNA-Fragmente angereichert werden sollten. Für diesen Nachweis wurden je 50ng PCR-Amplifikat des 5'- und 3'UTR (*untranslated region*) von *HeT-A* auf einer Nylonmembran kovalent immobilisiert.

An den Polytäanchrosomen sind neben den Telomeren auch an mehreren euchromatischen Positionen Signale immunocytoologisch nachweisbar, zum Beispiel ein starkes, reproduzierbar auftretendes Signal in der cytologischen Region 26B. Mit Hilfe verschiedener DrosDel-Defizienzen (Ryder *et al.*, 2004) konnten die Bindestelle(n) auf die Positionen 2L: 6.000.124 bis 2L: 6.054.407 eingegrenzt werden (M. Gabler, pers. Mitteilung). Um die Bindestelle(n) des Proteins innerhalb dieser Region weiter einzugrenzen, wurde ein *genomic tiling array* angefertigt, der aus 1,1 bis 1,7kb großen, einander überlappenden PCR-Amplifikaten besteht. Diese decken neben den 54kb (2L:6.000.124-6.054.407) auch beiderseits 3kb flankierende Sequenz ab. Jeweils 50ng der PCR-Amplifikate wurden ebenfalls auf der Nylonmembran immobilisiert. Die verwendeten PCR-Primer sind Anhang 1 zu entnehmen (unter „Primer für 50kb tiling array in Region 26B“).

Aus S2-Zellen wurde Chromatin isoliert und die Chromatinimmunopräzipitation (ChIP; nach Sambrook und Russell (Hrsg.), 2001) durchgeführt. Das Chromatin wurde mit anti-Mod(mdg4)-64.2-Antikörper inkubiert um die Mod(mdg4)-64.2-DNA-Komplexe anzureichern.

Es wurden zwei verschiedene Experimente mit affinitätsgereinigtem und IgG-angereichertem anti-Mod(mdg4)-64.2-Antikörper sowie ein Kontrollexperiment (mit Präimmunserum) durchgeführt. Nach Isolation der DNA-Fragmente aus den Protein-DNA-Komplexen wurden Oligonukleotidprimer ligiert, die DNA mittels PCR amplifiziert und anschließend [³²P]-radioaktiv markiert. Die markierten Amplifikate des angereicherten Chromatins wurden mit der, die PCR-Amplifikate von *HeT-A* und der Region 26B tragenden, Nylonmembran inkubiert.

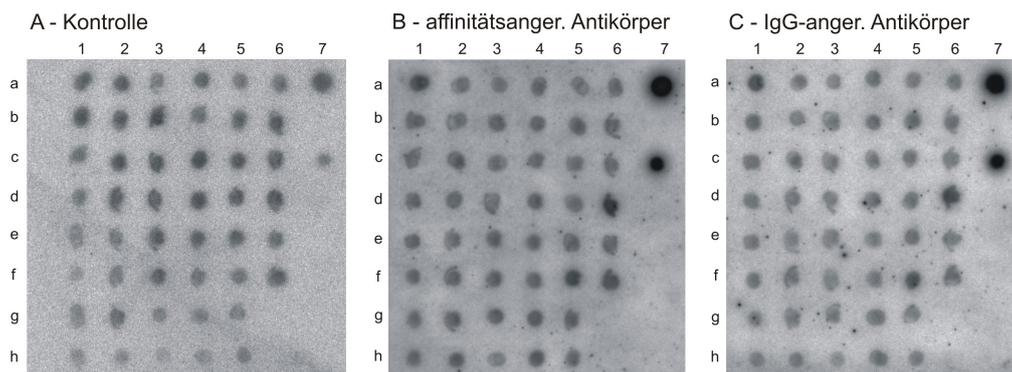


Abbildung 3.11 Autoradiogramm der Chromatinimmunopräzipitation (ChIP-*on-membrane*) mit polyklonalem anti-Mod(mdg4)-64.2-Antikörper aus S2-Zellen. (A) Experiment mit Präimmunserum als Kontrolle; (B) affinitätsangereichertes Antiserum durch Inkubation mit antigengekoppelter Matrix; (C) IgG-angereichertes Antiserum durch Inkubation mit Protein G-Sepharose (GE Healthcare).

Vergleicht man die drei Experimente miteinander, so ist eine Anreicherung der untranslatierten Bereiche von *HeT-A* zu erkennen (Dots in Spalte 7), trotz der geringeren *HeT-A*-Kopienzahl der S2-Zellen im Vergleich zu *Drosophila*-Stämmen. Während in S2-Zellen rund 14 Kopien von *HeT-A* vorliegen, sind es ca. 45 in Oregon R, dem Wildtypstamm, aus dem die S2-Zellen kultiviert wurden, und ca. 35 im Referenzstamm des *Drosophila*-Genomprojekts (George *et al.*, 2006). Diese Zahlen beziehen sich auf *HeT-A*-Elemente, die den vollständigen *open reading frame* enthalten. Da bei Addition eines *HeT-A* an ein Chromosomenende dessen 5'Ende den neuen Abschluß des Chromosoms bildet und von dort erodiert wird (Pardue, 1990), sind Fragmente, die 3'*HeT-A*-Sequenz enthalten, stärker repräsentiert (Abad *et al.*, 2004a; George *et al.*, 2006). Die Methode der ChIP ist aufgrund der Bruchstückgrößen bei der Fragmentierung der genomischen DNA (100-1000bp) und der Tandemanordnung der *HeT-A*-Elemente in den Telomeren, bei der die UTRs benachbarter Elemente direkt aufeinander folgen, nicht geeignet, die Bindestelle von Mod(mdg4)-64.2 auf den 5'UTR oder 3'UTR von *HeT-A* festzulegen. Die Anreicherung von *HeT-A* wurde durch

eine Chromatinimmunopräzipitation, gefolgt von einer quantitativen PCR (ChIP-qPCR) für den 5'UTR und 3'UTR von *HeT-A* bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Neben der Anreicherung der *HeT-A*-UTRs wurden auch Sequenzen, die drei Fragmenten des 50kb *tiling array* entsprechen, angereichert: Erstens das Fragment 2L:5.997.124 bis 2L:5.998.239 (Position 1a in Abb. 3.11), das aber außerhalb des mittels Immunocytochemie eingegrenzten Bereichs, im ORF von *lid* (*CG9088*) liegt. Zweitens 2L:6.043.932 bis 2L:6.045.523 (Position 5f), ein Bereich in *ade2* (*CG9127*), circa 500bp *downstream* des Transkriptionsstarts beginnend. Zum dritten der Bereich 2L:6.052.337 bis 2L:6.053.894 (Position 6d), der den 3'Teil des Gens *CG9135* und den intergenischen Bereich zwischen *CG9135* und *CG13995* umfaßt. Der *tiling array* ergab in beiden Experimenten mit anti-Mod(mdg4)-64.2-Antikörper (B und C in Abb. 3.11) reproduzierbar eine Anreicherung der gleichen Fragmente.

Eine unabhängige Bestätigung (alle durchgeführten Experimente beruhen auf der Spezifität nur eines polyklonalen Antiserums) kann durch eine Chromatinimmunopräzipitation des transgencodierten Mod(mdg4)-64.2-EGFP-Fusionsproteins mittels anti-EGFP-Antikörper erreicht werden, denn eine C-terminale EGFP-Fusion beeinträchtigt weder die Verteilung der Mod(mdg4)-Proteine auf den Polytänochrosomen (Gabler, 2003 und pers. Mitteilung) noch, soweit untersucht, deren Funktion (Thomas *et al.*, 2006).

3.1.5.2 Deletion des spezifischen Exons/*Knock out* der Isoform *mod(mdg4)-64.2*

Die Spezifität der Mod(mdg4)-Proteine wird von ihrem spezifischen C-Terminus, codiert vom isoformspezifischen Exon(s), vermittelt. Daneben betreffen Mutationen des gemeinsamen Teils alle 31 Isoformen des Locus. Um die funktionelle Analyse einer *mod(mdg4)*-Isoform zu ermöglichen, muß deren isoformspezifisches Exon mutiert werden. Eine gezielte Mutagenese des spezifischen Exons von *mod(mdg4)-64.2* würde es gestatten, ihre Funktion *in vivo* zu untersuchen. Zum Beispiel könnte so geklärt werden, ob der Verlust dieser Isoform verantwortlich ist für den in Revertante Rev31 beobachteten Telomerphänotyp (siehe 3.1.4.3) oder ob dieser auf den Ausfall einer anderen Isoform zurückgeht.

Zum einen sollte eine Mutation etabliert werden, die ausschließlich das isoformspezifische Exon der Isoform deletiert („ Δ 64.2“). Außerdem wurde eine weitere Mutation geplant, die ein Stopcodon in den 5'Bereich des isoformspezifischen Exons einfügt (T₄₀₄Stop). Hierzu wurde die Methode des „*Ends-in gene targeting*“ (Xie und Golic, 2004) angewendet. Die Klonierung der Transgenkonstrukte, die Etablierung der Transgene und deren Mobilisierung sowie die Durchführung von Nachweis-PCRs sind im Kapitel 2.1.6 beschrieben.

Das Donorelement zur Einführung des Stopcodons in das isoformspezifische Exon von *mod(mdg4)-64.2* konnte nicht erfolgreich mobilisiert werden (ca. 400 Kreuzungen). Daher konnte nur der *Knock out* der Isoform durch die $\Delta 64.2$ -Elemente umgesetzt werden.

Für das Experiment wurden zwei Donorelemente auf dem zweiten Chromosom, $\Delta 64.2$ #2 und $\Delta 64.2$ #13 (im folgenden mit $\Delta 2$ und $\Delta 13$ bezeichnet) ausgewählt. Es wurden etwa 600 Kreuzungen durchgeführt (siehe 2.1.6).

Von 12 erfolgreichen Mobilisierungen (leeres Donorelement und Mutation $\Delta 64.2$ vorhanden) waren sechs ($\Delta 2$ 30, $\Delta 2$ 39a, $\Delta 13$ 9a, $\Delta 13$ 42a, $\Delta 13$ 54 und $\Delta 13$ 85c) Insertionen ins dritte Chromosom, die sechs anderen Integrationen der Donor-DNA erfolgten in die Chromosomen 2 und X.

Durch die erfolgreiche Etablierung von stabilen Linien ließ sich die Integration in das dritte Chromosom, nicht jedoch die Position bestimmen, an der das $\Delta 64.2$ -Konstrukt eingefügt wurde. Der Integrationsort der Donor-DNA sollte durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) festgestellt werden. Hierzu wurde mittels PCR und unter Verwendung von Digoxigenin-11-dUTP eine Sonde (6.704-8.333 locusinterne Skala an $\Delta 64.2$ -DNA) generiert, die an das die Donor-DNA tragende Chromosom einmal in voller Länge (über die Deletion $\Delta 64.2$ hinweg) sowie partiell an endogene *mod(mdg4)*-Sequenz einmal mit dem 5'Sondenende (Pos. 6.704-7.080) und einmal mit dem 3'Ende (Pos. 8.027-8.333) assoziieren kann. Bei Integration außerhalb von *mod(mdg4)* sollten zwei Signale detektiert werden (Integrationsort und endogener Locus), wird die Donor-DNA in den Locus eingefügt, sollte ein Signal entstehen, das an beiden Chromosomen unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

Es wurde ein unikales Signal in der cytologischen Region 93D detektiert. In keinem Präparat wurden zwei Banden detektiert, und die meisten Präparate wiesen, wie erwartet, unterschiedlich stark gefärbte homologe Chromosomen auf (heterozygote Larven, Abb. 3.12). Da die verwendete Sonde auch endogene *mod(mdg4)*-Sequenz detektiert, wurde in einem zweiten Experiment der Transformationsvektor pTV2 als Sonde (ohne Transgen) verwendet. Die Ergebnisse des ersten FISH-Experiments wurden bestätigt, es zeigte sich ausschließlich eine Bande in der cytologischen Region 93D.

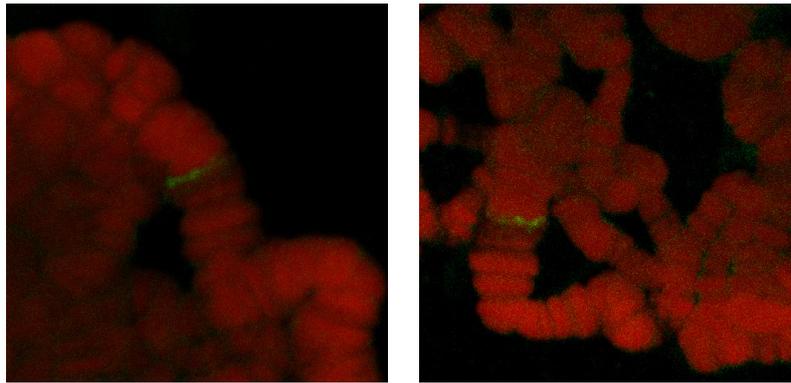


Abbildung 3.12 Repräsentative Aufnahmen der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung an Polytänchromosomen der Speicheldrüse heterozygoter Larven von $\Delta 13\ 85c$ (links) und $\Delta 2\ 39a$ (rechts). Als Sonde wurde ein Digoxigenin-11-dUTP-markiertes, deletionsüberspannendes PCR-Amplifikat benutzt, das durch einen FITC-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper nachgewiesen wurde (grünes Signal). Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (rot).

Weiterhin konnten durch verschiedene PCRs z.B. mit Primern aus dem w^+ -Marker und nicht in der Donor-DNA enthaltenen *mod(mdg4)*-Sequenz die Integration des Konstrukts an die gewünschte Position in *mod(mdg4)* nachgewiesen werden.

Die Integration der Donor-DNA in *mod(mdg4)* führte zu einer partiellen Duplikation des Locus. Um diese unter Beibehaltung der $\Delta 64.2$ -Mutation zu entfernen wurde zunächst ein Doppelstrangbruch an einem Ende der Transgensequenz gesetzt. Dazu wurde ein hitzeschockinduzierbares I-*CreI*-Transgen eingekreuzt und induziert (siehe 2.1.6). Die duplizierten Bereiche sollten sich parallel anordnen und die partielle Duplikation durch ein *Crossing over* aufgelöst werden, was phänotypisch am Verlust des w^+ -Markers erkennbar ist. Da die duplizierte Sequenz den Bereich um das isoformspezifische Exon von *mod(mdg4)*-64.2 mit umfaßt, ist abhängig von der Position der Rekombination, ob die $\Delta 64.2$ -Mutation erhalten bleibt oder verloren geht (vgl. Xie und Golic, 2004).

Etwa 40% aller Tiere, in denen das Restriktionsenzym I-*CreI* exprimiert wurde, erwiesen sich als steril. Außerdem kam es häufig zu Mißbildungen (siehe Anhang A2.3), die wahrscheinlich auf I-*CreI*-Aktivität an anderen Stellen als der Erkennungssequenz in der Donor-DNA zurückzuführen sind. Das Auftreten solcher Phänotypen wurde von Xie und Golic (2004) nicht beschrieben. Bei drei Linien $\Delta 2\ 30$, $\Delta 13\ 42a$ und $\Delta 13\ 54$ konnten aus den zwölf F1-Kreuzungen je Linie in der F2-Generation keine fertilen w^- -Tiere selektiert werden. Ein weiteres Experiment zur Auflösung der partiellen Duplikation in diesen Linien wurde nicht durchgeführt.

Nach 3 bis 5 Tagen wurde der F2-Kreuzung (siehe 2.1.6) die $w^{\text{mosaik}}\ Sb^-$ bzw. $w^- Sb^-$ -Fliege entnommen (bei $\Delta 2\ 39a$, $\Delta 13\ 9a$ und $\Delta 13\ 85c$), genomische DNA extrahiert & mittels PCR

überprüft, ob die Mutation $\Delta 64.2$ noch vorhanden ist. Nur in diesen Fällen wurden balancierte und parallel homozygote Linien aufgebaut.

Mit dem Aufbau von hetero- bzw. homozygoten Linien ist nach Xie und Golic (2004) der genetische Teil des Experiments beendet. O'Keefe *et al.* (2007) berichten jedoch von einer unspezifischen *second site*-Mutation mit der Empfehlung, nach Beendigung der Kreuzungen die entstandene, gewünschte Mutation einige Generationen frei gegen einen Wildtypstamm segregieren zu lassen. Die für eine genauere Untersuchung ausgewählten Linien $\Delta 13\ 9a\ II\ h$, $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$, $\Delta 2\ 39a\ IV\ b$ und $\Delta 2\ 39a\ III\ a$ wurden für vier Generationen mit w^{1118}_{iso} gekreuzt und anschließend wieder jeweils eine TM6C, *Sb*-stabilisierte Linie aufgebaut (für Erklärung der Linienbezeichnung und Umbenennungsschlüssel der Linien-Arbeitsnamen: siehe Anhang A2.3).

Bei den ausgewählten Linien wurde *mod(mdg4)* von Position 2.000 bis 13.000 sequenziert um Mutationen auszuschließen. Bei $\Delta 13\ 9a\ II\ h$, $\Delta 2\ 39a\ IV\ b$ und $\Delta 2\ 39a\ III\ a$ wurden zwischen den Linien übereinstimmende Polymorphismen zum annotierten *Drosophila melanogaster*-Genom und an Position 5.562 eine intakte I-*SceI*-Schnittstelle gefunden. Diese Mutanten wurden nicht weiter untersucht. Die Sequenzierung der genomischen DNA von Linie $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ ergab im gesamten Bereich keine Mutation außer der gewünschten Deletion des spezifischen Exons der Isoform *mod(mdg4)*-64.2. Eine zweite untersuchte Linie $\Delta 13\ 85c\ III\ d$ hingegen weist neben der gewünschten Exondeletion eine weitere Deletion der locusinternen Positionen 9.365 bis 11.083 auf, die vermutlich Ergebnis eines exonukleolytischen Abbaus während der Auflösung der partiellen Duplikation ist.

Um die weitere Umgebung der eingeführten Deletion auf Mutationen zu untersuchen wurde eine Southern-Analyse durchgeführt (Abb. 3.13 B, siehe auch 2.2.3). Dabei dienten die in Abb. 3.13 A dargestellten *Bam*HI-Fragmente als Sonden (für Herstellung der ^{32}P -markierten Sonden siehe 2.2.3).

Die erhaltenen Bandenmuster entsprechen den erwarteten Restriktionsfragmenten. So wird z.B. in den *Bam*HI-Restriktionen der beiden Mutanten statt der 6,7kb- und 7,5kb-Banden des Referenzstamms (Bande bei >10kb resultiert aus unvollständiger Restriktion der genomischen w^{1118}_{iso} -DNA) nur eine Bande bei $\approx 13\text{kb}$ bzw. $\approx 11\text{kb}$ detektiert, da die *Bam*HI-Schnittstelle (Pos. 7.559) im Bereich der $\Delta 64.2$ -Deletion liegt. Das verkürzte Fragment von $\Delta 13\ 85c\ III\ d$ ist auf die zusätzliche Deletion von 1,7kb (Pos. 9.365-11.083) zurückzuführen. Die *Sac*I-Restriktion zeigt ebenfalls den Erfolg der „*Ends-in gene targeting*“-Mutagenese. Das 7.792bp-Fragment des Referenzstamms erscheint in beiden Mutanten etwa 1kb kleiner, was der Größe der $\Delta 64.2$ -Deletion entspricht. Die *Eco*RI- und *Hind*III-Verdaus zeigen, daß es in der Umgebung der eingeführten Mutation nicht zu größeren Deletionen bzw. Rearrangements

gekommen ist, sowohl bis zu 2kb *upstream* des *mod(mdg4)*-Locus (1,5kb-Bande in *EcoRI*-, 2kb-Bande in *HindIII*-Restriktion), wie auch bis Position ca. 21.000 der locusinternen Skala (8kb-Bande in *EcoRI*-Restriktion; entspricht 7.909bp-Fragment in Abb. 3.13 A).

Als abschließender Test der Mutationen wurden RT-PCRs der sieben proximal codierten *mod(mdg4)*-Isoformen an Gesamt-RNA von homozygoten Mutantentieren durchgeführt (Abb. 3.13 C).

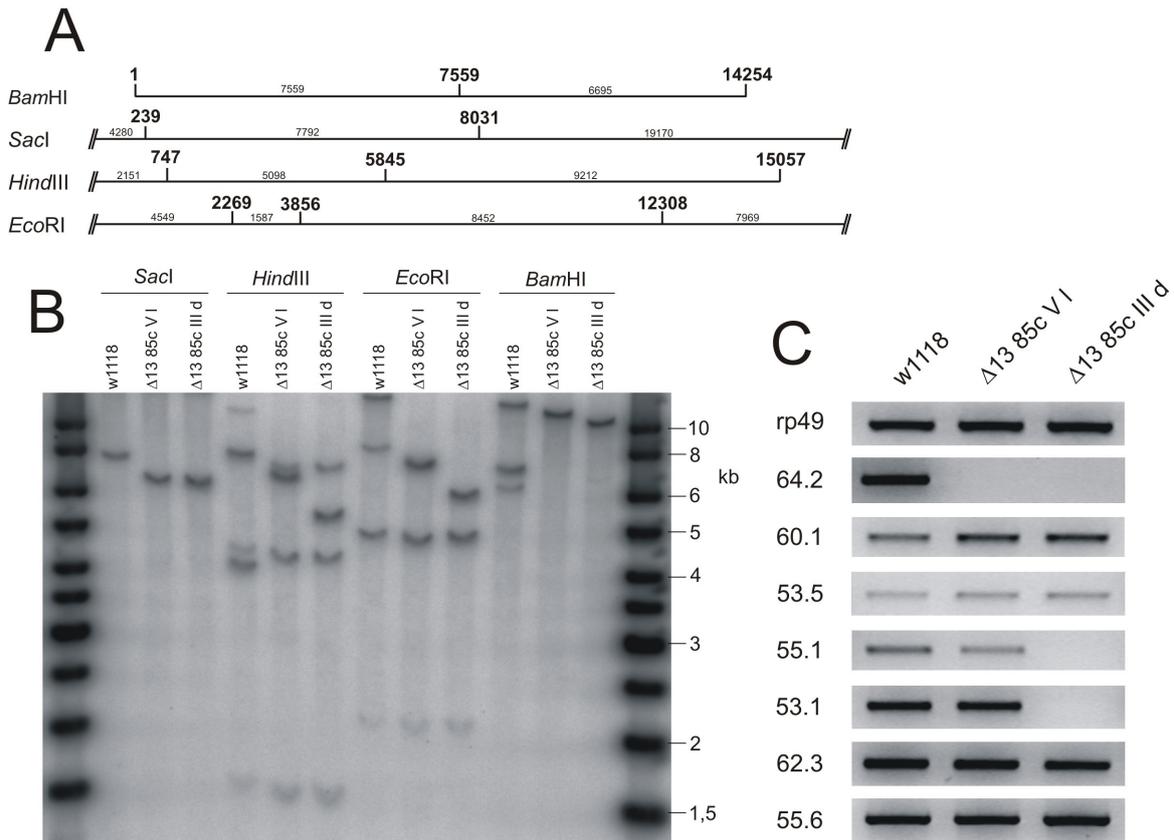


Abbildung 3.13 Molekulare Charakterisierung der zwei erzeugten *mod(mdg4)*-64.2-Knock out-Mutanten Δ13 85c V I¹⁶ und Δ13 85c III d im Vergleich mit w¹¹¹⁸_{iso}. (A) Restriktionsfragmentgrößen der *mod(mdg4)*-Referenzsequenz, fettgedruckte Zahlen geben die Position der Restriktionsenzymchnittstellen nach locusinterner Skala an, klein geschriebene die entstehenden Fragmentgrößen. Die *BamHI*-Fragmente 1-7.559 und 7.559-14.254 wurden als Sonden für die Southern-Analyse genutzt. (B) Southern Blot; je Restriktion 10μg genomische DNA des angegebenen homozygoten Genotyps; in w¹¹¹⁸_{iso} resultieren einige der Banden aus partiellem Verdau der genomischen DNA. (C) Semiquantitativer mRNA-Nachweis der proximal codierten sieben *mod(mdg4)*-Isoformen durch RT-PCR (RNA homozygoter Genotypen, Gen für ribosomales Protein RpL32 (*rp49*) als Kontrolle)

⁶ Arbeitsbezeichnung für Δ13 85c V I ist Mu55, für Δ13 85c III d Mu68 (siehe auch Anhang A2.3)

Die durchgeführten Tests, Southern Blot und RT-PCRs, belegen, daß der *Knock out* der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 durch „*Ends-in gene targeting*“ erfolgreich war. Durch eine Sequenzierung der umliegenden genomischen Sequenz über die Ausdehnung des für die Mutagenese eingesetzten Donorelements hinaus konnte sichergestellt werden, daß im Fall der Linie $\Delta 13\ 85c\ V\ I$ ausschließlich die gewünschte Deletion ins Genom eingeführt wurde. Die Linie $\Delta 13\ 85c\ III\ d$ trägt zusätzlich eine Deletion von 9.365 bis 11.083 (locusinterne Skala), die zum Ausfall der Isoformen *mod(mdg4)*-55.1 und -53.1 führt.

Ein mögliches Manko des *mod(mdg4)*-64.2-*Knock outs* ergab sich (nach Etablierung der $\Delta 64.2$ -Mutation) aus einem anderen Experiment: Mit Hilfe von *D. virilis-mod(mdg4)*-Transgenen konnte ein Promotor im spezifischen Exon der Isoform *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2 nachgewiesen werden, der die Expression von *Dvi-mod(mdg4)*-h60.1 und wahrscheinlich ebenfalls -h53.5 und -h55.1 treibt (siehe Tab. 3.18). Dieser Promotor (Pr. #3 in Tabelle 3.3), dessen Elemente CAAT-Boxen und TATA-Box zwischen beiden Arten konserviert sind, liegt innerhalb des beim „*Ends-in gene targeting*“ deletierten Bereichs und könnte neben *D. virilis* auch in *D. melanogaster* funktionell sein, was aufgrund fehlender Mutationen in diesem Bereich des Locus bisher nicht nachweisbar ist. Sollte der Promotor funktionell sein, könnten einige der Ergebnisse aus Experimenten mit $\Delta 13\ 85c\ V\ I$ nicht auf den Ausfall der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 zurückgehen sondern auf den Ausfall von *mod(mdg4)*-60.1, -53.5 oder -55.1 in den Geweben, in denen Promotor #3 aktiv ist; Promotor #2 liegt außerhalb des deletierten Bereichs und die drei Isoformen können ausgehend von diesem Promotor weiterhin gebildet werden. Die diesbezüglichen Daten des FlyAtlas-Projekts (siehe Abb. 3.5 und Anhang A2.3) lassen vermuten, daß Promotor #3 keine starke Aktivität in den untersuchten Geweben aufweist.

3.1.5.3 Microarray-Analyse der $\Delta 64.2$ -Mutation $\Delta 13\ 85c\ V\ I$ und weiterer ausgewählter *mod(mdg4)*-Mutationen

Die pleiotropen Effekte von Mutationen im gemeinsamen Teil von *mod(mdg4)* sowie die Bindung der Mod(mdg4)-Proteine an jeweils mehreren Dutzend bis hunderten Stellen an Polytänychromosomen deuten darauf hin, daß die Genprodukte des Locus an der Regulation der Expression einer Vielzahl von Genen beteiligt sind. Mit $\Delta 13\ 85c\ V\ I$ konnte eine definierte Mutation eingeführt werden, die eine einzelne Isoform deletiert – *mod(mdg4)*-64.2. Um von *Mod(mdg4)*-64.2 in ihrer Transkription regulierte Gene zu identifizieren, wurde eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden mehrere unabhängige Gesamt-RNA-Präparationen von w^{1118}_{iso} , dem Kontrollgenotyp für dieses Experiment, und $\Delta 13\ 85c\ V\ I$

auf Affymetrix-Microarrays (Drosophila Genome 2.0) hybridisiert. Außerdem wurden Transkriptomanalysen der Genotypen Revertante Rev31 (homozygot), Revertante GG295 (homozygot) und $mod(mdg4)^{neo129R32}/+$ durchgeführt (Imagenes, Berlin). Um eventuelle experimentelle Fehler zu minimieren, wurde $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ als Triplikate, alle anderen RNAs als Duplikate⁷ verwendet, d.h. beim Vergleich von w^{1118}_{iso} mit $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ wurden insgesamt fünf unabhängige RNA-Präparationen auf fünf Arrays hybridisiert, die Signalstärken ausgelesen und erst dann zu den Gruppen ‚Wildtyp‘ und ‚Mutante‘ zusammengefaßt.

Vor der Auswertung der Daten wurde die Expression von fünf bei molekularbiologischen Arbeiten mit *Drosophila* häufig genutzten *housekeeping*-Genen untersucht. (Tabelle 3.10). Die geringen Expressionsunterschiede von vier der *housekeeping*-Gene zwischen w^{1118}_{iso} und $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ in allen fünf getesteten RNAs weisen auf eine gute Qualität der Daten und hohe Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Microarrays. Die Expression der 18S ribosomalen RNA wird durch den Ausfall von $mod(mdg4)$ -64.2 um den Faktor 7 herunterreguliert und ist daher nicht als Kontrolle geeignet.

Tabelle 3.10 Expressionsveränderung von *housekeeping*-Genen in $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ im Vergleich mit w^{1118}_{iso} . Aufgeführt sind die Mittelwerte der \log_2 -fache Veränderung⁸ der zum jeweiligen Gen gehörenden Target-IDs auf dem Microarray (zusammengefaßt mittels GeneSpring GX[®],TM Software).

Gen	\log_2 -Veränderung ($\Delta 13\ 85c\ V\ 1$: w^{1118}_{iso})
GAPDH	0,0964
eIF-4a	-0,0307
Actin	0,1683
<i>rp49</i>	-0,007
18S rRNA	-2,8298

Da für $Mod(mdg4)$ -64.2 bereits eine Assoziation an das Retrotransposon *HeT-A* nachgewiesen werden konnte, wurde unter allen Target-IDs des Affymetrix „Drosophila Genome 2.0“-Arrays nach Transposons gesucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß sich die Regulation durch $mod(mdg4)$ -64.2 auf Klasse I-Elemente (Retrotransposons) beschränkt. Andere $mod(mdg4)$ -Isoformen regulieren auch Klasse II-Elemente (DNA-Transposons) in ihrer Transkription, wie aus den Daten des Microarrays von Rev31 hervorgeht. (Aufgrund der Fülle

⁷ Aufgrund eines Fehlers auf Seiten der Firma sind die Daten für w^{1118}_{iso} , Rev31, GG295 und $mod(mdg4)^{neo129R32}/+$ nur als Duplikate statt Triplikate verfügbar.

⁸ Ein \log_2 -Wert von 1 bedeutet doppelte Signalstärke bzw. doppelte mRNA-Menge in $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ gegenüber des Wildtyps w^{1118}_{iso} , ein Wert von -1 entspricht halber Signalstärke bzw. 50% mRNA-Menge.

dieser Daten ist die entsprechende Tabelle dieser Arbeit im Anhang als Tabelle A2 beigefügt worden.) Vor allem Retrotransposons der Klassen LTR und LINE-like⁹ sind in $\Delta 13$ 85c V 1 in ihrer Expression signifikant verändert, wie Tabelle 3.11 zeigt. Aus den erhaltenen Daten konnten jedoch keine Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden, ob ein Retrotransposon durch den Ausfall von *mod(mdg4)*-64.2 in seiner Expression positiv oder negativ beeinflusst wird. Elemente derselben Klasse LTR (*long terminal repeats*) werden bei Ausfall von *mod(mdg4)*-64.2 positiv (z.B. *opus*, *HeT-A*, *invader4*) und negativ (*297*, *invader5*) verändert.

Unter den stark regulierten Sequenzen findet sich mit der Target-ID 1631874_at (UniProt-ID Q4V613) auch ein laut der Flybase-Datenbank unbekanntes Transposon. Das Alignment mit dem *D. melanogaster*-Genom ergibt etwa 15 Vollängen- und ca. 50 Teilsequenzen des Elements. Das Transposon besitzt im 3' Bereich (ab Position 468 der Target-ID-Sequenz) über eine Länge von 125bp eine 96%-ige Übereinstimmung mit *HMS-Beagle*{4605} und über 57bp eine 87%-ige Übereinstimmung mit den Transposons *Stalker2* und *412*. Damit läßt es sich den Retrotransposons der LTR-Klasse (*long terminal repeats*) zuordnen.

Vier weitere nicht annotierte Target-IDs korrespondieren mit Teilsequenzen anderer Transposons. Wegen der lediglich partiellen Übereinstimmung wurde in Tabelle 3.11 der Suffix „-like“ angefügt.

Der in Tabelle 3.11 dargestellte Dreifachvergleich zwischen den Daten von $\Delta 13$ 85c V 1, Rev31 und GG295 wurde mit dem Ziel durchgeführt, Transposons zu identifizieren, die von *Mod(mdg4)*-64.2 reguliert werden. Diese sollten in den Datensätzen von $\Delta 13$ 85c V 1 und Rev31 gleich „gerichtet“ und etwa gleich stark, nicht jedoch in GG295 verändert sein, da deren Deletion das spezifische Exon von *mod(mdg4)*-64.2 nicht mit einschließt. Dies trifft auf *17.6-like*, *Stalker-like*, *Ivk*{1098-like}, *G4*, *Doc2-element* und *invader5* zu. Andere Retrotransposons wie z.B. *opus* und *G6* werden offenbar von mehreren *mod(mdg4)*-Isoformen in ihrer Expression gegenteilig reguliert, wie die differierenden Werte für $\Delta 13$ 85c V 1 und Rev31 zeigen. Auch *HeT-A* scheint neben *Mod(mdg4)*-64.2 noch von einer anderen Isoform des Locus negativ reguliert zu werden, da in $\Delta 13$ 85c V 1 die *HeT-A*-Transkriptmenge um das 2,9-fache ($\log_2 2,9=1,53$), in Rev31 aber um den Faktor 12 ($\log_2 \text{Signaldifferenz}=3,6$) steigt.

⁹ Transposons werden unterteilt in Klasse I-Elemente bzw. Retrotransposons, und weiter in Elemente mit langen repetitiven Sequenzen an ihren Enden (LTR) und welche ohne (LINE und SINE). Klasse II-Elemente transponieren nicht über RNA wie die Retrotransposons sondern über ein DNA-Intermediat. Sie besitzen terminale, invertierte Repeats (TIRs). Neben diesen Klassen gibt es Sonderformen wie das FB-Element oder DINEs.

Tabelle 3.11 (nächste Seite) Signifikant in ihrer Expression veränderte Retrotransposons in $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$. Angegeben ist die \log_2 -fache Veränderung des Hybridisierungssignals der Target-ID, die das Element repräsentiert. Es sind nur Elemente erfaßt, die um mindestens den Faktor 2 ($\log_2\text{Signaldifferenz} \geq 1$) in ihrer Transkriptmenge abweichen. Die Signifikanzgrenze ist $p \leq 0,2$ für $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$, p-Werte $> 0,2$ in Rev31 und GG295 wurden grau unterlegt. Nicht signifikant veränderte ($\log_2 x < 1$ oder $p > 0,2$) Transposons sind im Anhang 2 dargestellt.

Name	Klasse	$\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ (p-Wert)	Target-ID	Rev31 (p- Wert)	GG295 (p- Wert)
in $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ hochreguliert					
<i>17.6-like</i>	LTR	2,87 (0,0254)	1624379_s_at ¹	0,82 (0,0884)	0,58 (0,3925)
<i>Stalker-like</i>	LTR	2,82 (0,0101)	1628406_s_at ¹	0,58 (0,1196)	0,47 (0,1668)
<i>Ivk{}1098-like</i>	LINE	2,80 (0,0378)	1627745_s_at ¹	1,41 (0,5503)	0,76 (0,6027)
<i>G4</i>	LINE	2,71 (0,0592)	1626453_x_at	2,25 (0,0405)	0,39 (0,8244)
<i>- ? -</i> ²	LTR	2,64 (0,0148)	1631874_at	1,58 (0,0800)	0,97 (0,0430)
<i>Doc2-element</i>	LINE	2,30 (0,0322)	1632295_s_at	1,39 (0,0008)	0,40 (0,1880)
<i>opus</i>	LTR	1,79 (0,0249)	1638469_s_at	-0,90 (0,0174)	-0,58 (0,0583)
<i>invader4</i>	LTR	1,61 (0,0635)	1625791_s_at	-1,54 (0,4372)	0,80 (0,6915)
<i>HeT-A</i>	LINE	1,53 (0,0003)	1630585_s_at	3,60 (0,0012)	0,68 (0,0228)
<i>Tirant</i>	LTR	1,49 (0,1702)	1640955_s_at	-0,02 (0,9333)	2,42 (0,0114)
<i>G6</i>	LINE	1,41 (0,1173)	1626205_s_at	-0,52 (0,1030)	-2,23 (0,0179)
<i>Ivk</i>	LINE	1,38 (0,0579)	1629641_s_at	0,55 (0,5939)	0,32 (0,7789)
<i>ZAM</i>	LTR	1,23 (0,0203)	1634666_at	-0,08 (0,9231)	0,62 (0,3774)
<i>Quasimodo</i> ³	LTR	1,18 (0,1103)	1635258_s_at	3,20 (0,0325)	-0,36 (0,4283)
<i>GATE</i>	LTR	1,05 (0,1018)	1623960_s_at	0,54 (0,5279)	0,24 (0,8826)
in $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ herunterreguliert					
<i>297</i>	LTR	-1,56 (0,0570)	1629669_x_at	0,05 (0,9183)	0,08 (0,9324)
<i>invader5</i>	LTR	-1,01 (0,1029)	1623845_s_at	-0,44 (0,6940)	0,51 (0,7380)

¹ in Affymetrix-Datenbank nicht als Transposon gekennzeichnet, *nblast* mit Datenbank annotierter Transposons (Flybase) ordnete die in Spalte 1 aufgeführten Bezeichnungen zu. Da keine 100%ige Übereinstimmung gefunden wurde, ist den Namen die Silbe „-like“ angefügt worden.

² nicht in Datenbank annotierter Transposons (Flybase) enthalten, UniProt-ID Q4V613, LTR-Klasse

³ in NCBI-Nucleotide-Datenbank als *cruiser* bezeichnet

In allen drei Mutationen auf gleiche Weise und im gleichen Ausmaß deregulierte Transposons wurden nicht identifiziert, womit experimentelle Artefakte und *inbreeding-* /

imprinting-Effekte (da die Kontrolltiere dem w^{1118}_{iso} -Stamm entnommen wurden ohne vorherige Auskreuzung und Re-Etablierung), ausgeschlossen werden können.

Der Vergleich der Microarraydaten der drei Mutationen macht deutlich, daß *mod(mdg4)* in sehr komplexer Weise die Expression von Transposons moduliert. Das Retrotransposon *Tirant* z.B. wird von *mod(mdg4)*-64.2 und einer Isoform, deren spezifisches Exon im deletierten Bereich von GG295 liegt, in seiner Expression supprimiert (d.h. bei Ausfall der Isoformen höhere Expression), während eine dritte *mod(mdg4)*-Isoform im Bereich der Rev31 diese Suppression ausgleicht (siehe Tab. 3.11).

Neben Retrotransposons werden durch den Ausfall von *mod(mdg4)*-Isoformen auch Gene in ihrer Expression verändert. Da der „Drosophila Genome 2.0“-Chip über 18.000 Target-IDs umfaßt, wurde zu Filterung und Vergleich der Daten das von J. Gräßler im Rahmen eines Praktikums in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Programm „Microarrayanalyse“ (v1.0) eingesetzt. Anschließend wurde in Flybase nach Funktionen gesucht, die den als verändert identifizierten Genen experimentell zugeordnet worden waren. Theoretische, auf Sequenzähnlichkeiten beruhende Funktionen eines Gens wurden zugunsten von Ergebnissen genetischer Screenings und direkter genetischer, molekularbiologischer oder proteinchemischer Analysen zurückgestellt. Außerdem wurden Gene/Target-IDs mit eindeutigen Signaldifferenzen aus den Originaldaten in die Aufstellungen integriert, auch wenn die statistische Analyse $p > 0,05$ ergab (Tab. 3.12 und 3.13). *Gene Ontology*-Datenbanken wurden für diese Analyse nicht genutzt, da die schlechte Annotation von Gen-/Genproduktfunktionen die Ergebnisse verzerrt hätte (siehe dazu Ergebnisse der PANTHER®-Analyse in Anhang 2, 2.4)

Bei Ausfall der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 werden Teile des Immunsystems der Tiere und Gene, die Einfluß auf die männliche Meiose und/oder Spermienentwicklung haben, negativ beeinflusst. Hochreguliert sind hingegen Komponenten von Ionenkanälen (Tab. 3.12). Je zwei Gene aus G-Protein-gekoppelten Signalkaskaden und Gene, deren Mutation zu Bewegungsstörungen führt, sind ebenfalls höher exprimiert. Außerdem wurde die drei- bis vierfache Menge *cut*-mRNA (je nach Target-ID) und jeweils die 2,8-fache Menge (\log_2 Signaldifferenz=1,5) *trx*- (*trithorax*), *br*- (*broad complex*), *JIL-1*-mRNA (*Su(var)3-1*) gemessen.

Tabelle 3.12 Durch den Ausfall von *mod(mdg4)*-64.2 in ihrer Expression stark veränderte Gene

Prozeß, Funktion	Gen	\log_2 -fache Veränderung (p-Wert)
<u>Expression verringert</u>		
Immunsystem	<i>LysX (CG9120)</i>	-3,44 (0,0003)

	<i>dro2</i> (Affy-ID 1629230_at)	-4,034 (0,0002)
	<i>Ugt86Dd</i> (Fbgn0040256)	-2,81 (<0,0001)
	<i>DptB</i> (CG10794)	-2,27 (0,0013)
	<i>Vago</i> (FBgn0030262)	-1,97 (0,0031)
	<i>Corin</i> (CG2105)	-1,68 (0,0946)
männliche Meiose und/oder Spermienentwicklung	<i>JYalpha</i> (CG17923)	-2,43 (0,1737)
	<i>r-cup</i> (FBgn0031142)	-2,01 (0,0113)
	<i>can</i> (FBgn0011569)	-1,96 (0,1071)
	<i>bol</i> (CG4760)	-1,70 (0,1682)
<u>Expression erhöht</u>		
Ionenkanäle	<i>pHCl</i> (Fbgn0036542)	2,76 (0,1569)
	<i>GluClalpha</i> (Fbgn0024963)	2,22 (0,0092)
	<i>SK</i> (FBgn0029761)	2,03 (0,0665)

Insgesamt wurden 747 Target-IDs mit $p < 0,05$ und einer \log_2 Signaldifferenz > 1 erhalten, wofür zum Teil die Überexpression der Transkriptionsrepressors Her ($\log_2 \text{Sigdiff.} = 3,56$) verantwortlich sein dürfte. Zudem besteht in der Mutante $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ wahrscheinlich eine Diskrepanz zwischen verändertem Transkriptom, das mittels der Microarrays analysiert wurde, und dem veränderten Proteom für alle mRNAs, die ein EDEN-Translationsrepressorelement beinhalten. Durch die Überexpression von *bru-3* ($\log_2 \text{Sigdiff.} = 2,25$) werden diese mRNAs in geringerem Umfang in Proteine translatiert.

Neben Retrotransposons und den beschriebenen Genen ist *mod(mdg4)-64.2* auch in die Regulation anderer Elemente involviert. Eine Suche nach diesen Sequenzen in der Datenbank von Affymetrix (NetAffx) zeigte, daß ein Großteil dieser Target-IDs auf Hild *et al.* (2003) zurückgeht. Dabei handelt es sich um eine Arbeit zum Versuch, das komplette Transkriptom von *Drosophila melanogaster* zu erfassen (*transcriptional profiling*). 40 der 100 am stärksten in ihrer Expression veränderten Sequenzen der Microarray-Analyse von $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ haben lediglich die Hild *et al.*-Referenz, jedoch keine FlyBase-Annotierung. *mod(mdg4)-64.2* könnte demnach auch in Prozesse involviert sein, deren beteiligte Gene (oder Isoformen) bisher nicht annotiert wurden.

3.1.5.3.1 Analyse der Microarray-Expressionsdaten von GG295 und Rev31

Das spezifische Exon von *mod(mdg4)*-55.7 ist sowohl in Rev31 wie auch GG295 deletiert. Ein Vergleich der Expressionsprofile (siehe Abb. 3.3) zeigt, daß die Isoformen *mod(mdg4)*-52.2 und -58.8 in GG295 ausfallen, in Rev31 aber gebildet werden. Eine differentielle Analyse der Expressionsdaten beider Mutationen erlaubt es daher, Kandidatengene zu identifizieren, die durch *mod(mdg4)*-55.7 reguliert werden: die Gene sollten sich in ihrer Expression bei Rev31 und GG295 gleich verändern. Die Expression der Gene, die unter der Kontrolle der anderen beiden *mod(mdg4)*-Isoformen stehen, sollte in Rev31 unverändert bleiben oder sich in den Mutanten (wegen der Überexpression der Isoformen in Rev31) diametral verändern. Insgesamt wurden 180 Gene identifiziert, deren veränderte Expression auf das Fehlen der Isoform *mod(mdg4)*-55.7 zurückgeht (Tabelle 3.13). Rund 400 Gene, die direkt oder indirekt von *mod(mdg4)*-52.2 oder -58.8 reguliert werden, konnten aus den vorliegenden Daten und ohne weitere Anhaltspunkte nicht soweit analysiert werden, daß eine Zuordnung putativer Funktionen der Isoformen möglich ist. Einige der potentiell von *mod(mdg4)*-52.2 oder -58.8 regulierten Gene sind in Anhang A2, Tabelle A3 dargestellt. Aufgrund einer Überexpression der in Rev31 nicht deletierten Isoformen, darunter *mod(mdg4)*-52.2 und -58.8, ist Vorsicht vor einer Überinterpretation dieser Daten geboten (Erläuterung, siehe Tabelle A3 und Beibext).

Tabelle 3.13 Ausgewählte Gene, die durch die Deletion des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-55.7 in ihrer Expression verändert werden.

Prozeß, Funktion	Gen	log ₂ -fache Veränderung in GG295 (p-Wert)	log ₂ -fache Veränderung in Rev31 (p-Wert)
<u>Expression verringert</u>			
Embryonal- entwicklung	<i>LCBPI</i> (FBgn0036901)	-3,00 (0,0014)	-3,81 (0,0015)
	<i>paired</i> (FBgn0003145)	-2,67 (0,0353)	-1,66 (0,1180)
	<i>snail</i> (FBgn0003448)	-1,79 (0,0910)	-3,44 (0,0406)
Glutathionhaushalt, -synthese, Detoxifikation	<i>GstE8 & -9</i> (FBgn0063491 & FBgn0063492)	-3,81 (0,0006)	-1,71 (0,0109)
	<i>Prx2540-2</i>	-3,45 (0,0460)	-1,56 (0,0536)

	(FBgn0033518)		
	<i>Trxr-2</i> (FBgn0037170)	-2,81 (0,0060)	-2,77 (0,0003)
	<i>VGlut</i> (FBgn0031424)	-1,17 (0,0067)	-2,24 (0,0023)
Entwicklung	<i>Twin of m4/Barbu</i>	-4,91 (0,1607)	-4,41 (0,1629)
Sinnesorgane und peripheres NS	(FBgn0026320)		
	<i>Brother of Bearded A</i>	-3,07 (0,1702)	-5,52 (0,1574)
	(FBgn0040487)		
	<i>split locus enhancer protein mB</i>	-1,78 (0,1113)	-3,22 (0,0069)
	(FBgn0002735)		
	<i>tenectin</i> (FBgn0039257)	-1,38 (0,0265)	-1,13 (0,0381)
	<i>asense</i> (FBgn0000137)	-1,36 (0,0804)	-1,14 (0,0586)
	<i>miranda</i> (FBgn0021776)	-1,34 (0,1762)	-1,47 (0,1845)
	<i>scabrous</i> (FBgn0003326)	-1,29 (0,0276)	-1,48 (0,0240)

Die in Gruppen zusammengefaßten Daten zeigen, daß essentielle Gene der Segmentierung und Organogenese um 70% (*snail*) bis 87% (*LCBPI*) geringer exprimiert werden. Die Embryonalentwicklung von Revertanten, bei denen die Isoform *mod(mdg4)-55.7* ausfällt, sollte demnach gestört sein. Ebenso sind potentiell die Entgiftungsprozesse durch Glutathion gestört (Glutathion-S-Transferasen). Darüber hinaus sind eine Reduktase, die oxidiertes (GSSG) in reduziertes (GSH) Glutathion umwandelt und mit *VGlut* ein Glutamat-Transporter (Glutamat ist Ausgangspunkt der GSH-Synthese) herunterreguliert. Messungen der intrazellulären GSH-Konzentration und des GSH-GSSG-Verhältnisses sowie andere Experimente zur Reaktion auf oxidativen Stress könnten die Auswirkungen dieser Expressionsveränderungen belegen. Bei der dritten Gruppe von Genen, die herunterreguliert ist, handelt es sich um Transkriptionsfaktoren und Bestandteile von Signalkaskaden (Notch), die eine Rolle in der Entwicklung des (sensorischen) peripheren Nervensystems und der Sinnesorgane spielen. Außerdem könnten durch die verringerten Mengen *sisterless A*, *deadpan* (Numeratorgene) und *male-specific lethal-3* (X-Chromosom-Hyperaktivierung) Defekte bei der Geschlechtsfestlegung und Dosiskompensation auftreten.

Auch Gene, die die Lebensspanne von *Drosophila* beeinflussen (*methuselah*, *methuselah-like*-Gene; Lin *et al.*, 1998; Cvejic *et al.*, 2004) sind in beiden Revertanten dereguliert. Die Auswirkungen bzw. der mögliche Phänotyp läßt sich hier jedoch nicht prognostizieren, da z.B. die erhöhte Expression von *mthl7* einer schwächeren Expression von *mthl8* gegenübersteht.

Aufgrund der festgestellten Veränderungen der Expression von Segmentierungsgenen und Genen, die in die Entwicklung des peripheren Nervensystems involviert sind, wurden die homozygoten GG295-Tiere auf die Phänotypen ‚ektopische Scutellarborsten‘, ‚mißgebildete Flügelquerader‘ und ‚homöotische Transformation des Abdominalsegments A5 in A4‘ (eingegrenzt auf *mod(mdg4)*-58.0/55.2) untersucht. Die Phänotypen konnten nicht beobachtet werden.

3.2 Analyse des *trans*-Spleißens am Beispiel *mod(mdg4)*

mod(mdg4) stellt für die Analyse des *trans*-Spleißvorgangs ein sehr gut geeignetes Studienobjekt dar, da die reifen mRNAs des Locus generell durch diesen Prozeß entstehen. Bisherige Publikationen wiesen das *trans*-Spleißen durch Sequenzierung von *mod(mdg4)*-cDNAs (Büchner *et al.*, 2000) und Northern Blots über die *trans-splice junction* (Exon 4-Exon 5; Labrador *et al.*, 2001) am endogenen Locus nach. Dorn *et al.* (2001) erbrachten den Nachweis, daß von einem Transgen auf einem anderen Chromosom codierte, spezifische *mod(mdg4)*-Exons mit den (endogenen) Exons 1-4 verknüpft werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte *trans*-Spleißen ausschließlich zwischen dem *trans*-Spleißdonor am 3'Ende von Exon 4 und den Spleißakzeptoren am 5'Ende der Exons 5, nicht jedoch mit den Spleißakzeptoren der Exons 6 nachgewiesen werden. Ein Exon-Exon-Übergang „4-6“ konnte selbst in Revertanten nicht beobachtet werden, in denen das spezifische Exon 5 einer Isoform deletiert ist, das Exon 6 erhalten bleibt und transkribiert wird (z.B. GG295, 459; siehe Abb. 3.3).

Die in diesem Teil der Arbeit beschriebenen Experimente zielen auf eine noch eingehendere Analyse des *trans*-Spleißens, so zum Beispiel für das Spleißen notwendige Sequenzen, die funktionelle Konservierung in *D. virilis*, die Frage, ob die Integrität des Locus eine Voraussetzung für das *trans*-Spleißen ist, und möglicherweise in den Prozeß involvierte Spleißfaktoren.

3.2.1 Verlust der Fähigkeit zum *trans*-Spleißen in Revertante Rev31

Die *P{RS5}5-HA-1224*-Revertante Rev31 trägt eine Deletion von Position 6.502 bis 21.447 (locusinterne Skala), die 18 isoformspezifische Exons umfaßt. Die betroffenen Isoformen werden im homozygoten Genotyp nicht mehr gebildet, die verbleibenden andererseits überexprimiert: Eine 3'RACE an RNA aus homozygoten adulten Rev31-Weibchen ergab drei intensive Banden, die bei einer 3'RACE an w^{118}_{iso} -RNA nicht auftreten und die den mRNAs der Isoformen *mod(mdg4)*-52.2, -58.8 und -56.3 entsprechen. Semiquantitative RT-PCRs ergaben eine gegenüber dem Referenzstamm w^{118}_{iso} erhöhte Transkriptmenge dieser Isoformen. Mittels Real-time RT-qPCR wurde eine Zunahme der *mod(mdg4)*-56.3-mRNA um den Faktor 2 in der homozygoten Revertante Rev31 im Vergleich mit w^{118}_{iso} nachgewiesen.

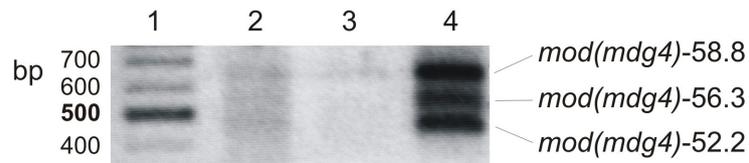


Abbildung 3.14 3'RACE an homozygoter Rev31-RNA. In den Bahnen 2 und 4 wurden RACE-PCRs mit verschiedenen Vorwärtsprimern aufgetragen. Für die PCR in Bahn 3 wurde als *template* eine reverse Transkriptionsreaktion eingesetzt, in die kein Enzym gegeben wurde (-RT-Kontrolle). Die Banden aus Bahn 4 wurden kloniert und sequenziert um ihre Identität zu bestimmen und den korrekten Exon 4-Exon 5-Übergang zu bestätigen.

In Komplementationsexperimenten mit Mutanten des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)* konnte Rev31 deren rezessive Letalität vollständig retten (siehe Tabelle 3.9), die transheterozygoten Weibchen erwiesen sich aber als steril (vgl. Kapitel 3.1.3.3). Da dieser Phänotyp auch bei homozygoten Weibchen der Revertante Rev31 auftritt, wurde vermutet, daß das interchromosomale *trans*-Spleißen zwischen der intakten prä-mRNA des gemeinsamen Teils vom Rev31-Chromosom mit den prä-mRNAs der proximalen 18 isoformspezifischen Exons vom homologen Chromosom nicht oder nicht effizient genug funktioniert.

Um diese Hypothese zu testen, erschien die Mutation des gemeinsamen Teils *mod(mdg4)^{neo129 R32}* (siehe 2.1.3) am besten geeignet. Aufgrund eines unexakten *P*-Elementausbaus sind die ersten drei gemeinsamen Exons deletiert, was zum Ausfall desselben führt und durch entsprechende Platzierung von PCR-Primern einen allelspezifischen Nachweis vereinfacht. Zunächst wurde aus 5-7d alten Weibchen des Genotyps Rev31/*mod(mdg4)^{neo129 R32}* RNA isoliert und mittels semiquantitativer RT-PCR die mRNA-Mengen ausgewählter *mod(mdg4)*-Isoformen bestimmt. In Abbildung 3.15 ist dies am Beispiel der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 gezeigt. Um ausschließlich mRNAs nachzuweisen, deren gemeinsame Exons 1-4 vom Rev31-Chromosom stammen, wurde ein *fwd*-Primer im Exon2 (im Bereich der *mod(mdg4)^{neo129 R32}*-Deletion) eingesetzt. Mit diesem Primer läßt sich die *mod(mdg4)*-64.2-mRNA weder in adulten Rev31/*mod(mdg4)^{neo129 R32}*-Weibchen noch in den Embryonen einer Auskreuzung mit *w¹¹⁸_{iso}*-Männchen nachweisen (*semi-nested* PCR, insgesamt 72 Zyklen). Das gleiche Ergebnis wurde für *mod(mdg4)*-67.2 erzielt (nicht gezeigt). Die mRNA der Isoform *mod(mdg4)*-51.4, deren isoformspezifisches Exon nicht von Rev31 deletiert wurde, ergab ein RT-PCR-Amplifikat. Ebenso die Isoformen *mod(mdg4)*-58.8 und -56.3 (nicht gezeigt).

Mit Vorwärtsprimern innerhalb der deletierten Sequenz auf dem *mod(mdg4)^{neo129 R32}*-Chromosom ließen sich in diesem Genotyp keine mRNAs nachweisen, die aus interchromosomalem *trans*-Spleißen entstanden waren.

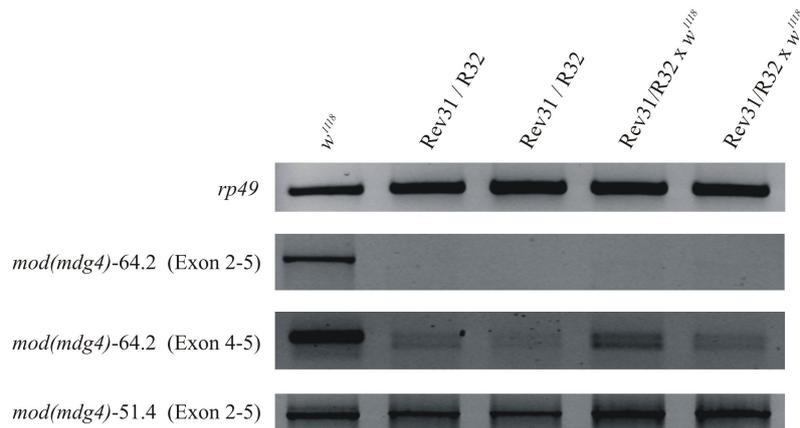


Abbildung 3.15 RT-PCR-Analyse von *mod(mdg4)* in w^{118}_{iso} -Weibchen (Kontrolle), Weibchen des Genotyps Rev31/*mod(mdg4)*^{neo129 R32} (Bahnen 2 und 3) und Embryonen aus der Kreuzung dieser Weibchen mit w^{118}_{iso} -Männchen (Bahnen 4 und 5). Untersuchte Isoformen: *mod(mdg4)*-64.2 (spezif. Exon innerhalb der Rev31-Deletion) *mod(mdg4)*-51.4 (außerhalb der Rev31-Deletion); Die verwendeten PCR-Vorwärtsprimer binden in Exon 2 (innerhalb der *mod(mdg4)*^{neo129 R32}-Deletion) bzw. Exon 4, das in beiden Allelen vorhanden ist.

Die Zunahme der mRNA-Konzentration von auf dem gleichen Chromosom codierten Isoformen bei gleichzeitigem Verlust der Fähigkeit zum interchromosomalen *trans*-Spleißen legt den Schluß nahe, daß bei Rev31 der Transkriptionsstop des gemeinsamen Teils des *mod(mdg4)*-Locus deletiert wurde. Das würde dazu führen, daß vom Promotor der gemeinsamen Exons ausgehend ein durchgehendes Transkript gebildet wird, aus dem durch alternatives *cis*-Spleißen die reifen mRNA gebildet werden.

Wurde für den Nachweis der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 in Rev31/*mod(mdg4)*^{neo129 R32} ein Vorwärtsprimer aus dem gemeinsamen Exon 4 und *reverse*-Primer aus den isoformspezifischen Exon (innerhalb der Rev31-Deletion) eingesetzt, entstehen Amplifikate. Diese gehen höchstwahrscheinlich auf die Promotoraktivität des 205bp großen *mod(mdg4)*^{neo129}-*P*-Elementrestes im Intron 3 des *mod(mdg4)*-Locus auf dem *mod(mdg4)*^{neo129 R32}-Chromosom zurück. Dabei entstehen 5' verkürzte Transkripte, denen die Exons 1-3 fehlen. Da von *mod(mdg4)*-Exons 2 und 3 die für die Proteinfunktion essentielle BTB-Domäne codiert wird, wären aus den verkürzten Transkripten entstehende Proteine höchstwahrscheinlich nicht funktionell. Die Transkriptionseinheiten der isoformspezifischen Exons sind von der *mod(mdg4)*^{neo129 R32}-Mutation nicht betroffen.

Aus den experimentellen Ergebnissen wurde die Arbeitshypothese abgeleitet, daß sich das Transkriptionsstoppsignal der Transkriptionseinheit, die die gemeinsamen Exons 1-4 enthält, im deletierten Bereich der Revertante Rev31 befindet. Somit würde in diesem Genotyp eine prä-mRNA gebildet werden, die die gemeinsamen Exons 1-4 und die spezifischen Exons der 13

Isoformen von *mod(mdg4)*-52.2 bis -54.5 enthält. Als Konsequenz würden reife mRNAs überwiegend durch *cis*-Spleißen gebildet¹⁰ und ein *trans*-Spleißen zwischen den gemeinsamen Exons aus dem Transkript des Rev31-Chromosoms und den prä-mRNAs, die von dem Chromosom gebildet werden, das die Mutation des gemeinsamen *mod(mdg4)*-Teils trägt, findet nur in geringem Maße oder gar nicht statt.

Das ausschließliche *cis*-Spleißen innerhalb von *mod(mdg4)* bei Rev31 konnte im Rahmen der Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Länge der Sequenz von rund 1,5kb zwischen Exon 4 und dem isoformspezifischen Exon von *mod(mdg4)*-52.2, die nun per Definition ein Intron ist, ermöglicht vermutlich ein geringes Maß von *trans*-Spleißen, die entstehenden mRNAs sind allerdings nicht mittels RT-PCR nachweisbar (siehe Abb. 3.15). Ein Indiz für tatsächlich stattfindendes interchromosomales *trans*-Spleißen ist die vollständige Komplementation der rezessiven Letalität von *mod(mdg4)^{neo129 R32}* bzw. die der rezessiven Semiletalität von Rev31 im transheterozygoten Genotyp *Rev31/mod(mdg4)^{neo129 R32}* (siehe Tabelle 3.9). Andererseits ist die mRNA-Menge, die so gebildet wird, nicht ausreichend, um die Sterilität der transheterozygoten Weibchen (Tab. 3.14) zu retten.

Um zu testen, ob die Sterilität durch einen intakten gemeinsamen Teil (Exons 1-4) gerettet werden kann, wurden Transgene aus *D. virilis* eingekreuzt, die unterschiedlich große Fragmente des *D. virilis-mod(mdg4)* enthalten. Getestet wurden drei verschieden große Transgene von 11,5kb, 9,5kb und 6,8 kb Größe¹¹, die alle mindestens den gemeinsamen Teil des *D. virilis-mod(mdg4)*-Locus enthalten. Diese Transgene konnten die Fertilität der Weibchen retten. Zwei 2,7kb große Fragmente, die drei isoformspezifische Exons von *D. virilis-mod(mdg4)* aber nicht dessen gemeinsamen Teil enthalten, konnten die Fertilität nicht retten. Außerdem konnte beobachtet werden, daß Weibchen, die die beiden rezessiv letalen Allele *Df(3R)ED6050* (intakter gemeinsamer Teil und proximale 11 spezifische Exons) und *mod(mdg4)^{neo129 R32}* (alle isoformspezifischen Exons intakt) tragen, normal fertil sind und auch sonst keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigen.

Tabelle 3.14 (nächste Seite) Fertilitätstest von Weibchen verschiedener Genotypen mit und ohne *D. virilis*-Transgenen. Die Rekombination von Transgenen mit *mod(mdg4)*-Allelen wurde mit einem Bindestrich dargestellt, z.B. *3-P(w⁺ Dvi 11.5kb) – Rev31*. Pro Röhrchen wurden drei Weibchen mit ca. fünf *w¹¹¹⁸_{iso}*-Männchen gekreuzt; je Genotyp wurden mindestens vier Röhrchen ausgewertet.

¹⁰ überwiegend aber nicht notwendigerweise ausschließlich, da *trans*-Spleißen nicht auf Outron-abhängige Ereignisse festgelegt ist (siehe Diskussion) Das „Einspleißen“ in eine intakte RNA *up*- und *downstream* eines *cis*-spleißenden Exons und Verdrängen desselben durch ein Outron-flankiertes Exon wird auch bei der SMART-Technik ausgenutzt (Puttaraju *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Rodriguez-Martin *et al.*, 2005).

¹¹ Das Transgen von 6,8kb Größe enthält nur die gemeinsamen Exons 1-4. Die größeren Transgene enthalten zusätzlich 3 (9,5kb) bzw. 5 (11,5kb) isoformspezifische Exons; siehe Abb 3.18.

Genotyp der getesteten Weibchen	weibl. Fertilität
Rev31 / <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	steril
Rev31 / <i>mod(mdg4)</i> ⁰²	steril
3- <i>P(w</i> ⁺ <i>Dvi 2.7kb)</i> – Rev31 / <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	steril
3- <i>P(w</i> ⁺ <i>Dvi 2.7kb C→A II)</i> – Rev31 / <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	steril
3- <i>P(w</i> ⁺ <i>Dvi 11.5kb)</i> – Rev31 / <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	fertil
3- <i>P(w</i> ⁺ <i>Dvi 11.5kb)</i> – <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32} / <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	fertil
<i>P(w</i> ⁺ <i>Dvi 9,5kb spin →← II)</i> – Rev31 / <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	fertil
2- <i>P(w</i> ⁺ <i>Dvi 6.8kb)</i> ; Rev31 / <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	fertil
<i>Df(3R)ED6050</i> / <i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}	fertil

Bemerkenswert ist, daß eine generierte Linie mit dem Transgen *P(w*⁺ *Dvi 6.8kb)*, das lediglich den gemeinsamen Teil zur Verfügung stellt, die Fertilität von Rev31 / *mod(mdg4)*^{neo129 R32} retten konnte, obwohl sich das Transgen auf dem zweiten Chromosom befindet, also zur Generierung reifer *mod(mdg4)*-mRNAs durch *trans*-Spleißen die prä-mRNAs von gemeinsamen und spezifischen Exons eine räumliche Distanz überwinden mußten, die vermutlich wesentlich größer ist als die im endogenen Locus. Darüber hinaus ist interessant, daß es in diesem Genotyp chimäre *D. virilis*-*D. melanogaster*-mRNAs sind, die die normale Fruchtbarkeit der Weibchen wiederherstellen.

3.2.2 Konservierung des *mod(mdg4)*-Locus zwischen *Drosophila melanogaster* und *D. virilis*

3.2.2.1 Nachweis chimärer *D. virilis*/*D. melanogaster*-*mod(mdg4)*-mRNAs

Kraus und Dorn (2004) wiesen eine Konservierung des *mod(mdg4)*-Locus in *Drosophila virilis*, *D. pseudoobscura*, *Anopheles gambiae* und *Bombyx mori* nach. Da die Genstruktur in *D. virilis* im Bereich der gemeinsamen Exons bisher nicht vollständig experimentell belegt ist, wurde zunächst eine 5'RACE durchgeführt, um den Transkriptionsstart und die Sequenz des Exon 1 zu bestimmen.

```

mel 2646 -----TTTCGTAATA---C-ATTTAAAAAAAAAATATCAAAGCACATC
vir 2665 ATATGTACATTCTCCATTTGGAATAAAACCAATTTAAAA---TTGTTCAAATCAATAC
          *** * * *** * *****          **** * *

mel 2686 AA-----
vir 2621 AATTTAATTTGCAATTTCAACTGTTTTTTTGGACAGTTGAACGTAATTTTGAATTTGAAT
          **

mel 2688 -----CTATCAATATTCATAAA-----AGTATTTTCGATATAAATATTTTA-
vir 2681 CGGACGTTTGCCAACACACTCAGGTTTCATCGTATGCGATATATCGTTATATATATATATCGT
          * *** * * *          *** ** ** ** **

mel 2728 ---AGCTA-----TCGATATATG-TCACTTTTTGTTTTGCCATCGCCAGCA-----
vir 2741 TACAGATACTCACATCGATACATCGATTACATATCAGCATACCTGC-CCAGTATAAAAAGT
          ** **          ***** ** * * * * *          * ** * ** ** *

mel 2771 --ATCTCGTCGCTG---GTA-ACACTTCTAATTTT---CACGTCAAAGAAGCTCGGACGC
vir 2800 CTGGCTCATCCCTAGCTAGTATACATTTATTTTCGTTGTAAGTCTGTTGAAAAAGTTGGACGC
          *** ** * *          *** ** ** * *          ** * ** ** ** * ** ** **

mel 2822 GTTCTGCGTGTGCGCCGCGCTAGCAAA-----AAACTCTGGCTTTAGTTAGTTA
vir 2860 AA-CTGCGCGTCATCAGCGCAGGAAAAGTAATTATTTTAAATTTGTGCAGCAAATAAGTA
          ***** ** * ** ** * ** **          *** * ** * * ** **

mel 2871 TTTTATTGGAAAAATATTTAGTCAAGAGCCAACAACGCATAG--ATACAGAAAAGT--
vir 2919 TCTCATTATAGAAATTTAATTTCAAAGGCACACACATACACAGCAGATACAGAAAATTTCT
          * * ** * * ** ** *          ***** * * *          ***** ** *

          M A D D E Q F S L C

mel 3137 ATTGATTT-----TCGTCCAAGATGGCGGACGACGAGCAATTCAGCTTTGTGC
vir 3254 ATTGATTTCTACGCTCGTCCAAGATGGCGGACGACGAGCAATTCAGTTTGTGC
          *****          *****

```

Abbildung 3.16 Alignment der *mod(mdg4)*-genomischen Sequenzen von *D. melanogaster* und *D. virilis* im Bereich Promotor bis Translationsstart ohne Intron 1. CAAT- und TATA-Boxen sind mit Kästchen markiert. Der transkribierte Bereich ist grau unterlegt. Der Doppelpfeil mit invertierten Spitzen kennzeichnet den Exon 1-Exon 2-Übergang. Die Basenpositionen (links) entsprechen den internen Skalen beider Loci.

Um neben der strukturellen auch die funktionelle Konservierung des Locus in *D. melanogaster* und *D. virilis* zu prüfen, wurde untersucht, ob *trans*-Spleißen zwischen *mod(mdg4)*-prä-mRNAs beider Spezies möglich ist. Zum Nachweis chimärer *D. virilis/D. melanogaster-mod(mdg4)*-mRNAs wurden drei verschiedene experimentelle Ansätze gewählt. Gegenstand dieser Experimente war die Isoform *mod(mdg4)*-64.2, deren Identität im weiteren nach Herkunftsspezies mit *Dme*, *Dvi* bzw. *Dvi/Dme* bezeichnet wird (*Dvi/Dme* für eine chimäre mRNA, deren gemeinsame Exons aus *D. virilis*, ihr 3' Bereich, das isoformspezifische Exon, aus *D. melanogaster* stammt). Für die Untersuchungen wurde jeweils Gesamt-RNA adulter (5-7d) *D. melanogaster*-Weibchen eingesetzt, die verschiedene *D. virilis-mod(mdg4)*-Transgene (alle in pW8) trugen. Zunächst wurden RT-PCRs durchgeführt mit einem *forward*-Primer, der spezifisch für das gemeinsame Exon 4 von *D. virilis-mod(mdg4)* ist (402virF in Anhang 1), und einem *reverse*-Primer, der bei der gewählten *Annealing*-Temperatur an die isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-64.2 beider Arten paßt (93D-64.2-B-RT; $T_{\text{ann}}=55^{\circ}\text{C}$). Das RT-PCR-Amplifikat wurde anschließend mit *PvuII*, das je eine

4; -: isoformspezifisches Exon *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2; -: isoformspezifisches Exon *Dme-mod(mdg4)*-64.2. (C) Kontrollexperimente, *PvuII*-Verdau von PCR- und RT-PCR-Amplifikaten, Bahn 1: Referenz-cDNA *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2; Bahnen 2 und 3: zwei verschiedene Referenz-cDNA-Klone *Dvi/Dme-mod(mdg4)*-64.2; Bahn 4: RT-PCR an Gemisch *D. melanogaster*- und *D. virilis*-RNA; Bahn 5: PCR an Gemisch *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2-Referenz-cDNA und *Dvi/Dme-mod(mdg4)*-Referenz-64.2-cDNA; (D) *PvuII*-Verdau von RT-PCR-Amplifikaten aus Gesamt-RNA der angegebenen Genotypen. Bahn 1: $2\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 11.5\text{kb})/+$; Bahn 2: $3\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 11.5\text{kb})/+$; Bahn 3: $2\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 11.5\text{kb})/+; \textit{mod(mdg4)}^{neo129}$; Bahn 4: $3\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 11.5\text{kb})\textit{mod(mdg4)}^{02}$

Die semiquantitativen RT-PCRs, gefolgt von *PvuII*-Verdau und Analyse der Restriktionsfragmente erlauben nur eine ungefähre Quantifizierung der chimären mRNAs. Daher wurden die RT-PCR-Amplifikate von $3\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 11.5\text{kb})/+$ in einem zweiten Experiment in pGEM-3Zf ligiert. 282 erhaltene Klone wurden mit speziesspezifischen Primern darauf getestet, ob sie *Dvi*- oder *Dvi/Dme-mod(mdg4)*-64.2-cDNA enthalten. Drei cDNA-Klone erwiesen sich als *Dvi/Dme-mod(mdg4)*-64.2-cDNA-Chimären, was einer Rate von ca. einem Prozent entspricht. Ein Abschnitt aller als chimär getesteter Klone und von 59 zufällig ausgewählten *D. virilis*-cDNA-Klonen wurde sequenziert um die Identität der Klone zu bestätigen und die Sequenz um die *trans*-Spleißposition zu überprüfen. Bei allen Klonen konnten zum einen die Identität (drei mal *Dvi/Dme* und 59 mal *Dvi/Dvi*) und zum anderen am Exon-Exon-Übergang die korrekte Sequenz nachgewiesen werden und somit *template switching* als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden.

Der dritte Ansatz zur Quantifizierung chimärer *Dvi/Dme-mod(mdg4)*-cDNAs war die Real-time RT-qPCR-Analyse. In diesem Experiment wurde die Konzentration verschiedener mRNAs bestimmt. Dazu wurden zwei Transgene als homozygote Linien verwendet. Das Transgen $3\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 11.5\text{kb})$ codiert die gemeinsamen Exons 1-4 und die fünf proximalen isoformspezifischen Exons von *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2 bis -h53.1 und ist auf dem dritten Chromosom lokalisiert. Das Transgen $2\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 6.8\text{kb})$ enthält lediglich die gemeinsamen Exons 1-4 und keine isoformspezifischen Exons. Dieses *P*-Element ist ins zweite Chromosom inseriert.

Tabelle 3.15 Real-time RT-qPCR-Analyse der *mod(mdg4)*-mRNA-Konzentrationen. Gesamt-RNA wurde aus 5-7d alten Weibchen von w^{1118}_{iso} , $w^{1118}_{iso}; 3\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 11.5\text{kb})/3\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 11.5\text{kb})$ und $w^{1118}_{iso}; 2\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 6.8\text{kb})/2\text{-}P(w^+ \textit{Dvi } 6.8\text{kb})$ isoliert. Die Quantifizierung erfolgte als Dreifachbestimmung mit unabhängigen RNA-Präparationen. Für verwendete Primer: siehe Anhang 1 unter „für Real-time RT-qPCRs“. Die ermittelten Werte wurden zunächst mit Hilfe

von Plasmidstandards auf Kopien je μg Gesamt-RNA umgerechnet und dann auf das *housekeeping*-Gen *rp49* ($rp49=1$) normalisiert.

relative Expression ¹	Genotyp		
	w^{1118}_{iso} (Kontrolle)	$w^{1118}_{iso}; 3-P(w^+ Dvi$ <i>11.5kb</i>)	$w^{1118}_{iso}; 2-P(w^+ Dvi$ <i>6.8kb</i>)
	gemeinsame Exons 1-4		
<i>D. melanogaster</i>	76,0 \pm 12,1	75,6 \pm 13,8	44,2 \pm 5,4
<i>D. virilis</i>	-	59,2 \pm 12,7	27,8 \pm 6,2
	mRNAs von <i>mod(mdg4)</i> -Isoformen		
<i>Dme</i> 64.2	0,667 \pm 0,042	0,314 \pm 0,044	0,132 \pm 0,010
<i>Dvi</i> h64.2 (transgen)	-	1,200 \pm 0,178	-
<i>Dvi/Dme</i> 64.2 (chimär)	-	0,008 \pm 0,001	0,005 \pm 0,001
<i>Dme</i> 67.2	0,654 \pm 0,085	0,451 \pm 0,051	0,214 \pm 0,013
<i>Dvi/Dme</i> 67.2 (chimär)	-	0,021 \pm 0,004	0,025 \pm 0,003

¹ $rp49=1$

Die Expression des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)* ist in w^{1118}_{iso} 76-fach höher als die des *housekeeping*-Gens *rp49*, während die Transkripte von *mod(mdg4)*-64.2 (0,667) und -67.2 (0,654) in etwa so hoch exprimiert werden wie *rp49* (1). *mod(mdg4)*-67.2 wird in der Literatur (Gerasimova *et al.*, 1995; Büchner *et al.*, 2000) als abundanteste Isoform beschrieben, deren mRNA-Konzentration wesentlich über der anderer Isoformen liegt. Die vergleichbare Konzentration von *mod(mdg4)*-64.2-mRNA als am weitesten proximal codierter Isoform erscheint plausibel. Die Konzentration des gemeinsamen Teils (gespleißte Form, Intron zwischen Exon 2 und 3 ist entfernt) ist dagegen um fast zwei Größenordnungen größer als *rp49*, was aber dadurch erklärt werden kann, daß der gemeinsame Teil mit den Exons 1-4 als *trans*-Spleißdonor zur Generierung aller stark exprimiert werden muß. In der Linie $3-P(w^+ Dvi$ *11.5kb*) ist die Expression des endogenen gemeinsamen Teils unverändert (75,6) gegenüber w^{1118}_{iso} , hingegen wird der gemeinsame Teil des Transgens geringer exprimiert (59,2). Die Expression der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 ist um den Faktor 2 geringer (0,314 verglichen mit 0,667). Die transgencodierte Isoform *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2 zeigt eine doppelt so hohe Expression wie die endogene (1,200 vgl. mit 0,667), was auf die geringe „Konkurrenz“ von lediglich fünf *trans*-Speißakzeptoren im Transgen zurückgeführt werden kann – die prä-mRNAs des endogenen Locus mit ihren *trans*-Speißakzeptoren dürften am Insertionsort des Transgens eine geringe lokale Konzentration haben – oder auf eine generell stärkere Expression der Isoform in *D. virilis*. Die Isoform *mod(mdg4)*-67.2 wird vom Transgen nicht

codiert. Sie wird, analog zu *mod(mdg4)*-64.2, in Gegenwart des *D. virilis*-Transgens in geringerer Konzentration gebildet (0,451 gegenüber 0,654). Dabei könnte es sich um Ergebnisse einer negativen *Feedback*-Schleife oder um generelle Veränderungen der Transkriptionsrate handeln.

Mit *reverse*-Primern, die zwischen den *mod(mdg4)*-64.2- bzw. *mod(mdg4)*-67.2-mRNAs beider Spezies diskriminieren¹², wurde die Konzentration der chimären mRNAs bestimmt. *Dvi/Dme-mod(mdg4)*-64.2-mRNA macht ca. 2,5% der entsprechenden endogenen Isoform (0,008:0,314) und 0,7% im Vergleich mit der *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2-mRNA (0,008:1,200). Damit konnten die Ergebnisse des Experiments mit den cDNA-Klonen (siehe oben) bestätigt werden. Die Konzentration chimärer *Dvi/Dme-mod(mdg4)*-67.2-mRNA beläuft sich auf 4,7% verglichen mit der endogenen Isoform (0,021:0,451).

Die Expression transgener und endogener gemeinsamer Exons wie auch der endogenen Isoformen *mod(mdg4)*-64.2 und -67.2 ist in $2\text{-}P(w^+ \text{Dvi } 6.8\text{kb})$ reduziert. Die Konzentration chimärer mRNAs betrug im Vergleich zu den korrespondierenden endogenen Transkripten 3,8 bzw. 11,7% (0,005:0,132 bzw. 0,025:0,214). Die höheren relativen Konzentrationen können durch das Fehlen isoformspezifischer Exons im Transgen erklärt werden, wodurch alle *D. virilis*-gemeinsamen Exons als *trans*-Spleißdonor zur Verfügung stehen.

Bei diesen Quantifizierungen wurden *D. virilis*- und chimäre *D. virilis/D. melanogaster*-mRNAs in transgenen Linien analysiert, die keine Mutation im endogenen *mod(mdg4)*-Locus tragen. In dieser Wildtypsituation in Bezug auf den endogenen Locus, wird von diesem relativ viel *trans*-Spleißdonor, die endogenen Exons 1-4, in unmittelbarer Nähe zu den *trans*-Spleißakzeptoren der isoformspezifischen Exons gebildet, was deren Konzentration im Nucleoplasma in größerem Abstand zum Locus stark vermindert. Wird der gemeinsame Teil des Locus nicht transkribiert, steigt die lokale Konzentration verfügbarer *trans*-Spleißakzeptoren. Ein Transgen, das die gemeinsamen *mod(mdg4)*-Exons 1-4 von *D. virilis* codiert, wäre dann die einzige Möglichkeit, funktionelle, chimäre *mod(mdg4)*-mRNAs zu synthetisieren. Die Diffusion der prä-mRNAs ist dabei ein limitierender Faktor und direkt von der Position des Transgens abhängig.

¹² $\Delta\Delta\text{Ct}=9$ bei Verwendung von *Dme-reverse*-Primer gegenüber *Dvi-reverse*-Primer an *D. virilis*-RNA und $\Delta\Delta\text{Ct}=14$ bei *Dvi-reverse*-Primer gegenüber *Dme-reverse*-Primer an *D. melanogaster*-RNA, d.h. 500- bis 16000-fach schlechtere Amplifikation bei Verwendung der PCR-Primer an cDNA der „falschen“ Art (bei einer angenommenen PCR-Effizienz von 100%)

3.2.2.2 Genetische Analysen zum nachweis von mRNA-*trans*-Spleißen am *mod(mdg4)*-Locus mit *D. virilis*- und *D. melanogaster*-Transgenen

In vorangegangenen Arbeiten (Büchner *et al.*, 2000) konnte gezeigt werden, daß die rezessive Letalität von Mutationen des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)* durch ein Transgen gerettet werden konnte, das den 5' Bereich des Locus einschließlich der Exons 1-4 enthält. Es sollte nun geprüft werden, ob Transgene, die die korrespondierende Sequenz aus *D. virilis* enthalten, ebenfalls in der Lage sind, diese Mutationen zu retten. Zwar konnte die Existenz chimärer mRNAs nachgewiesen werden (siehe oben), ihre physiologische Funktion sollte nun analysiert werden. Dazu wurden Komplementationsexperimente mit der rezessiv letalen *mod(mdg4)*-Mutation *mod(mdg4)*⁰² mit *Dvi-mod(mdg4)*-Transgenen durchgeführt (Tabelle 3.16). Des weiteren konnten folgende Linien etabliert und über mehrere Generationen homozygot erhalten werden: *3-P(w⁺ Dvi 11.5kb) - mod(mdg4)^{neo129}* (>30 Generationen) und *2-P(w⁺ Dvi 6.8kb)/+; mod(mdg4)^{neo129 R32}* (>20 Generationen).

Tabelle 3.16 Komplementation der rezessiv letalen Mutation *mod(mdg4)*⁰² durch verschiedene *D. virilis*-Transgene. Alle Transgene codieren die gemeinsamen Exons 1-4, die 9,5kb bzw. 11,5kb großen Transgene desweiteren zwei bzw. fünf isoformspezifische Exons. Drittchromosomale Transgene wurden vor dem Experiment mit *mod(mdg4)*⁰² rekombiniert.

Transgen	Komplementation <i>mod(mdg4)</i> ⁰²
Transgene auf dem zweiten Chromosom	
<i>2-P(w⁺ Dvi 6,8kb) / +; mod(mdg4)⁰²</i>	11%
<i>2-P(w⁺ Dvi 11,5kb) / +; mod(mdg4)⁰²</i>	27%
<i>2-P(w⁺ Dvi 9,5kb spin →← V) / +; mod(mdg4)⁰²</i>	47%
<i>2-P(w⁺ Dvi 9,5kb spin →← VI) / +; mod(mdg4)⁰²</i>	57%
Transgene auf dem dritten Chromosom	
<i>3-P(w⁺ Dvi 11,5kb) mod(mdg4)⁰²</i>	79%
<i>3-P(w⁺ Dvi 9,5kb C→A) mod(mdg4)⁰²</i>	88%
<i>3-P(w⁺ Dvi 9,5kb spin →← II) mod(mdg4)⁰²</i>	146%

Die erfolgreiche Komplementation der Mutation zeigt, daß *Dvi/Dme-mod(mdg4)*-Chimären auch die physiologischen Funktionen der endogenen *mod(mdg4)*-Isoformen ausfüllen können. Die unterschiedlichen Komplementationsraten der Transgene scheinen abhängig von der

Position im Genom zu sein, also dem räumlichen Abstand zum endogenen *mod(mdg4)*-Locus. Obwohl die getesteten *D. virilis*-Transgene unterschiedlich groß sind und unterschiedlich viele isoformspezifische Exons codieren, rettet das größte Transgen die rezessive Letalität von *mod(mdg4)⁰²* nicht am besten. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß für die Komplementation nicht nur die Position des Transgens (und in Verbindung damit die Chromatinstruktur in seiner Umgebung) verantwortlich ist, sondern auch das Vorhandensein von *D. virilis*-isoformspezifischen Exons in einigen verwendeten Transgenen die experimentellen Ergebnisse verfälschen kann. Die Funktionalität von transgencodierten *D. virilis*-Proteinisofomen in *D. melanogaster* wurde bereits nachgewiesen (Gabler, 2003; Gabler *et al.*, 2005).

In einem weiteren experimentellen Ansatz sollte systematisch geprüft werden, in wie weit tatsächlich die Position des Transgens in Genom die Effizienz des *trans*-Spleißens beeinflusst. Hierfür wurde ein Transgen etabliert, welches die proximalen 7080bp des *D. melanogaster-mod(mdg4)*-Locus¹³ umfaßt und ausschließlich die gemeinsamen Exons 1-4 codiert. Es konnten 29 unabhängige transgene Linien durch keimbahnvermittelte Transformation etabliert werden. Diese Transgene wurden für ein Komplementationsexperiment mit *mod(mdg4)⁰²* eingesetzt.

Tabelle 3.17 Komplementation der rezessiven Letalität des Allels *mod(mdg4)⁰²* durch das Transgen $P\{w^+ Dme\ mod(mdg4)^{common\ region}\}$. Die Komplementation ergibt sich aus dem Verhältnis $Sb^+ w^+$ -Tiere zur Gesamtzahl der w^+ -Tiere in F1. Gekreuzt wurden ♀ $P\{w^+ Dme\ mod(mdg4)^{common\ region}\}$; *mod(mdg4)⁰²/TM6C* mit ♂ *mod(mdg4)⁰²/TM6C*; für X-chromosomal lokalisierte Transgene wurde auch die reziproke Kreuzung durchgeführt (Transgen paternal eingebracht). Auf dem 3. Chromosom lokalisierte Transgene wurden zuvor mit *mod(mdg4)⁰²* rekombiniert. n.b. nicht bestimmt

Transgen	Lokalisierung (Chromosom)	% Komplementation <i>mod(mdg4)⁰²</i>
T2 (paternal)	X	0%
T2	X	0%
T6 (paternal)	X	0%
T7 (paternal)	X	0%
T7	X	0%
T12 (paternal)	X	0%
T12	X	n.b.

¹³ Um mögliche Inkompatibilitäten der Proteine auszuschließen, die in $60 \cdot 10^6$ Jahren getrennter Evolution (Casacuberta und Pardue, 2003) von *D. melanogaster* und *D. virilis* entstanden sein könnten, wurde für dieses Experiment die Sequenz des Transgens von *D. melanogaster* abgeleitet statt vorhandene *D. virilis*-Transgene zu mobilisieren.

T15 (paternal)	X	0%
T15	X	0%
T5	2	0%
T20	2	0%
T24	2	0%
T8	2	5% ¹
T13	2	33% ¹
T9	3	5% ¹
T19	3	12% ¹
T3	3	38% ²
T4	3	68% ²
T21	3	69% ²
T17	3	95% ²
T16	3	103% ²
T11	4	♂ 13% ¹
T25	4	29% ²

¹ Tiere waren steril

² Tiere waren eingeschränkt fertil

Tabelle 3.17 zeigt deutlich eine Positionsabhängigkeit der Fähigkeit des Transgens $P\{w^+ Dme mod(mdg4)^{common\ region}\}$, die rezessive Letalität des Allels $mod(mdg4)^{02}$ zu retten. Keines der X-chromosomal lokalisierten Transgene ist dazu in der Lage. Einige der auf dem 2. Chromosom lokalisierten Transgene können die rezessive Letalität von $mod(mdg4)^{02}$ teilweise komplementieren ($\leq 33\%$), ebenso viertchromosomale Transgene. Transgene auf dem 3. Chromosom wurden mit $mod(mdg4)^{02}$ rekombiniert ($w^{1118_{iso}}$; $P\{w^+ mod(mdg4)^{common\ region}\} mod(mdg4)^{02}/TM6C$) und dann mit $mod(mdg4)^{02}/TM6C$ gekreuzt. Die Komplementationsraten reichen hier von 5% bis zur vollständigen Rettung in zwei Fällen (95% und 103%).

Durch eine *in situ*-Hybridisierung der Transgene und des endogenen Locus könnten deren Positionen und der Abstand zueinander im (fixierten) Zellkern bestimmt werden. Der dreidimensionale Abstand zwischen Transgen und endogenem Locus entspricht der Diffusionsstrecke, die die prä-mRNAs – das Transkript mit den Exons 1-4 von Transgen und die Transkripte mit den isoformspezifischen Exons vom endogenen Locus – vor dem *trans*-Spleißvorgang überwinden müssen. Möglicherweise sind der Abstand beider Positionen im Kern ausschlaggebend für die Effizienz des *trans*-Spleißens und damit für die Komplementationsrate.

An den Tieren aus den Komplementationskreuzungen wurden homöotische Transformation der Abdominalsegmente (A. Dörfel, pers. Mitteilung) und eingeschränkte weibliche Fertilität

bis Sterilität (siehe Tab. 3.17) beobachtet, was auf zu geringe mRNA-Mengen der Isoformen *mod(mdg4)*-54.7 bis -53.1 (Fertilität, siehe 3.1.3.3) und *mod(mdg4)*-58.0 und/oder -55.2 (homöotische Transformation, siehe 3.1.3.4) schließen läßt. Bei den Komplementationen mit *D. virilis*-Transgenen wurde keine homöotische Transformation beobachtet. Die Fertilität der transheterozygoten Tiere war zudem ausreichend, um zum Beispiel die Linien *2-P(w⁺ Dvi 11,5kb)/+; mod(mdg4)⁰²*, *2-P(w⁺ Dvi 11,5kb)/+; mod(mdg4)^{neo129}*, *2-P(w⁺ Dvi 11,5kb)/+; mod(mdg4)^{neo129 R32}* und *2-P(w⁺ Dvi 6,8kb)/+; Rev31/mod(mdg4)^{neo129 R32}* zu etablieren und für mehr als 20 Generationen zu erhalten. Ein Unterschied zwischen den Transgenen beider Spezies besteht darin, daß für die genomischen *D. virilis-mod(mdg4)*-Konstrukte der Vektor pW8 genutzt wurde, die *D. melanogaster-mod(mdg4)*-Transgene im Transformationsvektor p{PGS} erstellt wurden. Ein weiterer Unterschied besteht in der Orientierung der genomischen Sequenzen im Transformationsvektor. Während die Transkriptionsrichtung der *D. virilis-mod(mdg4)*-Transgene in Richtung *w⁺*-Marker (und des SV40-Polyadenylierungssignals) gerichtet ist, sind die *D. melanogaster*-Sequenzen entgegengesetzt orientiert in Richtung 5'P-Elementende (A. Dörfel und R. Dorn, pers. Mitteilung).

Diese Unterschiede zwischen beiden Experimenten (*D. virilis*-Transgene gegenüber *D. melanogaster*-Transgenen) schmälern zwar nicht deren individuelle Erkenntnisse, doch bieten sie möglicherweise eine Begründung für die fehlende Vergleichbarkeit zwischen ihnen und können erklären, warum z.B. einerseits sämtliche *P{w⁺ mod(mdg4)^{common region}}*-Transgene auf dem zweiten Chromosom in Kombination mit *mod(mdg4)⁰²* steril sind, andererseits *2-P(w⁺ Dvi 6,8kb)* in Kombination mit Mutationen des gemeinsamen Teils aber fertil ist (Linien mit homozygoter *mod(mdg4)⁰²-*, *mod(mdg4)^{neo129}-* und *mod(mdg4)^{neo129 R32}-*Mutation wurden für >20 Generationen erhalten).

3.2.3 Molekularbiologische Analyse des *trans*-Spleißens an *D. virilis mod(mdg4)*-h64.2

3.2.3.1 Genomische Transgene von *D. virilis mod(mdg4)*-h64.2-Mutationen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Isoform *mod(mdg4)*-64.2, ihre Regulation und Funktion eingehend untersucht werden. Die endogene Isoform ist experimentell schwer zugänglich (siehe 3.1.5). Daher sollten die Experimente mit *mod(mdg4)*-64.2-Transgenen durchgeführt werden. Diese wurden von der *D. virilis-mod(mdg4)*-h64.2-Sequenz abgeleitet, da (a) die funktionelle Konservierung dieser Isoform zwischen beiden Arten nachgewiesen wurde (Gabler, 2003) und (b) sich die Nukleotidsequenz des isoformspezifischen Exons hinreichend

von der endogenen unterscheidet, um mittels PCR spezifisch *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2 nachweisen zu können.

Vier *D. virilis mod(mdg4)*-Transgene konnten als transgene Linien für die verschiedenen Fragestellungen etabliert werden (Abb. 3.18 B; fünf weitere konnten zwar erstellt aber nicht als transgene Linien etabliert werden, siehe Anhang A4). Alle Mutageneseprimer sind im Anhang 1 aufgelistet unter „Primer für *Drosophila virilis*-Transgene“.

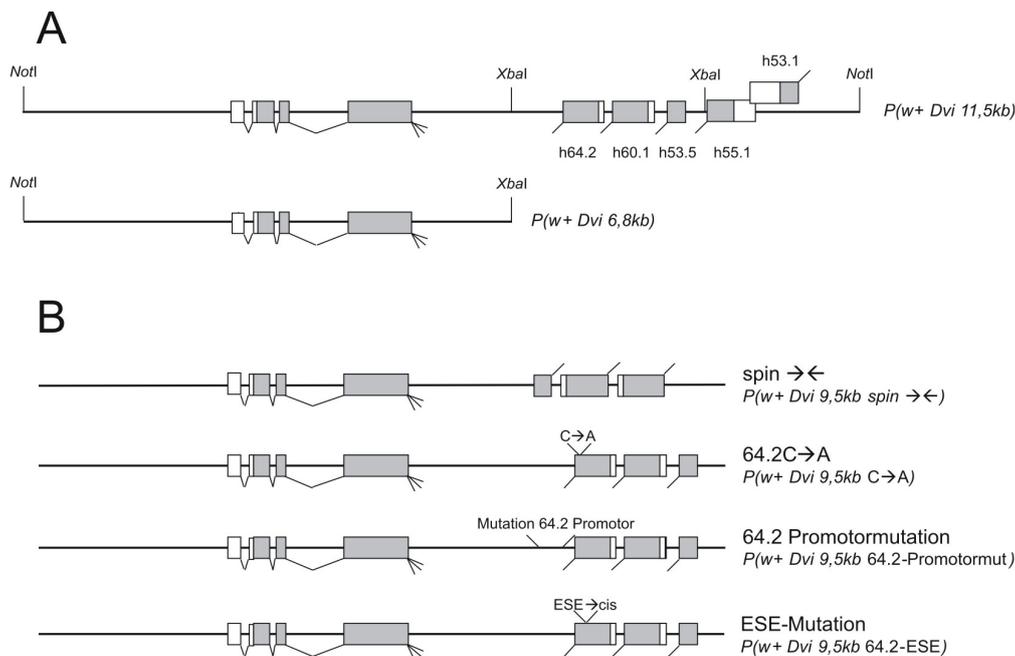


Abbildung 3.18 In dieser Arbeit verwendete *D. virilis mod(mdg4)*-Transgene. Exons sind als Rechtecke dargestellt, die farbige Unterlegung markiert codierende Sequenz (grau) und untranslatierte Bereiche (weiß). Die *trans*-Speiß-Sites sind durch Ab- bzw. Aufstriche gekennzeichnet. (A) Bereits etablierte *D. virilis mod(mdg4)*-Transgene $P(w^+ Dvi 11,5kb)$ und $P(w^+ Dvi 6,8kb)$. (B) Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte und etablierte *D. virilis*-Transgene, von oben nach unten: $P(w^+ Dvi 9,5kb spin \rightarrow \leftarrow)$, $P(w^+ Dvi 9,5kb C \rightarrow A)$, $P(w^+ Dvi 9,5kb 64.2\text{-Promotormut})$ und $P(w^+ Dvi 9,5kb 64.2\text{-ESE})$

- Das $P(w^+ Dvi 9,5kb spin \rightarrow \leftarrow)$ -Transgen, bei dem die enthaltenen isoformspezifischen Exons entgegengesetzt orientiert sind („*spin*“: spezifische Exons invertiert), ermöglicht eine Aussage, ob die isoformspezifischen Exons von *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2 & folgende einen eigenen Promotor besitzen, es sich also um eine selbständige Transkriptionseinheit handelt, oder vom Promotor des gemeinsamen Teils mit transkribiert werden.
- Im Konstrukt $P(w^+ Dvi 9,5kb C \rightarrow A)$ wurde ein Cystein, das in allen bekannten FLYWCH-Domänen konserviert ist, gegen ein Alanin ausgetauscht um die Auswirkung dieser Mutation auf die Funktion des Proteins zu untersuchen.

- In $P(w^+ Dvi\ 9,5kb\ 64.2\text{-Promotormut})$ wurde die putative Promotorsequenz *upstream* des *Dvi-mod(mdg4)-h64.2-Exons* gegen eine gleich lange Sequenz aus *E. coli* ausgetauscht, die keine Promotoraktivität besitzt. Die ausgetauschte Sequenz beinhaltet die CAAT- und die TATA-Box des Promotors und endet etwa 40bp *upstream* des Polypyrimidintraktes. So kann *Dvi-mod(mdg4)-h64.2-mRNA* durch *cis*-Spleißen entstehen, wenn das (experimentell noch nicht nachgewiesene) Transkriptionsstoppsignal des gemeinsamen *mod(mdg4)*-Teils nicht effizient wirkt und die Transkripte auch die isoformspezifischen Exons umfassen. Enthält die ausgetauschte Sequenz jedoch einen aktiven Promotor, sollte die Expression von *Dvi-mod(mdg4)-h64.2* in diesem Transgen herabgesetzt sein.
- Caudevilla *et al.* (2001) identifizieren im Carnitinoctanoyltransferase(COT)-Gen der Ratte die Sequenz GAAGAAG als wichtig für das *trans*-Spleißen (*exonic splice enhancer*, ESE). Eine Mutation zu A₇ resultierte in 50-60%iger Reduktion des *trans*-Spleißprodukts. Da diese ESE-Sequenz im isoformspezifischen Exon von *Dvi-mod(mdg4)-h64.2* vorhanden ist, wurde sie im Transgen $P(w^+ Dvi\ 9,5kb\ 64.2\text{-ESE})$ mutiert (GAAGAAG → A₇).

Der gemeinsame Teil der Transgene ist funktionell intakt und kann Mutationen im Bereich der gemeinsamen Exons des endogenen *D. melanogaster-mod(mdg4)*-Locus komplementieren (siehe Tabelle 3.16). Im Fall des $P(w^+ Dvi\ 9,5kb\ spin\ \rightarrow\leftarrow)$ -Transgens X.I erfolgte die Insertion ins dritte Intron des endogenen Locus und führte zu dessen funktionellem Ausfall. Nach Entfernung einer *second site*-Mutation auf dem Chromosom durch Rekombination war $P(w^+ Dvi\ 9,5kb\ spin\ \rightarrow\leftarrow)$ X.I homozygot lebensfähig und zeigte normale Fertilität. Zudem war das Transgen in der Lage, Mutationen des gemeinsamen Teils auf dem homologen Chromosom zu komplementieren (Tabelle 3.18). Die F1-Tiere waren, wie bei den anderen Komplementationen mit *D. virilis*-Transgenen ebenfalls normal fertil.

Das Transgen wurde in Tabelle 3.16 (siehe 3.2.2.2) nicht mit aufgeführt, da die Distanz zwischen Insertionsort des Transgens und dem endogenen Locus, um die es in jenem Experiment ging, bei X.I gleich null ist und der genetische Hintergrund während der Entfernung der *second site*-Mutation verändert wurde (*ss se eb ro*; vgl. Lindsley und Zimm, 1992; siehe Tab. 2.2). Diese Transgenlinie ist insofern besonders, daß im homozygoten Zustand alle synthetisierten *mod(mdg4)*-Isoformen sich entweder vollständig aus *D. virilis*-Exons zusammensetzen (transgencodiert sind *Dvi-mod(mdg4)-h64.2*, -h60.1 und -h53.5) oder es handelt sich um Chimären, deren gemeinsamer Teil vom Transgen und deren spezifischer Teil von den endogenen isoformspezifischen Exons stammt. Die homozygote Lebensfähigkeit

und die Abwesenheit aller unter 3.1.4 beschriebenen Phänotypen ist ein Beleg für die funktionelle Konservierung des gemeinsamen Teils des Locus.

Tabelle 3.18 Komplementation der rezessiv letalen Mutationen $mod(mdg4)^{02}$ und $mod(mdg4)^{07}$ durch das Transgen $P(w^+ Dvi 9,5kb spin \rightarrow \leftarrow)$ X.I.

Mutation	Komplementation
$mod(mdg4)^{02}$	104% (410/1180)
$mod(mdg4)^{07}$	105% (507/1455)

Die Mutationen im bzw. in der Nähe des isoformspezifischen Exons von $Dvi-mod(mdg4)$ -h64.2 in den verschiedenen Transgenen sollten sich auf die Expression der Isoform auswirken. Aus den transgenen Linien wurde Gesamt-RNA isoliert, um mittels Real-time RT-qPCR die relative Konzentration der $Dvi-mod(mdg4)$ -h64.2-mRNA zu bestimmen.

Tabelle 3.19 Real-time RT-qPCRs zum Nachweis von $Dvi-mod(mdg4)$ -h64.2 und -h60.1 in $D. virilis-mod(mdg4)$ -Transgenen. Die angegebenen $\Delta\Delta Ct$ -Werte sind auf $2-P(w^+ Dvi 11,5kb)$ (=0) normiert. Als Referenz und Bezugsgröße zur ΔCt -Berechnung diente ein Amplifikat aus dem gemeinsamen $Dvi-mod(mdg4)$ -Exons des Transgens um Positionseffekte der Transgeninsertion an verschiedenen Orten im Genom auszugleichen. Je höher die angegebenen Werte, desto geringer ist die relative Konzentration der untersuchten mRNA. n.b.: nicht bestimmt

Genotyp	$\Delta\Delta Ct$ h64.2 ¹¹⁴	$\Delta\Delta Ct$ h60.1 ¹¹²
$2-P(w^+ Dvi 11,5kb)$	$0 \pm 0,4$	$0 \pm 0,4$
$P(w^+ Dvi 9,5kb spin \rightarrow \leftarrow I)$	$1,3 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,6$
$P(w^+ Dvi 9,5kb spin \rightarrow \leftarrow II)$	$1,5 \pm 0,4$	n.b.
$P(w^+ Dvi 9,5kb C \rightarrow A)$	$0 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,6$
$P(w^+ Dvi 9,5kb 64.2$ -Promotormut IV)	$5,0 \pm 1,1$	n.b.
$P(w^+ Dvi 9,5kb 64.2$ -Promotormut III)	$5,3 \pm 1,0$	$-0,4 \pm 1,0$
$P(w^+ Dvi 9,5kb 64.2$ -ESE) I	$1,8 \pm 0,4$	n.b.

Das Transgen $2-P(w^+ Dvi 11,5kb)$ diente bei den Real-time RT-qPCRs als Kontrolle. Die Auswirkungen der Anwesenheit von zwei zusätzlichen isoformspezifischen Exons in diesem Transgen ($Dvi-mod(mdg4)$ -h55.1 und -53.1, letzteres ohne zugehörigen Promotor) dürften wegen der hohen Expression des gemeinsamen $D. virilis-mod(mdg4)$ -Teils gering sein und sich innerhalb der Abweichungen zwischen den qPCR-Wiederholungen bewegen. Das Transgen,

¹⁴ Ich bitte die hohen Standardabweichungen der Real-time RT-qPCRs zu entschuldigen. Die PCRs wurden aus Zeit- und Kostengründen nicht so oft wiederholt und optimiert, daß konziliantere Standardabweichungen erreicht werden konnten.

das die C→A-Mutation beinhaltet, kann ebenfalls als Kontrolle angesehen werden, da sich die Mutation nicht auf Transkriptebene auswirken sollte. Tatsächlich hat die Mutation des Cysteincodons im Transgen *P(w⁺ Dvi 9,5kb C→A)* keinen Einfluß auf die Konzentration des RT-PCR-Amplifikats: der ΔCt -Wert entspricht dem von *2-P(w⁺ Dvi 11,5kb)*.

Zunächst wurde die *Dvi-mod(mdg4)-h64.2*-Expression in zwei *P(w⁺ Dvi 9,5kb spin →←)*-Transgenen untersucht. Die Isoform wird von beiden Transgenen immer noch gebildet. Der korrekte Übergang von Exon 4 des gemeinsamen Teils zum isoformspezifischen Exon wurde mittels Sequenzierung bestätigt. Die Expression der Isoform und der fehlerfreie Exon-Exon-Übergang lassen auf das Vorhandensein eines aktiven Promotors *upstream* des isoformspezifischen Exons schließen. Die umgekehrte Orientierung des spezifischen Exons resultiert allerdings in einer geringeren mRNA-Konzentration der Isoform ($\Delta\Delta\text{Ct}=1,3$ bzw. 1,5, d.h. mRNA-Konzentration um 60-65% verringert).

Bei dem Transgen *P(w⁺ Dvi 9,5kb 64.2-Promotormut)* wurde der Promotor *upstream* des isoformspezifischen Exons von *Dvi-mod(mdg4)-h64.2* mutiert (siehe Abb. 3.18). Die Expressionsanalyse ergab, daß verglichen mit der Wildtypsequenz nur noch rund 3% der mRNA-Menge gebildet werden ($\Delta\Delta\text{Ct}=5$). Dies ist ein weiteres Indiz für die Existenz eines Promotors, der die Transkription des isoformspezifischen Exons von *Dvi-mod(mdg4)-h64.2* treibt und für seine Lokalisation im mutierten Bereich *upstream* des isoformspezifischen Exons.

Das alternative *trans*-Spleißen in *mod(mdg4)* unterliegt nicht nur der Regulation durch intragenische Promotoren. Die *trans*-Spleißakzeptoren in den prä-mRNAs mit mehreren isoformspezifischen Exons stehen auch untereinander in Konkurrenz um den gemeinsamen Teil (*trans*-Spleißdonor). Dabei kann die Konzentration einer Isoform durch Sequenzmotive – und daran bindende Proteine – beeinflusst werden. Die Sequenz GAAGAAG im isoformspezifischen Exon von *Dvi-mod(mdg4)-h64.2* ist ein *exonic splice enhancer*-Motiv, das eine Rolle beim *trans*-Spleißen spielt (Caudevilla *et al.*, 2001). Das Transgen *P(w⁺ Dvi 9,5kb 64.2-ESE) I* trägt die Mutation GAAGAAG→A₇, die zwar den Spleiß-Enhancer zerstört, aber eine stille Mutation ist, d.h. die codierte Aminosäuresequenz wird nicht verändert (auch die Codonhäufigkeit ist vergleichbar, was *ribosome stalling* ausschließen sollte). Die *Dvi-mod(mdg4)-h64.2*-mRNA-Konzentration, die aus *P(w⁺ Dvi 9,5kb 64.2-ESE) I* entsteht, ist um 71±8% gegenüber dem Referenztransgen verringert ($\Delta\Delta\text{Ct}=1,8\pm0,4$). Demnach ist die Fähigkeit zum *trans*-Spleißen nach der Mutation des *exonic splice enhancer* nur noch teilweise vorhanden. Die Abnahme der mRNA-Konzentration um rund 70% fällt sogar noch deutlicher aus, als die von Caudevilla *et al.* (2001) ermittelten Werte. In jenen Experimenten führte die Mutation GAAGAAG→A₇ zu einer Abnahme der mRNA-Menge um 50-60%.

Die zweite, in einigen der Transgene untersuchte, Isoform ist *Dvi-mod(mdg4)-h60.1*. In der Referenz $2\text{-}P(w^+ \text{ Dvi } 11,5\text{kb})$ und in $P(w^+ \text{ Dvi } 9,5\text{kb } C \rightarrow A)$ wurde die gleiche relative Konzentration ermittelt. In $P(w^+ \text{ Dvi } 9,5\text{kb } \text{spin } \rightarrow \leftarrow)$ fällt die mRNA-Menge im Verhältnis zu $h64.2$ etwas stärker. Bemerkenswert ist, daß in $P(w^+ \text{ Dvi } 9,5\text{kb } 64.2\text{-Promotormut})$ die RT-PCR-Amplifikatmenge wieder ähnlich der Referenz ist, obwohl der Promotor *upstream* des isoformspezifischen Exons von *Dvi-mod(mdg4)-h64.2* mutiert ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß sich zwischen den untersuchten isoformspezifischen Exons ein weiterer Promotor befindet.

Beide durch die Real-time RT-qPCR-Experimente identifizierte Promotoren befinden sich in *D. virilis*-Transgenen. Ihre CAAT- und TATA-Boxen sind aber in der genomischen Sequenz von *D. melanogaster* konserviert; daher wurden sie in die Tabelle 3.3 aufgenommen. Ein funktioneller Nachweis der Promotoraktivitäten im endogenen Locus ist mit dem vorliegenden Material nicht möglich.

3.2.4 Etablierung eines Systems zur *in vivo*-Analyse des *trans*-Spleißprozesses

3.2.4.1 EGFP-*trans*-Spleißen

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, daß die proximal codierte Isoform *mod(mdg4)-64.2* durch *trans*-Spleißen gebildet werden kann, obwohl durch die Position und Orientierung des isoformspezifischen Exons auch eine Synthese der reifen mRNA durch *cis*-Spleißen möglich wäre. Um die Frage zu beantworten, welche Faktoren den Vorgang des *trans*-Spleißens ermöglichen, sind funktionelle Analysen erforderlich um notwendige und hinreichende Elemente sowie beteiligte Spleißfaktoren zu identifizieren. Zu diesem Zweck sollte ein System etabliert werden, das es erlaubt, den Prozeß des *trans*-Spleißens umfassend *in vivo* zu analysieren.

Als Reporter wurde EGFP gewählt. Das EGFP-Gen, das in seiner Wildtypform kein Intron besitzt, wurde an geeigneter Stelle geteilt. An den 5'Teil des Gens wurde die Sequenz angefügt, die unmittelbar 3' des gemeinsamen Exons 4 von *mod(mdg4)* beginnt (siehe Abb. 3.19 A). Dies ist bei *mod(mdg4)* die Position, an der das *trans*-Spleißen ansetzt und die alternativen isoformspezifischen Exons angefügt werden. Um alle möglicherweise wichtigen Sequenzen zu integrieren, wurden rund 2kb Outronsequenz an die 5'Hälfte des EGFP-Gens fusioniert (Position 5.127 bis 7.082, locusinterne Skala) bis unmittelbar vor das am weitesten proximal codierte isoformspezifische Exon. Dieses Konstrukt wurde in eine pUAST-Variante (pCaSpeR-3) eingefügt. Damit steht es unter transkriptioneller Kontrolle des UAS-Promotors,

der durch Gal4 induzierbar ist. *downstream* des Konstrukts – EGFP-A – befindet sich ein SV40-Polyadenylierungssignal im Transformationsvektor.

Das zweite Konstrukt – EGFP-B – besteht aus 2kb Sequenz *upstream* des spezifischen Exons von *mod(mdg4)*-55.1 als *trans*-Spleißakzeptor (Position 7.587 bis 9.543, locusinterne Skala) und dem 3' Bereich des EGFP-Gens (siehe Abb. 3.19 A). Dieses Konstrukt wurde ebenfalls in pCaSpeR3 ligiert.

Von EGFP-A konnten 17 transgene Linien etabliert werden, von EGFP-B drei, darunter eine X-chromosomale Insertion, von der mittels Transposase-vermittelter Remobilisierung 40 weitere unabhängige Insertionen erzeugt werden konnten. Durch die große Anzahl von Transgenen sind zahlreiche Kombinationen der EGFP-A- und EGFP-B-Transgene möglich.

Eine aktive Transkription beider Transgene wurde durch die Einkreuzung Gal4-bildender Transgene, sogenannter Treiber, erreicht. Dies sind Transgene, die ein Gal4-Gen enthalten, dem der Promotor eines anderen *Drosophila*-Gens vorgeschaltet ist. Durch die Aktivität dieses Promotors (ubiquitär, zell-, entwicklungsstadienspezifisch, induzierbar) kann eine gezielte Synthese von Gal4 erreicht werden, das durch Aktivierung des UAS-Promotors die Transkription von EGFP-A bzw. EGFP-B induziert. Für die durchgeführten Experimente wurden für das zweite Chromosom Actin-Gal4, für das dritte Chromosom *daughterless*-Gal4 und ein weiterer Actin-Gal4-Treiber (Beschreibungen der Linien siehe 2.1.3) genutzt.

Zunächst sollte getestet werden, ob die EGFP-Konstrukte überhaupt *trans*-spleißen können. Dazu wurde aus 0-16h alten Embryonen mit nur einem Gal4-induzierten Transgen (EGFP-A oder EGFP-B) Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR die Fähigkeit der Transgen-prä-mRNAs untersucht, zum endogenen Locus *in trans* zu spleißen. Dabei sollte sich EGFP-A als *trans*-Spleißdonor wie der gemeinsame Teil von *mod(mdg4)* verhalten und zu den prä-mRNAs der isoformspezifischen Exons spleißen. Zum Nachweis von *trans*-Spleiß-Produkten von EGFP-A wurden ein *forward*-Primer aus EGFP und ein *reverse*-Primer aus dem isoformspezifischen Exon *mod(mdg4)*-64.2 verwendet. Die durchgeführte RT-PCR war erfolgreich, das erhaltene Amplifikat wurde sequenziert und der korrekte Übergang von der EGFP-Sequenz in das spezifische Exon von *mod(mdg4)*-64.2 nachgewiesen. Die RT-PCR wurde mit einem *forward*-Primer aus EGFP und einem *reverse*-Primer aus dem isoformspezifischen Exon von *mod(mdg4)*-55.1 wiederholt. Auch hier wurde der korrekte Übergang von EGFP-Sequenz zum isoformspezifischen Exon von *mod(mdg4)*-55.1 bestätigt.

Für EGFP-B wurde geprüft, ob die vom Transgen codierte prä-mRNA in der Lage ist, zu den endogenen gemeinsamen Exons 1-4 von *mod(mdg4)* zu spleißen, da dieses Konstrukt in Konkurrenz zu den *trans*-Spleißakzeptoren der isoformspezifischen Exons um den gemeinsamen Teil von *mod(mdg4)* tritt. Zum Nachweis des *trans*-Spleißens von EGFP-B

wurde ein *forward*-Primer aus dem *mod(mdg4)*-Exon 4 und ein *reverse*-Primer aus dem 3' Bereich von EGFP verwendet. Durch Sequenzierung des RT-PCR-Produkts konnte der korrekte Übergang von Exon 4 zum EGFP-B-Exon belegt werden.

Damit konnte gezeigt werden, daß treiberinduzierte Transgenkonstrukte zu endogenen *mod(mdg4)*-prä-mRNAs *trans*-spleißen können und daß *mod(mdg4)*-Outronsequenz ausreichend ist, quantitativ nachweisbares *trans*-Spleißen zu ermöglichen. Außerdem konnte gezeigt werden, daß während des Spleißprozesses die korrekten Exon-Exon-Übergänge erzeugt wurden.

Nachdem nachgewiesen wurde, daß beide EGFP-Konstrukte zum endogenen Locus *trans*-spleißen können, wurde das eigentliche Ziel des Projekts verfolgt, detektierbare und quantifizierbare Mengen EGFP *in vivo* mittels *trans*-Spleißens zu synthetisieren. Dazu wurden transgene Linien mit je einem EGFP-A- und EGFP-B-Transgen sowie dem *daughterless*- oder Actin-Gal4-Treiber durch Kreuzung erzeugt. Tiere generierter Linien wurden zunächst auf Fluoreszenz im grünen Spektralbereich untersucht. Es war keine Fluoreszenz nachweisbar, die sich von der Hintergrundfluoreszenz der Embryonen, Larven, Puppen und adulter Tiere (Präparation der inneren Organe und Quetschpräparate) unterschied. Ein PCR-Test bestätigte, daß beide EGFP-Transgene sowie der Gal4-Treiber in den untersuchten Tieren vorhanden waren.

Da keine EGFP-Fluoreszenz zu detektieren war, wurde auf das Vorhandensein intakter EGFP-mRNA untersucht. Die EGFP-mRNA konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden, ihre Sequenzierung zeigte die Einhaltung der definierten Exon-Intron-Grenzen – das *trans*-Spleißprodukt weist den korrekten Exon-Exon-Übergang auf und der EGFP-Leserahmen ist intakt.

Intakte, mittels RT-PCR nachweisbare EGFP-mRNA bei gleichzeitig fehlender EGFP-Fluoreszenz ließ vermuten, daß die Menge gebildeter mRNA zu gering ist, also der *trans*-Spleißprozeß nicht effizient genug abläuft, und in der Konsequenz nicht ausreichend Protein gebildet wird, um sich von der Hintergrundfluoreszenz abzuheben. Möglicherweise lag der Grund für die schlechte Effizienz darin, daß beide Transgene an verschiedenen Positionen ins Genom integriert wurden. Dadurch müssen entstehende prä-mRNAs weite Strecken durch Diffusion zurücklegen, ehe sie mit ihrem *trans*-Spleißpartner zu einer reifen mRNA verknüpft werden können. Um dieses Problem zu beheben, wurden im nächsten Schritt beide EGFP-Teile in einem Transgen codiert. Dazu wurden drei Transgene mit verschiedenen Anordnungen von EGFP-A und EGFP-B synthetisiert. Zum einen wurde eine Struktur gewählt, in der ein *cis*-Splicing der beiden EGFP-Hälften möglich ist (siehe Abb. 3.19; acht transgene Linien), dazu eine Kopf-an-Kopf-Orientierung (vier Linien) und eine Tandemanordnung (drei Linien).

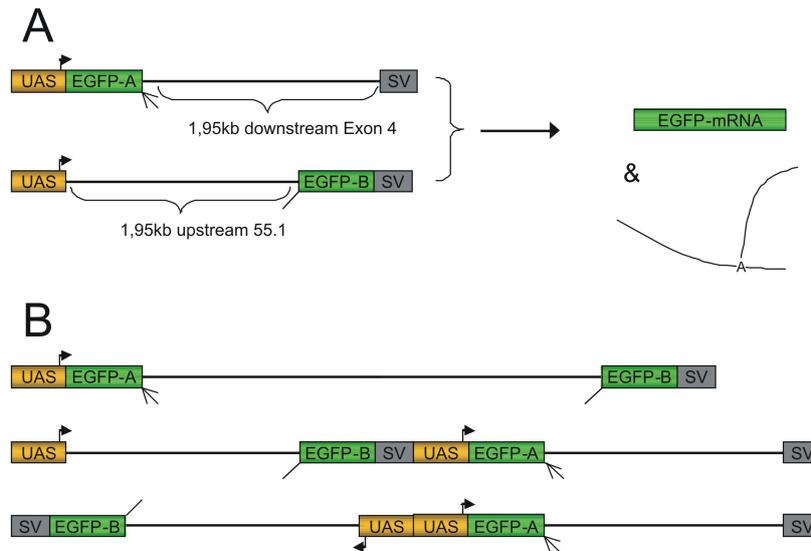


Abbildung 3.19 (A) Transgenkonstrukte EGFP-A und EGFP-B, die mittels *trans*-Spleißen EGFP-mRNA bilden. Außerdem dargestellt ist die Y-förmige Struktur, die während des Spleißvorgangs aus den Outronbereichen gebildet wird und nur beim *trans*-Spleißen entsteht. (B) Transgenkonstrukte mit EGFP-A- und -B-Kombinationen, von oben nach unten: *cis*-Splicing-Anordnung, Tandem-Anordnung, Kopf-an-Kopf-Anordnung.

UAS: Gal4-induzierbarer Promotor; SV: SV40-Polyadenylierungssignal

Obwohl sich in allen drei Transgenen beide Transkriptionseinheiten in räumlicher Nähe zueinander befinden, die Diffusionsstrecke der prä-mRNAs vor dem *trans*-Spleißen als limitierender Faktor also wegfällt, konnte nicht ausreichend Protein gebildet werden um eine deutlich sichtbare Fluoreszenz zu erzeugen, die eindeutig EGFP zugeordnet werden kann. Mittels RT-PCR konnte bei allen Konstrukten *trans*-gespleißte EGFP-mRNA nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der EGFP-*trans*-Spleißkonstrukte konnte nachgewiesen werden, daß das Vorhandensein von *mod(mdg4)*-Outronsequenzen in prä-mRNAs ausreicht, um das *trans*-Spleißen künstlich definierter Exons zu ermöglichen. In allen untersuchten Fällen konnte mittels Sequenzierung nachgewiesen werden, daß die Exon-Exon-Übergänge basengenau eingehalten wurden, sowohl beim Spleißen der transgencodierten Transkripte untereinander als auch beim Spleißen zu prä-mRNAs des endogenen *mod(mdg4)*-Locus. Jedoch konnte mit dem System nicht genug EGFP-mRNA (und in Folge EGFP-Protein) synthetisiert werden, daß eine klar vom Hintergrund unterscheidbare Fluoreszenz detektiert werden konnte.

Aufgrund der zu geringen Menge gebildeten EGFPs, eignet sich das System nicht zum *in vivo*-Test für den *trans*-Spleißprozeß, denn für eine Analyse der *trans*-Spleißeffizienz hätte

auf molekularbiologische (Realtime-RT-qPCR) bzw. proteinchemische (Western Blot, ELISA) Methoden zurückgegriffen werden müssen.

Ein alternatives System, bei dem sich eine Änderung der *trans*-Spleißeffizienz *in vivo* in einfach quantifizierbaren Größen/Mengen niederschlägt, bieten die bekannten Funktionen der Isoformen Mod(*mdg4*)-67.2 (*insulator*-Aktivität an y^2 und ct^6 , Gerasimova *et al.*, 1995 und 1998) und -56.3 (*nondisjunction*, Thomas *et al.*, 2006).

3.2.5 Teilung von *mod(mdg4)* durch induzierte chromosomale Umbauten und funktionelle Analyse des geteilten Locus

3.2.5.1 Etablierung, Verifizierung und molekularbiologische Analyse der chromosomalen Rearrangements

In den vorigen Kapiteln wurden einige Aspekte der Analyse des *trans*-Spleißens dargestellt. In den beschriebenen Experimenten wurden verschiedene, der Fragestellung angepasste Transgene von *mod(mdg4)* eingesetzt. Der endogene Locus spielte bei diesen Experimenten eine eher untergeordnete Rolle, wurde lediglich als Kontrolle bzw. als Donor isoformspezifischer Exons genutzt. Die schlechte experimentelle Zugänglichkeit des endogenen Locus bzw. die Notwendigkeit aufwendiger Protokolle zu dessen gerichteter Manipulation (siehe 3.1.5.2) schränken seine Verwendbarkeit für Analysen bei vertretbarem experimentellen Aufwand ein.

Basis für die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche ist das *P{RS5}*-Element (*rearrangement screen*, Golic und Golic, 1996) *P{RS5}5-HA-1224*, das sich an Position 18.434 (3R:17.191.073) zwischen den spezifischen Exons von *mod(mdg4)*-54.7 und -58.0 befindet, etwa 360bp *upstream* von *mod(mdg4)*-58.0. Damit wird das *P*-Element flankiert von einerseits den gemeinsamen Exons 1-4 und den proximal codierten elf isoformspezifischen Exons und andererseits von den 20 distal codierten isoformspezifischen Exons. Diese Position prädestiniert das Element für die Mutagenisierung des *mod(mdg4)*-Locus. Die ungerichtete Mutagenese durch Transposase-vermittelte Remobilisierung wurde bereits beschrieben (siehe 3.1). Im Weiteren wird die gerichtete Mutagenese durch Induzierung definierter Chromosomenmutationen beschrieben, wobei *P{RS5}5-HA-1224* einen Bruchpunkt markiert.

Die *P{RS}*-Elemente der DrosDel-*P*-Elementkollektion (Ryder *et al.*, 2004) können dazu genutzt werden, definierte Defizienzen im *D. melanogaster*-Genom zu erzeugen, ebenso können mit ihnen aber auch chromosomale Umbauten induziert werden. Die Generierung der Chromosomenmutationen, die etabliert und für Analysen verwendet wurden, ist im Kapitel 2.1.5 ausführlich beschrieben. Es wurden eine reziproke Translokation $T(2;3)26A,mod(mdg4)$

(mit *P{RS3}CB-0716-3r*), zwei parazentrische Inversionen *In(3R)89C,mod(mdg4)* und *In(3R)mod(mdg4),94C* (mit *P{RS3}CB-6279-3r* bzw. *P{RS3}CB-5827-3r*) sowie die 68kb große Defizienz *Df(3R)ED6050* (mit *P{RS3}CB-6403-3r*) erzeugt, in welcher die 20 distal codierten isoformspezifischen Exons deletiert sind¹⁵. Die gleichen distal codierten spezifischen Exons werden durch die Inversionen 1,4Mb im Fall von *In(3R)mod(mdg4),94C* bzw. 4,9Mb im Fall von *In(3R)89C,mod(mdg4)* von den gemeinsamen Exons 1-4 und den proximal codierten elf isoformspezifischen Exons wegverlagert. Die reziproke Translokation *T(2;3)26A,mod(mdg4)* verlagert die gemeinsamen und die elf proximalen spezifischen Exons des *mod(mdg4)*-Locus, zusammen mit dem distalen Teil des Chromosoms 3R (cytologische Regionen 93D9-100) auf den linken Arm des zweiten Chromosoms (siehe Abb. 2.2 B, Material & Methoden).

Die generierten Rearrangements sind, ebenso wie die Defizienz w^+ -markiert. Die korrekte Sequenz eines PCR-Produkts mit Primern aus den flankierenden genomischen Bereichen über das w^+ -Element hinweg, welches einen Bruchpunkt der Umbauten sowie die Defizienz kennzeichnet („one step confirmation“, siehe Abb. 2.2 A) dient als Beleg für die erfolgreiche Etablierung der beabsichtigten Chromosomenmutationen. Alle PCR-Amplifikate enthielten die erwarteten Sequenzen. Inversionen und Translokation, nicht aber die Defizienz besitzen weiterhin ein Element, das den anderen Bruchpunkt im Genom markiert und aus zwei 5'P-Enden und einem FRT dazwischen besteht. Aus thermodynamischen Gründen¹⁶ ist dieses Element einer überspannenden PCR nicht zugänglich.

Da bei *Drosophila* die homologen Chromosomen gepaart in der Zelle vorliegen (*somatic chromosome pairing*, Metz, 1916; Hiraoka *et al.*, 1993; Csink und Henikoff, 1998), sollten in Präparaten heterozygoter Rearrangement-Genotypen aufgrund der Chiasmata charakteristische Chromosomenfiguren auftreten. Daher wurden, als ergänzende Methode der Verifizierung der chromosomalen Umbauten mittels PCR und Sequenzierung, in Zusammenarbeit mit M. Gabler Quetschpräparate polytärer Speicheldrüsenchromosomen aus heterozygoten Larven angefertigt und mikroskopisch ausgewertet. Die Cytologien der Chromosomen (Abb. 3.20) zeigen die erwarteten Figuren: Bei der heterozygoten Translokation ist deutlich die kreuzartige Struktur zu erkennen, bei den Inversionen bilden die gepaarten Chromosomen Schleifen (Abb. 3.20 B, C). Im Fall der *In(3R)mod(mdg4),94C*-Inversion ist die Schleife aufgrund ihrer relativ geringen Größe nicht gut zu erkennen.

¹⁵ Die Bezeichnung der Defizienz folgt den Konventionen des DrosDel-Konsortiums, die chromosomalen Rearrangements sind nach den Bruchpunkten in *mod(mdg4)* und der Position des verwendeten *P{RS3}*-Elements (cytolog. Region) benannt.

¹⁶ Bildung einer extrem stabilen Haarnadelstruktur mit einem Stamm von ca. 580bp aus den beiden 5'P-Elementenden und einem *loop* von etwas mehr als 200bp, in dem sich die FRT-Sequenz befindet

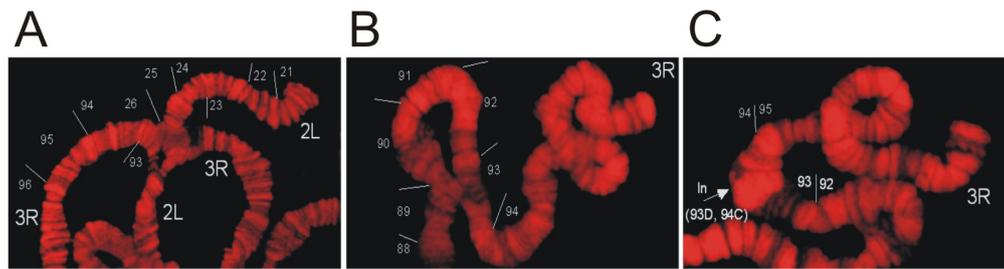


Abbildung 3.20 Speicheldrüsenpolytänchromosomen aus heterozygoten Larven der chromosomalen Rearrangements. (A) $w^{1118}_{iso}; +T(2;3)26A, mod(mdg4)/+$ (B) $w^{1118}_{iso}; +In(3R)89C, mod(mdg4)/+$, (C) $w^{1118}_{iso}; +In(3R)mod(mdg4),94C/+$. Die Angaben in den Abbildungen bezeichnen die Chromosomenarme und die cytologischen Regionen, der Pfeil in (C) markiert die Position der Inversion. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

Quelle: Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden von M. Gabler angefertigt.

Nach ihrer Etablierung wurde zunächst getestet, ob die sich die Chromosomenmutationen auf die Lebensfähigkeit der Tiere auswirken. Die Defizienz *Df(3R)ED6050*, die die 20 distalen spezifischen Exons einschließt, ist rezessiv letal. Beide Inversionen und die Translokation erwiesen sich hingegen als homozygot vital und fertil (derzeit als homozygote Linien für >40 Generationen erhalten). Ebenso zeigen sie keine auffälligen Phänotypen. Und dies, obwohl die Architektur des *mod(mdg4)*-Locus in den homozygoten Rearrangements zerstört ist und sich die codierenden Bereiche – d.h. gemeinsamer und isoformspezifischer Teil – von 20 Isoformen an weit voneinander entfernten Positionen im Genom befinden. Da die distal codierten *mod(mdg4)*-Isoformen als essentiell für die Lebensfähigkeit nachgewiesen wurden (siehe 3.1.3.1), müssen sie trotz des nicht mehr intakten Locus noch in einem ausreichenden Umfang gebildet werden, um ihre biologische Funktion zu erfüllen.

Daher wurde die Expression mehrerer Isoformen untersucht, deren spezifische Exons *downstream* des Bruchpunktes lokalisiert sind, und mit der Expression von Isoformen verglichen, deren spezifische Exons nicht von den Chromosomenmutationen betroffen sind. Hierzu wurden semiquantitative RT-PCRs an RNA der homozygoten Genotypen durchgeführt. Nachgewiesen wurde die Expression von einerseits *mod(mdg4)*-64.2 und -53.1, deren spezifische Exons proximal zum Rearrangement-Bruchpunkt codiert sind, und andererseits von *mod(mdg4)*-67.2, -56.3, -58.8 und -51.4, deren isoformspezifische Exons in drei Transkriptionseinheiten *downstream* des Bruchpunkts codiert sind (Promotoren #8, #10 und #11).

Die mRNA-Konzentration der Isoformen *mod(mdg4)*-64.2 und -53.1 nimmt in den homozygoten Mutationsgenotypen zu (Abb. 3.21). Die Expression der Isoformen *mod(mdg4)*-67.2, -56.3, -58.8 und -51.4 ist in den homozygoten Rearrangements deutlich geringer als in

der Referenz w^{1118}_{iso} . Dabei fällt auf, daß bei allen vier getesteten Isoformen die Intensität der RT-PCR-Bande zunimmt von der Translokation über $In(3R)89C,mod(mdg4)$ zu $In(3R)mod(mdg4),94C$ (kleinere Translokation).

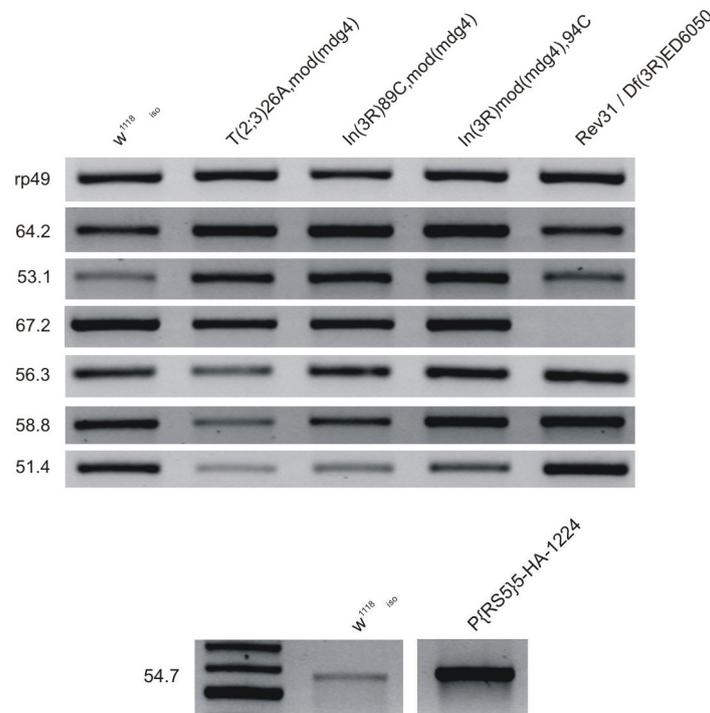


Abbildung 3.21 Semiquantitative RT-PCR-Analyse homozygoter chromosomaler Rearrangements und transheterozygoter Defizienz $Df(3R)ED6050$ /Revertante Rev31. $rp49$ dient als Kontrolle. Die isoformspezifischen Exons von $mod(mdg4)$ -64.2 und -53.1 sind proximal, die der anderen aufgeführten Isoformen distal des Rearrangement-Bruchpunkts lokalisiert. Das isoformspezifische Exon der Isoform $mod(mdg4)$ -67.2 liegt in den überlappenden deletierten Bereichen der Defizienz $Df(3R)ED6050$ und von Rev31. unten: semiquantitative RT-PCR-Analyse an homozygoter $P\{RS5\}5-HA-1224$ im Vergleich zu w^{1118}_{iso} einer $mod(mdg4)$ -Isoform, deren spezifisches Exon in Juxtaposition zum P -Element liegt

Die Transkriptionseinheiten unter der Kontrolle der Promotoren #6 und #7, die sich unmittelbar proximal bzw. distal des Bruchpunkts befinden, sind in den chromosomalen Rearrangements im Vergleich zur verwendeten Kontrolle w^{1118}_{iso} ebenfalls disreguliert. Allerdings werden hier die Effekte, die die Expressionsveränderungen der weiter oben beschriebenen Isoformen bewirken, bei weitem überwogen vom Vorhandensein der w^+ bzw. w^- -Elemente. Die Promotorwirkung der P -Elementenden (siehe 3.1.2.2 und Anhang A2.1) führt zu einer starken Überexpression der Isoformen, deren spezifisches Exon in einer der Transkriptionseinheiten liegt, die die Bruchpunkte der Chromosomenmutationen flankieren. Exemplarisch ist dies in Abb. 3.21 für die Isoform $mod(mdg4)$ -54.7 in der homozygoten

P{RS5}5-HA-1224 gezeigt, Translokation und Inversionen zeigen eine ähnliche Disregulation. Bei *mod(mdg4)*-52.4 und -55.8 wurde der gleiche Effekt nachgewiesen (siehe Abb. 3.2 A, dort von *P*-Elementresten von *P{RS5}5-HA-1224* verursacht).

3.2.5.2 Funktionelle Untersuchung der Isoform *mod(mdg4)*-56.3 in den chromosomalen Rearrangements

Thomas *et al.* (2006) konnten *Mod(mdg4)*-56.3 an Chromosomen während der Prometaphase der ersten meiotischen Teilung (Meiose I) in den Testis von *Drosophila*-Männchen nachweisen. Ein vorangegangenes Screening der *Zuker*-Sammlung (Koundakjian *et al.*, 2004) identifizierte diese Isoform als erforderlich für die korrekte Verteilung der homologen Chromosomen auf die Tochterzellen während der männlichen Meiose I, bei der kein synaptonemaler Komplex gebildet wird. Eine Mutation von *mod(mdg4)*-56.3 führt zu einem hohen Anteil von *nondisjunction*, d.h. es entstehen Spermatiden und Spermien, die kein und welche, die beide homologe Chromosomen tragen. Bei Fehlverteilung der Geschlechtschromosomen entwickeln sich, in Kombination mit dem X-Chromosom der Oocyte, X0-Männchen und XXY-Weibchen.

In den chromosomalen Umbauten wurde bereits eine verringerte mRNA-Menge der Isoform *mod(mdg4)*-56.3 nachgewiesen (siehe Abb. 3.21). Nun sollte die physiologisch effektive Konzentration der Isoform bestimmt werden. Wenn der *nondisjunction*-Phänotyp direkt mit der *Mod(mdg4)*-56.3-Konzentration korreliert, statt die Unterschreitung eines Schwellenwertes zu erfordern, ließe sich die physiologische Konzentration der Isoform anhand der *nondisjunction*-Rate (NDJ) bestimmen. Mit abnehmender Transkriptmenge in den homozygoten Rearrangements, die sich wahrscheinlich in einer ebenso abnehmenden Proteinmenge widerspiegelt, sollte es zu immer höheren NDJ-Raten in entsprechenden Kreuzungen kommen.

Um die verschiedenen Geschlechtschromosomkonstellationen in der F1-Generation feststellen zu können, wurden Männchen des zu analysierenden Genotyps erzeugt, die statt des nicht markierten ein dominant B^S -markiertes Y-Chromosom besitzen ($YB^S y^+$, Brosseau und Lindsley, 1958; Brosseau *et al.*, 1961). Diese Männchen wurden im Alter von 0-2 Tagen mit Jungfrauen einer $w^+ y^1$ -markierten Referenzlinie (a-31, siehe auch Material & Methoden) gekreuzt¹⁷ und aus Geschlecht und Phänotyp der F1-Generation¹⁸ auf das jeweils in den

¹⁷ 2♂ 0-2d $YB^S y^+$;[zu testender Genotyp] x 3♀ a-31: 3d auf dem ersten Röhrchen, 3d auf zweitem Röhrchen (jeweils mit Bäckerhefe als Futterzusatz)

Spermien enthaltene Geschlechtschromosom(en) geschlossen. Normal pigmentierte F1-Männchen mit B^S -Phänotyp besitzen das Geschlechtschromosomenpaar XYB^S , während X0-Männchen *yellow* und ohne Augenphänotyp sind. In diesen Fällen wurde von Spermium das YB^S -Chromosom (für XYB^S -Genotyp) bzw. kein Geschlechtschromosom (für X0-Genotyp) übertragen. Die Form der Augen bei Weibchen mit der Konstellation XX ist normal, ebenso ihre Körperpigmentierung, da sie auf dem paternalen X-Chromosom das Wildtypallel von *yellow* tragen (Spermium mit einem X-Chromosom). Das gilt auch für $XXYB^S$ -Weibchen (Spermium mit XYB^S -Genotyp, *yellow*-Wildtypallel auf dem X-Chromosom und $YB^S y^+$), die aber den B^S -Phänotyp ausprägen.

Tabelle 3.20 Analyse der Geschlechtschromosomen-*nondisjunction* (NDJ) in den chromosomalen Rearrangements mit Bruchpunkt in *mod(mdg4)*. Weibchen mit y^1 -markierten X-Chromosomen (a-31) wurden mit $B^S y^+$ (Bar-Stone)-markierten Y-Chromosomen und der *mod(mdg4)*-Mutation, die in Spalte 1 angegeben ist, gekreuzt. Die Konstellation der Geschlechtschromosomen in den Spermien wurde aus Geschlecht und Phänotyp der F1-Tiere geschlossen. Der NDJ-Anteil wurde als Division der Summe der X0-Männchen und XXY-Weibchen durch die Gesamtzahl der F1-Tiere (n) berechnet.

Genotyp der gekreuzten Männchen (paternales/maternales Allel)	Spermienklasse				n	% NDJ
	X	Y	XY	0		
<i>Z3-5578 / Df(3R)GC14</i>	541	347	326	359	1573	♂50,8 ♀37,6 ¹
<i>Df(3R)GC14 / Z3-5578</i>	189	120	146	98	553	44,1
<i>Df(3R)6050 / Z3-5578</i>	3310	2417	1770	1384	8881	35,5
<i>T(2;3)26A,mod(mdg4) / mod(mdg4)⁺</i>	1321	1298	3	1	2623	0,15
<i>In(3R)89C,mod(mdg4) / mod(mdg4)⁺</i>	771	599	0	0	1370	0
<i>In(3R)mod(mdg4),94C / mod(mdg4)⁺</i>	6649	5950	8	5	12599	0,1
<i>T(2;3)26A,mod(mdg4)</i>	1048	750	400	371	2569	30,0
<i>In(3R)89C,mod(mdg4)</i>	1018	854	131	125	2128	12,0
<i>In(3R)mod(mdg4),94C</i>	867	796	27	45	1735	4,1

¹⁸ Die Kreuzungen/Generationen zum Aufbau des gewünschten Genotyps wurden nicht berücksichtigt, die in der Kreuzung eingesetzten Tiere wurden als Parentalgeneration (P), die daraus hervorgehenden, in der Tabelle aufgelisteten Tiere als erste Filialgeneration (F1) definiert.

<i>T(2;3)26A,mod(mdg4) / Z3-5578</i>	2063	1885	437	359	4744	16,8
<i>In(3R)89C,mod(mdg4) / Z3-5578</i>	4547	3867	259	191	8864	5,1
<i>T(2;3)26A,mod(mdg4) hs-cDNA mod(mdg4)-56.3 (2. Chr.)²</i>	954	831	86	86	1957	8,8
<i>T(2;3)26A,mod(mdg4) hs-cDNA mod(mdg4)-56.3 (3. Chr.)²</i>	786	649	94	95	1624	11,6

¹ getrennt aufgeführt, da Unterschied von >5% zwischen den Geschlechtern

² 24h Eiablage, Hitzeschock 1h bei 37°C nach 48h (ab Beginn der Eiablage; Alter der Embryonen bzw. Larven: 24 bis 48h) und weiterhin im Abstand von 24h bis erste Puppen im Röhrchen; Positionen der *mod(mdg4)-56.3-cDNA*-Transgene: 3L 67E4 und 2R 55E-F

Zunächst wurde untersucht, wie ein Ausfall des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)-56.3* die Verteilung der Geschlechtschromosomen beeinflusst. Da sowohl die Defizienz des gesamten *mod(mdg4)*-Locus *Df(3R)GC14* wie auch die partielle Defizienz *Df(3R)6050*, die das isoformspezifische Exon einschließt, rezessiv letal sind, wurden sie transheterozygot mit der EMS-Mutation *Z3-5578* getestet. Diese trägt ein vorzeitiges Stopcodon *upstream* der potentiell für die Chromatinassoziation notwendigen FLYWCH-Domäne (*W₄₄₉Stop*). In beiden untersuchten Genotypen, *Z3-5578/Df(3R)GC14* und *Df(3R)GC14/Z3-5578* (paternale bzw. maternale Einbringung des Allels), liegen die *nondisjunction*-Raten bei knapp 50%, d.h. es entstehen gleich häufig Spermatozonen mit einem wie mit der falschen Anzahl Geschlechtschromosomen (null oder zwei). Bei der Kombination von *Z3-5578* und der partiellen *mod(mdg4)*-Defizienz *Df(3R)6050* liegt die Rate bei 35%. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen von Thomas *et al.* (2005; 37% bzw. 41% für *Z3-Allel/Df(3R)T16*). Eine weitere Kontrolle sind die Kreuzungen, die mit den heterozygoten chromosomalen Rearrangements durchgeführt wurden. Bei allen drei Experimenten liegen die *nondisjunction*-Raten mit ca. 0,1% auf Wildtypniveau.

Dann wurden die chromosomalen Rearrangements im homozygoten Zustand analysiert. Während die Translokation eine geringe partielle Rettung des *nondisjunction*-Phänotyps (30%) zeigt, werden in den Inversionen die Geschlechtschromosomen nur zu 12 bzw. 4% falsch verteilt. Auffallend ist dabei, daß von der Translokation zur großen Inversion *In(3R)89C,mod(mdg4)* (12,0%) zur kleinen Inversion *In(3R)mod(mdg4),94C* (4,1%) auch die *nondisjunction*-Rate abnimmt, was mit der mRNA-Menge von *mod(mdg4)-56.3* nach den RT-PCRs korreliert.

Anschließend wurde die Kombination *Z3-5578* mit heterozygoter Translokation (16,8%) bzw. heterozygoter Inversion (5,1%) getestet. Die *nondisjunction*-Raten dieser Genotypen liegen unter denen der korrespondierenden homozygoten Rearrangements. Eine Erklärung hierfür ist, daß bei *Drosophila* die homologen Chromosomen in der Zelle gepaart vorliegen,

und sich im Falle von $T(2;3)26A,mod(mdg4) / Z3-5578$ der strukturell intakte Locus auf dem $Z3-5578$ -Chromosom und die beiden Teile des $mod(mdg4)$ -Locus auf den Translokationschromosomen am Translokationskreuz (siehe Abb. 3.20 A) in größerer Nähe zueinander befinden, als das in der homozygoten Translokation der Fall ist. Das gleiche gilt für $In(3R)89C,mod(mdg4) / Z3-5578$ an der Basis der Schleife.

Die hitzeschock-induzierte Expression einer transgencodierten $mod(mdg4)$ -56.3-EGFP-cDNA im Hintergrund der homozygoten Translokation $T(2;3)26A,mod(mdg4)$ (Transgene wurden zuvor auf Translokationschromosomen rekombiniert; Hitzeschocks täglich 1h, 37°C während der Embryonalentwicklung) führte zu einer erheblichen Reduktion der *nondisjunction*-Rate, wenn auch keine vollständige Rettung erreicht werden konnte (8,8% NDJ für Transgen auf dem 2. Chromosom, 11,6% für dritschromosomales Transgen). Die Resultate dieser Experimente stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Thomas *et al.* (2006), die mittels hitzeschock-induzierter Expression der gleichen Transgen-cDNAs eine vollständige Rettung des *nondisjunction*-Phänotyps in verschiedenen Genotypen erreichten. Ein möglicher Grund für die Diskrepanz kann in abweichenden Protokollen der Hitzeschockgabe liegen. Protein-Turnover, also der Abbau des Mod(mdg4)-56.3-EGFP, kann als Grund für die im Vergleich höheren NDJ-Raten zwar nicht ausgeschlossen werden, ist aber unwahrscheinlich. Eine zeitaufgelöste Analyse der Kreuzung zeigt, daß die *nondisjunction*-Raten unter früh und spät schlüpfenden Tiere annähernd gleich sind (tendenziell sogar abnehmend).

Mit den durchgeführten Experimenten konnte belegt werden, daß die Isoform $mod(mdg4)$ -56.3 für die korrekte Verteilung der Geschlechtschromosomen während der männlichen Meiose I essentiell ist – eine *nonsense*-Mutation im ORF der Isoform führt zu einer unkontrollierten, zufälligen Verteilung, während eine transgene Expression die *nondisjunction*-Rate senkt. Zweitens wurde nachgewiesen, daß der NDJ-Phänotyp rezessiv ist. Die heterozygoten Chromosomenmutationen bilden ausreichende Mengen der Isoform, sodaß der Phänotyp nicht auftritt. Drittens konnte gezeigt werden, daß in den homozygoten chromosomalen Rearrangements, in denen der $mod(mdg4)$ -Locus auf zwei Orte im Genom verteilt ist, trotzdem physiologische Mengen der Isoform $mod(mdg4)$ -56.3 gebildet werden, die den NDJ-Phänotyp teilweise retten. Die homozygoten Chromosomenmutationen weisen dabei unterschiedliche NDJ-Raten auf, die mit den mRNA-Mengen von $mod(mdg4)$ -56.3 und mit der „Größe“ der jeweiligen Mutation korrelieren. Je größer die Distanz zwischen den codierenden Bereichen (1,4Mb → 4,9Mb → anderes Chromosom), desto höher die NDJ-Rate.

3.2.5.3 *T(2;3)26A,mod(mdg4)* als Testsystem für Effektoren des *trans*-Spleißens

Der *nondisjunction*-Phänotyp, dessen Ausprägung von der Expression der Isoform *mod(mdg4)*-56.3 abhängt, wird in der Translokation *T(2;3)26A,mod(mdg4)* partiell gerettet. Dies eröffnet die Möglichkeit, den Prozess des *trans*-Spleißens *in vivo* ohne Verwendung von Transgenen zu analysieren. Die homozygote Translokation *T(2;3)26A,mod(mdg4)* weist eine *nondisjunction*-Rate von 30% auf, welche sich sowohl von den Raten der Null-Allele (>35%) wie auch des Wildtyps und den kleineren chromosomalen Rearrangements unterscheidet. Diese Besonderheit der *T(2;3)*-Translokation sollte es ermöglichen, positive und negative Effektoren des *trans*-Spleißprozesses zu identifizieren. Dazu wurden bekannte Spleißfaktormutationen mit der Translokation rekombiniert (Mount und Salz, 2000; Furuyama und Bruzik, 2002). Da alle Mutationen, für die Linien erhalten wurden, rezessiv letal sind, können lediglich dominante bzw. Haploinsuffizienzeffekte auf den *trans*-Spleißprozeß untersucht werden.

Alle Mutationen, die mit *T(2;3)26A,mod(mdg4)* rekombiniert werden konnten, wurden gekreuzt, um Männchen zu erhalten, die das $YB^S y^+$ -Chromosom enthielten, homozygot für *T(2;3)26A,mod(mdg4)* und heterozygot für die Spleißfaktormutationen (maternal eingebracht) waren. Diese Tiere wurden mit Jungfrauen der oben erwähnten $w^+ y^l$ -markierten Referenzlinie (a-31) gekreuzt. Für die Mutation $B52^{s2249}$ wurden die Effekte der maternalen und paternalen Einbringung des Allels in die zu untersuchenden Männchen getestet (Tab. 3.21, 1. und 2. Zeile).

Tabelle 3.21 (nächste Seite) Analyse der Geschlechtschromosomen-*nondisjunction* (NDJ) in homozygoter *T(2;3)26A,mod(mdg4)* und heterozygoter Spleißfaktormutation. Weibchen mit $w^+ y^l$ -markierten X-Chromosomen (a-31) wurden mit $B^S y^+$ (Bar-Stone)-markierten Y-Chromosomen, der homozygoten Translokation und der in Spalte1 angegebenen Spleißfaktormutation gekreuzt. Die Konstellation der Geschlechtschromosomen in den Spermien wurde aus Geschlecht und Phänotyp der F1-Tiere geschlossen. Der NDJ-Anteil wurde als Division der Summe der X0-Männchen und XXY-Weibchen durch die Gesamtzahl der F1-Tiere (n) berechnet.

Genotyp der gekreuzten Männchen (paternales/maternales Allel)	Spermienklasse				n	%
	X	Y	XY	0		
<i>T(2;3) B52^{s2249} / T(2;3)</i>	290	242	167	74	773	31,2
<i>T(2;3) / T(2;3) B52^{s2249}</i>	634	485	338	244	1701	34,2
<i>T(2;3) / T(2;3) Prp19⁰⁷⁸³⁸</i>	716	612	313	325	1966	32,5
<i>T(2;3) / T(2;3) noi^{j3E}</i>	1293	1068	711	531	3603	34,5

$T(2;3) / T(2;3)$ $CG10689^{BG01776}$	1853	1491	999	891	5234	<u>36,1</u>
$T(2;3) / T(2;3)$ tra^1	821	639	327	382	2169	32,7
$T(2;3) / T(2;3)$ $heph^2$	402	274	167	149	992	31,8
$T(2;3) / T(2;3)$ $heph^{03429}$	577	475	336	291	1679	<u>37,3</u>

Die *nondisjunction*-Raten in den meisten Kreuzungen sind gegenüber der homozygoten Translokation moderat erhöht. Darum wurde ein Minimum von 35% festgelegt (entspricht *Df(3R)6050/Z3-5578*). Die Spleißfaktormutationen $CG10689^{BG01776}$ und $heph^{03429}$ zeigen eine erhöhte *nondisjunction* gegenüber der Translokation ohne Spleißfaktormutation. Da die Abweichungen (36,1% : 30,0% bzw. 37,3% : 30,0%) gering sind und um herauszufinden, ob sie das Ergebnis natürlicher Varianz sind, die bei Kreuzungsergebnissen auftritt, wurden die Ergebnisse der Auszählung statistisch überprüft. Dazu wurde der t-Test für binominal verteilte Gesamtheiten angewandt (siehe 2.3.2). Der Fisher-Irwin-Test konnte bei so großen Kreuzungsumfängen aus technischen Gründen nicht angewendet werden.¹⁹ Der berechnete p-Wert gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, ob eine Korrelation zwischen Mutation und Phänotyp besteht, d.h. mit einer Wahrscheinlichkeit von z.B. $p=0,01$ sind die ermittelten NDJ-Werte Produkte natürlicher Varianz in der Kreuzung. Der Test der Translokation mit $CG10689^{BG01776}$ (RNA-Helicase) gegenüber der Translokation ohne Mutation ergab $p=3,5 \cdot 10^{-22}$. Für die Translokation mit $heph^{03429}$ (*P*-Insertion in konstitutives Exon von *heph*; Heph-Protein bindet an den Polypyrimidintrakt in Introns von prä-mRNAs) wurden $p=2,1 \cdot 10^{-11}$ ermittelt. Aufgrund der niedrigen p-Werte können die Ergebnisse als signifikant angesehen werden.

Die Einbringung der Spleißfaktormutation von maternaler oder paternaler Seite in die zu untersuchenden Männchen kann Einfluß auf das Ergebnis der Kreuzung haben, wie die unterschiedlichen Werte für das Allel $B52^{s2249}$ zeigen (erste und zweite Zeile in Tab. 3.21). Obwohl die Unterschiede beim Umfang der durchgeführten Kreuzungen nicht signifikant waren (Fisher-Irwin-Test: $p<0,15$; TbvG: $p<0,041$), sind sie ein Hinweis auf eine nur bedingte Vergleichbarkeit der Effekte bei maternaler bzw. paternaler Vererbung der Mutation.

¹⁹ Die Größe der Zwischenergebnisse überstieg 1×10^{307} bei $n(\text{ges}) > 2700$ und damit die Möglichkeiten zur Berechnung, die mir im Rahmen dieser Arbeit und privat zur Verfügung standen. $n(\text{ges})$ meint hier die addierten Kreuzungsumfänge von $n=2569$ für $T(2;3)$ und $n=\dots$ (siehe Tab. 3.21) für $T(2;3)/T(2;3)$ -Spleißfaktormutation.

4. Diskussion

Der Genlocus *mod(mdg4)* in *Drosophila melanogaster* zeichnet sich durch eine besondere Genstruktur aus. Von ihm werden, durch komplexe Regulationsmechanismen gesteuert, mehr als 30 Proteinisoformen gebildet, die wichtige Funktionen im Chromatin haben.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte ein besseres Verständnis der Expressionsregulation dieses Locus durch multiple intragenische Promotoren sowie zur funktionellen Differenzierung der Mod(mdg4)-Proteinisoformen erarbeitet werden. Für die Isoform Mod(mdg4)-64.2 konnte ein Knockout etabliert und Experimente zur Funktionsaufklärung durchgeführt werden. Zudem konnte ein *in vivo*-Testsystem für den Prozeß des *trans*-Spleißens etabliert werden – ein Vorgang, bei dem Exons von zwei verschiedenen Primärtranskripten verbunden werden und der essentiell für die Funktion von *mod(mdg4)* ist, da alle bisher identifizierten Isoformen des Locus durch diesen Prozeß gebildet werden. Darüber hinaus konnte die funktionelle Konservierung des *trans*-Spleißvorgangs zwischen den entfernt verwandten Arten *Drosophila melanogaster* und *D. virilis* nachgewiesen werden.

Regulation des mod(mdg4)-Locus

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen besseren Einblick in die Regulation des Locus *modifier of mdg4* zu erhalten. Die Struktur des Locus ist sehr komplex: den 5' Bereich bilden vier gemeinsame Exons (1-4), die in jeder reifen *mod(mdg4)*-mRNA enthalten sind. Daran schließen sich 31 verschiedene Exons 5 (bzw. 5 und 6) an, die spezifisch für die Isoformen sind und die die C-Termini der Mod(mdg4)-Proteinisoformen codieren. Neun dieser isoformspezifischen Exons werden vom antiparallelen DNA-Strang codiert (Dorn *et al.*, 2001; Dorn und Krauss, 2003 und 2004; Labrador und Corces, 2003). Da die RNA Polymerase II unter normalen Umständen¹²⁰ nicht in der Lage ist, während der Transkription auf den antiparallelen DNA-Strang zu wechseln, legt bereits die Genstruktur von *mod(mdg4)* das Vorhandensein intragenischer Promotoren nahe.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese Promotoren lokalisiert werden. Durch Remobilisierung der *P*-Elemente *P{RS5}5-HA-122* und *P{KG}08515* wurden unterschiedlich große Deletionen im spezifischen Bereich des Gens erhalten (siehe Abb. 3.1), deren Untersuchung auf differentielle Expression der deletionsflankierenden *mod(mdg4)*-Isoformen

²⁰ Im Gegensatz zu z.B. T7 RNA Polymerase, die auch größere Läsionen in der DNA-Matrize überwinden kann (Rong *et al.*, 1998), wurde für RNA Pol II *template switching* nur unter sehr speziellen Bedingungen wie Hepatitis D-Infektion (RNA-Synthese von einer RNA-Matrize; Chang und Taylor, 2002) und Infektion mit linearer Retrovirus-DNA ohne 3' LTR (*end-to-end template switching*; Kandel und Nudler, 2002) nachgewiesen.

zur Identifizierung von acht intragenischen Promotoren führte (Promotoren #4 bis #11; siehe Tab. 3.3). Zwei weitere intragenische Promotoren (Promotoren #2 und #3) konnten mit Hilfe von *D. virilis*-Transgenen identifiziert werden. Eine graphische Übersicht zu den Promotoren im *mod(mdg4)*-Locus ist in Abbildung 4.1 gegeben (geknickte Pfeile an der kb-Skala).

Die hohe Anzahl intragenischer Promotoren – nur auf Basis der Genstruktur sind fünf intragenische Promotoren das Minimum; experimentell wurden zehn gefunden – deutet darauf hin, daß sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genaktivität von *mod(mdg4)* spielen. Die Promotoren innerhalb der Transkriptionseinheiten (z.B. #3, #4 und #11; Tab. 3.3) dienen nicht der Verstärkung der Expression (Tsuda *et al.*, 2000), sondern sie aktivieren die Transkription in zusätzlichen Geweben, z.B. in den männlichen akzessorischen Drüsen (Promotor #10, siehe Abb. 3.5 und Anhang A2.2).

Neben der räumlichen Regulation ist die *mod(mdg4)*-Genaktivität durch die intragenischen Promotoren auch zeitlich reguliert (*developmental timecourse*; siehe Anhang A2.2; Arbeitman *et al.*, 2002; Costello *et al.*, 2008). Allgemein ist zu erkennen, daß alle analysierten *mod(mdg4)*-Isoformen in Embryo und Puppe hochreguliert sind. Bei genauerer Betrachtung zeigen sich Unterschiede zwischen Isoformen in verschiedenen Transkriptionseinheiten, vor allem in den Larvenstadien, in der Puppe kurz vor dem Schlüpfen und geschlechtsspezifische Abweichungen in adulten Fliegen. Die intragenischen Promotoren erlauben also eine räumlich und zeitlich differenzierte Transkription.

In Experimenten mit *mod(mdg4)*-Transgenen aus *Drosophila virilis* konnte gezeigt werden, daß selbst die Isoform *mod(mdg4)*-64.2, deren spezifisches Exon am weitesten proximal codiert ist, mittels *trans*-Spleißen synthetisiert wird und daß das isoformspezifische Exon von einem separaten Promotor transkribiert wird (Kapitel 3.2.3). Durch Austausch der Promotorsequenz vor dem spezifischen Exon sank die mRNA-Menge von *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2 um 97% (siehe Tab. 3.18). In einem anderen Transgen wurde die Orientierung des isoformspezifischen Exons und der zwei folgenden (*mod(mdg4)*-60.1 und -53.5) inklusive der putativen Promotorsequenz umgekehrt ($P(w^+ \text{ Dvi } 9,5\text{kb } \textit{spin} \rightarrow \leftarrow)$, siehe Abb. 3.18), was eine Bildung der Isoform-mRNA aus einer einzigen prä-mRNA des Transgens mittels *cis*-Spleißen unmöglich macht. Die ermittelte *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2-mRNA-Konzentration aus diesem Transgen beträgt 35-45% verglichen mit der Referenz (Transgen mit *D. virilis*-Wildtypsequenz)²¹. Die Expression der Isoform aus diesem Konstrukt und die sehr starke Reduktion der mRNA-Menge im Fall des mutierten Promotors weisen auf eine eigenständige Transkriptionseinheit hin. Die Reifung der *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2-mRNA durch intramole-

²¹ Die umgekehrte Orientierung der isoformspezifischen Exons wurde durch ungerichtete Ligation eines *Xba*I-Fragments erreicht, in welchem möglicherweise nicht der komplette Promotor und/oder regulatorische Sequenzen enthalten waren. Dies würde die geringere *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2-mRNA-Menge erklären.

kulares *cis*-Spleißen aus einem durchgehenden Primärtranskript kann anhand dieser experimentellen Ergebnisse zwar nicht ausgeschlossen werden, nimmt man die RT-qPCR-Daten als Referenz, trägt *cis*-Spleißen aber maximal 3% zur mRNA-Synthese von *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2 bei (siehe Tabelle 3.18).

Die Promotoren #2 und #3 wurden im Rahmen der Arbeit anhand von *D. virilis*-Transgenen untersucht. Obwohl sehr gut speziesdiskriminierende Primer verwendet wurden¹²², kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch den *mod(mdg4)*⁺-Hintergrund nicht ganz ausgeschlossen werden (chimäre mRNAs, siehe 3.2.2). Die Funktion der identifizierten Promotoren #2 und #3 im endogenen *mod(md4)*-Locus konnte nicht experimentell untersucht werden, doch sind die typischen Promotorsequenzelemente wie CAAT-Boxen und TATA-Box zwischen den Arten konserviert, sodaß die Funktion der Promotoren wahrscheinlich auch erhalten blieb.

Die Anzahl der intragenischen Promotoren und die zum Teil verschachtelten Transkriptionseinheiten widerlegen die von Labrador *et al.* (2001) postulierten zwei *mod(mdg4)*-Primärtranskripte, (1) der Locus vom Promotor des gemeinsamen Teils aus „vorwärts“ und (2) der Locus zum Teil, ausgehend vom Promotor vor dem isoformspezifischen Exon von *mod(mdg4)*-67.2, antiparallel. Zudem zeigt die Aufarbeitung von Rohdaten quantitativer Microarrays verschiedener *Drosophila melanogaster*-Gewebe (Chintapalli *et al.*, 2007; Abb. 3.5; Anhang A2.2), daß Isoformen, von beiden antiparallelen DNA-Strängen codiert, in den gleichen Geweben hoch exprimiert sind, was im von Labrador *et al.* vorgeschlagenen Modell zu doppelsträngiger RNA (bestehend aus den Primärtranskripten) und im weiteren zur Bildung von siRNAs führen würde (Okamura *et al.*, 2008), die für *mod(mdg4)* nicht nachgewiesen wurden (Ghildiyal *et al.*, 2008).

Der Transkription nachgeschaltet ist die Generierung reifer *mod(mdg4)*-mRNAs durch alternatives *trans*-Spleißen. Dabei wird aus den prä-mRNAs mit mehreren isoformspezifischen Exons ein Spleißakzeptor selektiert und mit dem Spleißdonor (gemeinsame Exons) verknüpft. Neben der transkriptionellen Kontrolle durch die verschiedenen intragenischen Promotoren kann die Konzentration der reifen *mod(mdg4)*-mRNAs auch durch die relative Stärke der verschiedenen *trans*-Spleißakzeptoren in den prä-mRNAs bestimmt werden. Diese *splice site strength* (Graveley *et al.*, 1998; Fahey und Higgins, 2007) ist zwar intrinsisch bezogen auf die Sequenzebene, kann jedoch durch die Bindung von sequenzspezifischen Spleißfaktoren an exonische/intronische *splice enhancer* (ESE/ISE) bzw. *silencer* (ESS/ISS) beeinflusst werden (Ito *et al.*, 2001; Scamborova *et al.*, 2004; Sironi *et al.*, 2004; Kiesler *et al.*, 2005; Lev-Maor *et al.*, 2007; Wang und Burge, 2008). Caudevilla *et al.* (2001) identifizierten einen *exonic*

²² 500- bzw. 16.000-fach schlechtere Amplifikation der entsprechenden Isoform der „falschen“ Art bei angenommener PCR-Effizienz von 100%; in RT-qPCRs ergaben sich $\Delta\Delta Ct$ -Werte von 9 bzw. 14

splice enhancer, der das *trans*-Spleißen zweier Carnitin-Octanoyltransferase-prä-mRNAs in *Rattus norvegicus* positiv reguliert. Das verantwortliche DNA-Motiv GAAGAAG ist auch in zwei isoformspezifischen Exons von *D. melanogaster* und *D. virilis* konserviert, neben *mod(mdg4)*-64.2 auch in *mod(mdg4)*-53.1. In beiden Spezies befindet es sich an ähnlichen Positionen im Exon 5; die mit einem *D. virilis-mod(mdg4)*-h64.2-Transgen gewonnenen Erkenntnisse sollten sich also auf *D. melanogaster* übertragen lassen. Die Reduktion der Isoform-mRNA-Konzentration um 70% im Vergleich nichtmutierter mit GAAGAAG→A₇-mutierter ESE-Sequenz (Real-time RT-qPCR, siehe Tab. 3.19) belegt die Funktionalität des Motivs als *exonic trans-splice enhancer*. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Caudevilla *et al.* erhalten (50-60% Reduktion).

Das alternative *trans*-Spleißen und die Modulation der Spleißakzeptorstärke, die am Beispiel des ESE der Isoform *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2 nachgewiesen werden konnte, stellt nach den multiplen intragenischen Promotoren die zweite Stufe der Expressionsregulation am *mod(mdg4)*-Locus dar.

Das *trans*-Spleißen ist essentiell für die Aktivität des *mod(mdg4)*-Locus. Um den *trans*-Spleißprozeß und damit überhaupt die Synthese reifer *mod(mdg4)*-mRNAs zu ermöglichen, ist als *trans*-Spleißpartner der Primärtranskripte von den intragenischen Promotoren eine prä-mRNA erforderlich, die die gemeinsamen Exons 1-4 enthält. Um diese prä-mRNA *trans*-spleißkompetent zu generieren, ist ein Transkriptionsstoppsignal *downstream* von Exon 4 notwendig¹²³. Einen Hinweis auf die Existenz des Transkriptionsstops bietet die molekulare Analyse der *P{RS5}5-HA-1224*-Revertante Rev31 (15kb-Deletion ab Position 6.502; siehe Abb. 3.1). In dieser Revertante wird wahrscheinlich der gesamte Locus als eine einzige prä-mRNA vom starken Promotor des gemeinsamen Teils ausgehend transkribiert, sodaß reife *mod(mdg4)*-mRNAs durch intramolekulares, also *cis*-Spleißen gebildet werden. Aufgrund der dreidimensionalen Bewegungsmöglichkeiten von Spleißdonor und -akzeptoren in einem Molekül (Pasman und Garcia-Blanco, 1996; Spleißreaktion ist infolge physikalischer Verbindung, wenn auch lang und flexibel, von Spleißdonor und -akzeptor keine Reaktion zweiter Ordnung mehr) ist eine höhere Konzentration derjenigen Isoform-mRNAs zu erwarten, deren spezifischen Exons in Rev31 nicht deletiert sind. Tatsächlich ist die Expression von z.B. *mod(mdg4)*-56.3 in der homozygoten Revertante Rev31 auf das ca. Dreifache erhöht. Gleichzeitig konnten in transheterozygoten Tieren von Rev31 mit *loss of function*-Allelen des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)* keine Isoform-mRNAs nachgewiesen werden, deren isoformspezifisches Exon im Bereich der Deletion von Rev31 lag (siehe Abb. 3.15). Obwohl

²³ vgl. *mod(mdg4)* (Tab. 3.15, Isoformen in ähnlicher Kopienzahl wie *housekeeping*-Gen *rp49*) mit z.B. Puttaraju *et al.* (1999), wo *trans*-Spleißen als Konkurrenzreaktion zum *cis*-Spleißen an einem „normalen“ Intron, d.h. durchgehendem Transkript zu <<1% *trans*-gespleißter mRNA führt (siehe auch Liu *et al.*, 2002)

mittels *nested* RT-PCRs kein interchromosomales *trans*-Spleißen zwischen den Allelen nachweisbar war, könnte es doch in geringem Umfang stattfinden, da der *trans*-Spleißprozeß nicht notwendigerweise Outrons erfordert, sondern auch an Introns beobachtet wurde (*exon repetition*: Dixon *et al.*, 2005 und 2007; Finta und Zaphiropoulos, 2002). Bei langen Introns – in Rev31 liegen zwischen Exon 4 und dem nächsten Spleißakzeptor 1,5kb – oder wenn die Synthese der 3'Spleißposition (Spleißakzeptor) verzögert wird z.B. durch RNA Pol II *pausing sites* (Herbert *et al.*, 2006; von Hippel, 2006) kann *trans*-Spleißen auch durch „Einspleißen“ eines *trans*-Spleißpartners in eine prä-mRNA zwischen zwei intakte *cis*-Spleißsites stattfinden (Takahara *et al.*, 2005). Dies wäre eine Erklärung für die bei transheterozygoten Linien (Rev31/*mod(mdg4)*^{neo129 R32}, Rev31/*mod(mdg4)*⁰²) beobachteten Phänotypen, die in ihrer Ausprägung lediglich zum Teil denen der homozygoten Revertante Rev31 entsprechen. So wird einerseits die rezessive Letalität von *mod(mdg4)*^{neo129}, *mod(mdg4)*^{neo129 R32} und *mod(mdg4)*⁰² in den Rev31-transheterozygoten Tieren vollständig gerettet, andererseits sind die transheterozygoten F1-Weibchen jedoch steril (vgl. Tab. 3.9 und 3.14; Sterilität z.B. auch in homozygoter Rev31 und homozygoten *mod(mdg4)*^{neo129}-*Escaper*-Tieren). Die Position des vermuteten Transkriptionsstoppsignals des gemeinsamen Teils (Exons 1-4) konnte zwischen den Positionen 6.502, dem proximalen Ende der Deletion in Revertante Rev31, und 7.104 (5'Ende des spezifischen Exons von *mod(mdg4)*-64.2) eingegrenzt werden.

Phänotypen der mod(mdg4)-Mutationen

Die zur Aufklärung der Locusregulation etablierten Revertanten deletieren isoform-spezifische Exons bzw. deren Promotoren führen zum Verlust bzw. zu einer verringerten Expression der betroffenen Isoformen (in verschachtelten Transkriptionseinheiten bei Deletion des proximalen aber nicht des nachfolgenden Promotors; siehe Abb. 3.2B). Sofern die Funktionen der *mod(mdg4)*-Isoformen nicht redundant sind, sollten die bei verschiedenen Revertanten auftretenden Phänotypen unterschiedlich sein und ihre Untersuchung Rückschlüsse zulassen auf die Funktion der betroffenen Isoformen.

Die meisten der bisher bekannten *mod(mdg4)*-Funktionen konnten anhand von Mutationen des gemeinsamen Teils identifiziert werden. Diese Mutationen sind im Larven- bis Puppenstadium rezessiv letal, sodaß lediglich dominante Effekte, wie der *Enhancer*-Effekt auf die Positioneffektvariegation (PEV; Dorn *et al.*, 1993b), oder Phänotypen an homozygoten *Escaper*-Tieren (homöotische Transformation, weibl. Sterilität; Büchner *et al.*, 2000) bzw. Larven (Gorczyca *et al.*, 1999) beobachtet werden konnten. Aus den pleiotropen Effekten der

Mutationen des gemeinsamen Teils lassen sich keinerlei Rückschlüsse auf die Funktion einzelner *mod(mdg4)*-Isoformen ziehen. Andererseits ermöglichen Mutationen, die ein isoformspezifisches Exon betreffen, funktionelle Untersuchungen ebendieser Isoform. Bis heute sind nur zwei der 31 *mod(mdg4)*-Isoformen funktionell analysiert worden: *mod(mdg4)*-67.2 als essentieller Teil von *gypsy*-Chromatinisolatoren (Georgiev und Gerasimova, 1989; Gerasimova *et al.*, 1995, 1998, 2007) und *mod(mdg4)*-56.3, das eine Rolle bei der Paarung der homologen Chromosomen während der Pro- und Prometaphase der männlichen Meiose I spielt (Surrogat für synaptonemalen Komplex; Thomas *et al.*, 2006; McKee *et al.*, 2007). In beiden Fällen gelang die Aufklärung der Funktion durch isoformspezifische Mutationen, bei *mod(mdg4)*-67.2 in Form einer *stalker*-Elementinsertion in Exon 5 und im Fall von *mod(mdg4)*-56.3 durch eine EMS-induzierte Mutation (W₄₄₉→Stop), die ein vorzeitiges Stopcodon entstehen ließ.

Zur Identifizierung der intragenischen Promotoren wurden für die etablierten Revertanten die exakten Deletionsbruchpunkte kartiert und Expressionsprofile erstellt (Abb. 3.2, 3.3; Tab 3.2), d.h. es ist für jede Mutante bekannt, welche *mod(mdg4)*-Isoformen in welchem Umfang (semiquantitativ) exprimiert werden. Auftretende Phänotypen lassen sich so dem Ausfall bzw. der verminderten Expression weniger, im Idealfall einer Isoform zuordnen. Sollte eine funktionelle Redundanz zwischen Isoformen vorliegen, so betrifft sie nicht die untersuchten Phänotypen oder die Redundanz besteht zwischen Isoformen, deren spezifische Exons räumlich unmittelbar benachbart liegen und in den untersuchten Mutanten jeweils beide deletiert wurden. Jedoch wäre eine funktionelle Komplementation am ehesten zwischen den phylogenetisch am nächsten verwandten Isoformen denkbar, die in *mod(mdg4)* aber nicht benachbart codiert sind und daher nicht gemeinsam in den untersuchten Revertanten deletiert sind (vgl. Anhang A2.6; Krauss und Dorn, 2004)²⁴. Außerdem weisen alle bisher untersuchten *Mod(mdg4)*-Proteinisoformen distinkte, nicht-überlappende Bindemuster an Polytänochrosomen auf (Büchner *et al.*, 2000; Gabler, pers. Mitteilung). Die Zuordnung von Phänotypen zum Ausfall bestimmter Isoformen sowie die spezifische Verteilung der Isoformen an Chromosomen lassen die Schlußfolgerung zu, daß jede *mod(mdg4)*-Isoform eine spezifische physiologische Funktion hat.

Die für *mod(mdg4)*-67.2 und -56.3 beschriebenen Phänotypen konnten an Revertanten nachgewiesen werden, deren Deletion entweder das spezifische Exon der entsprechenden Isoform umfaßt oder den Promotor einschließt, von dem die Transkription des betreffenden isoformspezifischen Exons ausgeht (Gabler, pers. Mitteilung; Volkmar *et al.*, in Präp.).

²⁴ Ausnahme: Die spezif. Exons von *mod(mdg4)*-56.3 und -54.6 liegen benachbart und beide Isoformen sind phylogenetisch nahe verwandt (siehe Abb. A5). Allerdings wird der *non-disjunction*-Phänotyp eindeutig von *mod(mdg4)*-56.3 hervorgerufen wie Komplementationen mit transgencodierter *mod(mdg4)*-56.3-cDNA belegen (siehe Tab. 3.20; Thomas *et al.*, 2006).

Daneben konnten sechs neue, bisher nicht beschriebene Phänotypen für *mod(mdg4)* beobachtet und auf wenige Isoformen eingegrenzt werden (siehe Abbildung 4.1). Diese Phänotypen treten alle rezessiv auf. Revertanten, die die spezifischen Exons der Isoformen *mod(mdg4)*-53.1 bis -54.7 bzw. deren Promotoren deletieren, zeigten eine stark eingeschränkte Bewegungskoordination (siehe 3.1.3.2): Die Tiere waren nicht in der Lage, sich aus dem Futter zu befreien und die Gefäßwand zu erklimmen. Sie starben i.d.R. im/auf dem Futter. Von Gorczyca *et al.* (1999) wurde für eine *P*-Elementinsertion ins Exon 1 von *mod(mdg4)* in Larven eine fehlerhafte Innervierung von Muskeln durch Motorneuronen und eine veränderte Synapsenmorphologie beschrieben. Die beschriebene Mutation ist jedoch, wie alle *loss of function*-Mutationen im gemeinsamen Teil von *mod(mdg4)*, larval-pupal letal, sodaß Effekte in Adulten nicht analysiert werden können. Nichtsdestoweniger könnten die Koordinationsstörungen in den homozygoten Revertanten das Ergebnis fehlerhafter Neuroanatomie/-physiologie sein, die evtl. auch Defekte der motorischen Endplatten umfassen.

Ein zweiter Phänotyp wurde in Anlehnung an Hall *et al.* (1980; *stuck*, *sk*) *stuck-like* benannt, ist allerdings von wesentlich stärkerer Ausprägung. Im Gegensatz zu *sk*, wo sich das Männchen nach der Kopulation zwar verzögert aber immer erfolgreich vom Weibchen lösen kann, bleibt die Verbindung bei *stuck-like* in der großen Mehrzahl der Fälle bis zum Tod erhalten (siehe Abb. 3.5). Die inneren und äußeren Genitalien beider Geschlechter sind morphologisch unauffällig. Schließt man subtile Deformationen der Genitalien¹²⁵ aus, die während der Kopulation zu einer untrennbaren Verbindung führen, könnte auch dieser Phänotyp auf Veränderungen in der Neuroanatomie/-physiologie zurückzuführen sein. Ein regulatorischer Effekt auf die Gene *stuck* bzw. *lingerer* durch den Ausfall einer/mehrerer *mod(mdg4)*-Isoformen ist unwahrscheinlich, da die beobachteten Effekte sehr viel stärker sind als die beschriebenen *sk*- bzw. *lig*-Phänotypen (Hall *et al.*, 1980; Yamamoto *et al.*, 1997; Kuniyoshi *et al.*, 2002) und *lig* nicht unter den durch Rev31 signifikant veränderten Genen ist.¹²⁶

Als dritter neu erfaßter *mod(mdg4)*-Phänotyp tritt bei einigen Revertanten in Kombination mit dem YB^S -Chromosom (Brosseau und Lindsley, 1958; Brosseau *et al.*, 1961) eine teilweise Reversion des dominanten *Bar-(of)-Stone*-Phänotyps auf (siehe Abb. 3.7). Da das YB^S -Chromosom nicht molekular charakterisiert ist, kann keine immunocytoologische oder molekularbiologische Methode (z.B. ChIP) angewendet werden, um zu prüfen, ob es sich hier um epigenetische Veränderung handelt. Interessant ist, daß der Ausfall oder die verminderte Expression von *mod(mdg4)* in diesem Fall epistatisch zu einer dominanten Mutation (B^S) ist.

²⁵ Morphologische Veränderungen könnten trotz größtmöglicher Sorgfalt bei der Durchführung der lichtmikroskopischen Untersuchungen übersehen worden sein.

²⁶ Rev31 deletiert die spezifischen Exons der in Frage kommenden Isoformen. Expressionsanalyse mittels Affymetrix Dros_Genome2-Array: *sk*-Phänotyp verursachendes Gen ist nicht kloniert, daher ist keine Aussage über Interaktionen möglich.

Der vierte beobachtete Phänotyp ist die verstärkte Ausbildung ektopischer Borsten auf dem Scutellum (siehe Tab. 3.8); er wurde nur bei homozygoten Tieren der Revertante Rev31 beobachtet. Da dieser Phänotyp auch bei dem verwendeten Referenzstamm w^{1118}_{iso} auftritt, wurden die Ergebnisse statistisch überprüft und es wurde für Weibchen eine signifikante Erhöhung des Anteils ektopischer Scutellarborsten festgestellt (Anzahl analysierter männlicher Tiere war zu gering für statistisch signifikantes Ergebnis).

Die unvollständige Ausbildung der posterioren Flügelquerader tritt ebenfalls bei Rev31 und geschlechtsabhängig mit unterschiedlicher Penetranz auf (siehe Tab. 3.8), kommt jedoch in der w^{1118}_{iso} -Referenz nicht vor. Dansereau *et al.* (2002) beschreiben für somatische Mutationen von *hephaestus* unter anderem Defekte der posterioren Flügelquerader. Der Mittelteil der Ader fehlt, während die Verbindungen zu den Longitudinaladern intakt sind, während bei Rev31 der mittlere Teil vorhanden ist aber die Verbindungen zu den Flügellängsadern fehlen (siehe Abb. 3.9). Die Expression von *hephaestus* ist in der homozygoten Revertante Rev31 unverändert, was gegen eine Interaktion spricht. Andererseits beeinflussen beide Gene Teile der Notch-Signalkaskade (vgl. Tab. 3.13), die u.a. die Entwicklung der Flügel (Dansereau *et al.*, 2002) und des peripheren sensorischen Nervensystems (siehe ektopische Borsten) steuert.

Der sechste neue Phänotyp wurde bei der immunocytoologischen Untersuchung von Polyänchromosomen der Revertante Rev31 identifiziert. Die Telomere der Chromosomen wiesen eine verstärkte Erosion auf (siehe Abb. 3.10). Von M. Gabler (2003) wurde eine Assoziation von Mod(*mdg4*)-Proteinen an Telomere nachgewiesen. Der Ausfall einer oder mehrerer *mod(mdg4)*-Isoformen in Rev31 könnte, z.B. durch die Deregulation der Retrotransposons, aus denen die Telomere in *Drosophila* aufgebaut sind (Tab 3.11, Tab A2), zu einer verminderten Aufbaurrate (Transposition der Retrotransposons an die Chromosomenenden, verringerte Transkription?) oder zu einem erhöhten Abtrag von Telomerasequenz führen (Biessmann *et al.*, 1990a, b, 2005; Mason *et al.*, 2000; Frydrychova *et al.*, 2007).

Neben der Erfassung und Analyse neuer Phänotypen der *P*-Elementrevertanten sollte im Rahmen der Arbeit auch versucht werden, bekannte Phänotypen von Mutationen im gemeinsamen Teil des Locus einzelnen Isoformen oder Isoformgruppen zuzuordnen. Dies gelang für die homöotische Transformation des Abdominalsegments A5 in A4, die von Dorn *et al.* (1993b; Büchner *et al.*, 2000) in homozygoten *mod(mdg4)^{neo129}*-Escapern erstmals beschrieben wurde. Der Phänotyp konnte auf den Ausfall der Isoform *mod(mdg4)*-58.0 und/oder die reduzierte mRNA-Menge von *mod(mdg4)*-55.2 eingegrenzt werden, ist in der entsprechenden homozygoten Revertante JK14 jedoch etwas schwächer ausgeprägt als z.B. in *mod(mdg4)^{neo129}*-Escapern oder Rev31. Eine Verstärkung des Phänotyps durch den Ausfall weiterer Isoformen kann daher nicht ausgeschlossen werden. Eine immunocytoologische

Untersuchung der Speicheldrüsenpolytänchromosomen von Revertanten mit deletierter Isoform *mod(mdg4)*-58.0 ergab eine mögliche Bindestelle in der Nähe des *Ubx*-Locus (M. Gabler, pers. Mitteilung), ein weiteres Indiz für die mögliche Kausalität von Ausfall der *mod(mdg4)*-58.0/-55.2 und homöotischer Transformation.

Die rezessive Letalität von allen Mutanten des gemeinsamen Teils konnte auf die 13 am weitesten distal codierten Isoformen eingegrenzt werden (*mod(mdg4)*-52.2 bis -54.5). Diese Eingrenzung gelingt jedoch nur indirekt, da die proximalen 18 Isoformen auch einen Einfluß auf das Überleben der Tiere haben. Ihr Ausfall, wie in Revertante Rev31, führt zu starker Semiletalität. Vergleicht man die Komplementationsrate von Revertante 459 mit *Df(3R)ED6050* (letal; 6/1061 F1-Tiere; keine Expression von *mod(mdg4)*-58.0 bis -54.5; für Annotierung siehe Abb. 3.1) mit transheterozygoten Rev31/*Df(3R)ED6050*-Tieren (Überlappung beider Deletionen umfaßt spezif. Exons von *mod(mdg4)*-58.0 bis -55.7), die normal lebensfähig und fertil sind, so kann die rezessive Letalität auf den Ausfall einer oder mehrerer Isoformen zwischen *mod(mdg4)*-52.2 und -54.5 eingegrenzt werden.¹²⁷

Der dominante *Enhancer of variegation*-Phänotyp im Positioneffektvariegationssystem (PEV; Dorn *et al.*, 1993a) konnte nicht auf eine bzw. eine Gruppe von *mod(mdg4)*-Isoformen eingegrenzt werden, obwohl Mutationen des spezifischen Teils getestet wurden, die in ihrer Kombination alle isoformspezifischen Exons abdecken. Eine mögliche Ursache, warum dieser Phänotyp nicht eingegrenzt werden konnte, ist ein dominant negativer oder haploinsuffizienter Effekt der Mutation des gemeinsamen Teils, während die Mutationen im spezifischen Teil des Locus in diesem Fall rezessiver Natur sind. Da der gemeinsame Teil von *mod(mdg4)* im Überschuß vorliegt (Büchner *et al.*, 2000; Gabler *et al.*, 2005) sollte eine heterozygote Deletion eines spezifischen Exons gut kompensiert werden können. Sinkt jedoch die Konzentration des gemeinsamen Teils um die Hälfte, ist eine verstärkte Konkurrenz der *trans*-Spleißakzeptoren um die verbliebenen prä-mRNAs zu erwarten. Wird infolgedessen eine Schwellenkonzentration unterschritten, tritt der PEV-Phänotyp auf. Das Vorhandensein von Schwellenkonzentrationen für *mod(mdg4)*-mRNAs legt z.B. die Analyse des *cut*⁶-Phänotyps nahe (*mod(mdg4)*-67.2; Gabler, pers. Mitteilung). Eine zweite mögliche Erklärung ist, daß für die Ausprägung des PEV-Phänotyps der Ausfall mehrerer *mod(mdg4)*-Isoformen notwendig ist, deren Kombination in den durchgeführten Analysen nicht getestet wurde.

Der Ausfall der 18 proximal codierten Isoformen in Rev31 führt zu weiblicher Sterilität, wie sie auch in *Escapern* von Mutationen des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)* gefunden wurde (Dorn *et al.*, 1993b; Gerasimova *et al.*, 1995). Zur Identifizierung der für die Sterilität verantwortlichen Isoformen wurden folgende Ergebnisse herangezogen: In der normal fertilen

²⁷ Die Revertanten 439 und GG48 (siehe Abb. 3.1) bestätigen die mit Revertante 459 erhaltenen Ergebnisse.

Linie $\Delta 13\ 85c\ III\ d$ werden *mod(mdg4)*-64.2, -55.1 und -53.1 nicht mehr gebildet (siehe Abb. 3.13). Eine Deletion bzw. eingeschränkte Transkription der isoformspezifischen Exons zwischen *mod(mdg4)*-53.1 und -52.4 resultiert in weiblicher Semsterilität (siehe 3.1.3.3). Schließlich sind transheterozygote *Rev31/Df(3R)ED6050*-Weibchen, in denen die Isoformen *mod(mdg4)*-58.0 bis -55.7 nicht gebildet werden, normal fertil. Die (vollständige) Sterilität wird also durch den Ausfall von *mod(mdg4)*-60.1, -53.5 oder einer Kombination mehrerer Isoformen hervorgerufen. Unklar bleibt, ob der Grund der Sterilität in strukturellen Abnormitäten der Ovarien begründet liegt, ob die Weibchen eventuell überwiegend unbefruchtete Eier legen oder ob es fehlende maternale RNAs sind, die die Embryonalentwicklung verhindern.

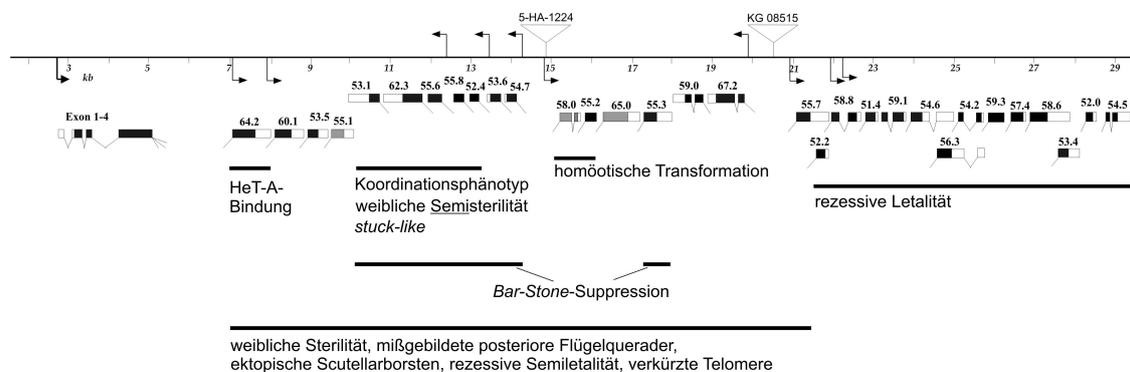


Abbildung 4.1 In Mutationen des spezifischen Teils von *mod(mdg4)* beobachtete Phänotypen und Zuordnung der verantwortlichen Isoformen bzw. Isoformgruppen. durch Analyse der Revertanten die den entsprechenden Phänotyp ausprägen.

Isoform mod(mdg4)-64.2: Funktion und Knockout

Für die Isoform *Mod(mdg4)*-64.2 konnte von M. Gabler (2003) eine Assoziation mit den Telomeren von Polytänchromosomen aus Speicheldrüsen nachgewiesen werden. In den verwendeten Linien ist (w^{118}_{iso} -Hintergrund) am Chromosomenarm 3L kein *HeT-A*-Element vorhanden (Abad *et al.*, 2004; Brückner, 2007 und pers. Mitteilung). Hier fehlte in den immunocytoologischen Analysen auch ein Signal für *Mod(mdg4)*-64.2. Daher liegt der Schluß nahe, daß das Protein mit dem *HeT-A*-Retrotransposon assoziiert ist. Um dies zu prüfen, wurde eine Chromatinimmunopräzipitation in Kombination mit Filterhybridisierung (*ChIP on membrane*; siehe 3.1.6.2; Sambrook und Russell, 2001; Clark und Shen, 2006) durchgeführt. Es konnte eine Anreicherung von *HeT-A*-UTRs nachgewiesen werden (Abb. 3.11). In diesem Experiment konnten auch drei Bereiche in der cytologischen Region 26B2-5 reproduzierbar angereichert

werden. Die Bindung von Mod(mdg4)-64.2 an *HeT-A* sowie an genomische Bereiche könnte auf ein generelles Prinzip bei Mod(mdg4)-Proteinen hindeuten – die Bindung sowohl an (Retro-)Transposons wie auch an genomische Sequenzen. So wurde für Mod(mdg4)-67.2, neben *gypsy* auch die Assoziation mit endogenen *chromatin insulator sites* nachgewiesen (Georgiev und Gerasimova, 1989; Gerasimova *et al.*, 1995, 1998, 2007; Nègre *et al.*, 2010).

Zunächst wurde Revertante Rev31 zur Untersuchung der Telomerassoziation von Mod(mdg4)-64.2 eingesetzt. Die Ergebnisse (siehe Abb. 3.10) ließen sich jedoch nicht dem Ausfall der Isoform *mod(mdg4)-64.2* zuordnen (vgl. Abb. 3.1; 17 weitere Isoformen deletiert). Daher wurde mit Hilfe des „*Ends-in gene targeting*“ (Xie und Golic; 2004) ein gezielter *mod(mdg4)-64.2-Knock out* generiert. Da diese Methode mit ihrer erfolgreichen Anwendung in der Arbeitsgruppe etabliert werden konnte, wurde im Material & Methoden-Kapitel 2.1.6 ausführlich auf ihre Durchführung sowie im Ergebniskapitel 3.1.6.1 und Anhang A2.3 auf kritische Punkte und angewendete Kontrollen eingegangen. Es wurde die Mutante $\Delta 13\ 85c\ V\ I$ erhalten, die ausschließlich die gewünschte Mutation, eine Deletion der Basen 7.081 bis 8.026 des *mod(mdg4)*-Locus trägt (locusinterne Skala). Desweiteren entstand eine zweite Mutante ($\Delta 13\ 85c\ III\ d$), die neben *mod(mdg4)-64.2* ebenfalls die spezifischen Exons von *mod(mdg4)-55.1* und *-53.1* deletiert, vermutlich durch exonucleolytischen Abbau während der Auflösung einer partiellen Duplikation die im Laufe der Mutagenese entsteht.

Um von *mod(mdg4)-64.2* regulierte Zielgene zu identifizieren, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt, die zwischen $\Delta 13\ 85c\ V\ I$ und $w^{1118}_{iso}\ 733$ signifikant in ihrer Expression veränderte Gene ergab (763 Target-IDs; $p \leq 0,05$)²⁸. Der spezifische *Knock out* von *mod(mdg4)-64.2* beeinflusst die Transkription von Retrotransposons/Klasse I-Elementen, z.B. *opus*, *HeT-A*, *invader4* und *-5* sowie 297, nicht jedoch von Klasse II-Elementen (DNA-Transposons). Eine Gesetzmäßigkeit, welche Retrotransposons positiv oder negativ in ihrer Transkription reguliert werden, oder ein DNA-Bindemotiv für die FLYWCH-Domäne (Beaster-Jones und Okkema, 2004; Nègre *et al.*, 2010) von Mod(mdg4)-64.2 ließen sich nicht ableiten. Zudem zeigt ein Vergleich von $\Delta 13\ 85c\ V\ I$, Rev31 und GG295 (siehe Tabelle 3.11), daß wahrscheinlich mehrere Mod(mdg4)-Isoformen die Expression derselben Transposons beeinflussen; so aktiviert neben Mod(mdg4)-64.2 mindestens eine weitere Isoform (unter 18, die in Revertante Rev31 ausfallen) die Expression von *HeT-A* (vgl. Rev31 in Tab. 3.11). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, daß verstärkte Transkription von *HeT-A* in $\Delta 13\ 85c\ V\ I$ und Rev31 nicht mit der Transposition an die Chromosomenenden bzw. Telomere

²⁸ Ein Signifikanzkriterium $p \leq 0,01$ schloße 403 Target-IDs ein. Die nicht überlappende Mutation GG295 wurde in diesem Fall als externe Negativkontrolle verwendet. Differentielle Expression: $\log_2 \text{Signaldifferenz} \geq 1$, d.h. \leq halbe bzw. \geq doppelte Signalstärke.

korreliert (Biessmann *et al.*, 1992; Abad und Villasante, 1999; Abad *et al.*, 2004; Brunmeir *et al.*, 2010). So zeigt zwar Rev31 eine Erosion von Telomersequenz (siehe Abb. 3.10), $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ jedoch nicht. Hierfür sind drei Erklärungen denkbar. (1) In Rev31 ist gegenüber $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ zusätzlich eine Komponente des Transpositionskomplexes dereguliert. Andererseits wäre denkbar, daß (2) aufgrund der starken *HeT-A*-Überexpression in Rev31 die reverse Transkriptase, die nicht von *HeT-A* codiert wird, aber für dessen Transposition notwendig ist und von anderen Elementen rekrutiert werden muß, von der 12-fach erhöhten *HeT-A*-Transkriptmenge (siehe Tab. 3.11: $2^{3,6} \approx 12$) austitriert wird, was zu einer insgesamt geringeren Transpositionsrate führt. Wenn die von *HeT-A* rekrutierte reverse Transkriptase das von *TART* und/oder *TAHRE* codierte Enzym sein sollte, wäre auch die Erosion am Telomer von z.B. Chromosomarm 2R erklärbar (siehe Abb. 3.10), das neben *HeT-A* auch aus *TART* aufgebaut ist (Abad *et al.*, 2004a). Biessmann *et al.* identifizierten die Telomer-lokalisierten *HeT-A*-, *TART*- und *TAHRE*-Bereiche der Telomere als euchromatisch und potentiell transkriptionell aktiv (Biessmann *et al.*, 2005, 2006; Golubowsky *et al.*, 2001; Mason *et al.*, 2003, 2004). Als Konsequenz ist ein Mechanismus vorstellbar, der die Telomere anhand der jeweiligen Transkriptmengen der Elemente reguliert (3). Bei einer erhöhten *HeT-A*-Transkription könnte dieser Mechanismus mit einer Transpositionsrate reagieren als sei eine ausreichende Menge von *HeT-A* an den Telomeren vorhanden, während diese tatsächlich aber erodieren. Die Erosion des 2R-Telomers, das neben *HeT-A* auch *TART* enthält, welches in seiner Transkription in Rev31 kaum verändert wird (Anhang 2: Tab. A2), kann mit diesem potentiellen Mechanismus jedoch nicht erklärt werden.

Der Vergleich von $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$, Rev31 und GG295 zeigt außerdem, daß einige Retrotransposons durch Mod(mdg4)-64.2 und andere Mod(mdg4)-Isoformen gegenteilig in ihrer Expression reguliert werden (vgl. z.B. *opus*, *invader4*, *G6* und *297* in Tab. 3.11).

Neben den Retrotransposons wird auch die Expression zahlreicher proteincodierender Gene durch den Ausfall von Mod(mdg4)-64.2 in $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ beeinflusst. Die umfangreichen Veränderungen im Transkriptom nach Deletion der Isoform ($\approx 4\%$ des *Drosophila*-Genoms) können zum Teil damit begründet werden, daß die Isoform Teil regulatorischer Netzwerke auf Transkriptionsebene (veränderte Gene *trx*, *br*, *Her*), epigenetischer/Histon-Modifikation (*JIL-1* bzw. *Su(var)3-1*) und Translation (*bru-3*) ist. Zudem zeigen immunologische Untersuchungen von Mod(mdg4)-64.2-EGFP-Fusionsproteinen (Gabler, 2003; Wagner, 2007) viele Dutzend Signale an Speicheldrüsen-Polytänchromosomen, was eine direkte Wirkung auf die Transkription der den Bindestellen benachbart liegenden Gene haben könnte, ähnlich der gestörten *insulator*-Aktivität bei Mutationen der Isoform Mod(mdg4)-67.2 (Gerasimova *et al.*, 1998, 2007; Volkmar *et al.*, in Präp.). Eine Einschränkung der arraygestützten Transkriptom-

analyse ist die Verwendung von Gesamt-RNA adulter Weibchen (komplette Tiere), obwohl die Expression der Isoform gewebespezifisch unterschiedlich hoch ist (siehe Tabelle 3.5). Es konnten also nur Mod(mdg4)-64.2-Zielgene identifiziert werden, deren Expressionsunterschiede in einem bzw. mehreren Geweben so ausgeprägt ist, daß dieser Unterschied auch in Gesamt-RNA noch deutlich heraustritt. Von Experimenten mit der Isoform Mod(mdg4)-56.3 ist bekannt, daß auch die Chromatinassoziation der Mod(mdg4)-Proteine gewebs- und zellzyklusspezifisch variieren kann (Thomas *et al.*, 2005; Wagner, 2007) und demzufolge eine veränderte Expression der Zielgene in verschiedenen Geweben oder Zelltypen zu erwarten ist. Zudem sollte die Auswertung der Microarray-Experimente mit einer neueren, umfassenderen Annotation des *Drosophila*-Transkriptoms wiederholt werden, denn unter den 100 am stärksten deregulierten Target-IDs finden sich neben annotierten auch 35 von Hild *et al.* (2003) identifizierte Transkripte, deren zugehörige Gene noch nicht in die aktuelle Annotation des *Drosophila*-Genoms (Release 5, 2008) eingegangen sind. Anhand der aktuellen Annotierung können als potentielle Phänotypen, die durch den Ausfall von Mod(mdg4)-64.2 entstehen, vorausgesagt werden: eine Beeinträchtigung der Immunabwehr und der männlichen Meiose sowie Spermientwicklung, da mehrere Gene, die in diese Prozesse involviert sind, in $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ signifikant dereguliert sind (siehe Tabelle 3.13).

Ursprünglich als Kontrollen für $\Delta 13\ 85c\ V\ 1$ vorgesehen, können die Microarray-Datensätze von Rev31 und GG295 (vgl. Abb. 3.1 und 3.3, Tab. 3.13) durch Vergleich untereinander – ihre Deletionen überlappen sich um das isoformspezifische Exon von *mod(mdg4)*-55.7 – zur Identifizierung von Genen verwendet werden, die von dieser Isoform direkt oder indirekt in ihrer Expression reguliert werden.¹²⁹ Ein Vergleich beider Expressionsdatensätze erbrachte 180 Target-IDs, die in beiden Genotypen konkordant verändert waren, darunter drei Gengruppen, die aufgrund ihrer verminderten Expression vermutlich zu einer gestörten Entwicklung der Sinnesorgane und des peripheren Nervensystems, einer verminderten Glutathionsynthese und Glutathion-vermittelten Detoxifikation und die Embryonalentwicklung beeinträchtigen. Genauer, in Embryonen beider Mutanten müßte es aufgrund des Ausfalls von *mod(mdg4)*-55.7 zu Phänotypen bei Segmentierung und Organogenese kommen. Obwohl in GG295 keine homöotische Transformation zu beobachten ist, könnte der Ausfall der Isoform *mod(mdg4)*-55.7 ein Grund sein, warum die Transformation in Rev31 stärker ausgeprägt ist als in allen Revertanten mit kleineren Deletionen und viel intensiver als in JK14 (siehe Abb. 3.6).

Mit Hilfe der Affymetrix-Microarraydaten konnte ein Einblick in die Veränderungen des Transkriptoms verschiedener *mod(mdg4)*-Revertantenlinien gewonnen werden und es wurden

²⁹ Analyse der gleichen Datensätzen (Rev31 und GG295) ergab auch ca. 400 Gene, deren Expression von den Isoformen *mod(mdg4)*-52.2 und/oder -58.8 reguliert wird; siehe Anhang A2.3

Schlüsse über mögliche molekulare Ursachen von Phänotypen der entsprechenden Revertanten gezogen. Da jedoch bis zu 30% aller Microarraysondengruppen / Target-IDs wenig reproduzierbar sind (D.L. Eizirik, pers. Mitteilung) und aufgrund der komplexen Genstruktur des *mod(mdg4)*-Locus mit verschachtelten Transkriptionseinheiten und gewebeabhängiger Promotoraktivität können die Microarraydaten nur der Kandidatenidentifizierung dienen und die veränderten Transkriptmengen müssen mittels RT-qPCR (ggf. von Gewebe-RNA) überprüft werden.

Untersuchungen zum Prozeß des trans-Spleißens

Existieren in einer prä-mRNA mehrere Spleißakzeptoren, so konkurrieren diese um den Spleißdonor, wobei neben z.B. dem Vorhandensein von Spleißfaktoren auch die intrinsische Stärke der Spleißakzeptoren (*splice site strength*; Fahey und Higgins, 2007) die resultierende Konzentration der Isoform-mRNAs bestimmt. Beim *trans*-Spleißen befinden sich Spleißdonor und Spleißakzeptoren in verschiedenen prä-mRNA-Molekülen. Darum spielen sowohl die Stärke der *trans*-Spleißakzeptoren als auch deren lokale Konzentration in räumlicher Nähe zum *trans*-Spleißdonor eine Rolle für die Expressionshöhe der verschiedenen Isoformen (Dorn *et al.*, 2001). Um den Einfluß räumlicher Trennung von *trans*-Spleißdonor und -akzeptoren am *mod(mdg4)*-Locus zu untersuchen wurden definierte Chromosomenmutationen generiert, die die gemeinsamen Exons von einigen der isoformspezifischen Exons trennen: eine reziproke *T(2;3)*-Translokation und zwei Inversionen (1,4Mbp bzw. 4,9Mbp; siehe 2.1.5 und Abb. 4.2).

In allen drei erzeugten homozygoten chromosomalen Rearrangements werden weiterhin mRNAs der Isoformen gebildet, deren isoformspezifische Exons durch die Rearrangements aus der Nähe des gemeinsamen Teils wegverlagert wurden. Dies belegt, daß *mod(mdg4)* nicht auf die Integrität des Locus angewiesen ist, also die konservierte Reihenfolge der Transkriptionseinheiten und die unmittelbare räumliche Nähe der *trans*-Spleißpartner. Die Expressionshöhe der Isoformen, deren spezifische Exons infolge der Chromosomenmutationen verlagert wurden, korrelierte umgekehrt mit der Größe der Mutation (siehe Abb. 3.21): Während diese Isoformen in der 1,4Mbp-Inversion noch fast auf Wildtypniveau gebildet werden, zeigen sie in der größeren Inversion und noch stärker in der Translokation eine schwächere Expression. Im Gegenzug ist die Expression der Isoformen erhöht, deren spezifische Exons von den Rearrangements nicht verlagert wurden (siehe *mod(mdg4)*-64.2 und -53.1 in Abb. 3.21).

Die unabhängigen Transkriptionseinheiten von *mod(mdg4)* ermöglichen die Synthese von prä-mRNAs des gemeinsamen Teils (Spleißdonor) und von prä-mRNAs, die isoformspezifische Exons (Spleißakzeptoren) enthalten, auch an verschiedenen Stellen im Genom. Sobald *trans*-Spleißdonor und -akzeptor zusammentreffen, werden die prä-mRNAs zu funktionalen Isoform-mRNAs zusammengefügt. Im Falle der *T(2;3)*-Translokation bedeutet dies für die 20 distalen *mod(mdg4)*-Isoformen eine Verknüpfung durch interchromosomales *trans*-Spleißen (Abb. 4.2). In der Literatur lediglich zwei weitere Gene im Tierreich beschrieben, deren Exons von zwei verschiedenen Chromosomen codiert werden, die also auf interchromosomales *trans*-Spleißen zur Generierung reifer mRNAs angewiesen ist. Dabei handelt es sich um *ACAT1* (Li *et al.*, 1999) und um eine Isoform von *CDC2L2* (*CDC2L2* β sv13; Jehan *et al.*, 2006).

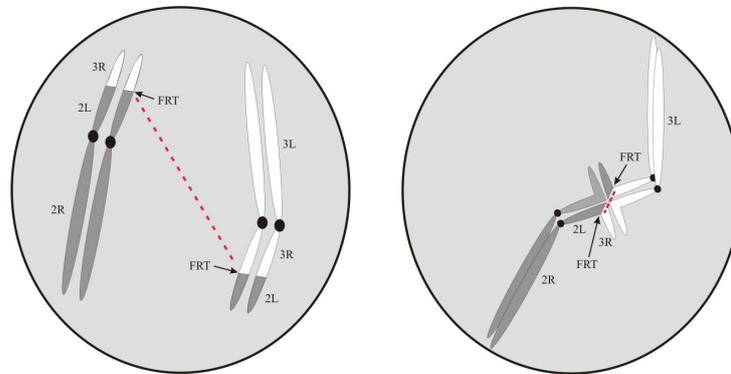


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der Chromosomen in der homozygoten (links) bzw. heterozygoten (rechts) Translokation *T(2;3)26A,mod(mdg4)*. In der homozygoten Situation können die distal codierten 20 *mod(mdg4)*-Isoformen nur durch interchromosomales *trans*-Spleißen synthetisiert werden. Die Distanz zwischen den Spleißpartnern wird durch die rote gestrichelte Linie symbolisiert. In der heterozygoten Translokation befinden sich die Teile des Locus auf den Translokationschromosomen in räumlicher Nähe zueinander. Grund hierfür ist das *somatic chromosome pairing* (Metz, 1916; Hiraoka *et al.*, 1993; Csink und Henikoff, 1998; Vazquez *et al.*, 2002).

Für die verringerte mRNA-Menge der Isoformen, deren prä-mRNAs in den Rearrangements über eine Distanz zusammengeführt werden, z.B. *mod(mdg4)*-67.2 und -51.4 (siehe Abb. 3.21), ist die einfachste Erklärung eine größere räumliche Entfernung zwischen *trans*-Spleißdonor und -akzeptor (siehe Abb. 4.2) im Vergleich zum endogenen Locus. Möglich ist zudem die Lokalisierung beider Teile des *mod(mdg4)*-Locus in verschiedenen Kompartementen des Zellkerns, was das Zusammentreffen der prä-mRNAs erschweren würde, oder eine Veränderung des epigenetischen Kontexts für den Teil des Locus, der nicht die gemeinsamen Exons enthält. Ein starker RNA Polymerase II-Promotor, wie der des gemeinsamen Teils von

mod(mdg4), kann als *chromatin barrier* wirken (Zhao und Dean, 2004) und demzufolge seine Wegverlagerung durch Inversion bzw. Translokation einen negativen Einfluß auf die Transkription der „zurückgebliebenen“ Exons haben, wenn die neue benachbarte Sequenz keinen starken Promotor enthält, transkriptionell weniger aktiv oder gar heterochromatisch ist. Dieser Chromatineffekt wiederum würde durch den künstlichen Promotor beeinflusst, den die *P*-Elementreste tragen, mit deren Hilfe die Chromosomenmutationen etabliert wurden („FRT“ in Abb. 4.2; vgl. auch Abb. 2.2B die Struktur der Elemente und Abb. 3.21 für den Beleg der Promotoraktivität des Elementrests auf benachbart codierte Isoformen). Möglich ist außerdem auch eine Beeinflussung des Chromatins durch die veränderte Expression der *Mod(mdg4)*-Isoformen, die selbst Chromatinproteine sind (Immunfluoreszenzsignale an Polytänchromosomen für den Großteil der untersuchten Isoformen, M. Gabler, pers. Mitteilung; *Mod(mdg4)-67.2*: Bestandteil eines *chromatin insulators*; Gerasimova *et al.*, 1995).

Nicht nur die mittels RT-PCR meßbare Expression sondern auch die physiologisch wirksame Konzentration, d.h. die bekannten Funktionen der Isoformen, deren codierende Exons beidseitig des Bruchpunktes liegen, bleibt in den homozygoten Rearrangements erhalten: Für die Isoform *mod(mdg4)-67.2* in vollem Umfang und für die Isoform *mod(mdg4)-56.3* zum Teil (Volkmar *et al.*, in Präp.; Gabler, pers. Mitteilung).

Trotz verringerter Menge *Mod(mdg4)-67.2* in der homozygoten Translokation (RT-PCR siehe Abb. 3.21; Western Blot, M. Gabler, pers. Mitteilung) ist ihre Funktion auf die *gypsy*-Retrotransposon-induzierten Mutationen *ct⁶* und *y²* (Georgiev und Gerasimova, 1989; Gerasimova *et al.*, 1995) nicht unterscheidbar vom Wildtyp (Volkmar *et al.*, in Präp.). Die Funktion von *mod(mdg4)-56.3*, die eine essentielle Rolle bei der Paarung homologer Chromosomen vor der ersten meiotischen Teilung in *Drosophila melanogaster*-Männchen (Thomas *et al.*, 2006) spielt, wird hingegen von den chromosomalen Rearrangements meßbar beeinträchtigt: In homozygoten Tieren kommt es zu erhöhter *nondisjunction* (NDJ) von Geschlechtschromosomen (siehe Tab. 3.20). Dabei ist auffällig, daß von der homozygoten 1,4Mbp-Inversion zur 4,9Mbp-Inversion zur *T(2;3)*-Translokation auch die NDJ-Rate steigt, die heterozygoten Situationen aber Wildtyp-NDJ-Raten aufweisen. Wahrscheinlich werden hier beide Teile des *mod(mdg4)*-Locus vom nichtmutierten Chromosom zueinander in räumliche Nähe gebracht (siehe Abb. 4.2, vgl. Abb. 3.20, Translokationskreuz) durch sogenannte „somatische“ Chromosomenpaarung, die von Vazquez *et al.* (2002) auch in Spermatozoonen beobachtet wurde.

Durch die Nähe der Transkriptionseinheiten des gemeinsamen Teils und der spezifischen Exons 5-6 von *mod(mdg4)-56.3* steigt die lokale Konzentration beider prä-mRNAs und folglich die Expression von *mod(mdg4)-56.3* bis auf ein Niveau, das phänotypisch nicht vom

Wildtyplevel unterschieden werden kann. Der gleiche Mechanismus gilt für die transheterozygoten Konstellationen mit einer Mutation des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-56.3 (Z3-5578), da es sich dabei nur um eine Punktmutation (W449→Stop) handelt, der chromosomale Kontext aber unverändert ist. In diesem Fall befinden sich zwei intakte Transkriptionseinheiten für den gemeinsamen Teil von *mod(mdg4)* und ein nicht mutiertes spezifisches Exon (auf einem der Translokationschromosomen) in räumlicher Nähe, sodaß ausreichend reife mRNA von *mod(mdg4)*-56.3 gebildet werden kann, damit kein NDJ-Phänotyp ausgeprägt wird. Die Expressionshöhe der Isoform als Ursache der *nondisjunction* wird durch die partielle Rettung des Phänotyps mittels induzierter Expression transgencodierter *mod(mdg4)*-56.3-cDNA ebenfalls bestätigt (siehe Tab. 3.20).

Ein möglicher Einfluß von *meiotic drive* auf die Ergebnisse der analysierten Kreuzungen läßt sich ausschließen: Zum einen befindet sich die *nondisjunction*-hervorrufende Mutation auf dem dritten Chromosom, während experimentell die Verteilung der Geschlechtschromosomen untersucht wurde, der Effekt wäre also zumindest indirekt (untersuchtes Autosom bei Thomas *et al.* (2006) war Chromosom 2). Zum anderen wäre bei *meiotic drive* zu Ungunsten des YB^S -Chromosoms, also einer negativen Selektion, die Anzahl auftretender X0-Männchen erhöht, während gleichzeitig XXY-Weibchen ($XXYB^S$) unterrepräsentiert wären. Die *nondisjunction*-Raten beider Geschlechter aus einer Kreuzung, also X0:XY bei Männchen und XXY:XX bei Weibchen, wichen jedoch nie mehr als 5% voneinander ab (einzige Ausnahme Z3-5578/*Df(3R)GC14* allerdings umfaßt *Df(3R)GC14* mindestens 13 Gene; siehe Tab. 2.1).

Um den Einfluß der räumlichen Trennung von Donor und Akzeptoren des *trans*-Spleißens in *mod(mdg4)* zu untersuchen, sind die drei etablierten chromosomalen Rearrangements nicht ausreichend. Da die Etablierung der Rearrangements relativ aufwendig ist, wurden für eine umfangreichere Analyse 19 transgene Linien von $P\{w^+ Dme \textit{mod(mdg4)}^{\text{common region}}\}$ etabliert (codiert gemeinsame *mod(mdg4)*-Exons). Abhängig von der Position des Transgens war die Komplementation der rezessiv letalen *loss of function*-Mutation *mod(mdg4)*⁰² im gemeinsamen Teil des endogenen Locus unterschiedlich hoch (siehe Tab. 3.17). Nur drittschromosomale Transgene konnten die rezessive Letalität partiell (5-69%) oder vollständig komplementieren, und nur bei vollständiger Komplementation der rezessiven Letalität wurde auch die weibliche Sterilität teilweise komplementiert. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, daß die verschiedenen Funktionen des Locus, also dessen Isoformen, verschieden sensitiv gegenüber Änderungen der Expressionshöhe sind (siehe oben, *Mod(mdg4)*-67.2- und -56.3).

In vivo-Testsystem für *trans*-Spleißen

Im Rahmen der Arbeit sollte ein System zur *in vivo*-Analyse des *trans*-Spleißens entwickelt werden. Zunächst wurde EGFP als Reporter gewählt (siehe Abb. 3.19) und es konnte gezeigt werden, daß die verwendeten *mod(mdg4)*-Outron-Sequenzen ausreichend sind, um transgencodierte EGFP-prä-mRNAs mit endogenen *mod(mdg4)*-prä-mRNAs durch *trans*-Spleißens verbinden zu können. Auch intakte EGFP-mRNA mit korrekter ORF-Sequenz entsteht und konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden – der *proof of principle* war damit erfolgreich. Die synthetisierte EGFP-Proteinmenge war jedoch nicht ausreichend, um ein fluoreszenzbasiertes Testsystem zu etablieren.

Ein anderes Testsystem zur *in vivo*-Analyse des *trans*-Spleißprozesses ergibt sich aus der Funktion der Isoform *mod(mdg4)*-56.3 im Hintergrund der homozygoten Translokation *T(2;3)26A,mod(mdg4)*. Die herabgesetzte Expression der Isoform führt zu *nondisjunction* (NDJ; Thomas *et al.*, 2006) deren Rate durch Verfolgung eines dominant markierten Y-Chromosoms (YB^S) analysiert werden kann (*T(2;3)26A,mod(mdg4)* $\approx 30\%$; siehe Tab. 3.20). Mit Hilfe dieses Testsystems wurde nach Effektoren des *trans*-Spleißens gesucht. Dazu wurden Männchen mit YB^S -Chromosom, heterozygoter Spleißfaktormutation und homozygoter *T(2;3)*-Translokation erzeugt ($\sigma YB^S; T(2;3)26A,mod(mdg4) / T(2;3)26A,mod(mdg4)$ Spleißfaktormut.), in denen die NDJ-Rate bestimmt wurde. Die rezessiv letale Natur der getesteten Spleißfaktormutationen erlaubte dabei lediglich die Suche nach dominanten Einflüssen auf das *trans*-Spleißens (z.B. Haploinsuffizienz).

heph, ein Polypyrimidintraktbindeprotein (Dansereau *et al.*, 2002), und *CG10689*, eine RNA-Helicase, wurden als erste Effektoren des *trans*-Spleißens überhaupt identifiziert (siehe Tabelle 3.21). Da die Einbringung heterozygoter Mutationen dieser Gene eine Erhöhung der NDJ-Rate zur Folge hatte, sollten deren Produkte essentiell für den *trans*-Spleißprozeß sein oder zumindest einen positiven Einfluß darauf haben. Eine Charakterisierung der Gene war im Rahmen der Arbeit nicht möglich, könnte aber z.B. durch Detektion der Proteine in Spliceosomen mittels goldgekoppelter Antikörper und Elektronenmikroskopie (Azubel *et al.*, 2004) oder eine Präparation *mod(mdg4)*-prä-mRNA-haltiger Spliceosomen und anschließende Coimmunopräzipitation (Azubel *et al.*, 2006, Sperling *et al.*, 1985) erfolgen.

Mit der *nondisjunction*-Analyse im Hintergrund der homozygoten Translokation *T(2;3)26A,mod(mdg4)* wurde ein einfach anzuwendendes genetisches Testsystem etabliert, mit dessen Hilfe Effektoren des *trans*-Spleißprozesses identifiziert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden rezessiv letale Allele von Spleißfaktoren untersucht, mit dem System können aber auch homozygote Mutationen untersucht werden, solange letale Wechselwirkungen mit der homozygoten *T(2;3)26A,mod(mdg4)* oder mit YB^S (*T(1;Y)*-Translokation, siehe Tab. 2.2; Brosseau und Lindsley, 1958; Brosseau *et al.*, 1961) bestehen.

Evolutionäre Konservierung des mod(mdg4)-Locus und des trans-Spleißens

Unter den *Drosophila*-Arten, deren Genom bisher sequenziert wurde, weisen *Drosophila melanogaster* und *D. virilis* die größte genetische Distanz auf (Drosophila 12 Genomes Consortium, Clark *et al.*, 2007: Figure 1). Ihr letzter gemeinsamer Vorfahre lebte vor rund 62 Millionen Jahren (Beverley und Wilson, 1984). Die *mod(mdg4)*-Loci beider Spezies eignen sich also aufgrund ihrer genetischen Distanz sehr gut, um die funktionelle Konservierung des Locus innerhalb der Gattung *Drosophila* zu untersuchen.

Ein durch eine erfolgreiche 5'RACE ermöglichter Vergleich des nicht translatierten *mod(mdg4)*-Exons 1 beider Spezies ergab eine relativ geringe Übereinstimmung (siehe Abb. 3.16), was die Ergebnisse von Krauss und Dorn (2004) bestätigt, wonach innerhalb des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)* auf DNA- wie Proteinebene lediglich die BTB-Domäne hoch konserviert ist. Die vergleichende, artübergreifende Phylogenieanalyse der FLYWCH-Domänen aus den isoformspezifischen C-Termini (siehe Anhang 2 Abb. A5) von *D. melanogaster*, *D. virilis* und *D. pseudoobscura* bestätigt einige Ergebnisse einer früheren Analyse von Dorn und Krauss (2003), z.B. die Mod(mdg4)-59.0 und -54.7-Dichotomie. Andere, wie die (dort auch nur schwach unterstützte) Verwandtschaft der FLYWCH-Sequenzen von *C. elegans* Peb-1 mit Mod(mdg4)-52.0 und -55.3 wurden mit hoher statistischer Unterstützung widerlegt. Das generelle Aussehen des Phylogramms („Schneeflocken-Struktur“, U. Volkmar und V. Knoop, pers. Mitteilung) ist ein Indiz für ein hohes Alter des Locus und eine lange, getrennte Evolution seiner Isoformen. Das Fehlen gemeinsamer Sequenzabschnitte zwischen mehreren Isoformen (was zu einer Gruppierung im Baum führen würde) legt zudem nahe, daß die einzelnen Isoformen wahrscheinlich innerhalb kurzer Zeit entstanden sind. Bei einem Vergleich der homologen Sequenzen der verschiedenen untersuchten Spezies zeigt sich, daß die Mod(mdg4)-Isoformen höchstwahrscheinlich schon im gemeinsamen Vorfahren von *Drosophila* und *Anopheles* existiert haben (Ordnung der Diptera) und der Locus wahrscheinlich noch älter ist (Astlängen in den *shortest trees* (nicht gezeigt), Einordnung der *Bombyx mori*-Sequenz (Lepidoptera) in den Baum). Innerhalb der Gattung *Drosophila* kann anhand einiger Isoformen die geringere evolutionäre Distanz von *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* im Vergleich zur Distanz zwischen *D. melanogaster* und *D. virilis* nachvollzogen werden, andere zeigen eine Trichotomie (z.B. Mod(mdg4)-64.2 und -55.8).

Neben der phylogenetischen wurde die funktionelle Konservierung des Locus in *D. melanogaster* und *D. virilis* untersucht. Durch *trans*-Spleißen zwischen transgencodierten

und endogenen *mod(mdg4)*-prä-mRNAs werden chimäre mRNAs gebildet. Eine solche chimäre mRNA mit den gemeinsamen Exons von *D. virilis* und dem endogen codierten isoformspezifischen Exon von (*D. melanogaster*-)*mod(mdg4)*-64.2 konnte in drei unabhängigen Experimenten nachgewiesen und quantifiziert werden – je nach Transgen betrug die Konzentration der *Dvi/Dme-mod(mdg4)*-64.2-mRNA bis zu 2,5% im Vergleich mit der entsprechenden endogenen Isoform-mRNA (siehe Tabelle 3.15; Gabler *et al.*, 2005). Die Fähigkeit von *mod(mdg4)*-prä-mRNAs beider Spezies, miteinander *in trans* zu spleißen ist auch unter dem Aspekt interessant, daß einerseits dieser Prozeß trotz der Aufspaltung beider Arten vor langer Zeit noch möglich ist, andererseits aber keine mRNA-Chimären zwischen *mod(mdg4)* und *lola* experimentell nachgewiesen werden konnten (nicht gezeigt) bzw. in Sequenzdatenbanken gefunden wurden. Bei *lola* handelt es sich um einen Locus im *Drosophila*-Genom mit zu *mod(mdg4)* ähnlicher Struktur, dessen Isoform-mRNAs auch mittels *trans*-Spleißen generiert werden (Goeke *et al.*, 2003; Horiuchi *et al.*, 2003). Ein gezielter Abbau (*nonsense-mediated decay*) solcher *mod(mdg4)*-*lola*-mRNA-Chimären ist wahrscheinlich nicht der Grund für ihre Nicht-Nachweisbarkeit, da sich in beiden Fällen die *trans*-Spleißposition innerhalb eines Codons hinter der zweiten Base befindet, der Leserahmen also nicht gestört wird. Es muß also eine Unkompatibilität zwischen den prä-mRNAs beider Loci bestehen oder ein effizienter Kontrollmechanismus diese Art von *trans*-Spleißen unterbinden.

Die Konservierung von *mod(mdg4)* zwischen *D. melanogaster* und *D. virilis* beschränkt sich nicht nur auf die Fähigkeit zum *trans*-Spleißen. Darüber hinaus wurde auch die Funktion des gemeinsamen N-Terminus der Mod(mdg4)-Proteine erhalten. So sind *D. virilis*-Transgene in der Lage, die rezessiv letalen Mutationen *mod(mdg4)^{neo129}* und *mod(mdg4)⁰²* zu komplementieren (siehe Tab. 3.16). Hier zeigen sich, wie für *Dme-mod(mdg4)*-Transgene (siehe oben) beschrieben, Unterschiede der Komplementation je nach Insertionsort des Transgens im Genom (Gabler *et al.*, 2005; siehe Tabelle 3.14). Die Komplementation rezessiv letaler Allele des gemeinsamen Teils ist dabei bei allen getesteten Transgenen so ausgeprägt, daß keine Phänotypen wie z.B. homöotische Transformation oder Semisterilität beobachtet wurden – mehrere Linien, die ausschließlich chimäre *Dvi*(gem. Teil)-*Dme*-Mod(mdg4)-Proteine bilden, wurden für >20 Generationen erhalten. Dies spricht für eine vollständige funktionelle Konservierung des gemeinsamen Teils in allen Funktionen, nicht nur was die Aufgabe der BTB-Domäne betrifft (Dimerisierung (Read *et al.*, 2000; Mazur *et al.*, 2005), sondern z.B. auch mögliche Interaktoren wie Chip (Morcillo *et al.*, 1997), die für die Funktion von Mod(mdg4)-Proteinen notwendig sind.

5. Zusammenfassung

Gegenstand der Experimente, die in der vorliegenden Arbeit dokumentiert wurden, ist der komplexe Locus *modifier of mdg4* in *Drosophila melanogaster*, dessen Isoformen durch den Prozeß des *trans*-Spleißens zwischen vier, in jeder *mod(mdg4)*-mRNA enthaltenen, gemeinsamen Exons und 31 verschiedenen isoformspezifischen Exons 5 (bzw. 5 und 6) gebildet werden.

Ziele der Arbeit waren die funktionelle Analyse des Locus, im Speziellen die Identifikation intragenischer Promotoren, die funktionelle Analyse der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 durch Generierung eines *Knock out* und die Etablierung eines Testsystems zur *in vivo*-Analyse des *trans*-Spleißprozesses.

Mittels Mutationen im spezifischen Teil des Locus und *mod(mdg4)*-Transgenen aus der verwandten Art *Drosophila virilis* konnte nachgewiesen werden, daß alle isoformspezifischen Exons von intragenischen Promotoren ausgehend transkribiert werden und daß alle Isoformen, die von *mod(mdg4)* synthetisiert werden, durch *trans*-Spleißen gebildet werden. Mit Hilfe der Revertanten und der *D. virilis*-Transgene konnten wahrscheinlich alle intragenischen Promotoren in *mod(mdg4)* identifiziert werden.

Die generierten Mutationen im spezifischen Teil des *mod(mdg4)*-Locus ermöglichten zudem funktionelle Analysen, die mit den bisher verfügbaren Mutanten (im gemeinsamen Teil des Locus) aufgrund deren rezessiver Letalität nicht möglich war. Die beobachteten, neuen Phänotypen konnten dem Ausfall bestimmter Isoformen oder Isoformgruppen des Locus zugeordnet werden. Bekannte Phänotypen von Mutationen des gemeinsamen Teils konnten ebenfalls auf den Ausfall weniger (im günstigsten Fall zweier) *mod(mdg4)*-Isoformen eingegrenzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Arbeit war die Untersuchung der Isoform *mod(mdg4)*-64.2. Neben Daten zur Regulation – das isoformspezifische Exon wird von einem separaten Promotor aus transkribiert und die Effizienz der *trans*-Spleißakzeptor-Site am 5'Ende durch einen *trans*-Spleiß-Enhancer (ESE) erhöht – konnten Einblicke in die Funktion der Isoform gewonnen werden. *Mod(mdg4)*-64.2 ist mit dem *HeT-A*-Retrotransposon assoziiert und beeinflußt dessen Transkription negativ. Ein *Knock out* der Isoform durch gerichtete Deletion des isoformspezifischen Exons mittels „*Ends-in gene targeting*“ zeigte, daß *mod(mdg4)*-64.2 neben *HeT-A* auch die Transkription anderer Retrotransposons beeinflußt. Durch einen Vergleich des Transkriptomts der *Knock out*-Mutation mit dem Referenzstamm w^{1118}_{iso} auf einem Microarray konnten Gene identifiziert werden, deren Expression durch den Ausfall von

mod(mdg4)-64.2 verändert wird. Zu klären bleibt, ob es sich dabei um direkte oder indirekte Zielgene der Isoform handelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten eine reziproke $T(2;3)$ -Translokation und zwei Inversionen erzeugt werden, deren einer Bruchpunkt sich im spezifischen Teil des *mod(mdg4)*-Locus befindet. An diesen chromosomalen Rearrangements konnte gezeigt werden, daß *mod(mdg4)* nicht der räumlichen Nähe seiner codierenden Sequenzen bedarf, sondern Isoformen auch über eine Distanz innerhalb des Zellkerns noch effektiv bilden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, daß *mod(mdg4)*-Outronsequenzen hinreichend sind, den Prozess des *trans*-Spleißens zu ermöglichen.

Der *nondisjunction*-Phänotyp, hervorgerufen durch verminderte Expression von *mod(mdg4)*-56.3 in der homozygoten $T(2;3)$ -Translokation, wurde als Testsystem zur Identifikation von Effektoren des *trans*-Spleißens verwendet. Mit der RNA-Helicase *CG10689* und dem Polypyrimidintraktbindeprotein *heph* konnten zwei potentielle, positive Effektoren des Prozesses identifiziert werden.

Außerdem konnte die funktionelle Konservierung des Locus zwischen den Arten *Drosophila melanogaster* und *D. virilis* und das Auftreten chimärer mRNAs nachgewiesen werden. Ohne signifikante Einbußen in Vitalität oder Fertilität konnte der gemeinsame Teil des endogenen Locus durch den transgencodierten gemeinsamen Teil des *D. virilis-mod(mdg4)*-Locus komplementiert werden. Dies gelang auch, wenn sich das Transgen auf dem zweiten Chromosom befand und die reifen *mod(mdg4)*-mRNAs durch interchromosomales *trans*-Spleißens gebildet wurden.

6. Literaturliste

- Abad, J. P., and Villasante, A. (1999). The 3' non-coding region of the *Drosophila melanogaster* HeT-A telomeric retrotransposon contains sequences with propensity to form G-quadruplex DNA. *FEBS Lett* 453, 59-62.
- Abad, J. P., De Pablos, B., Osoegawa, K., De Jong, P. J., Martin-Gallardo, A., and Villasante, A. (2004a). Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of HeT-A and TART elements at telomeres. *Mol Biol Evol* 21, 1613-1619.
- Abad, J. P., De Pablos, B., Osoegawa, K., De Jong, P. J., Martin-Gallardo, A., and Villasante, A. (2004b). TAHRE, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Mol Biol Evol* 21, 1620-1624.
- Abhiman, S., Iyer, L. M., and Aravind, L. (2008). BEN: a novel domain in chromatin factors and DNA viral proteins. *Bioinformatics* 24, 458-461.
- Ahmad, K. F., Engel, C. K., and Prive, G. G. (1998). Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12123-12128.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
- Arbeitman, M. N., Furlong, E. M., Imam, F., Johnson, E., Null, B. H., Baker, B. S., Krasnow, M. A., Scott, M. P., Davis, R. W., and White, K.P. (2002). Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science* 297, 2270-2275
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila. A laboratory handbook*. (Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Ast, G. (2004). How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet* 5, 773-82.
- Azubel, M., Wolf, S. G., Sperling, J., and Sperling, R. (2004). Three-dimensional structure of the native spliceosome by cryo-electron microscopy. *Mol Cell* 15, 833-839.
- Azubel, M., Habib, N., Sperling, R., and Sperling, J. (2006). Native spliceosomes assemble with pre-mRNA to form supraspliceosomes. *J Mol Biol* 356, 955-966.
- Babu, M. M., Iyer, L. M., Balaji, S., and Aravind, L. (2006). The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic Acids Res* 34, 6505-6520.
- Balschun, T. (2006). Isolierung und Charakterisierung von Mutationen des komplexen Genlokus *mod(mdg4)* von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik
- Bardwell, V. J., and Treisman, R. (1994). The poz domain: A conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* 8, 1664-1677.

- Bateson, W., and Saunders, E. (1902). Experiments in the physiology of heredity. *Rep Evol Comm R Soc* 1:1-160
- Beaster-Jones, L., and Okkema, P. G. (2004). DNA binding and in vivo function of *C. elegans* PEB-1 require a conserved FLYWCH motif. *J Mol Biol* 339, 695-706.
- Beverley, S. M., and Wilson, A. C. (1984). Molecular evolution in *Drosophila* and the higher Diptera II. A time scale for fly evolution. *J Mol Evol* 21, 1-13.
- Biessmann, H. (1985). Molecular analysis of the yellow gene (*y*) region of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7369-7373.
- Biessmann, H., and Green, M. M. (1986). Molecular analysis of insertional mutations in the yellow gene region of *Drosophila*. *J Mol Biol* 191, 573-576.
- Biessmann, H., Mason, J. M., Ferry, K., d'Hulst, M., Valgeirsdottir, K., Traverse, K. L., and Pardue, M. L. (1990a). Addition of telomere-associated HeT DNA sequences "heals" broken chromosome ends in *Drosophila*. *Cell* 61, 663-673.
- Biessmann, H., Carter, S. B., and Mason, J. M. (1990b). Chromosome ends in *Drosophila* without telomeric DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1758-1761.
- Biessmann, H., Champion, L. E., O'Hair, M., Ikenaga, K., Kasravi, B., and Mason, J. M. (1992). Frequent transpositions of *Drosophila melanogaster* HeT-A transposable elements to receding chromosome ends. *Embo J* 11, 4459-4469.
- Biessmann, H., Prasad, S., Semeshin, V. F., Andreyeva, E. N., Nguyen, Q., Walter, M. F., and Mason, J. M. (2005). Two distinct domains in *Drosophila melanogaster* telomeres. *Genetics* 171, 1767-1777.
- Biessmann, H., Prasad, S., Walter, M. F., and Mason, J. M. (2006). Euchromatic and heterochromatic domains at *Drosophila* telomeres. *Biochem Cell Biol* 83, 477-485.
- Blumenthal, T. (2005). Trans-splicing and operons. *WormBook*, 1-9.
- Brandstädter, J., Rossbach, C., and Theres, K. (1994). The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta* 192, 69-74.
- Brosseau, G.E., and Lindsley, D.L. (1958). A dominantly marked Y chromosome: YB^S. *D. I. S.* 32, 116.
- Brosseau, G. E., Nicoletti, B., Grell, E. H., AND Lindsley, D. L. (1961). Production of Altered Y Chromosomes Bearing Specific Sections of the X Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 46, 339-346.
- Brückner, S. (2007). Zytologische Analyse am komplexen Locus *mod(mdg4)* bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik
- Brunmeir, R., Lagger, S., Simboeck, E., Sawicka, A., Egger, G., Hagelkruys, A., Zhang, Y., Matthias, P., Miller, W. J., and Seiser, C. (2010). Epigenetic Regulation of a Murine Retrotransposon by a Dual Histone Modification Mark. *PLoS Genet* 6, e?
- Büchner, K., Roth, P., Schotta, G., Krauss, V., Saumweber, H., Reuter, G., and Dorn, R. (2000). Genetic and molecular complexity of the position effect variegation modifier *mod(mdg4)* in *Drosophila*. *Genetics* 155, 141-157.

- Capelson, M., and Corces, V. G. (2005). The ubiquitin ligase dTopors directs the nuclear organization of a chromatin insulator. *Mol Cell* 20, 105-116.
- Casacuberta, E., and Pardue, M. L. (2003). HeT-A elements in *Drosophila virilis*: retrotransposon telomeres are conserved across the *Drosophila* genus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14091-14096.
- Caudevilla, C., Codony, C., Serra, D., Plasencia, G., Roman, R., Graessmann, A., Asins, G., Bach-Elias, M., and Hegardt, F. G. (2001). Localization of an exonic splicing enhancer responsible for mammalian natural trans-splicing. *Nucleic Acids Res* 29, 3108-3115.
- Chandler, and Fayet, (1993). Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Mol Microbiol.* 7, 497-503.
- Chang, J.H., and Taylor, J. (2002). In vivo RNA-directed transcription, with template switching, by a mammalian RNA polymerase. *Embo J* 21, 157-164.
- Chetverina, D., Savitskaya, E., Maksimenko, O., Melnikova, L., Zaytseva, O., Parshikov, A., Galkin, A. V., and Georgiev, P. (2007). Red flag on the white reporter: a versatile insulator abuts the white gene in *Drosophila* and is omnipresent in mini-white constructs. *Nucleic Acids Res.*
- Chintapalli, V. R., Wang, J., and Dow, J. A. T. (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila* models of human disease. *Nature Genetics* 39, 715-720
- Clark, D. J., and Shen, C. H. (2006) Mapping histone modifications by nucleosome immunoprecipitation. *Methods Enzymol.* 410, 416-30.
- Costello, J. C., Dalkilic, M. M., and Andrews, J. R. (2008). Microarray Normalization Protocols. FlyBase ID: FBrf0202545 (2008.1.21). Personal communication to FlyBase
- Csink, A.K., and Henikoff, S. (1998). Large-scale chromosomal movements during interphase progression in *Drosophila*. *J Cell Biol* 143, 13-22.
- Cvejic, S., Zhu, Z., Felice, S. J., Berman, Y., and Huang, X. Y. (2004). The endogenous ligand Stunted of the GPCR Methuselah extends lifespan in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 6, 540-546.
- Dansereau, D. A., Lunke, M. D., Finkielsztain, A., Russell, M. A., and Brook, W. J. (2002). Hephaestus encodes a polypyrimidine tract binding protein that regulates Notch signalling during wing development in *Drosophila melanogaster*. *Development* 129, 5553-5566.
- Dixon, R. J., Eperon, I. C., Hall, L., and Samani, N. J. (2005). A genome-wide survey demonstrates widespread non-linear mRNA in expressed sequences from multiple species. *Nucleic Acids Res* 33, 5904-5913.
- Dixon, R. J., Eperon, I. C., and Samani, N. J. (2007). Complementary intron sequence motifs associated with human exon repetition: a role for intragenic, inter-transcript interactions in gene expression. *Bioinformatics* 23, 150-155.
- Dörfel, A. (2007). Isolation und funktionelle Charakterisierung von Mutanten für den komplexen Locus „modifier of *mdg4*“ in *Drosophila*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik

- Dorn, R., Heymann, S., Lindigkeit, R., and Reuter, G. (1986) Suppressor mutation of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* affecting chromatin properties. *Chromosoma* *93*, 398-403
- Dorn, R., Szidonya, J., Korge, G., Sehnert, M., Taubert, H., Archoukieh, E., Tschiersch, B., Morawietz, H., Wustmann, G., Hoffmann, G., and et al. (1993a). P transposon-induced dominant enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *133*, 279-290.
- Dorn, R., Krauss, V., Reuter, G., and Saumweber, H. (1993b). The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, E(var)3-93D, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 11376-11380.
- Dorn, R., Reuter, G., and Loewendorf, A. (2001). Transgene analysis proves mRNA trans-splicing at the complex mod(mdg4) locus in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 9724-9729.
- Dorn, R., and Krauss, V. (2003). The modifier of mdg4 locus in *Drosophila*: functional complexity is resolved by trans splicing. *Genetica* *117*, 165-177.
- Drosophila 12 Genomes Consortium, Clark, A. G., Eisen, M. B., Smith, D. R., Bergman, C. M., Oliver, B., Markow, T. A., Kaufman, T. C., Kellis, M., Gelbart, W., Iyer, V. N. *et al.* (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*. *450*, 203-218.
- Duffy, J. B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* *34*, 1-15.
- Engels, W. R., Johnson-Schlitz, D. M., Eggleston, W. B., and Sved, J. (1990). High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell* *62*, 515-525.
- Espinás ML, Jiménez-García E, Vaquero A, Canudas S, Bernués J, Azorín F. (1999) The N-terminal POZ domain of GAGA mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity. *J Biol Chem* *274*, 16461-9.
- Fahey, M.E. and Higgins, D.G. (2007) Gene expression, intron density, and splice site strength in *Drosophila* and *Caenorhabditis*. *J Mol Evol* *65*, 349-357.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* *132*, 6-13.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* *137*, 266-267.
- Finta, C., and Zaphiropoulos, P. G. (2002). Intergenic mRNA molecules resulting from trans-splicing. *J Biol Chem* *277*, 5882-5890.
- Fischer, S. E. J., Butler, M. D., Pan, Q., and Ruvkun, G. (2008) Trans-splicing in *C. elegans* generates the negative RNAi regulator ERI-6/7 *Nature*. doi:10.1038/nature07274
- Flouriot, G., Brand, H., Seraphin, B., and Gannon, F. (2002). Natural trans-spliced mRNAs are generated from the human estrogen receptor-alpha (hER alpha) gene. *J Biol Chem* *277*, 26244-26251.

- Frydrychova, R. C., Biessmann, H., Konev, A. Y., Golubovsky, M. D., Johnson, J., Archer, T. K., and Mason, J. M. (2007). Transcriptional activity of the telomeric retrotransposon HeT-A in *Drosophila melanogaster* is stimulated as a consequence of subterminal deficiencies at homologous and nonhomologous telomeres. *Mol Cell Biol* 27, 4991-5001.
- Furuyama, S., and Bruzik, J. P. (2002). Multiple roles for SR proteins in trans splicing. *Mol Cell Biol* 22, 5337-5346.
- Gabler, M. (2003). Immunzytologische Analyse von Mod(mdg4) Protein-Isoformen bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik
- Gabler, M., Volkmar, M., Weinlich, S., Herbst, A., Dobberthien, P., Sklarss, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Kress, H., Reuter, G., and Dorn, R. (2005). Trans-splicing of the mod(mdg4) complex locus is conserved between the distantly related species *Drosophila melanogaster* and *D. virilis*. *Genetics* 169, 723-736.
- Gause, M., Morcillo, P., and Dorsett, D. (2001). Insulation of enhancer-promoter communication by a gypsy transposon insert in the *Drosophila cut* gene: cooperation between suppressor of hairy-wing and modifier of mdg4 proteins. *Mol Cell Biol* 21, 4807-4817.
- George, J. A., DeBaryshe, P. G., Traverse, K. L., Celniker, S. E., and Pardue, M. L. (2006). Genomic organization of the *Drosophila* telomere retrotransposable elements. *Genome Res* 16, 1231-1240.
- Georgiev, P. G., and Gerasimova, T. I. (1989). Novel genes influencing the expression of the yellow locus and mdg4 (gypsy) in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 220, 121-126.
- Georgiev, P. G., and Corces, V. G. (1995). The su(Hw) protein bound to gypsy sequences in one chromosome can repress enhancer-promoter interactions in the paired gene located in the other homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5184-5188.
- Georgiev, P., Golovnin, A., Melnikova, L., Krivega, I., Kostuchenko, M., and Volkov, I. (2008). Nuclwoskeletal proteins EAST and CP60 modulate activity of the gypsy insulator in *Drosophila melanogaster*. Abstract A. Dros. Conf. 49: 269B (FBrf0203648)
- Gerasimova, T. I., Gdula, D. A., Gerasimov, D. V., Simonova, O., and Corces, V. G. (1995). A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect variegation. *Cell* 82, 587-597.
- Gerasimova, T. I., and Corces, V. G. (1998). Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell* 92, 511-521.
- Gerasimova, T. I., Lei, E. P., Bushey, A. M., and Corces, V. G. (2007). Coordinated control of dCTCF and gypsy chromatin insulators in *Drosophila*. *Mol Cell* 28, 761-772.
- Gesteland, R. F., Cech, T. R. and Atkins, J. F. (1999). *The RNA World*. (Cold Spring Harbor, New York, CSHL Press).
- Geyer, P.K., Spana, C., and Corces, V.G. (1986). On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the yellow locus of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 10, 2657-62.

- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M.D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E.L., Zapp, M.L., Weng, Z., *et al.* (2008). Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* 320, 1077-1081.
- Gloor, G. B., Nassif, N. A., Johnson-Schlitz, D. M., Preston, C. R., and Engels, W. R. (1991). Targeted gene replacement in *Drosophila* via P element-induced gap repair. *Science* 253, 1110-1117.
- Goeke, S., Greene, E. A., Grant, P. K., Gates, M. A., Crowner, D., Aigaki, T., and Giniger, E. (2003). Alternative splicing of *lola* generates 19 transcription factors controlling axon guidance in *Drosophila*. *Nat Neurosci* 6, 917-924.
- Golic, K. G., and Golic, M. M. (1996). Engineering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics* 144, 1693-1711.
- Golubovskiy, M. D., Konev, A. Y., Walter, M. F., Biessmann, H., and Mason, J. M. (2001). Terminal retrotransposons activate a subtelomeric white transgene at the 2L telomere in *Drosophila*. *Genetics* 158, 1111-1123.
- Gorczyca, M., Popova, E., Jia, X. X., and Budnik, V. (1999). The gene *mod(mdg4)* affects synapse specificity and structure in *Drosophila*. *J Neurobiol* 39, 447-460.
- Gräßler, J. Programm "Microarrayanalyse" v0.9 und v1.0
- Graveley, B. R., Hertel, K. J., and Maniatis, T. (1998). A systematic analysis of the factors that determine the strength of pre-mRNA splicing enhancers. *Embo J* 17, 6747-6756.
- Hadorn, E. (1955) Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung. Thieme-Verlag, Stuttgart (Original der englischsprachigen Veröffentlichung von 1961).
- Hall, J. C., Siegel, R. W., Tompkins, L., and Kyriacou, CP. (1980). Neurogenetics of courtship in *Drosophila*. *Stadler Genet. Symp.* 12, 43-82.
- Herbert, K. M., La Porta, A., Wong, B. J., Mooney, R. A., Neuman, K. C., Landick, R., and Block, S. M. (2006). Sequence-resolved detection of pausing by single RNA polymerase molecules. *Cell* 125, 1083-1094.
- Hild, M., Beckmann, B., Haas, S., Koch, B., Solovyev, V., Busold, C., Fellenberg, K., Boutros, M., Vingron, M., Sauer, F., *et al.* (2003) An integrated gene annotation and transcriptional profiling approach towards the full gene content of the *Drosophila* genome. *Genome Biol.* 5, R3.
- von Hippel, P. H. (2006). Transcriptional pausing caught in the act. *Cell* 125, 1027-1028.
- Hiraoka, Y., Dernburg, A.F., Parmelee, S.J., Rykowski, M.C., Agard, D.A., and Sedat, J.W. (1993). The onset of homologous chromosome pairing during *Drosophila melanogaster* embryogenesis. *J Cell Biol* 120, 591-600.
- Holmes, D. S., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114, 193-197.
- Horiuchi, T., Giniger, E., and Aigaki, T. (2003). Alternative trans-splicing of constant and variable exons of a *Drosophila* axon guidance gene, *lola*. *Genes Dev* 17, 2496-2501.

- Imanishi, T., Itoh, T., Suzuki, Y., O'Donovan, C., Fukuchi, S., Koyanagi, K.O., Barrero, R.A., Tamura, T., Yamaguchi-Kabata, Y., Tanino, M., *et al.* (2004). Integrative annotation of 21,037 human genes validated by full-length cDNA clones. *PLoS Biol.* 6, e162.
- Ito, T., Takeshima, Y., Sakamoto, H., Nakamura, H., and Matsuo, M. (2001). Purine-rich exon sequences are not necessarily splicing enhancer sequence in the dystrophin gene. *Kobe J Med Sci* 47, 193-202.
- Ivanov, I.P., Simin, K., Letsou, A., Atkins, J.F., and Gesteland, R.F. (1998). The *Drosophila* gene for antizyme requires ribosomal frameshifting for expression and contains an intronic gene for snRNP Sm D3 on the opposite strand. *Mol Cell Biol.* 18, 1553-1561.
- Jehan, Z., Vallinayagam, S., Tiwari, S., Pradhan, S., Singh, L., Suresh, A., Reddy, H. M., Ahuja, Y. R., and Jesudasan, R. A. (2006). Novel noncoding RNA from human Y distal heterochromatic block (Yq12) generates testis-specific chimeric CDC2L2. *Genome Res* 17, 433-440.
- Jowett, T., Rizki, T. M., and Rizki, R. M. (1986). Regulation of synthesis of larval serum proteins after transplantation of larval fat body into adult *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 116, 23-30.
- Kandel, E.S., and Nudler, E. (2002). Template switching by RNA polymerase II in vivo: Evidence and implications from a retroviral system. *Mol Cell* 10, 1495-1502.
- Kiesler, E., Hase, M. E., Brodin, D., and Visa, N. (2005) Hrp59, an hnRNP M protein in *Chironomus* and *Drosophila*, binds to exonic splicing enhancers and is required for expression of a subset of mRNAs. *The Journal of Cell Biology* 168, 1013–1025
- Kikumori, T., Cote, G. J., and Gagel, R. F. (2001). Promiscuity of pre-mRNA spliceosome-mediated trans splicing: a problem for gene therapy? *Hum Gene Ther* 12, 1429-1441.
- Kikumori, T., Cote, G. J., and Gagel, R. F. (2002). Naturally occurring heterologous trans-splicing of adenovirus RNA with host cellular transcripts during infection. *FEBS Lett* 522, 41-46.
- Klemenz, R., Weber, U., and Gehring, W. J. (1987). The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 15, 3947-3959.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., and Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56, 341-361.
- Knoop, V., Schuster, W., Wissinger, B., and Brennicke, A. (1991). Trans splicing integrates an exon of 22 nucleotides into the nad5 mRNA in higher plant mitochondria. *Embo J* 10, 3483-3493.
- Knoop, V., Altwasser, M., and Brennicke, A. (1997). A tripartite group II intron in mitochondria of an angiosperm plant. *Mol Gen Genet* 255, 269-276.
- Koundakjian, E. J., Cowan, D. M., Hardy, R. W., and Becker, A. H. (2004). The Zuker collection: a resource for the analysis of autosomal gene function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 203–206.

- Krauss, V., and Dorn, R. (2004). Evolution of the trans-splicing *Drosophila* locus *mod(mdg4)* in several species of Diptera and Lepidoptera. *Gene* 331, 165-176.
- Kuniyoshi, H., Baba, K., Ueda, R., Kondo, S., Awano, W., Juni, N., and Yamamoto, D. (2002). *lingerer*, a *Drosophila* gene involved in initiation and termination of copulation, encodes a set of novel cytoplasmic proteins. *Genetics* 162, 1775-1789.
- Labrador, M., Mongelard, F., Plata-Rengifo, P., Baxter, E. M., Corces, V. G., and Gerasimova, T. I. (2001). Protein encoding by both DNA strands. *Nature* 409, 1000.
- Labrador, M., and Corces, V. G. (2003). Extensive exon reshuffling over evolutionary time coupled to trans-splicing in *Drosophila*. *Genome Res* 13, 2220-2228.
- Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L., and Jenuwein, T. (1997). Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *Embo J* 16, 3219-3232.
- Lev-Maor, G., Goren, A., Sela, N., Kim, E., Keren, H., Doron-Faigenboim, A., Leibman-Barak, S., Pupko, T., and Ast, G. (2007) The "alternative" choice of constitutive exons throughout evolution. *PLoS Genet. Nov 3(11)*, e203.
- Lewin, B. (2000). *Genes VII* (Oxford ; New York, Oxford University Press).
- Li, B. L., Li, X. L., Duan, Z. J., Lee, O., Lin, S., Ma, Z. M., Chang, C. C., Yang, X. Y., Park, J. P., Mohandas, T. K., *et al.* (1999). Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) gene organization and evidence that the 4.3-kilobase ACAT-1 mRNA is produced from two different chromosomes. *J Biol Chem* 274, 11060-11071.
- Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S., and Michaeli, S. (2003). trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* 2, 830-840.
- Lin, Y. J., Seroude, L. and Benzer, S. (1998). Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science* 282, 943-946.
- Lindsley, D. L., and Zimm, G. G. (1992). *The genome of Drosophila melanogaster* (San Diego, Academic Press).
- Liu, X., Jiang, Q., Mansfield, S. G., Puttaraju, M., Zhang, Y., Zhou, W., Cohn, J. A., Garcia-Blanco, M. A., Mitchell, L. G., and Engelhardt, J. F. (2002). Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Biotechnol* 20, 47-52.
- Lund, A. H., Duch, M., and Pedersen, F. S. (1996). Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Res* 24, 800-801.
- Maldonado, R., and Herr, A.J. (1998). Efficiency of T4 gene 60 translational bypassing. *J Bacteriol.* 180, 1822-1830.
- Mason, J. M., Haoudi, A., Konev, A. Y., Kurenova, E., Walter, M. F., and Biessmann, H. (2000). Control of telomere elongation and telomeric silencing in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 109, 61-70.

- Mason, J. M., Konev, A. Y., and Biessmann, H. (2003). Telomeric position effect in *Drosophila melanogaster* reflects a telomere length control mechanism. *Genetica* *117*, 319-325.
- Mason, J. M., Ransom, J., and Konev, A. Y. (2004). A deficiency screen for dominant suppressors of telomeric silencing in *Drosophila*. *Genetics* *168*, 1353-1370.
- Mazur, A. M., Georgiev, P. G., and Golovnin, A. K. (2005a). Analysis of interaction between proteins containing the BTB domain in the yeast two-hybrid system. *Dokl Biochem Biophys* *400*, 24-27.
- McKee, B. D., Habera, L., and Vrana, J. A. (1992). Evidence that intergenic spacer repeats of *Drosophila melanogaster* rRNA genes function as X-Y pairing sites in male meiosis, and a general model for achiasmatic pairing. *Genetics* *132*, 529-544.
- McKee, B. D., Hong, C. S., and Das, S. (2000). On the roles of heterochromatin and euchromatin in meiosis in *Drosophila*: mapping chromosomal pairing sites and testing candidate mutations for effects on X-Y nondisjunction and meiotic drive in male meiosis. *Genetica* *109*, 77-93.
- Metz, C.W. (1916). Chromosome studies on the Diptera II. The paired association of chromosomes in the Diptera and its significance. *J Exp Zool* *21*, 213-279.
- Mongelard, F., Labrador, M., Baxter, E. M., Gerasimova, T. I., and Corces, V. G. (2002). Trans-splicing as a novel mechanism to explain interallelic complementation in *Drosophila*. *Genetics* *160*, 1481-1487.
- Morcillo, P., Rosen, C., Baylies, M. K., and Dorsett, D. (1997). Chip, a widely expressed chromosomal protein required for segmentation and activity of a remote wing margin enhancer in *Drosophila*. *Genes Dev* *11*, 2729-2740.
- Mount, S. M., and Salz, H. K. (2000). Pre-messenger RNA processing factors in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol* *150*, F37-44.
- Muller, H. (1930). Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Genetics* *22*, 299-334.
- Nègre, N., Brown, C. D., Shah, P. K., Kheradpur, P., Morrison, C. A., Henikoff, J. G., Feng, X., Ahmad, K., Russell, S., White, R. A. H., *et al.* (2010). A Comprehensive Map of Insulator Elements for the *Drosophila* Genome. *PLoS Genetics* *6*, e1000814
- O'Keefe, L. V., Smibert, P., Colella, A., Chataway, T. K., Saint, R., and Richards, R. I. (2007). Know thy fly. *Trends Genet* *23*, 238-242.
- Okamura, K., Balla, S., Martin, R., Liu, N., and Lai, E.C. (2008). Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 581-590.
- Okamura, K., Balla, S., Martin, R., Liu, N., and Lai, E.C. (2008). Two distinct mechanisms generate endogenous siRNAs from bidirectional transcription in *Drosophila melanogaster*. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 998.
- Pai, C. Y., Lei, E. P., Ghosh, D., and Corces, V. G. (2004). The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. *Mol Cell* *16*, 737-748.

- Pardue, M. L., Rashkova, S., Casacuberta, E., DeBaryshe, P. G., George, J. A., and Traverse, K. L. (2005). Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*. *Chromosome Res* 13, 443-453.
- Pasman, Z., and Garcia-Blanco, M. A. (1996). The 5' and 3' splice sites come together via a three dimensional diffusion mechanism. *Nucleic Acids Res* 24, 1638-1645.
- Pel, H.J., Rep, M., and Grivell, L.A. (1992) Sequence comparison of new prokaryotic and mitochondrial members of the polypeptide chain release factor family predicts a five-domain model for release factor structure. *Nucleic Acids Res.* 20, 4423-4428.
- Puttaraju, M., Jamison, S. F., Mansfield, S. G., Garcia-Blanco, M. A., and Mitchell, L. G. (1999). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat Biotechnol* 17, 246-252.
- Randau, L., Munch, R., Hohn, M. J., Jahn, D., and Soll, D. (2005). Nanoarchaeum equitans creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves. *Nature* 433, 537-541.
- Read, D., Butte, M. J., Dernburg, A. F., Frasch, M., and Kornberg, T. B. (2000). Functional studies of the BTB domain in the *Drosophila* GAGA and Mod(mdg4) proteins. *Nucleic Acids Res* 28, 3864-3870.
- Robertson, H. M., Preston, C. R., Phillis, R. W., Johnson-Schlitz, D. M., Benz, W. K., and Engels, W. R. (1988). A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 461-470.
- Rodriguez-Martin, T., Garcia-Blanco, M. A., Mansfield, S. G., Grover, A. C., Hutton, M., Yu, Q., Zhou, J., Anderton, B. H., and Gallo, J. M. (2005). Reprogramming of tau alternative splicing by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: implications for tauopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15659-15664.
- Rong, M., Durbin, R. K., and McAllister, W. T. (1998). Template Strand Switching by T7 RNA Polymerase. *J Biol Chem* 273, 10253-10260.
- Ross, S.M. (Übers. Heinisch, C.) (2006) Statistik für Ingenieure und Naturwissenschaftler. 3. Auflage; Elsevier GmbH, München, Spektrum Akademischer Verlag (ist ein Imprint der Elsevier)
- Rubin, G. M., and Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-353.
- Ryder, E., Blows, F., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Coulson, D., Drummond, J., Webster, J., Gubb, D., Gunton, N., Johnson, G., *et al.* (2004). The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 797-813.
- Ryder, E., Ashburner, M., Bautista-Llacer, R., Drummond, J., Webster, J., Johnson, G., Morley, T., Chan, Y. S., Blows, F., Coulson, D., *et al.* (2007). The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* 177, 615-629.
- Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324, 163-166.

- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2006). *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Scamborova, P., Wong, A., and Steitz, J. A. (2004). An intronic enhancer regulates splicing of the twintron of *Drosophila melanogaster* prospero pre-mRNA by two different spliceosomes. *Mol Cell Biol* 24, 1855-1869.
- Sironi, M., Menozzi, G., Riva, L., Cagliani, R., Comi, G. P., Bresolin, N., Giorda, R., and Pozzoli, U. Silencer elements as possible inhibitors of pseudoexon splicing. *Nucleic Acids Res.* 32, 1783-1791.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Sperling, R., Sperling, J., Levine, A. D., Spann, P., Stark, G. R. and Kornberg, R. D. (1985). Abundant nuclear ribonucleoprotein form of CAD RNA. *Mol Cell Biol* 5, 569–575.
- Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J., Nandra, S.K., and Privé, G.G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol* 6, R82.
- Takahara, T., Tasic, B., Maniatis, T., Akanuma, H., and Yanagisawa, S. (2005). Delay in synthesis of the 3' splice site promotes trans-splicing of the preceding 5' splice site. *Mol Cell* 18, 245-251.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Tartof, K. D., Hobbs, C., and Jones, M. (1984). A structural basis for variegating position effects. *Cell* 37, 869-878.
- Thomas, S. E., Soltani-Bejnood, M., Roth, P., Dorn, R., Logsdon, J. M., Jr., and McKee, B. D. (2005). Identification of two proteins required for conjunction and regular segregation of achiasmate homologs in *Drosophila* male meiosis. *Cell* 123, 555-568.
- Thomas, S.E., and McKee, B.D. (2007). Meiotic pairing and disjunction of mini-X chromosomes in *Drosophila* is mediated by 240-bp rDNA repeats and the homolog conjunction proteins SNM and MNM. *Genetics* 177, 785-799.
- Tsuda, M., Egashira, M., Niikawa, N., Wada, Y., and Honke, K. (2000) Cancer-associated alternative usage of multiple promoters of human GalCer sulfotransferase gene. *Eur J Biochem.* 267, 2672-2679.
- Vazquez, J., Belmont, A. S., and Sedat, J. W. (2002). The dynamics of homologous chromosome pairing during male *Drosophila* meiosis. *Curr Biol* 12, 1473-1483.
- Wagner, E. (2007). Funktionelle Analyse der konservierten FLYWCH-Protein-Domäne des *mod(mdg4)* Locus bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik

- Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., and Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* doi:10.1038/nature07509
- Wang, Z., and Burge, C. B. (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14, 802-813.
- Weiler, K.S., and Wakimoto, B.T. (1995). Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 29, 577-605.
- Weiler, K. S., and Wakimoto, B. T. (2002). Suppression of heterochromatic gene variegation can be used to distinguish and characterize E(var) genes potentially important for chromosome structure in *Drosophila melanogaster*. *Mol Genet Genomics* 266, 922-932.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415,871-80.
- Xie, H. B., and Golic, K. G. (2004). Gene deletions by ends-in targeting in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 168, 1477-1489.
- Yamamoto, D., Jallon, J. M., and Komatsu, A. (1997). Genetic dissection of sexual behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 551-585.
- Yang, L., Lee, O., Chen, L., Chen, L., Chang, C.C.Y., Zhou, P., Wang, Z.Z., Ma, H.-H., Sha, H.-F., Feng, J.-X., et al. (2004). Human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 (acat1) sequences located in two different chromosomes (7 and 1) are required to produce a novel ACAT1 isoenzyme with additional sequence at the N-terminal. *J Biol Chem Manuscript* M408155200 (August 18, 2004)
- Zeng, X. C., Luo, F., and Li, W. X. (2006). Characterization of a novel cDNA encoding a short venom peptide derived from venom gland of scorpion *Buthus martensii* Karsch: trans-splicing may play an important role in the diversification of scorpion venom peptides. *Peptides* 27, 675-681.
- Zhao, H., and Dean, A. (2004). An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. *Nucl Acids Res* 32, 4903–4914.

Anhang 1: Primer für 50kb tiling array für Region 26B auf Chromosom 2L (ChIP-*on-membrane*-Experiment, siehe 3.1.5.1): Die Zahl bezeichnet die Position innerhalb der Sequenz zwischen beiden Defizienz-P-Elementen (Minus-Vorzeichen: Primer bindet vor dem „vorderen“ P-Element); Sequenz zwischen den P-Elementen endet bei 54284, danach: Amplifikate der 3' flankierenden 3kb

(Spalte 1 auf der Membran in **Abb. 3.11**)

mel-3000F GTATCTACATCAAATCGCCGCACACC
 mel-1884B GCCGTGCTGCCAATCAATAATC
 mel-1908F CGGATTATTGATTGGGCAGCACG
 mel-866R CCGAACCCAGTGCGATTGTGTG
 mel-1100F TCCTGATCTATATGCACCGACTTGGC
 240B AGCAGCTGATTCTACTGGTCTCGC
 117F CACACTGGCGAGCAGAATTCATACG
 1015B GGTGAATTTCAATATGCATTTCCGAAAG
 913F GTGATCAAGAACAAGCAATGCGGCTAC
 2133B TATTAGTCAATGTCCACGAAGACGGAAATG
 2076F GTACGCTATGTGTCTAACTAAAGCAAACGC
 3682B TTGCTCAGCTGGACGGAGAGTCTGG
 3665F CTCCGTCCAGCTGAGCAACTGC
 4903B GGAGGTAGCCAATGACTAAGGTATGTTG
 4867F CGTATTTCCAACATACCTTAGTGCATTG
 6050R TCTCCTCGAGGTGAGTTGCAGTTG
 (Spalte 2)
 6026F GCAACTGCAACTCACCTCGAGGAG
 7497R CTTTAAGAGCCACCTCACTCTGATGTACTACC
 7465F TGGTAGTACATCAGAGTGAGGTGGCTC
 8728R GCTCAGTAAATGGATTGAGATCGCAG
 8712F GAATCCATTTACTGAGCAGTTGGGCT
 9923B CAACCAACTGCACACGCAGATG
 9859F CCATCGGCGAGTTCAGAGGACTCAG
 11469R GTCCTGAAGCAACTAACCTTTGATGAGAC
 11452F GGTTAGTTGCTTCAGGACCTTGCCAC
 12567R CAGTGAGGGTAAATTTGTTGGTGCACG
 12559F TTCAATGTCGTGCACCAACAATTTACC
 13797R AGCCTCACGAGCCTCCAGCTG
 13745F GTCTTGCCAGAAATCGCTGCTG
 15158B CGATGGTTGACACAAGCCAAATGC
 15094F GCACATCTGCAGGGGCTAATAACG
 16678B CATTATGGGCAGATACAGATAGCTATCC
 (Spalte 3)
 16617F CGGAACAATTCATTAGAGAGCGGG
 18136B CCGTATGTTGTGTGCACTTGCAGC
 18111F GCGCTGCAAGTGCACACAACATAC
 19434B GCATTATATCCTGATCATCTCGCACTC
 19367F TCGCTGAGATTGTGTATTCTGGTGC
 20664B GTTGCGGTTTCCAGCGATTCCCTC
 20575F GGCATACAACAAATGAAAGCGAAACG
 21868B GCTCTCGACGGTAACAACACTGATCC
 21758F CGCATTGATCACTTATCGCTCTGAATTG
 23031B CGATCCGCGAAAGGTATTGCTGG
 22964F TGCCTTGGTATGAACACAGCGCC
 24407B CGGTACACTGGCACACAACGTG
 24334F TCAACCATTTGTGTAAATTCGCGG
 25824B AATGACTAGACACATCCAATGCAGTGC
 25798F GCACTGCATTGGATGTGTCTAGTCAT
 27172B TCCATAGCCACCTCTACTATTCCGCC
 (Spalte 4)
 27132F CACGTCTTGATTGAAGGCGGAATAGTAG
 28402B GAGCCACACTTAGCAAAGTGCCTTCA
 28373F TGACTGAAGGCAGTTTGCTAAGTGTGG
 29713B CCACTACGTGCAGCCTTCTCGTCC
 29675F ATCCGCAACTAATTAGGACGAGAAGG
 30982B TGCGGCTTTCGTGTCAGTTAATTAG
 30933F CGCAGCCACATTTGAGCATTCTAC
 32244B GACATCCGCTGGCTTATGCTCGTC
 32122F TATTGAACCTCCGAGGAAGTGCCTAATC
 33460B GGATCTGGTTGCTCCTAATCGGCC
 33400F GGCATCAATGGAGAAATCGCTGTG
 34796B GACTGGCCTCGCCTATGACTAATAG
 34787F GAGGCCAGTCCGCTAGTTGTCTG
 36139B GACGGCTGGGCGGTATATGAAC
 36038F GCAAATTCGCTAGGACTCGTTTAGC
 37376B CACATCACGACCTCTACATGGACCAC
 (Spalte 5)
 37308F TCGAATCTAGGGCCAGTTGCTCG
 38695B AGTCGCGTTCCAAGTTGATGCC
 38626F GTTGATGACGAAGTCATCCCTTGAC
 39959B GAGAATTGAGATCGTTGCAGTGCAG
 39956F TCTCGGGTGGTTCCGGGACATG
 41296B GCCCTATGTGCCATTTCTATTGCAAG
 41221F CGCGTTGTTAAACATAATCTGCCAAG
 42558B GACGGAGGATTGCTTGTGTTGCG
 42486F CCGATAGATCCACTCTAAGGCCACTC
 43902B GCAAGCTCTGTGGAGATACAAGGATC
 43808F GGTTCATTTATTCTCCATTTCCGGC
 45400B CACGACATGGTCATCCTTCGCTAC
 45287F CATGCGCACGGACACCACG
 46830B TGGACGATGGACATGGACAGC
 46765F TGAATGGCTTGAGAATAGAGGAAGGTG
 48233B CAAGATAATGGACTACGAGAGCGAGAAG
 (Spalte 6)
 48181F GACGAGTGCTGATCTGGTTGACTATCTTC
 49599B GTCTTTCAATTTGGTCACTTCCGTTTCAG
 49498F TGAGCAAGCAAGGTATGAACACGTAC
 50801B CTTACAGTTCTGTGTGCGGCTTAATTAC
 50715F CCATCGATACATGTTCCAGCTCTGTAAC
 52274B CGGACCTCGGTAGTTAATTGGCG
 52214F CGGTGTGGGAAATACGCATGC
 53771B GCCAGTGATAAACGAGTGCAGTCTAAATAC
 53564F TCGAACAGAGTGAGCAAAAAGCAACC
 54810B CGGGCAGGACACTTTCTAATTAGTTTCG
 54782F GCGAAACTAATTAGAAAGTGCCTGCC
 56302B CAATACGGAGCAGCAATAGTCCG
 56183F TGCCATGCAAGAGATATGAATCACC
 57283B CCAGGAGATCGGCAATGCAGACG

Ends in zum *Knock out* des isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-64.2:

pTV-Seq_F GGAGAGTCACAAAACGAATAGAG
 pTV-Seq_B CTGTCAAGTAGACCCATACGGC
 3800fwd_SacI_NotI tgagctcggccgcCTCGCTCTGGCTCGCACG
 5561rev_Cfr42I ccgaggGTTCCGGCTTACGTTGACATCAG
 5563fwd_Kpn_Xba tggtagctctagaCGTGAAGAGCTGCAACTACTCAAGG
 7107Stop-rev_Kpn tggtagcctaATCTGCGAGAGTCGAGGAAAACCG
 7117fwd_Kpn tggtagcAGTTTCATTCGAGCCAGAAGAAGAAC
 11447rev_Not-Xba tctcagagcggccgcGCTGGAGCAATACTGGATGATGAATC
 11447rev_Not-Xba2 ttctagagcggccgcTGGAGCAATACTGGATGATGAATC
 I-SceI-Not1 GGCCTAGGATAACAGGGTAAT
 I-SceI-Not2 GGCCATTACCCTGTTATCCCTA
 5563fwd_SacI_Xba tgagctcctagaCGTGAAGAGCTGCAACTACTCAAGG
 7080rev_SacI tgagctcGCATGGGGTTTGTGGGCATAATAT

Primer für *Drosophila virilis*-Transgene:

int4-amp-fwd CTTGGTGATTTGTGCTAATAAAAACATAAATTCTCTTACTGTCATGCC
 int4-amp-rev GAATCGTATGATTAATAATGTCGTGTCGGTCGCCGCATACACTATTC
 k404-mut-fwd GCTGATGCAGCTGGCTAAATCCAATTTATAC
 k404-mut-rev GTATAAATTGGATTTAGCCAGCTGCATCAGC
 ESE-mut_fwd CAATTTATACGCAGCCAAAAAACAACGCACAGCTTGTGTC
 ESE-mut_rev GAC AAG CTG TGC GTT TTT TTT TTG GCT GCG TAT AAA TTG
 64.2 Bam fwd GGATCCTAGAGGCTATCTAAACGAAAGTTAC
 64.2 Bam rev GGATCCATGCAGCTTAAGCTTGTGCGAC
 60.1 Sac fwd CCGCGGTAGAAGGTGGCACATTTAGTT
 60.1 Sac rev CCGCGGGTTCGTGTATGAGCATCAAGGAGG
 2,7kb Apa-Xba rev GGGCCCTCTAGAGAAAGGCGAGAGG
 vir7078fwd GTGTGACTTGTGTCGTGAATGATCCC
 vir64.2only-Xba-rev tctagaTAACAGTAATTGTAAGTGTGCTGCTTGT
 ECFP Bam fwd GGATCCATGGTGAAGCAAGGGCGAG
 ECFP Bam rev GGATCCTCAATAATATTGGATCTATAACT
 ECFP-Bam_rev2 GGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
 EYFP Sac fwd CCGCGGATGGTGAAGCAAGGGCGAG
 EYFP Sac rev CCGCGGTTACTTGTACAGCTCGTCC

Primer für Real-time RT-qPCR und qPCR:

RT-EGFP-fwd CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
 RT-EGFP-rev GCGGATCTTGAAGTTCACCTTGATGCC
 rp49_fwdTGTCCTTCCAGCTTCAAGATGACCATC
 rp49_rev CTGGGCTTGCGCCATTTGTG
 mel ex2-rev2 (fit-vir) TTGCGGAAAAAGGGCGAGCAGAC
 mel_ex2_fwd TTCTTCCGCAAGATGTTCACTCAGATG
 mel_ex3_rev TGAATTGGATGAGGTCCTTCAGCG
 mel-ex4-rev GAGGTGCTGCTGGCGGCGGG
 mel-ex3-fwd GAACAACGTCAGCCACTCGGGCGC
 mel_ex4_fwd TCCAAGGCTGTGGTCAAGCAACAGTCC
 neu-mel-ex4-fwd CAAATACAGAGCGGTGGCGGAGTGAC
 mel_64-2_rev TGGCTGCGAATGAAACTGATCTCCG
 mel_60-1_rev TTGGAGTAGTTGTGGCAGCGCCAATAC
 mel_55-1_rev TTTGAATCGGTGCTATATGTCGTGCAG
 mel_53-1_rev TGGTGAAGAAGAAGTGGGTGGCGTAC
 mel52.4rev CGTCGGCAAACACAACACTGTGGCG
 mel52.4rev GTTCCGTCGGCAAACACAACACTGTGG
 mel54.7rev GGCAGGTGCAACTGAAAGTCACTCCTC
 mel53.6rev GTTCTTCCCACCGCGCGATTG
 mel55.8rev CCTCGGTTGGAGCGCACATACTG
 mel55.6rev GGAGATGGCGCAATGTCGAAAGATG
 vir_ex1_fwd GCACCGTTTGGTGTGCTGTCTGTC

vir_ex2_rev TCAGGTCCTTCAAAGCCGAATGG
 vir_ex3_fwd CGTGGTCAAGCAGCAATCGCAAAG
 vir-ex2_rev_neu ATCAGGTCCTTCAAAGCCGAATGGC
 vir-ex1-fwd-2 TTTACCCAAATGCCATCGAATACCCAC
 vir-ex2-rev-2 CCTCGCCGCAATACATAAACTGAATCAGG
 vir-ex2-fwd GCGGAGTCGCTGCAAATAAAGGG
 vir-ex3-rev TCTCATCGCCCAACACATCGTCAACGG
 vir-ex1-fwd3 CGCACCGTTTGGTGTGCTGTCTGTC
 vir_64-2_rev GTTGTCTGGCCATTTCGCTTGGGTC
 vir_60-1_rev GGGTCTCGATGAACAGCAGCTGAC
 vir_55-1_rev CGAGTTGCGTGTCTCTGGTGTAGG
 vir_53-1_rev CTGACCCTTGGTGAAGTAGAAGATCGG
 HeT128fwd GCCAAAGACTCTCACGCGCATAAC
 HeT309rev TGTATGGCGGCAGCTTGTGTC
 HeT286fwd AACCGACAAGCTGCCGCCATAAC
 HeT483rev CGCGTGGAGTATTATGTAGATTTAGCG
 HeT938fwd CATCCTGCTGCCGACACACAAG
 HeT1088rev ATGCAGTGCAACAGGAGGTGG
 HeT1900fwd CCATGACGACTCCTCTGTCACGATG
 HeT2103rev CGCCGAGTCGTTTGGTGTGATGTC
 Tsp26A-785F GCTGGAGGCCCATCTGATTAGTGTG
 Tsp26A-905B CATCCATTCTTCGCTGCTTGAAC

genomische mod(mdg4)-Primer (*D. melanogaster* & *D. virilis*):

mel1561fwd CGCACACATTGTACCTGACTATCAGATTC
 mel2002fwd CATTTCGAATCTTGGCATTGCACC
 mel2834fwd GGCCGCGCTAGCAAAAAACTCTG
 Mod-trastart
 tgcggccgcACACTTCTAATTTTCACGTCAAAGAACTCG
 93DgemF4 ACCGATTGGTGTATCCGTCTG
 Primer501 CTTCCAAGGCTGTGGTCAAGC
 mel-6181-rev ATCCGTAATAATATCGTGAAATTCTTCAGAC
 6668fwd TGCATCCGAATTACACGGCCTATTTG
 mel-6699-rev TGTGAACAAATAGGCCGTGTAATTCG
 6704fwd ATTATTCCAGCTTGTGACGGTGTGTTTG
 64.2_RT TCCTTCCGTTGGTTCG
 64-2_fwd_Xba tctagatagacggagatcagtttcattc
 64-2_rev_Kpn ggtaccctagggtgctcgtctcttc
 64.2_fwd_Kpn ggtaccgatacggagatcagtttcattc
 64.2_rev_Xba tctagactagggtgctcgtctcttc
 mel7111fwd GAGATCAGTTTCATTTCGACGCCAG
 mel7723fwd CTACAGTCAATCAGTTGGAAAGTC
 60.1_fwd_Kpn ggtaccgagcagagctggttttatag
 60.1_rev_Xba tctagactattcgtcatgagcatcatg
 mel8460rev CGATGAACTCTTGCTTCTGCTCC
 mel8969fwd GCAGATAGAGGAAAATTAGTCCACGAG
 mel9209rev CTTTATGAGGACGAGGTGGGCAATC

9644 TGGAAGGCTGAACCTAAAGAACC
 mel9884rev GGGTAATATCATCCTTTTCCTCATCCACTC
 10613 fwd ATCCACTTGGTGGCGGCTCCATT
 10798 TGGGTGTGGAGAAAGTTCCGGAG
 mel11335fwd GTGCCGCCACAATGCC
 mel11686rev GGCGCTGCAACCAATGGTG
 mel11961fwd TCTGATTATAGCGACGCTTCTTTGG
 12030rev GTAGCTACAAAGTATATCTGACCCAGCC
 12094fwd GGCAGTGCCAGTAGGTTGTGGTATC
 mel12276rev GACATCTTTCGACATTGCGCCATC
 mel12514fwd CGAGTGTTAACGCAGAGTGGATTCC
 mel12821rev AACTCGAAAATAGCGCAGTATGTGC
 mel12978fwd TGCTACTTCTTAGAGATACGCTCCGCTCAC
 13032rev GCCATAATCACTCCCGATCGGAT
 mel13208rev TCGCCACAGTTGTGTTGGCCG
 13345fwd CCAAATGAACAGTGATTCCATTACACC
 mel13415fwd TGTGACTAACAATTGCCGAAGCCTG
 mel13736rev CATGCTACCAACTGGTGCCCAATC
 mel13846fwd
 ACCTTTATTAGACTAATGAGATGGCACAGG
 1-UKN-B GGCTTAAAGGCATCCGCCGGATG
 2-UKN-B GGATTTGGTACCACACGGGCGGAGC
 14028rev CTTACCCTCAATCGTCCGATCA

mel14161rev TGCACCTGCCTCTCCTCGTG
 antiHA1224F-rev CAGCCCTGGGTGCAAGCGCTTG
 HA1224F CAAGCGCTTGCAACCCAGGGCTG
 HA1224B GGATGCTCCGCGGGCTTCGGGATGGCAG
 14697fwd CTAACACGGAACGAGCTGTTTGCATGACG
 14865fwd GCCCTTTTACCGAGGACTCGCTGTGC
 14892fwd CGAGTGCAGCCCTGGCATTGTTGC
 mel14725rev CGTCATGCAAACAGCTCGTTCCGTCG
 14907fwd CATTGTTGCTGCCATTTTCCTTGTCTAC
 mel15246fwd ACCAGTAACTGATAGCGTGCAGAAAGTC
 mel15614rev GTGGTCAATGAACCTCTGTACTGCG
 mel15811fwd GTGTCATCCAGTCGCTGAAGGC
 15967fwd CACGCTACGTGAAACACAGCTGCC
 16106rev TTCGTCCAGCAGGTCAGTCGTG
 mel16121rev CTGCAGCTCCGGAATTCGTC
 mel16318fwd GCCTTCGCCGACGCCTG
 mel16628rev GCACAGTGCCGTTGGCCTTG
 17121fwd CAAATCGAGCCACCTAACCTAAGCTA
 mel17370fwd CAGTCTGTGCTCATAGACGTCCG
 17473rev TGCAACGCCAGGATCCGATAAG
 mel17694rev AGCTGTGTCTATTACCTATGCAGTGCAG
 mel18343fwd GTATAGGAAGCGGCTACATCTTGGG
 18421fwd CGGCGGCTGTGAGGGAACCTCAACTTC
 18446fwd CTTGTGGATCAGCATCCCAGCCG
 18473fwd GGCCGCTCAATACGCTTGTGTGTCG
 mel18622fwd GCACCTAACCGATCGGTTTTGGACG
 mel18701rev ACCGCTCCAATCTTAAGTTCTTCGG
 18782rev AACACGTCCGCAACTGTGGTCC
 mel19116fwd CAGTGCTTTTTGCAGTCGTGCG
 mel19175rev GAAGAAGTGGACCCCAATGATTCCG
 67.2-B-RT atatgactcccgattccgagg
 20046rev GGTGCCAAACATCGATAACATAGTGAG
 mel20828fwd GTCCACTTGTCTACCAATCAACCC
 mel21011rev CTATTTATTGCAGGCAATCCCGATAC
 21138fwd CGCGTGGCCAGTGGATTGATAAGC
 mel21219fwd ACATGTACAAGAAGGAGGCCAGTTTC
 mel21538rev TGCCACATGAGTTTAATGAGCTTATGG
 mel21518rev CTTATGGTAGGTAATGCATGCAACTGG
 mel9557fwd GGCTGCACGACATATAGCACCG
 mel10165fwd CGAGTTAGGAAGATCATATAGGCGTTC
 mel10475rev TGTGATCCAAAATGTAACGTGAGAGTGTG

mel19415rev TACGAGGGCGAGCACGTGCAC
 mel19456fwd ACTCCTCGCCGTGCTCACGG
 mel19792rev CACATCCGCATCTGCAACTAAG
 mel21594fwd AGACCAGAACAAGGGCGTCCCTC
 21718rev CATGATGCCTGGTGAGTCGAGGTCG
 mel21881rev
 TGGTAAAATGGTATTCGGTATATTGTACATTG
 mel21983fwd CAAATTCGACTACCAGATCAGCGTG
 mel22537rev GAGCCGACTTTTCGCGCCTTAG
 mel22822fwd GTTCTGTTGCGTACTACTCGTACATCACC
 mel23124rev
 CGATTTTCAAGATTGTATTCTACAATAAATAAGC
 mel23332fwd ACCGTCGAGTAACCTGAAGACC
 23697fwd AAGGACGCTCAACTTAAGCATCGAGG
 mel23737rev GCAGGTTGTTAAGGTCCTCGATGC
 mel23938fwd CATTGTATGTGTTAACGGATCCCATC
 mel24263rev TGTATGTGTCCCGATTACAGACTTCTG
 mel24887fwd TAAGCTGCAACGTCTACATGATTACCC
 mel25186rev GAGAGGCGGAACATCGGTTCTTAAC
 mel25097fwd AACTGGCTGTCTTCGGCACTGG
 25195rev AATAAGTACGAGAGGGCGGAACATCGG
 mel-25573-fwd CATGATCACAGCCGAAATTCCTAG
 mel25675rev CTAAATGTAAGCCTATGACGCATCCAG
 mel25870fwd TCGCGGACTCCAAGAAGAACGG
 mel26169rev CGGTTTCATTATCCAACCTCAGCCTC
 mel26492fwd GCAGATTCAGTTCTCCGTGCCAAAC
 mel26791rev TGCGCCATGCTCTGAGGAAGAC
 mel27038fwd AATGGCATTGCTTTCTGATCATGAG
 mel-27153-rev GTCTCCTTTAACATGGTGTGTCGTCG
 mel27337rev AAGTTCATTGAGCTCCTCCTCGTGC
 mel27559fwd TCGAGTACGTTGTGACCCAGAAGG
 mel27830rev TGGAATTCATAACCATAGCCAAAAGATG
 mel28300fwd GTACCTCACATTTGGCCACTTTTATGTTG
 mel-28414-fwd GTGCCAGGTATCGAAGTTCGAAGT
 mel28573rev
 TGTATAAAAATGCTTTAAGATTTATTCAACAGG
 mel28816fwd CGCAAGCGAGGTATAATGATTGTCAAG
 mel29160rev GCTAATGCTCGGGATCTTTAGACTTAAGG
 mel29920fwd TGCATGGCCAGCTCTCAAATTTGATAC
 mel30682rev CGAGCCAAGGGAAATTTGATATCTATGGG

Primer für Antigenkonstrukte zur Generierung polyklonaler Antikörper gegen Mod(mdg4)-64.2 und -60.1:

64.2-AB_pKM_Nco_fwd CCATGGATACGGAGATCAGTTTCATTC
 64.2-AB_pKM_Hind_rev AAGCTTCTAGGGGTGCTCGCTCTTC
 60.1-AB_pKM_Nco_fwd CCATGGAGGACGAGCTGGTTTTTATAG
 60.1-AB_pKM_Hind_rev AAGCTTCTATTCGTGCATGAGCATCATG
 64.2-AB_pGEX_Eco_fwd GAATTCGATAACGGAGATCAGTTTCATTC
 64.2-AB_pGEX_Sal_rev GTCGACCTAGGGGTGCTCGCTCTTC
 60.1-AB_pGEX_Eco_fwd GAATTCGAGGACGAGCTGGTTTTTATAG
 60.1-AB_pGEX_Sal_rev GTCGACCTATTCGTGCATGAGCATCATG

Primer zum Nachweis von Splice-Faktormutanten und DrosDel-Defizienzen auf 2L:

Gbp_Prp19_rev TGGCGGTTTTCGGTTTACCACAGC
 SC35_571fwd CCAGGGATCGCTACACAGTGAGAG
 tra1-fwd CGCATAACCCTAAAGTTAAAATACTCGCTTG
 tra1-rev TACGTGACGCGCTGGCGCTTC
 tra1_rev2 ATTGGAGGCGGACACCACAACG
 tra1_rev3 GATGAGCTATTGGAGGCGGACACCAC
 U2A_F GTTCATCACCACCTCGCGTCCG
 U2A_wt_B CCCAGTTTCTCAGATTTGTGGAATCTTA
 U2A-mut_B CCCAGTTTCTCAGATTTGTGGAATCTTT
 heph2_275rev CGATGTGCGGCTGTTGTGCGTC
 heph03429_299rev GTGCCCGGGTGGTGTGTA AAAAG
 CG10689_123rev GCGCTGGGTGCTTTATCACGAG

HA3038_173R GAATAAAAACGGGTGTGAAGTGGAGGGC
 SZ3596_294F GTCCACTGACGCCAAGTCCAACG
 HA2983_280R CAGCGAGTAACAGGTATCCTCTGGTCCG
 HA1599_216R CCACTCAATAGCAACATGATGATGCACC
 CB0509_379R TGCACCTCCTCCGAGTCAAACCCG
 CB5641_142F CCAAGTGAATGCAGCTATATTGGGTTGG
 SZ3215_163R TGACAGCTCGGCTCAAGAACGC
 CB0337_250F TGCTGTTTGAACCTCGACGACGACG
 CB0383_227F ATCACGATACGACAGCCGAAGAAATGG
 CB5668_230F CAACGGCAATCGAGCGGATCAAG
 CB0211_438R GTGATCGTGGCGTGCAGAGACATG

biotinylierte Primer für LAM-PCR (linear amplification mediated PCR):

Bio14701fwd CACGGAACGAGCTGTTTGCATG
 Bio18455fwd CAGCATCCAGCCGCTTG

Vektoretten-Primer:

vec-top_Bam gatcAATTAAGGAGAGGACgctGTCTGTCTGAAGGTAAGGAACGGAcgaGAGAAGGGAGAG
 vec-top_Xba ctagAATTAAGGAGAGGACgctGTCTGTCTGAAGGTAAGGAACGGAcgaGAGAAGGGAGAG
 vec-top_Eco aattAATTAAGGAGAGGACgctGTCTGTCTGAAGGTAAGGAACGGAcgaGAGAAGGGAGAG
 vec-bottom CTCTCCCTTCTCgaATCGTAACCGTTCTGACGAGAATCGCtGTCCTCTCCTT
 vec-prim ATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGC
 vec-prim2 AACCGTTCGTACGAGAATCGCTGTC
 vec-seq ATCGCTGTCCTCTCCTT

sonstige Primer:

Bam-Pst-Lig GATCTGCA
 1896 CGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATG
 1896-2 catgatgaaataa cataaggtgg tcccgtcg
 Act496fwd CCAAGGCCAACCGTGAGAAGATG
 Act795rev TGTACGACGATTTCACGCTCAG
 rp49_RT-F GATGACCATCCGCCAGCATAC
 rp49_RT-B AGTAAACGCGGTTCTGCATGAGC
 aTub-RT-F TGAATCCCAGCTGTGTGTCGCATC
 aTub-RT-B TTGCGAATCCTGTCCAGGACCAC
 mel-mau_ex4_fwd CGCCCAACTTGTGCCGCAACAGATC
 mel-mau_64-2_rev
 CTTATACAGTTGTGCTGGCCAATCCTCG
 mel-mau_55-1_rev CCTTCATGCGAGGCAATCCCACATAC
 mini white 5' rev GTTCAATGATGTCCAGTGCAG
 mini white 3' fwd GCTTGGATTTCACTGGAAC
 m-white-5'-fwd GCCAAGAGGATCAGGAGCTATTAATTC
 m-white-3'-rev CCGAAGTCTTAGAGCCAGATATGCGAG
 HeT-A_5'UTR_fwd tttactctgtctccgtacccaccagcaagt
 HeT-A_5'UTR_rev
 GTTGGGTTTTTGTATATTAACGATAAGTGTAAG
 HeT-A_3'UTR_fwd ccaattaacttacaactacttatattctttaat
 HeT-A_3'UTR_rev TAACTTTGCTGGTGGAGGTACG
 EGFP-A_fwd ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
 EGFP-A_rev GTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCCAGC
 EGFP-B_fwd GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
 EGFP-B_rev CCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
 EGFP_RT GGTACCTGTACAGCTCG
 RT-EGFP-fwd2 TGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGG
 RT-EGFP-rev2 CACCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTGTC
 T17anchor
 GACTCGAGTCGACATGGATTTTTTTTTTTTTTTTTT
 T17anchor2
 CGCTGATGATAGACTCGAGTCGACATGTTTTTTTTTTTTT
 anchor2 CGCTGATGATAGACTCGAGTCGACATG
 CA07012_fwd
 AGATCACATATGTATTCCAAACTTGAACACTTTCC
 CA07012_rev
 TTCTTCAGACACCCTTAATTTCGGAACCATAT
 46_F GGTATCACCCGCGACGGACAC
 46_B CTGTCACACTCTTAAGGCGTCCGTTCTC
 K46_pr_F TGGGCTGGAAGCGGTGAGGAGAG

AR AATACTCAAGCTATGCATCC
 T7 GTAATACGACTCACTATAGGGC
 B2e_3R-rev TGAGTTCGGATTTTCGGCGCGACTG
 52.2RT AATGGTAAAATGGTATTCGG
 KG08515_F GCCTTGATACACCATCGATTGTTGAGC
 KG08515_B
 CCTTTAACTGGCTACAAGTCGATTGATAGTC
 KG08515_B2 CATGCTTATCAATCCACTGGCCACG
 zam_gag_fwd CAAACAACCTCGCTCCGTTAGAAATCAC
 zam_gag_rev TGTCGAGTTGGCCTGGAGTACCATC
 anti1896 CATGATGAAATAACATAAGGTGGTCCCCGTCCG
 mel11375fwd CGTATTTTCAGGTGCATCCCCAGCTCG
 mel30960rev TGATATTAGGCAAAACGCATCGGC
 mel29920fwd tgcattgcccagctctcaaatgatacc (Andrea)
 3'white-fwd GCTCGCATATCTGGCTCTAAGACTTCCG
 Ubx_probe_F GGCCATAAATCTCCAGGTGACGG
 Ubx_probe_R CAGCAGCGAGTCCCATTCTCTCAG
 5-HA-5045-F ATTTCTGACCTGTGCCGACTGAGTTC
 yellow192fwd GATCCTTGTGACCCTGATCACCTTG
 yellow491rev CGCCAATCTGGATACGGAATTAGC
 white177fwd GAGCTATTAATTCGCGGAGGCAG
 white476rev CGGTATGTGTCGCTCGTTGTCAG
 white1374fwd AAGGCCACCTGGTTCATGCAG
 white1687rev TTGCCCAGAAAGTATGTGTCACAGC
 abd-a2112fwd AATGGCTGGGTGCGATGGCTTAG
 abd-a2409rev CTTCTTAGGCCTTTGCCGCTATTC
 abd-b2317fwd CAAGAAGACACACTCCGCACTAGT
 abd-b2619rev ATTCGAAAGCGACTTCAACTATGGG
 Ubx3319fwd GTTTGAGAGAGTCTTCGCGGGCTAC
 Ubx3624rev GCGGTAGTACGTATACATCTTCTGCAGG
 ct-a6195fwd CAGTGCGGAGTTCACGACGAAAG
 ct-a6494rev CATCGTCGTCCTCCTCCTGTTTG
 2R-fwd TTAATAGAAACGCAATAGGACACACAGC
 2R-rev CAATGAAACTTACCCAATGAATGTAGGTC
 Y-Chr_fwd TTCCTGTTGCTAGGCCACTCCC
 Y-Chr_rev CCAGCTTGGACACTTCGAGTTCCC
 X-Chr_fwd GGAATCAGAAGGTCGTGTGATGTAG
 X-Chr_rev AAACAATGGTTCGGGTAAATGAAGAG
 CB-5786-B2 GGTCCAAGTTCCTGAAATTCGG

Anhang 2

A2.1 Transkription in *P{RS3}CB-6686-3*

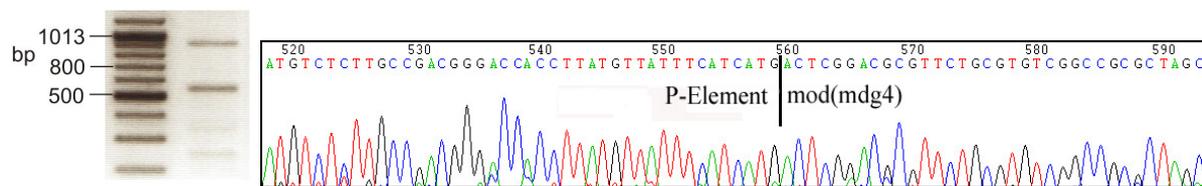
P{RS3}CB-6686-3 ist eine *P*-Elementinsertion in das erste, nicht translatierte Exon von *mod(mdg4)* (locusinterne Position 2.809; im Genom 3R:17.203.088). Trotz dieser Position sind die Ergebnisse von (semiquantitativen) RT-PCRs zum Nachweis verschiedener *mod(mdg4)*-Isoformen in homozygoten *P{RS3}CB-6686-3*-Tieren den mit RNA des Referenzstammes w^{1118}_{iso} erhaltenen sehr ähnlich. Darüber hinaus komplementiert *P{RS3}CB-6686-3* alle untersuchten *mod(mdg4)*-Mutationen sehr gut, einschließlich insertioneller Mutationen des gemeinsamen Teils und der Defizienz des gesamten *mod(mdg4)*-Locus *Df(3R)GC14*:

Tabelle A1: Komplementation von *P{RS3}CB-6686-3* mit ausgewählten *mod(mdg4)*-Allelen. Angegeben sind transheterozygote Tiere im Verhältnis zur Gesamtzahl F1-Tiere. Die Komplementationen wurden nach Geschlechtern getrennt ausgewertet und anschließend zusammengefaßt wenn sich die Ergebnisse um nicht mehr als 5% unterschieden. +: $\geq 85\%$; sv: subvital, 50-85%; sl: semilethal, 5-50%; -: letal (<5%) (nach Hadorn, 1955)

♀ <i>mod(mdg4)</i> -Allel	♂ <i>P{RS3}CB-6686-3</i>	Komplementation
<i>mod(mdg4)</i> ⁰²		+ 260/616 (127%)
<i>mod(mdg4)</i> ⁰⁴		+ 388/982 (119%)
<i>mod(mdg4)</i> ⁰⁷		+ 172/319 (162%)
<i>mod(mdg4)</i> ^{neo129}		+ 397/611 (195%)
<i>mod(mdg4)</i> ^{neo129 R32}		+ 317/655 (145%)
Rev31		+ 336/776 (130%)
<i>Df(3R)ED6050</i>		+ 296/844 (105%)
<i>Df(3R)eGp4</i>		+ 241/514 (141%)
<i>Df(3R)GC14</i>		+ 125/316 (119%)

Da trotz des Integrationsortes zwischen Promotor und Translationsstart sowohl mit der Referenz (w^{1118}_{iso}) vergleichbare Mengen der mRNAs gebildet werden, wie auch die Funktion des Locus nicht beeinträchtigt scheint, wurde eine 5'RACE an Gesamt-RNA homozygoter, adulter *P{RS3}CB-6686-3*-Weibchen durchgeführt. Bereits die erste PCR (*nested* PCR war nicht notwendig, was für hohe RNA-Konzentrationen spricht) ergab zwei Banden von ca. 550bp und ca. 900bp, die in pGEM-3Zf ligiert und anschließend sequenziert wurden. Die PCR-

Amplifikate entsprechen zwei verschiedenen langen, abundanten mRNAs. Eine enthält an ihrem 5'Ende 32bp *P*-Element und dahinter Sequenz der Exons 1-3 von *mod(mdg4)*. Die andere enthält an ihrem 5'Ende Sequenz des X-Chromosoms, die der Sequenz *downstream* des *white*-Gens entspricht. Daran schließt sich *P*-Elementsequenz (3'*P*-Ende) an, gefolgt von den ersten drei gemeinsamen Exons von *mod(mdg4)* (siehe Abbildung). Das Fehlen von Intronsequenz zwischen den *mod(mdg4)*-Exons in beiden RACE-PCR-Amplifikaten bestätigt die Isolierung und Amplifikation von mRNAs.



```

CAGTAGACCA GAGTCGCATG CTCCCGGCCG CCTGGCCGCG GGATTGGCCC GCGTCGACTA 60
GTACGGGGGG GGGGGGGGGG GGAATAACAA AATATTAGTC GACGGTAGCG GTCCGGTTGT 120
TTTCGTGCTC ATCGCGGGTA CGTATTTATT TTTAAAAAAT AATAAACGCG GCAAACACAA 180
TCACACAAAT GTGCAGGCAC AGTGGGACAA AGTGCCTAA ATTTGGATAT GTAATAAATC 240
CAAAACCAAA AAGAAAACAA AAAACGGTAA AATATTTTAC TGTGTAAA ATTCGATCAT 300
TCATTATTCG CTGCATGAAT TAGCTTTGCG TACTCGCAA TTATTAATAA TAAACTTTA 360
AAAATAATTT CGTCTAATTA ATATTATGAG TTAATTCAA CCCACGGAC ATGCTAAGGG 420
TTAATCAACA ATCATATCGC TGTCCTCACT AAACCAATA CGACACTCAA AATACTATTC 480
CTTCACTCG CACTTATTGC AAGCATACGT TAAGTGGATG TCTCTGCGC ACGGACCAC 540
CTTATGTTT TTCATCATGA CTCGGACGCG TTCTGCGTGT CGGCCGCGCT AGCAAAAAAC 600
TCTGGCTTTA GTTAGTTATT TTATTGAAA AATATTTAGT CAAGAGCCAA CAACGCATA 660
GATACAGAAA AGTATTGATT TTCGTCCAAG ATGGCGGACG ACGAGCAATT CAGCTTGTGC 720
TGGAACAAC TCAACACGAA TTTGTCGGCC GGCTCCACG AGTCGCTATG CCGCGGCGAC 780
CTGGTGGACG TCTCGCTGGC CGCCGAGGCG CAAATAGTGA AGGCCACCG ATTGGTGTAT 840
CCGTCTGCTC GCCCTTCTTC

```

Basen 1-45	Vektorsequenz pGEM-3Zf
Basen 46-64	RACE-fwd-Primer
Basen 65-82	d(G)-Sequenz, entstanden während 5'RACE durch d(C)-tailing des rev. Transkripts
Basen 83-170	entsprechen 2.683.833-2.683.746 auf X-Chromosom (3B3, <i>downstream</i> des <i>white</i> -Gens)
Basen 171-309	entsprechen 2.681.641-2.681.503 auf X-Chr. (3B3, <i>downstream</i> des <i>white</i> -Gens)
Basen 322-559	entsprechen 2.998-2.761 in pUAST-C5 (<i>P</i> -Elementvektor-Referenz)
Basen 560-860	entsprechen <i>mod(mdg4)</i> -Exons 1 bis 3 (ohne Intronsequenzen)

Abbildung A1: 5'RACE an *P{RS3}CB-6686-3*. links: die Agarosegelelektrophorese mit zwei Banden, die den beobachteten abundanten Transkripten von 550bp und 900bp entsprechen; rechts: Ausschnitt aus Sequenz des 900bp-Amplifikats, links des senkrechten Trennstrichs befindet sich *P*-Elementsequenz, rechts davon das Exon1 von *mod(mdg4)* distal der Insertionsstelle, darunter die Sequenz des 900bp-5'RACE-Amplifikats in pGEM-T ligiert und mit Vektorprimer sequenziert und die Legende zur Sequenz

Die von Promotoren im *P*-Element ausgehende Transkription im homozygoten *P{RS3}CB-6686-3*-Genotyp ist in Stärke, Gewebe- und Entwicklungsspezifität der des endogenen

Promotors von *mod(mdg4)* ausreichend ähnlich (vermutlich ubiquitär) um zu gewährleisten, daß die Embryonalentwicklung ohne erkennbare rezessive Letalität möglich ist, die für insertionelle Mutationen in den gemeinsamen Teil von *mod(mdg4)* typisch ist (siehe Tabelle A1). In adulten homozygoten Tieren wurden keinerlei Phänotypen beobachtet, sodaß von einer physiologisch hinreichenden Transkription des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)* ausgegangen werden kann.

Im Stamm *P{RS3}CB-6686-3* steht *mod(mdg4)* unter transkriptioneller Kontrolle von Promotorelementen im *P{RS3}*-Element. Da die Sequenz der *P{RS}*-Elemente (Golic und Golic, 1996) nicht in öffentlichen Datenbanken hinterlegt wurde und die 5'RACE die Vollständigkeit des Transkripts nicht garantiert (Transkriptionsstart erreicht oder nicht), kann weder bestätigt noch widerlegt werden, ob der für die Transkription des *white*-Markers verantwortliche Promotor und/oder der Promotor von *CG32795*, das im Genom unmittelbar *downstream* von *white* lokalisiert und im *P{RS3}*-Element teilweise enthalten ist, die Expression von *mod(mdg4)* treibt. Darüber hinaus wirkt auch das *P{RS3}*-3'*P*-Elementende als Promotor. Sollte in der erstgenannten Situation eine komplette CDS innerhalb des *P*-Elements transkribiert und translatiert werden, muß der Translationsstart im Exon 2 von *mod(mdg4)* als IRES (*internal ribosome entry site*) funktionieren.

Da zu den *P{RS}*-Vektoren keinerlei Sequenzinformationen zur Verfügung stehen, ist nicht bekannt, ob darin die Sequenz vorhanden ist, die zum Aufbau des Wari-Chromatin-*insulator* nötig ist (Chetverina *et al.*, 2007). Die Wirkung eines solchen *insulator*-Elements dürfte ebenfalls Einfluß auf die Transkription des gemeinsamen Teils von *mod(mdg4)* haben. Es sei weiterhin angemerkt, daß anscheinend das in den *P{RS3}*-Elementen enthaltene Polyadenylierungssignal nicht effektiv funktioniert, wie zumindest die mittels 5'RACE nachgewiesene, längere mRNA zeigt.

Für die Transkription der spezifischen *mod(mdg4)*-Exons in der Nähe des Insertionsortes von *P{RS5}5-HA-1224*, für Revertanten mit teilweise erhalten gebliebenem *P*-Element (siehe 3.1.2.2) und evtl. andere, Nicht-*P{RS}*-Elemente bedeutet dies: Ausgehend von den 5'- bzw. 3'*P*-Elementenden erfolgt eine (ektopische) Transkription. Diese Promotoraktivität(-en) wurde nicht entwicklungsstadien- bzw. gewebespezifisch getestet. Sie ist bzw. sind jedoch „ausreichend ubiquitär“, um die unter Punkt 3.1.3 beschriebenen Phänotypen nicht auftreten zu lassen. Zum Beispiel wurde bei den Revertanten 186 und 99 der Phänotyp einer homöotischen Transformation des fünften ins vierte Abdominalsegment nicht beobachtet, was auf die im *P*-Elementfragment beginnende, ausreichend starke Transkription der isoformspezifischen Exons von *mod(mdg4)*-58.0 und -55.2 zurückgeführt wird.

A2.2 entwicklungsstadien- und gewebespezifische Expression von *mod(mdg4)*-Isoformen

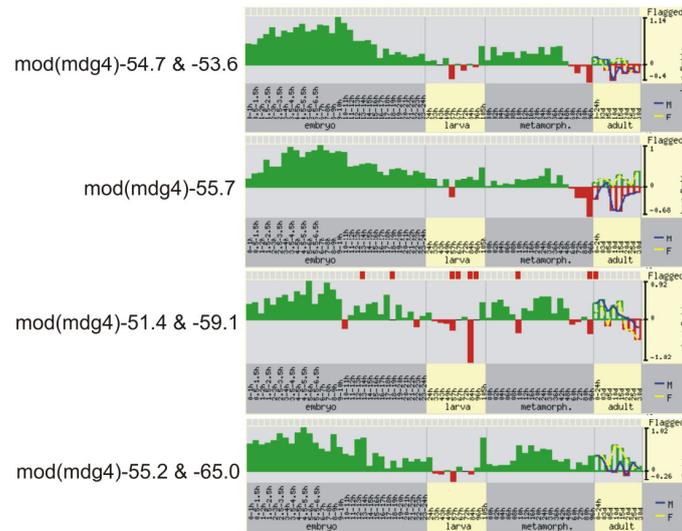


Abbildung A2: Zeitaufgelöste Expression (*developmental timecourse*) einiger *mod(mdg4)*-Isoformen (Costello *et al.*, 2008; Arbeitman *et al.*, 2002); logarithmische Skala am rechten Rand; grüne Balken: relative Überexpression im Vergleich zur Gesamt-RNA; rote Balken: relativ geringere Expression

von Flyatlas veröffentlichte Originaldaten, aus denen Abbildung 3.5 im Ergebnisteil erstellt wurde:

1636765_at <i>mod(mdg4)</i> -51.4					Larval fat body	52 ± 8	4 of 4	0.60	Down
Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy	Whole fly	85 ± 3	4 of 4		
	Signal	Call	ment	Call					
Brain	80 ± 2	4 of 4	2.60	Up	1627953_at <i>mod(mdg4)</i> -59.1				
Head	28 ± 2	4 of 4	0.90	None	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy
Thoracoabdominal ganglion	53 ± 2	4 of 4	1.70	Up		Signal	Call	ment	Call
Crop	29 ± 1	4 of 4	0.90	None	Brain	77 ± 3	4 of 4	2.20	Up
Midgut	15 ± 1	3 of 4	0.50	Down	Head	20 ± 1	4 of 4	0.60	Down
Tubule	18 ± 1	4 of 4	0.60	Down	Thoracoabdominal ganglion	57 ± 3	4 of 4	1.60	Up
Hindgut	20 ± 1	4 of 4	0.60	Down	Crop	22 ± 1	4 of 4	0.60	Down
Ovary	82 ± 3	4 of 4	2.70	Up	Midgut	11 ± 1	0 of 4	0.30	Down
Testis	10 ± 1	4 of 4	0.30	Down	Tubule	14 ± 0	3 of 4	0.40	Down
Male accessory glands	18 ± 1	3 of 4	0.60	Down	Hindgut	11 ± 1	4 of 4	0.30	Down
Adult carcass	22 ± 2	2 of 4	0.70	Down	Ovary	122 ± 3	4 of 4	3.40	Up
Larval tubule	11 ± 1	4 of 4	0.40	Down	Testis	7 ± 1	4 of 4	0.20	Down
Larval fat body	18 ± 2	2 of 4	0.60	Down	Male accessory glands	14 ± 1	4 of 4	0.40	Down
Whole fly	31 ± 2	4 of 4			Adult carcass	12 ± 1	1 of 4	0.30	Down
					Larval tubule	18 ± 1	4 of 4	0.50	Down
					Larval fat body	20 ± 1	4 of 4	0.60	Down
					Whole fly	35 ± 1	4 of 4		
1634258_at <i>mod(mdg4)</i> -64.2					1628932_at <i>mod(mdg4)</i> -62.3				
Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy
	Signal	Call	ment	Call		Signal	Call	ment	Call
Brain	201 ± 5	4 of 4	2.40	Up	Brain	86 ± 3	4 of 4	1.50	Up
Head	76 ± 1	4 of 4	0.90	None	Head	31 ± 1	4 of 4	0.60	Down
Thoracoabdominal ganglion	129 ± 3	4 of 4	1.50	Up	Thoracoabdominal ganglion	54 ± 4	4 of 4	1.00	None
Crop	41 ± 3	4 of 4	0.50	Down	Crop	36 ± 1	4 of 4	0.60	Down
Midgut	48 ± 2	0 of 4	0.60	Down	Midgut	20 ± 2	4 of 4	0.40	Down
Tubule	31 ± 1	4 of 4	0.40	Down	Tubule	30 ± 1	4 of 4	0.50	Down
Hindgut	37 ± 2	4 of 4	0.40	Down	Hindgut	24 ± 1	4 of 4	0.40	Down
Ovary	187 ± 8	4 of 4	2.20	Up	Ovary	178 ± 5	4 of 4	3.20	Up
Testis	44 ± 2	4 of 4	0.50	Down	Testis	7 ± 0	2 of 4	0.10	Down
Male accessory glands	84 ± 2	4 of 4	1.00	None	Male accessory glands	31 ± 1	4 of 4	0.60	Down
Adult carcass	50 ± 3	4 of 4	0.60	Down					
Larval tubule	48 ± 2	4 of 4	0.60	Down					

glands					Ovary	110 ± 3	4 of 4	2.30	Up
Adult carcass	31 ± 2	4 of 4	0.60	Down	Testis	13 ± 1	4 of 4	0.30	Down
Larval tubule	23 ± 2	4 of 4	0.40	Down	Male accessory glands	54 ± 3	4 of 4	1.20	None
Larval fat body	24 ± 4	4 of 4	0.40	Down	Adult carcass	39 ± 3	4 of 4	0.80	None
Whole fly	56 ± 2	4 of 4			Larval tubule	46 ± 3	4 of 4	1.00	None
					Larval fat body	48 ± 4	4 of 4	1.00	None
					Whole fly	47 ± 1	4 of 4		
1626650_at mod(mdg4)-55.7									
Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy					
	Signal	Call	ment	Call					
Brain	112 ± 5	4 of 4	2.60	Up	1624020_at mod(mdg4)-60.1				
Head	39 ± 2	4 of 4	0.90	None	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy
Thoracoabdomina	76 ± 6	4 of 4	1.80	Up		Signal	Call	ment	Call
l ganglion					Brain	116 ± 3	4 of 4	1.80	Up
Crop	36 ± 2	4 of 4	0.80	None	Head	34 ± 2	4 of 4	0.50	Down
Midgut	36 ± 3	4 of 4	0.80	None	Thoracoabdomina	77 ± 1	4 of 4	1.20	None
Tubule	26 ± 0	4 of 4	0.60	Down	l ganglion				
Hindgut	33 ± 2	4 of 4	0.80	Down	Crop	24 ± 1	4 of 4	0.40	Down
Ovary	98 ± 1	4 of 4	2.30	Up	Midgut	11 ± 2	0 of 4	0.20	Down
Testis	14 ± 1	4 of 4	0.30	Down	Tubule	14 ± 0	3 of 4	0.20	Down
Male accessory glands	42 ± 7	4 of 4	1.00	None	Hindgut	21 ± 0	3 of 4	0.30	Down
Adult carcass	27 ± 3	4 of 4	0.60	Down	Ovary	167 ± 3	4 of 4	2.60	Up
Larval tubule	23 ± 4	4 of 4	0.50	Down	Testis	14 ± 0	4 of 4	0.20	Down
Larval fat body	45 ± 2	4 of 4	1.10	None	Male accessory glands	28 ± 4	0 of 4	0.40	Down
Whole fly	43 ± 3	4 of 4			Adult carcass	22 ± 1	1 of 4	0.30	Down
					Larval tubule	18 ± 2	4 of 4	0.30	Down
					Larval fat body	27 ± 1	4 of 4	0.40	Down
					Whole fly	64 ± 8	4 of 4		
1636471_at mod(mdg4)-54.7									
Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy					
	Signal	Call	ment	Call					
Brain	89 ± 2	4 of 4	2.60	Up	1625283_at mod(mdg4)-55.3				
Head	26 ± 0	4 of 4	0.80	None	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy
Thoracoabdomina	74 ± 4	4 of 4	2.20	Up		Signal	Call	ment	Call
l ganglion					Brain	54 ± 3	4 of 4	1.20	Up
Crop	28 ± 2	4 of 4	0.80	None	Head	18 ± 0	4 of 4	0.40	Down
Midgut	22 ± 4	1 of 4	0.70	None	Thoracoabdomina	41 ± 2	4 of 4	0.90	None
Tubule	11 ± 1	0 of 4	0.30	Down	l ganglion				
Hindgut	22 ± 2	1 of 4	0.70	Down	Crop	15 ± 0	3 of 4	0.30	Down
Ovary	86 ± 4	4 of 4	2.60	Up	Midgut	11 ± 1	0 of 4	0.30	Down
Testis	23 ± 0	4 of 4	0.70	None	Tubule	9 ± 1	1 of 4	0.20	Down
Male accessory glands	30 ± 5	1 of 4	0.90	None	Hindgut	11 ± 1	3 of 4	0.30	Down
Adult carcass	19 ± 3	1 of 4	0.60	Down	Ovary	111 ± 5	4 of 4	2.50	Up
Larval tubule	40 ± 3	4 of 4	1.20	None	Testis	14 ± 0	4 of 4	0.30	Down
Larval fat body	42 ± 4	4 of 4	1.30	None	Male accessory glands	16 ± 5	0 of 4	0.40	Down
Whole fly	33 ± 3	4 of 4			Adult carcass	16 ± 3	2 of 4	0.40	Down
					Larval tubule	14 ± 0	3 of 4	0.30	Down
					Larval fat body	14 ± 2	3 of 4	0.30	Down
					Whole fly	44 ± 3	4 of 4		
1627603_at mod(mdg4)-53.6									
Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy					
	Signal	Call	ment	Call					
Brain	52 ± 0	4 of 4	4.70	Up	1633152_at mod(mdg4)-53.4 (?)				
Head	20 ± 0	0 of 4	1.80	Up	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy
Thoracoabdomina	38 ± 1	4 of 4	3.50	Up		Signal	Call	ment	Call
l ganglion					Brain	26 ± 3	4 of 4	3.00	Up
Crop	20 ± 1	0 of 4	1.90	Up	Head	7 ± 1	3 of 4	0.90	None
Midgut	8 ± 2	0 of 4	0.80	None	Thoracoabdomina	21 ± 2	4 of 4	2.50	Up
Tubule	6 ± 1	0 of 4	0.50	Down	l ganglion				
Hindgut	17 ± 2	0 of 4	1.50	None	Crop	10 ± 0	1 of 4	1.20	None
Ovary	17 ± 1	1 of 4	1.50	Up	Midgut	8 ± 1	3 of 4	0.90	None
Testis	6 ± 0	0 of 4	0.60	Down	Tubule	7 ± 0	2 of 4	0.90	Down
Male accessory glands	20 ± 6	0 of 4	1.80	None	Hindgut	8 ± 2	3 of 4	1.00	None
Adult carcass	16 ± 5	0 of 4	1.50	None	Ovary	28 ± 2	4 of 4	3.20	Up
Larval tubule	26 ± 1	1 of 4	2.30	Up	Testis	3 ± 0	1 of 4	0.40	Down
Larval fat body	29 ± 3	0 of 4	2.60	Up	Male accessory glands	12 ± 2	2 of 4	1.40	None
Whole fly	11 ± 0	0 of 4			Adult carcass	8 ± 2	1 of 4	0.90	None
					Larval tubule	9 ± 1	3 of 4	1.10	None
					Larval fat body	8 ± 2	2 of 4	1.00	None
					Whole fly	8 ± 1	4 of 4		
1640268_at mod(mdg4)-55.1									
Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy					
	Signal	Call	ment	Call					
Brain	97 ± 8	4 of 4	2.10	Up	1631742_s_at mod(mdg4)-54.2 & mod(mdg4)-56.3				
Head	50 ± 3	4 of 4	1.10	None	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy
Thoracoabdomina	106 ± 2	4 of 4	2.30	Up		Signal	Call	ment	Call
l ganglion					Brain	195 ± 14	4 of 4	3.00	Up
Crop	36 ± 1	4 of 4	0.80	Down	Head	56 ± 1	4 of 4	0.90	Down
Midgut	11 ± 2	0 of 4	0.20	Down	Thoracoabdomina	118 ± 6	4 of 4	1.80	Up
Tubule	31 ± 2	4 of 4	0.70	Down	l ganglion				
Hindgut	29 ± 1	4 of 4	0.60	Down					

Crop	41 ± 1	4 of 4	0.60	Down	1631500_at mod(mdg4)-52.0				
Midgut	30 ± 3	1 of 4	0.50	Down	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy
Tubule	51 ± 0	4 of 4	0.80	Down		Signal	Call	ment	Call
Hindgut	34 ± 2	4 of 4	0.50	Down	Brain	39 ± 2	4 of 4	2.90	Up
Ovary	163 ± 7	4 of 4	2.50	Up	Head	13 ± 1	4 of 4	1.00	None
Testis	11 ± 0	0 of 4	0.20	Down	Thoracoabdominal ganglion	32 ± 1	4 of 4	2.40	Up
Male accessory glands	32 ± 1	0 of 4	0.50	Down	Crop	15 ± 1	3 of 4	1.10	None
Adult carcass	23 ± 1	0 of 4	0.40	Down	Midgut	7 ± 1	0 of 4	0.50	Down
Larval tubule	41 ± 2	4 of 4	0.60	Down	Tubule	10 ± 0	2 of 4	0.70	Down
Larval fat body	74 ± 5	4 of 4	1.20	None	Hindgut	8 ± 1	3 of 4	0.60	None
Whole fly	64 ± 2	4 of 4			Ovary	46 ± 1	4 of 4	3.40	Up
					Testis	6 ± 1	4 of 4	0.50	Down
					Male accessory glands	10 ± 2	2 of 4	0.80	None
1630536_at mod(mdg4)-65.0					Adult carcass	9 ± 3	0 of 4	0.70	None
Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy	Larval tubule	13 ± 1	3 of 4	1.00	None
	Signal	Call	ment	Call	Larval fat body	16 ± 1	3 of 4	1.30	None
Brain	76 ± 6	4 of 4	2.80	Up	Whole fly	13 ± 1	4 of 4		
Head	16 ± 0	1 of 4	0.60	Down					
Thoracoabdominal ganglion	60 ± 4	4 of 4	2.20	Up	1637723_at mod(mdg4)-55.6				
Crop	20 ± 2	3 of 4	0.70	None	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy
Midgut	20 ± 1	2 of 4	0.70	Down		Signal	Call	ment	Call
Tubule	20 ± 0	3 of 4	0.70	Down	Brain	302 ± 7	4 of 4	1.90	Up
Hindgut	16 ± 0	1 of 4	0.60	Down	Head	91 ± 4	4 of 4	0.60	Down
Ovary	71 ± 5	4 of 4	2.60	Up	Thoracoabdominal ganglion	359 ± 23	4 of 4	2.20	Up
Testis	8 ± 1	0 of 4	0.30	Down	Crop	104 ± 2	4 of 4	0.60	Down
Male accessory glands	29 ± 4	3 of 4	1.10	None	Midgut	79 ± 3	4 of 4	0.50	Down
Adult carcass	22 ± 4	0 of 4	0.80	None	Tubule	85 ± 1	4 of 4	0.50	Down
Larval tubule	27 ± 1	4 of 4	1.00	None	Hindgut	72 ± 2	4 of 4	0.40	Down
Larval fat body	4 ± 2	0 of 4	0.20	Down	Ovary	367 ± 7	4 of 4	2.30	Up
Whole fly	27 ± 2	4 of 4			Testis	23 ± 2	4 of 4	0.10	Down
					Male accessory glands	128 ± 10	4 of 4	0.80	Down
1631833_at mod(mdg4)-58.0					Adult carcass	71 ± 7	4 of 4	0.40	Down
Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy	Larval tubule	143 ± 7	4 of 4	0.90	None
	Signal	Call	ment	Call	Larval fat body	89 ± 4	4 of 4	0.60	Down
Brain	163 ± 11	4 of 4	1.50	Up	Whole fly	161 ± 8	4 of 4		
Head	70 ± 2	4 of 4	0.70	Down					
Thoracoabdominal ganglion	177 ± 4	4 of 4	1.70	Up	1627483_at mod(mdg4)-54.5				
Crop	68 ± 4	4 of 4	0.60	Down	Tissue	mRNA	Present	Enrichment	Affy
Midgut	47 ± 3	4 of 4	0.40	Down		Signal	Call	ment	Call
Tubule	69 ± 4	0 of 4	0.70	Down	Brain	30 ± 1	4 of 4	3.20	Up
Hindgut	60 ± 0	4 of 4	0.60	Down	Head	9 ± 0	3 of 4	1.00	None
Ovary	189 ± 2	4 of 4	1.80	Up	Thoracoabdominal ganglion	18 ± 1	4 of 4	2.00	Up
Testis	83 ± 1	4 of 4	0.80	None	Crop	9 ± 3	1 of 4	1.00	None
Male accessory glands	113 ± 10	4 of 4	1.10	None	Midgut	7 ± 1	0 of 4	0.80	None
Adult carcass	75 ± 7	4 of 4	0.70	None	Tubule	9 ± 1	0 of 4	1.00	None
Larval tubule	85 ± 5	4 of 4	0.80	None	Hindgut	10 ± 1	1 of 4	1.10	None
Larval fat body	76 ± 5	4 of 4	0.70	None	Ovary	20 ± 1	4 of 4	2.10	Up
Whole fly	106 ± 10	4 of 4			Testis	5 ± 0	0 of 4	0.50	Down
					Male accessory glands	7 ± 1	0 of 4	0.80	None
1638041_at mod(mdg4)-56.3					Adult carcass	8 ± 1	0 of 4	0.90	None
Tissue	mRNA	Present	Enrichment	Affy	Larval tubule	11 ± 1	1 of 4	1.20	None
	Signal	Call	ment	Call	Larval fat body	5 ± 2	0 of 4	0.50	None
Brain	34 ± 4	4 of 4	4.70	Up	Whole fly	9 ± 1	3 of 4		
Head	9 ± 2	4 of 4	1.30	None					
Thoracoabdominal ganglion	25 ± 3	4 of 4	3.40	Up	1640554_at mod(mdg4)-57.4				
Crop	10 ± 1	3 of 4	1.40	None	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy
Midgut	8 ± 0	4 of 4	1.20	None		Signal	Call	ment	Call
Tubule	8 ± 0	2 of 4	1.20	Up	Brain	94 ± 4	4 of 4	3.00	Up
Hindgut	7 ± 0	3 of 4	1.00	None	Head	24 ± 2	4 of 4	0.80	None
Ovary	10 ± 0	4 of 4	1.50	Up	Thoracoabdominal ganglion	73 ± 3	4 of 4	2.40	Up
Testis	2 ± 0	0 of 4	0.30	Down	Crop	28 ± 2	4 of 4	0.90	None
Male accessory glands	4 ± 1	0 of 4	0.60	None	Midgut	19 ± 3	4 of 4	0.60	Down
Adult carcass	11 ± 2	1 of 4	1.60	None	Tubule	17 ± 0	4 of 4	0.60	Down
Larval tubule	10 ± 1	4 of 4	1.40	None	Hindgut	21 ± 1	4 of 4	0.70	Down
Larval fat body	14 ± 1	4 of 4	2.00	Up	Ovary	66 ± 0	4 of 4	2.20	Up
Whole fly	7 ± 1	2 of 4			Testis	8 ± 1	4 of 4	0.30	Down
					Male accessory glands	24 ± 3	4 of 4	0.80	None
					Adult carcass	19 ± 1	4 of 4	0.60	Down

Larval tubule	24 ± 1	4 of 4	0.80	None	1639308_at mod(mdg4)-58.6	Tissue	mRN	Presen	Enrichme	Affy
Larval fat body	20 ± 1	4 of 4	0.70	Down		A	t Call	nt	Call	
Whole fly	30 ± 2	4 of 4				Signal				
1634052_s_at mod(mdg4)-58.6 & mod(mdg4)-54.1					Brain	38 ± 1	4 of 4	3.20	Up	
Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy	Head	15 ± 4	3 of 4	1.30	None	
	Signal	Call	ment	Call	Thoracoabdomina	24 ± 3	4 of 4	2.00	Up	
Brain	86 ± 1	4 of 4	2.90	Up	l ganglion					
Head	23 ± 1	4 of 4	0.80	Down	Crop	15 ± 1	4 of 4	1.30	None	
Thoracoabdomina	80 ± 5	4 of 4	2.70	Up	Midgut	9 ± 1	0 of 4	0.80	None	
l ganglion					Tubule	9 ± 0	0 of 4	0.80	Down	
Crop	16 ± 2	3 of 4	0.60	Down	Hindgut	11 ± 0	3 of 4	0.90	None	
Midgut	15 ± 1	0 of 4	0.50	Down	Ovary	37 ± 2	4 of 4	3.20	Up	
Tubule	13 ± 0	2 of 4	0.50	Down	Testis	3 ± 1	0 of 4	0.30	Down	
Hindgut	16 ± 1	3 of 4	0.50	Down	Male accessory	5 ± 0	0 of 4	0.50	Down	
Ovary	70 ± 2	4 of 4	2.40	Up	glands					
Testis	8 ± 0	2 of 4	0.30	Down	Adult carcass	7 ± 2	0 of 4	0.70	None	
Male accessory	16 ± 1	0 of 4	0.50	Down	Larval tubule	12 ± 1	3 of 4	1.10	None	
glands					Larval fat body	12 ± 2	3 of 4	1.10	None	
Adult carcass	15 ± 3	0 of 4	0.50	Down	Whole fly	11 ± 1	3 of 4			
Larval tubule	21 ± 2	4 of 4	0.70	Down	1639006_at mod(mdg4)-53.1					
Larval fat body	17 ± 3	1 of 4	0.60	Down	Tissue	mRN	Presen	Enrichmen	Affy	
Whole fly	29 ± 1	4 of 4			A	t Call	t	Call	Call	
1638829_s_at mod(mdg4)-55.7 & mod(mdg4)-52.2					Brain	19 ± 2	3 of 4	1.50	None	
Tissue	mRN	Presen	Enrichmen	Affy	Head	14 ± 2	2 of 4	1.10	None	
	A	t Call	t	Call	Thoracoabdomina	15 ± 0	4 of 4	1.20	None	
	Signal				l ganglion					
Brain	133 ± 2	4 of 4	3.70	Up	Crop	13 ± 1	2 of 4	1.00	None	
Head	42 ± 3	4 of 4	1.20	None	Midgut	4 ± 1	0 of 4	0.40	None	
Thoracoabdomina	108 ± 1	4 of 4	3.00	Up	Tubule	7 ± 0	0 of 4	0.50	Down	
l ganglion					Hindgut	7 ± 1	0 of 4	0.60	None	
Crop	36 ± 1	4 of 4	1.00	None	Ovary	41 ± 2	4 of 4	3.20	Up	
Midgut	19 ± 2	1 of 4	0.50	Down	Testis	5 ± 0	1 of 4	0.40	None	
Tubule	25 ± 1	4 of 4	0.70	Down	Male accessory	25 ± 2	3 of 4	2.00	Up	
Hindgut	20 ± 1	3 of 4	0.60	Down	glands					
Ovary	84 ± 3	4 of 4	2.30	Up	Adult carcass	16 ± 1	0 of 4	1.30	None	
Testis	6 ± 1	0 of 4	0.20	Down	Larval tubule	8 ± 2	0 of 4	0.70	None	
Male accessory	24 ± 4	2 of 4	0.70	None	Larval fat body	8 ± 1	0 of 4	0.70	None	
glands					Whole fly	12 ± 3	4 of 4			
Adult carcass	31 ± 3	4 of 4	0.90	None	1628921_s_at mod(mdg4)-59.0					
Larval tubule	16 ± 1	3 of 4	0.50	Down	Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy	
Larval fat body	28 ± 2	4 of 4	0.80	Down	Brain	Signal	Call	ment	Call	
Whole fly	36 ± 1	4 of 4			Head	88 ± 2	4 of 4	1.50	Up	
1622976_at mod(mdg4)-54.6					Thoracoabdomina	35 ± 1	4 of 4	0.60	Down	
Tissue	mRN	Presen	Enrichmen	Affy	l ganglion	67 ± 2	4 of 4	1.20	None	
	A	t Call	t	Call	Crop	43 ± 2	4 of 4	0.70	None	
	Signal				Midgut	39 ± 4	3 of 4	0.70	Down	
Brain	56 ± 2	4 of 4	2.60	Up	Tubule	37 ± 1	4 of 4	0.60	Down	
Head	18 ± 1	4 of 4	0.90	None	Hindgut	29 ± 3	4 of 4	0.50	Down	
Thoracoabdomina	37 ± 2	4 of 4	1.70	Up	Ovary	117 ± 1	4 of 4	2.00	Up	
l ganglion					Testis	8 ± 1	1 of 4	0.10	Down	
Crop	22 ± 2	4 of 4	1.00	None	Male accessory	228 ± 1	4 of 4	3.90	Up	
Midgut	11 ± 0	4 of 4	0.50	Down	glands					
Tubule	13 ± 0	4 of 4	0.60	Down	Adult carcass	40 ± 3	4 of 4	0.70	Down	
Hindgut	14 ± 0	4 of 4	0.70	None	Larval tubule	27 ± 2	4 of 4	0.50	Down	
Ovary	59 ± 1	4 of 4	2.70	Up	Larval fat body	38 ± 3	4 of 4	0.60	Down	
Testis	6 ± 0	2 of 4	0.30	Down	Whole fly	58 ± 5	4 of 4			
Male accessory	11 ± 0	2 of 4	0.50	Down	1628562_s_at mod(mdg4)-67.2					
glands					Tissue	mRNA	Present	Enrich	Affy	
Adult carcass	12 ± 1	4 of 4	0.60	Down	Brain	Signal	Call	ment	Call	
Larval tubule	17 ± 1	4 of 4	0.80	None	Head	130 ± 4	4 of 4	1.00	None	
Larval fat body	30 ± 3	4 of 4	1.40	None	Thoracoabdomina	76 ± 2	4 of 4	0.60	Down	
Whole fly	21 ± 2	4 of 4			l ganglion	101 ± 7	4 of 4	0.80	Down	
					Crop					
					Crop	105 ± 12	4 of 4	0.80	None	
					Midgut	87 ± 5	4 of 4	0.70	Down	
					Tubule	151 ± 8	4 of 4	1.20	Up	
					Hindgut	85 ± 3	4 of 4	0.70	Down	
					Ovary	241 ± 5	4 of 4	1.90	Up	
					Testis	37 ± 3	4 of 4	0.30	Down	
					Male accessory	605 ± 15	4 of 4	4.80	Up	
					glands					

Adult carcass	71 ± 2	4 of 4	0.60	Down	Crop	27 ± 1	3 of 4	0.60	Down
Larval tubule	135 ± 3	4 of 4	1.10	None	Midgut	13 ± 0	2 of 4	0.30	Down
Larval fat body	159 ± 11	4 of 4	1.30	None	Tubule	42 ± 3	4 of 4	0.90	None
Whole fly	126 ± 3	4 of 4			Hindgut	31 ± 3	4 of 4	0.70	Down
					Ovary	107 ± 3	4 of 4	2.30	Up
1632973_at mod(mdg4)-58.8					Testis	16 ± 0	4 of 4	0.40	Down
Tissue	mRNA	Present	Enrichment	Affy Call	Male accessory glands	88 ± 7	4 of 4	1.90	Up
	Signal				Adult carcass	23 ± 1	0 of 4	0.50	Down
Brain	149 ± 6	4 of 4	3.20	Up	Larval tubule	23 ± 3	3 of 4	0.50	Down
Head	34 ± 1	4 of 4	0.70	Down	Larval fat body	40 ± 3	4 of 4	0.80	None
Thoracoabdominal ganglion	103 ± 1	4 of 4	2.20	Up	Whole fly	47 ± 3	4 of 4		

A2.3 Phänotypen nach hitzeschockvermittelter I-CreI-Expression und Nomenklaturschlüssel der Linien nach erfolgreicher Insertion der Donor-DNA in *mod(mdg4)*

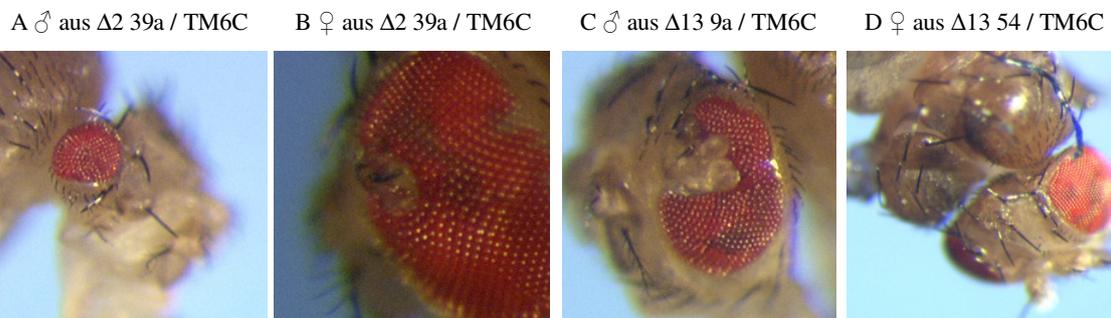


Abbildung A3: Phänotypen nach hitzeschockinduzierter I-CreI-Expression. (A-C) Phänotypen des Komplexauges; (D) gespaltener Thorax (Kreuzungsschema siehe 2.1.6)

Zur Nomenklatur der Linien: Δ2 bzw. Δ13 beziehen sich auf die Donorlinien, die folgenden Zahlen entsprechen der Kreuzungsnummer während der Mobilisierung des Donorelements. Kleine Buchstaben wurden verwendet, wenn mehrere Tiere aus einer Mobilisierungskreuzung selektiert wurden. Zusätzlich wurde eine römische Zahl, die der Nummer der Duplikations-Auflösungskreuzung (= F1-Tiere) entspricht, und nachstehend ein kleiner Buchstabe, der die Nummer der F2-Kreuzung benennt, angefügt. Aufgrund der nun relativ komplexen Linien-Bezeichnungen im Ergebnis der „Ends-in gene targeting“-Kreuzungen wurden diese Linien umbenannt.

Schlüssel für Umbenennung der Linien nach den „Ends-in gene targeting“-Kreuzungen:

Mu2 = Δ2 39a III f	Mu32 = Δ2 39a IV c
Mu3 = Δ2 39a IV n	Mu35 = Δ2 39a III h
Mu5 = Δ2 39a III g	Mu37 = Δ2 39a IV a
Mu6 = Δ13 9a II h	Mu38 = Δ13 85c IV p
Mu7 = Δ13 85c IV h	Mu39 = Δ2 39a III k
Mu9 = Δ13 85c III a	Mu43 = Δ13 85c III j

Mu10 = $\Delta 13$ 85c V k	Mu46 = $\Delta 13$ 85c IV j
Mu11 = $\Delta 13$ 85c III b	Mu48 = $\Delta 13$ 9a IIIg
Mu13 = $\Delta 13$ 85c IV c	Mu55 = $\Delta 13$ 85c V l
Mu16 = $\Delta 2$ 39a IV h	Mu57 = $\Delta 2$ 39a IV g
Mu18 = $\Delta 13$ 85c V f	Mu60 = $\Delta 2$ 39a III k
Mu19 = $\Delta 2$ 39a III b	Mu62 = $\Delta 13$ 9a II g
Mu20 = $\Delta 13$ 85c Va	Mu66 = $\Delta 2$ 39a IV b
Mu21 = $\Delta 2$ 39a IV j	Mu68 = $\Delta 13$ 85c III d
Mu24 = $\Delta 13$ 85c III k	Mu77 = $\Delta 2$ 39a III
Mu28 = $\Delta 13$ 85c V h	

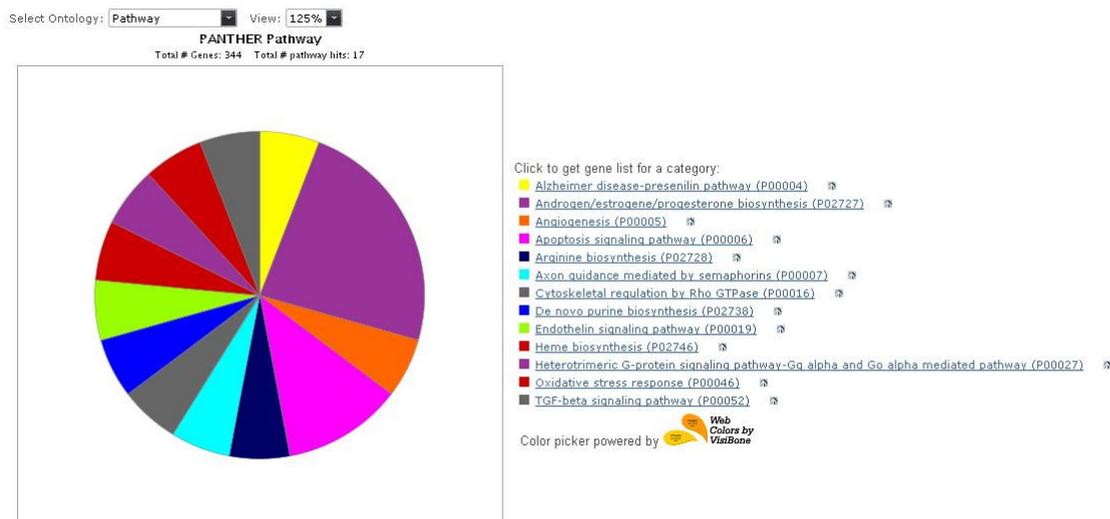
A2.4 ergänzende Microarraydaten zu $\Delta 13$ 85c V l und Rev31

Tabelle A2: In $\Delta 13$ 85c V l nicht signifikant in ihrer Expression veränderte Transposons ($\log_2 x < 1$ oder $p > 0,2$), alphabetisch geordnet, und entsprechendes Signal von Revertante Rev31 als Vergleich. p-Werte im t-Test von $p > 0,2$ wurden grau unterlegt.

Name	$\Delta 13$ 85c V l (p-Wert)	Rev31 (p-Wert)	Target-ID
<i>412</i>	0,23 (0,5780)	1,08 (0,0056)	1640167_s_at
<i>1731</i>	0,62 (0,4572)	-1,02 (0,1286)	1625050_s_at
<i>Bari1</i>	-0,37 (0,5765)	-0,54 (0,4794)	1637622_s_at
<i>Bari2</i>	0,26 (0,7885)	1,06 (0,3411)	1636749_at
<i>blood</i>	0,59 (0,1255)	-0,23 (0,5795)	1635886_s_at
<i>Burdock</i>	-0,79 (0,0534)	-0,91 (0,1378)	1633959_s_at
<i>Circe</i>	0,23 (0,8974)	0,42 (0,6714)	1626288_at
<i>copia</i>	0,13 (0,3195)	0,44 (0,0262)	1632683_s_at
<i>diver2</i>	0,41 (0,7366)	0,59 (0,6988)	1641421_s_at
<i>G-element</i>	-0,31 (0,6417)	-0,34 (0,7058)	1626130_s_at
<i>G3</i>	-0,08 (0,9073)	0,57 (0,5249)	1632902_s_at
<i>gtwin</i>	0,46 (0,6195)	-0,18 (0,8679)	1637055_s_at
<i>mdg1</i>	-0,92 (0,0202)	-0,90 (0,0794)	1625195_s_at
<i>gypsy2</i>	0,06 (0,9378)	-2,38 (0,1930)	1635829_s_at
<i>gypsy5</i>	-0,79 (0,2610)	-0,75 (0,0815)	1626434_s_at

<i>gypsy6</i>	1,06 (0,5459)	0,57 (0,0920)	1635017_at
<i>H-element</i>	-0,09 (0,7279)	0,001 (0,9978)	1623559_s_at
<i>HeT-A</i>	0,85 (0,2339) ¹	3,85 (0,0522)	1624224_at
<i>HMS-Beagle</i>	-0,56 (0,1397)	1,59 (0,0142)	1633998_s_at
<i>invader3</i>	0,32 (0,7267)	1,59 (0,0545)	1627936_s_at
<i>INE-1</i>	-0,92 (0,4743)	2,09 (0,2455)	1634508_at
<i>mariner2</i>	0,09 (0,8107)	-0,67 (0,5005)	1637377_x_at
<i>micropia</i>	0,76 (0,2465)	0,73 (0,1097)	1641450_s_at
<i>P-element</i>	1,67 (0,5046)	2,47 (0,4224)	1628989_at
<i>qbert</i>	0,28 (0,3163)	-0,65 (0,2093)	1641210_s_at
<i>rooA</i>	0,70 (0,1673)	-0,27 (0,5860)	1638228_s_at
<i>rover</i>	-0,78 (0,0913)	-0,17 (0,2414)	1624377_s_at
<i>Rt1a</i>	1,38 (0,2440)	-0,50 (0,7221)	1624631_x_at
<i>Rt1b</i>	-0,51 (0,1527)	-1,02 (0,0184)	1623349_x_at
<i>Rt1c</i>	-0,68 (0,5192)	-0,003 (0,9976)	1634338_x_at
<i>S-element</i>	0,62 (0,5440)	0,48 (0,7525)	1631713_x_at
<i>S2</i>	2,34 (0,3911)	0,21 (0,7138)	1641296_at
<i>springer</i>	-0,45 (0,0056)	0,25 (0,0126)	1624543_s_at
<i>Stalker3</i>	-0,43 (0,7546)	-0,17 (0,9045)	1627940_at
<i>Tabor</i>	-0,15 (0,4560)	3,01 (0,0008)	1631349_s_at
<i>TART-element</i>	-0,20 (0,6523)	-0,16 (0,7233)	1638428_at
<i>TART-element</i>	-0,08 (0,5469)	-0,59 (0,0313)	1629242_x_at
<i>Tom1</i>	0,77 (0,0052)	0,40 (0,0849)	1623158_s_at
<i>Tom1</i>	-0,64 (0,4184)	-0,65 (0,5339)	1632924_at
<i>transib3</i>	1,75 (0,3386)	-0,94 (0,5246)	1627374_at
<i>transib3</i>	0,12 (0,7533)	0,05 (0,9976)	1635012_x_at
<i>transib4</i>	-0,37 (0,4262)	-3,51 (0,0266)	1627177_x_at
<i>Transpac</i>	-0,66 (0,0349)	-0,03 (0,8064)	1640242_s_at

¹ schlechte Hybridisierung bei dieser Target-ID: Werte in w_{iso}^{1118} : 26 und 36; in Mu55: 42, 44 und 81



Ergebnisse der Analyse differentiell exprimierter *target* IDs mittels PANTHER® (www.pantherdb.org):

Von 747 *target* IDs (dereguliert mit $p < 0,05$ und $|\log_2 \text{fold}| > 1$) sind für 180 weder Gensymbol noch UniGeneID o.ä. verfügbar. 567 nicht-redundante Gensymbole wurden analysiert. Davon sind lediglich 344 in *gene ontology*-Datenbanken (GO) für *D. melanogaster* gelistet (entspricht 46% der veränderten *target* IDs und 61% der untersuchten Gene). In der „*Molecular Function*“-Datenbank erfolgten 363 Treffer, davon für 197 Gene „*molecular function unclassified*“ (desweiteren 23 Proteasen, 21 Hydrolasen, 19 TFs, 14 Oxidoreductasen, 10 NA-binding, 10 Transporter, 9 Phosphatasen, ...). Die Suche in der „*Biological Process*“-Datenbank ergab 397 Gentreffer, davon für 206 Gene „*Biological process unclassified*“ (39 Proteinmetabolismus & -modifikation, 24 Transport, 19 Nukleosid-, Nukleotid & NS-Metabolismus, 15 Lipid-, Fettsäuren- & Steroidmetab., 12 Entwicklungsprozesse, 10 „other metabolism“, 9 Signaltransduktion, ...).

Tabelle A3: Auswahl der stark ($|\log_2 x| > 1,7$) putativ von *mod(mdg4)*-52.2 oder -58.8 regulierten Gene, sortiert nach Stärke der Abweichung der Expression vom Referenzstamm w^{118}_{iso} .

Symbol	Name	$\log_2 x$	p-Wert
<i>stet</i> (FBgn0020248)	<i>rhomboid-2</i>	-4,80	0,0155
<i>Eip63E</i> (FBgn0005640)	<i>Pftaire</i>	-3,65	0,00009
<i>DmsR-2</i> (FBgn0035329)	<i>Dromyosuppressin receptor 2</i>	-3,33	0,0794
<i>Or42b</i> (FBgn0033043)	<i>Odorant receptor 42b</i>	-3,32	0,0615
<i>Ste12DOR</i> , Ste:CG33236 (multiple CG-Nummern)	<i>Stellate orphon</i>	-3,28	0,0127
<i>gt</i> (FBgn0001150)	<i>giant</i>	-3,23	0,0730

<i>Cyp12d1-d, Cyp12d1-p</i> (FBgn0050489,FBgn0053503)	<i>Cyp12d1-p, Cyp12d1-d</i>	-2,98	0,0017
<i>Sb</i> (FBgn0003319)	<i>stubbloid</i>	-2,76	0,0797
<i>Ama</i> (FBgn0000071)	<i>amalgam</i>	-2,75	0,0992
<i>sca</i> (FBgn0003326)	<i>scabrous</i>	-2,72	0,1663
<i>Cpr51A</i> (FBgn0033942)	<i>CG10112</i>	-2,72	0,0828
<i>Mst35Ba</i> (FBgn0013300)	<i>protamine</i>	-2,52	0,0142
<i>Obp46a</i> (FBgn0033508)	<i>Odorant-binding protein 46a</i>	-2,51	0,003
<i>cona</i> (FBgn0038612)	<i>corona</i>	-2,38	0,0037
<i>GstE1</i> (FBgn0034335)	<i>glutathione-S-transferase</i>	-2,30	0,0005
<i>alc</i> (FBgn0033383)	<i>beta homologue</i>	-2,28	0,1426
<i>Task6</i> (FBgn0038165)	<i>Task6</i>	-2,21	0,0025
<i>PFE</i> (FBgn0032661)	<i>Pray For Elves</i>	-2,16	0,0714
<i>kay</i> (FBgn0001297)	<i>shroud</i>	-2,14	0,0712
<i>Kif3C</i> (FBgn0039925)	<i>Kif3C</i>	-2,12	0,0013
<i>fan</i> (FBgn0028379)	<i>farinelli</i>	-2,08	0,0464
<i>Pxd</i> (FBgn0004577)	<i>Peroxidase</i>	-1,83	0,0374
<i>to</i> (FBgn0039298)	<i>takeout</i>	-1,82	0,0031
<i>Taf12L</i> (FBgn0031623)	<i>ryan express</i>	-1,81	0,1064
<i>Cyp12d1-d</i> (FBgn0053503)	<i>Cyp12d1-d</i>	-1,77	0,0325
<i>HLHm7</i> (FBgn0002633)	<i>Enhancer of split m7</i>	-1,76	0,0887
hochreguliert			
<i>Gr39a</i> (FBgn0041244)	<i>Gustatory receptor 39a</i>	1,74	0,1427
<i>Pk34A</i> (FBgn0028410)	<i>Pk34A</i>	1,84	0,1034
<i>unc</i> (FBgn0003950)	<i>section 5</i>	1,87	0,0897
<i>GstD4</i> (FBgn0010040)	<i>Glutathione S transferase D4</i>	1,90	0,0972
<i>bsh</i> (FBgn0000529)	<i>brain-specific homeobox</i>	1,95	0,0081
<i>Fer1</i> (FBgn0037475)	<i>48 related 1</i>	1,96	0,1347
<i>Gr2a</i> (FBgn0027796)	<i>Gustatory receptor 2a</i>	2,04	0,0516

<i>Ntl</i> (FBgn0031934)	<i>CG7075</i>	2,34	0,0548
<i>Obp58d</i> (FBgn0034770)	<i>Odorant-binding protein 58d</i>	2,39	0,0748
<i>sha</i> (FBgn0003382)	<i>kojak</i>	2,47	0,1193
<i>Obp58c</i> (FBgn0034769)	<i>Odorant-binding protein 58c</i>	2,50	0,0085
<i>dmrt93B</i> (FBgn0038851)	<i>doublesex-Mab related 93B</i>	3,06	0,0611
<i>Osi19</i> (FBgn0037429)	<i>Osiris</i>	3,25	0,0047
<i>RacGAP84C</i> (FBgn0045843)	<i>RnRacGAP</i>	3,51	0,0405

Bei den mit Hilfe der Datensätze Rev31 und GG295 identifizierten Zielgenen für *mod(mdg4)*-52.2 und -58.8 ist Achtsamkeit vor einer Überinterpretation geboten. In der Revertante Rev31 konkurrieren die Spleißakzeptoren von nur noch 13 (statt über 30) isoformspezifischen Exons um den Spleißdonor am 3'Ende von Exon 4. Zudem gibt es starke Indizien für einen Übergang von *trans*- (intermolekular) zu *cis*-Spleißen (intramolekular) (siehe Kap.3.2.1), was aufgrund der Einschränkung von Freiheitsgraden der Koordination der Moleküle zu einer Erhöhung der mRNA-Mengen, also einer Überexpression der nicht deletierten Isoformen (im Fall von *mod(mdg4)*-56.3 mittels RT-qPCR bestimmt: circa Faktor drei) im Vergleich zur Wildtypsituation führen kann. Dies wiederum kann, wie der Ausfall von Isoformen, zur Deregulation von Zielgenen führen. Bei der differentiellen Analyse beider Datensätze wurden ca. 400 Target-IDs identifiziert (Auswahl siehe oben), deren mRNA-Menge in GG295 signifikant gegenüber w^{1118}_{iso} verändert ist, in Rev31 aber unverändert (unterhalb der Signifikanzgrenze) oder gegenteilig reguliert ist.

A2.5 *D. virilis-mod(mdg4)*-Konstrukte ohne etablierte Transgene

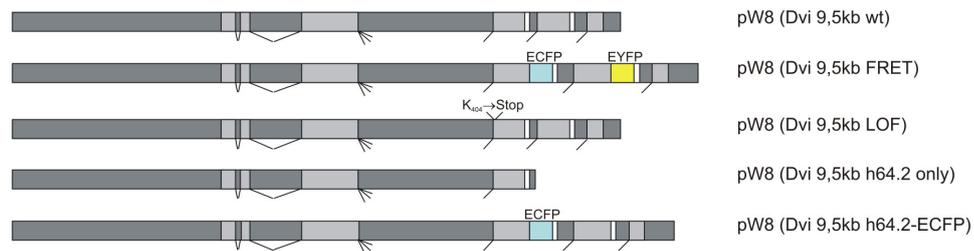


Abbildung A4. Im Rahmen der Arbeit erstellte *D. virilis-mod(mdg4)*-Konstrukte, von denen jedoch keine Transgene etabliert werden konnten. Bei pW8 (Dvi 9,5kb wt) handelt es sich um eine verkürzte Version des 11,5kb großen Konstrukts, das die Grundlage für die $P(w^+ Dvi 11,5kb)$ -Transgene bildet, ohne Mutation. Mit dem Konstrukt pW8 (Dvi 9,5kb FRET) sollte eine mögliche Colokalisation der Proteinisoformen *Dvi-Mod(mdg4)*-64.2 und -60.1 untersucht werden durch Fluoreszenzenergietransfer (FRET) von ECFP auf EYFP, die jeweils C-terminal an die Isoformen fusioniert wurden (pW8 (Dvi 9,5kb h64.2-ECFP) ist eine Variante dieses Konstrukts ohne EYFP-Fusion an h60.1). Bei pW8 (Dvi 9,5kb LOF) handelt es sich um eine *loss of function*-Mutante der Isoform *Dvi-Mod(mdg4)*-h64.2 durch Austausch der zweiten, vom isoformenspezifischen Exon codierten Aminosäure (K_{404}) gegen ein Stopcodon. Mit pW8 (Dvi 9,5kb h64.2 only) sollte ein Transgen etabliert werden, das neben dem gemeinsamen Teil lediglich das isoformenspezifische Exon von *Dvi-mod(mdg4)*-h64.2 enthält.

A2.6 Phylogramm verschiedener *mod(mdg4)*-Homologen-FLYWCH-Sequenzen

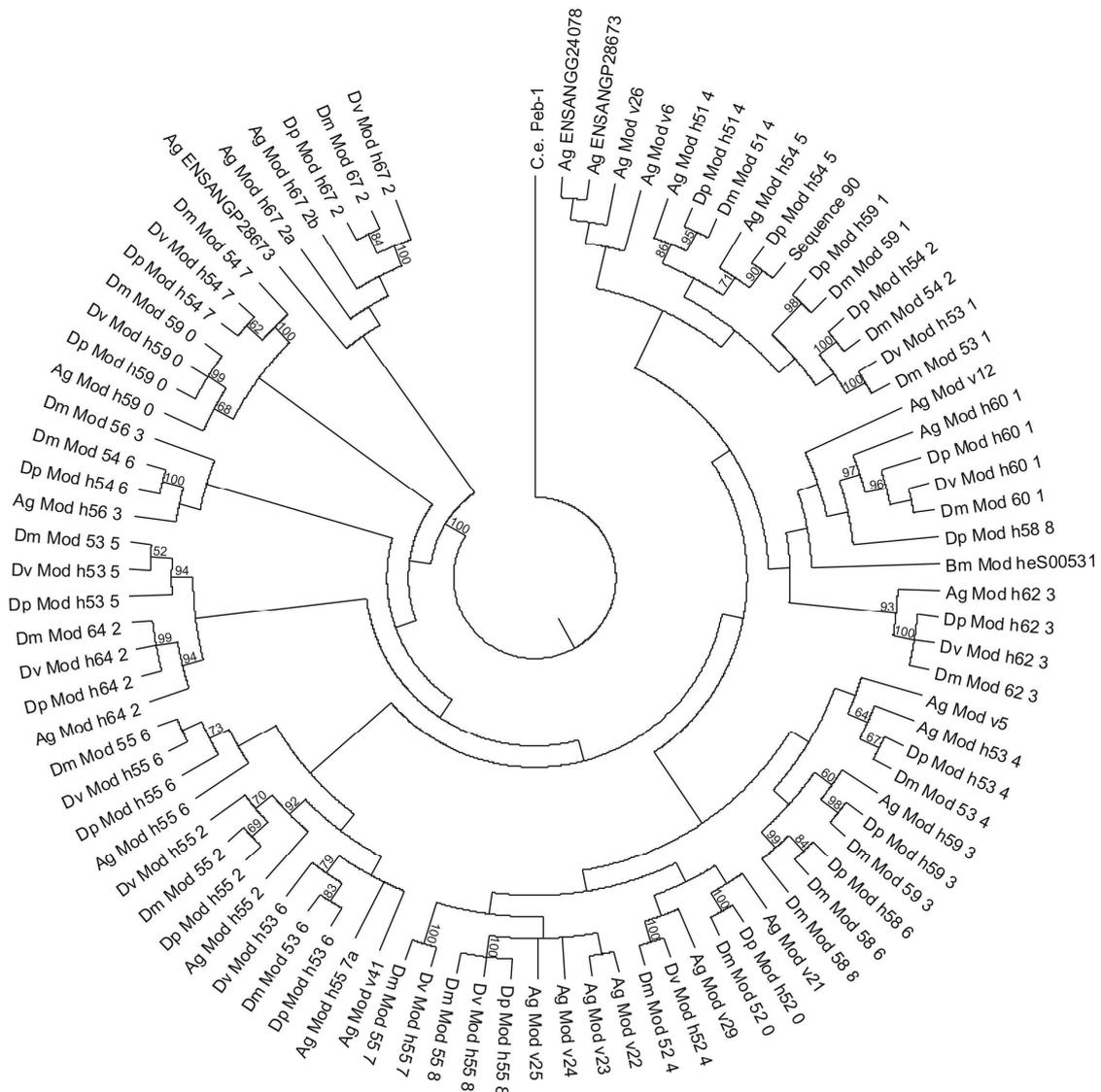


Abbildung A5: Ergebnis der phylogenetischen Analyse der FLYWCH-Domäne von Proteinen mit zu *Mod(mdg4)*-Proteinen analoger Domänenstruktur (N-Terminus enthält eine BTB/POZ-Dimerisierungsdomäne und der C-Terminus die FLYWCH-Domäne). Die Ausnahme bildet die FLYWCH-Domäne des *C. elegans*-Proteins Peb-1, das als „Außengruppe“ für die Erstellung des Phylogramms diente. Gezeigt ist der *strict consensus*-Baum als Zusammenfassung der 170 kürzesten Phylogramme der *maximum parsimony*-Analyse (Länge=1960 Schritte; CI=0,399). Die Werte über einigen Ästen (*bootstraps*) stehen für das Vorhandensein des Astes in Prozent bei 100-facher Wiederholung der *Bootstrapping*-Analyse. Die Länge der radialen Äste entspricht im *strict consensus*-Baum **weder** der Anzahl der Substitutionen **noch** ist sie ein Maß für die Zeit der getrennten evolutionären Entwicklung der die Proteine codierenden Gene bzw. der Spezies. Software: MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007)

Ag: *A. gambiae*; Bm: *B. mori*; Ce: *C. elegans*; Dm: *D. melanogaster*; Dp: *D. pseudoobscura*; Dv: *D. virilis*

Publikationsliste

Soling, A., Sackewitz, M., Volkmar, M., Schaarschmidt, D., Jacob, R., Holzhausen, H.-J., and Rainov, N.G. (2005). Minichromosome Maintenance Protein 3 Elicits a Cancer-Restricted Immune Response in Patients with Brain Malignancies and Is a Strong Independent Predictor of Survival in Patients with Anaplastic Astrocytoma. *Clin Cancer Res* *11*, 249-258.

Gabler, M., Volkmar, M., Weinlich, S., Herbst, A., Dobberthien, P., Sklarss, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Kress, H., Reuter, G., *et al.* (2005). Trans-splicing of the mod(mdg4) complex locus is conserved between the distantly related species *Drosophila melanogaster* and *D. virilis*. *Genetics* *169*, 723-736.

Lebenslauf

persönliche Daten:

Name	Michael Volkmar
geboren	21. Juni 1976 in Bad Langensalza/Thüringen
Nationalität	deutsch
Familienstand	verheiratet

Ausbildung:

1983 – 1985	Pestalozzi-Schule, Sömmerda
1985 – 1990	Karl Marx-Obschule, Sömmerda
1990 – 1995	Albert Schweitzer-Gymnasium, Sömmerda, Abitur 1995
1995 – 1996	Grundwehrdienst
1996 – 2001	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2000 – 2001	Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Thema: „Matrixunterstützte Reaktivierung von rekombinant hergestellten Proteinen“
2001 – 2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Neuroonkologischen Labor an der Klinik für Hirnchirurgie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2002 – 2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 2008	wissenschaftlicher Mitarbeiter im „Laboratoire de Epigenetique du Cancer“ der Freien Universität Brüssel (U.L.B.)

Halle, den 13. März 2010

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 13. März 2010

Danksagung

Dr. Rainer Dorn danke ich für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas, die Einführung in genetische Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*, die ständige Diskussionsbereitschaft, das kritische Abwägen der Durchführbarkeit von Experimenten und seine Hilfe bei umfangreichen Kreuzungen.

Bei Prof. Dr. Gunter Reuter bedanke ich mich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Arbeitsgruppe Drosophilagenetik am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität durchzuführen, die zahlreichen Ressourcen, auf die ich dank seiner zurückgreifen konnte sowie für zahlreiche interessante und mitunter spätabendliche Diskussionen.

Mauela Gabler danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die Anfertigung immuncytologischer Analysen, die ausgezeichnete Zusammenarbeit und Arbeitsteilung im Labor, die Kaffeepausen, etc. pp.

Bei Andrea Dörfel, Tobias Balschun, den Diplomanden und Praktikanten des Labors Dorn bedanke ich mich für die Hilfe bei Experimenten, die Revertanten und die Denkanstöße aus den Diskussionen.

Der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität danke ich für die freundliche Aufnahme und die gute Arbeitsatmosphäre.

Besonderer Dank für Zuspruch wenn ich den brauchte, für Ablenkung wenn sie nötig war und für immerwährende Unterstützung gilt meiner Familie und am allermeisten Ute.