

Die Kontrolle von Histonmodifikationen durch nicht-kodierende RNAs und Ecdyson-*Signalling*

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften -
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg**

vorgelegt

von Frau Claudia Lein, geb. Nickel
geb. am 04.12.1982 in Leipzig

Gutachter:

Prof. Dr. G. Reuter

Prof. Dr. A. Imhof

Prof. Dr. P. Stadler

Termin der Verteidigung: 21.04.2015

Abkürzungsverzeichnis

ac	Acetylierung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
<i>D.ere</i>	<i>Drosophila erecta</i>
<i>D.mel</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>D.pse</i>	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
<i>D.sec</i>	<i>Drosophila sechellia</i>
<i>D.sim</i>	<i>Drosophila simulans</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EST	<i>expressed sequence tag</i>
<i>E(var)</i>	Enhancer of Variegation
HDAC	Histondeacetylase
H3K4	Lysin 4 von Histon H3
H3K9	Lysin 9 von Histon H3
H3K27	Lysin 27 von Histon H3
H4K20	Lysin 20 von Histon H4
KMTase	Histonmethyltransferase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<i>lacZ</i>	<i>β-Galactosidase</i> -Gen
logFC	logarithmic Fold Change (logarithmische fache Änderung)
LSM	<i>Laser Scanning Mikroskopie</i>
me	Methylierung
miRNA	<i>messenger-like non-coding RNA</i> (mRNA-ähnliche nicht-kodierende RNA)
ncRNA	<i>non-coding RNA</i> (nicht-kodierende RNA)
Nt	Nukleotid
ORF	<i>open reading frame</i> (offenen Leserahmen)
p	Phosphorylierung
PcG	Polycomb-Gruppenproteine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEV	Positionseffekt-Variegation
qPCR	quantitative (<i>Real-time</i>) PCR
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
SET	Su(var)3-9 / Enhancer of zeste / Trithorax
<i>Su(var)</i>	Suppressor of Variegation
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactosid

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden.....	7
2.1 Genetische Methoden	7
2.1.1 Anzucht der Fliegen.....	7
2.1.2 Verwendete Fliegenstämme.....	7
2.1.3 Generierung transgener Fliegenstämme.....	8
2.1.4 Generierung rekombinanter Fliegenstämme.....	9
2.1.5 Gal4-UAS-kontrollierte Transgenexpression.....	9
2.1.6 Herstellung einer Deletion durch P-Element-Ausbau.....	10
2.1.7 Herstellung einer <i>mlncRNA42E5-1</i> Nullmutante durch homologe Rekombination..	10
2.1.8 Herstellung von <i>w</i> Duplikationen mittels Inversionen.....	13
2.2 Molekularbiologische Methoden	14
2.2.1 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme	14
2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden	15
2.2.3 Isolation genomischer DNA.....	15
2.2.4 Isolation genomischer RNA.....	15
2.2.5 Reverse Transkription	16
2.2.6 RACE.....	16
2.2.7 Real-time-PCR	17
2.2.8 Inverse PCR	17
2.2.9 <i>Microarray</i>	18
2.2.10 RNA-Seq	18
2.2.11 Klonierung von Fusionskonstrukten	19
2.3 Immunzytologische Methoden	20
3. Ergebnisse	21
3.1 Neue mlncRNA-ähnliche Transkripte.....	21
3.1.1 Identifikation neuer mlncRNA-ähnlichen Transkripte in <i>Drosophila melanogaster</i> ..	21
3.1.2 Neue putative mlncRNA-Transkripte sind konserviert	23
3.1.3 Identifikation nicht-kodierender Transkripte	24
3.1.3.1 Fünf neue transkribierte Bereiche gehören zu annotierten Genen	24
3.1.3.2 Identifizierung zweier mlncRNA kodierender Loci.....	30
3.1.4 Funktionelle Analyse des neuen mlncRNA Transkripts <i>mlncRNA42E5-1</i>	32
3.1.4.1 <i>mlncRNA42E5-1</i> zeigt stadienspezifische Expression.....	32
3.1.4.2 Generierung eines <i>mlncRNA42E5-1-S1MS2</i> -Fusionstranskripts	33
3.1.4.3 Generierung einer <i>mlncRNA42E5-1</i> Deletion	36
3.1.4.4 Eine Deletion für <i>mlncRNA42E5-1</i> ist ein rezessiver PEV Suppressor und beeinflusst die Expression benachbarter Gene	38

3.1.4.5 <i>mlncRNA42E5-1</i> beeinflusst genomweite Expression in <i>Drosophila</i>	41
3.2 Ecdyson-Signalling und die Kontrolle epigenetischer Effekte	44
3.2.1 P-Insertionsmutanten beeinflussen die Transkriptmenge von <i>taiman</i>	44
3.2.2 Charakterisierung der Deletion <i>Df(2L)tai2</i>	47
3.2.3 Deletionen im <i>taiman</i> -Gen sind dominante Suppressoren für PEV	50
3.2.4 Die <i>taiman</i> -Mutante <i>tai^{61G1}</i> zeigt einen maternalen Suppressoreffekt.....	52
3.2.5 <i>EcR</i> -Suppressoreffekt Rettung.....	53
3.2.6 Mutanten des Ecdyson-Signallings beeinflussen Ecdyson-abhängige Expression .	55
3.2.7 Differentielle Expression von kodierenden und nicht-kodierenden RNAs in Embryonen von <i>taiman</i> -Mutanten	56
3.2.8 <i>taiman</i> -Mutanten weisen veränderte Expression der H3K4me3 spezifischen Demethylase LID auf.....	60
3.2.9 Transkriptionsanalysen von <i>nejire</i> und <i>Rpd3</i> in <i>taiman</i> -Mutanten	61
3.2.10 Transkriptionsanalysen von Histonmethyltransferase- und Histondemethylasegenen in <i>taiman</i> -Mutanten.....	63
3.2.11 <i>Su(var)3-7</i> , <i>Su(var)2-1</i> , <i>HP1a</i> , <i>HP1b</i> und <i>HP1c</i> sind nicht differentiell reguliert in <i>taiman</i> -Mutanten	64
3.2.12 Die Transkription des PRDM-Familienproteins <i>Blimp-1</i> ist in <i>Df(2L)tai2</i> beeinflusst	65
3.2.13 Die Transkription des BTB-Proteins Abrupt ist in <i>Df(2L)tai2</i> beeinflusst.....	67
3.2.14 <i>taiman</i> -Mutanten zeigen veränderte Expression von Kontrollfaktoren der Dosiskompensation	68
3.2.15 <i>taiman</i> -Mutanten weisen veränderte Expression von Faktoren der embryonalen Achsenbildung auf.....	70
3.2.16 <i>taiman</i> beeinflusst TGFβ-Signalling	74
4. Diskussion.....	77
4.1. Nachweis und Analyse nicht-kodierender polyadenylierter RNAs	77
4.1.1 Bioinformatisch vorhergesagte neue Introns gehören zu proteinkodierenden Transkripten	77
4.1.2 Identifizierung von neuen putativ nicht-kodierenden Transkripten.....	78
4.1.3 <i>mlncRNA42E5-1</i> ist ein rezessiver PEV-Suppressor und beeinflusst Genexpression	79
4.2 TAIMAN und die frühe Embryonalentwicklung	81
4.2.1 TAIMAN ist in frühembryonales Ecdyson-Signalling involviert.....	81
4.2.2 TAIMAN-abhängiges Ecdyson-Signalling beeinflusst die Expression Chromatin- modifizierende Enzyme	83
4.2.3 TAIMAN-abhängiges Ecdyson-Signalling beeinflusst Dosiskompensation X- chromosomaler Gene.....	87
4.2.4 TAIMAN-abhängiges Ecdyson-Signalling und die embryonale Achsenbildung.....	88
5. Zusammenfassung	92

6. Literatur	93
7. Anhang	104
7.1 Transgene Stämme	104
7.2 Intronpositionen, Oligosequenzen und Konservierung	106
7.3 Primerliste	111
Publikationsliste	117
Danksagung	118
Eidesstattliche Erklärung.....	119
Lebenslauf.....	120

1. Einleitung

Während der Ontogenese müssen sich verschiedene Zellen trotz gleicher genomischer DNA-Sequenz unterschiedlich vermehren und differenzieren. Koordiniert werden diese Vorgänge durch differentielle Expressionsmuster in verschiedenen Zelltypen und Entwicklungsstufen. Diese Prozesse werden epigenetisch gesteuert und an folgende Zellgenerationen weitergegeben, ohne die DNA-Sequenz zu verändern. Schon 1904 beobachtete Boveri, dass Chromatin während der Mitose zu Chromosomen kondensiert und anschließend wieder dekondensiert (Boveri, 1904). Dies wird durch eine Verpackung der DNA ermöglicht. Chromatin besteht nicht nur aus DNA, sondern weiterhin auch aus RNA und assoziierten Proteinen.

Durch jeweils zwei der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4, um welche sich die negativ geladene DNA wickelt, bildet sich das Nukleosom als kleinste Verpackungseinheit des Chromatins (Luger et al., 1997). Durch weitere Verpackung dieser 11nm Faser wird das Chromatin mittels Linker-Histon H1 weiter kondensiert zur 30nm Faser (Bartolome et al., 1994). An den aus dem Nukleosom herausragenden N-terminalen Enden der Histone können diese kovalent posttranslational modifiziert werden, wodurch Erkennungsstellen für spezifische Proteine entstehen (van Holde, 1988; Strahl & Allis, 2000). Mindestens acht verschiedene Modifikationen von mehr als 60 verschiedenen Aminosäuren konnten an Histonen festgestellt werden (Kouzarides, 2007). Die meisten Erkenntnisse konnten bisher über die kleinen kovalenten Modifikationen Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierungen zusammengetragen werden. Methylierung kann zusätzlich in mehreren Formen erfolgen, an Lysinen Mono-, Di-, oder Trimethylierung und an Argininen Mono- oder Dimethylierung, wodurch zusätzliche Komplexität erreicht wird.

Das transkriptionell aktive Euchromatin zeichnet sich durch Methylierung von H3K4 und H3K36 sowie durch Histonacetylierung und -phosphorylierung aus (Wang et al., 2001; Zhang & Reinberg, 2001; Santos-Rosa et al., 2002; Ebert et al., 2004). Beim transkriptionell weitgehend inaktiven Heterochromatin lässt sich eine weitere Unterteilung vornehmen. Zum einen in das durch Bindung von Polycomb-Gruppen-Proteinen und H3K27 Methylierung charakterisierte fakultative Heterochromatin, welches hauptsächlich Entwicklungsgene reguliert indem es zeitlich, räumlich oder erblich bedingt wieder euchromatisiert vorliegen kann (Sparmann & van Lohuizen, 2006; Trojer & Reinberg, 2007). Zum anderen in das konstitutive Heterochromatin, markiert durch H3K9-Trimethylierung (H3K9me3), H3K27-Monomethylierung (H3K27me1) und H4K20me3 in Säugern und methyliertes H3K9, H3K27 und H4K20 in *Drosophila* (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003; Schotta et al., 2002 und 2004; Ebert

et al., 2004). Durch genomweite Lokalisierung von 53 Chromatinkomponenten konnten fünf prinzipielle Chromatinstadien identifiziert werden, welche den hohen Grad an spezifischer Genregulation realisieren können (Filion et al., 2010).

Die Bildung des Heterochromatins erfordert Wechselwirkungen vieler molekularer Komponenten. Die Positions-Effekt-Variation kann bei der Identifizierung solcher Faktoren sehr hilfreich sein. Dieses Phänomen besteht darin, dass ein Markergen aus seinem euchromatischen Locus in oder in die Nähe eines heterochromatischen Chromosomenbereiches gelangt ist. Hier müsste es nun teilweise oder ganz stillgelegt werden, da es dem lokalen Chromatinzustand unterworfen ist. Durch das sichtbare Markergen kann dieses *Silencing* phänotypisch beobachtet werden (Muller, 1930; Reuter & Wolff, 1981).

Im Falle des *In(1)^{w^{m4h}} Rearrangements* ist das *white* Gen durch eine Inversion in die Nähe des perizentromeren Heterochromatins gelangt. Wegen teilweiser Stilllegung des Gens durch Ausbreitung des Heterochromatins, kann ein gemotteltes Auge beobachtet werden. Sind Faktoren mutiert, welche die Heterochromatinausbildung beeinflussen, können diese mittels *In(1)w^{m4h} Rearrangement* identifiziert werden, indem das Markergen mehr [*Enhancer of variegation E(var)*] oder weniger [*Suppressor of variegation Su(var)*] *gesilenced* ist. Auf diese Weise konnten viele wichtige Faktoren zur Heterochromatinetablierung identifiziert werden (Reuter & Wolff, 1981, Reuter et al., 1982). Hierzu gehören die H3K9-spezifische Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9, das Heterochromatinprotein 1 [kodiert durch SU(VAR)2-5], das Zink-Finger-Protein SU(VAR)3-7 oder die H3K4 mono- und dimethyl-spezifische Histonmethylase SU(VAR)3-3 (Rea et al., 2000; Schotta et al., 2002; Eissenberg et al., 1990; Delattre et al., 2000; Rudolph et al., 2007).

Die Differenzierung des Chromatins in Eu- und Heterochromatin passiert schon früh in der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*. Schon im syncytiellen Blastoderm des 14. Kernteilungszyklus lässt sich erstmals die Rab1-Konformation nachweisen, bei der sich das Heterochromatin apikal und das Euchromatin basal anordnen (Foe et al., 1993). Durch welche Auslöser jedoch dieser Differenzierungsmechanismus initiiert wird ist bisher unbekannt. Mit der Identifikation des Ecdyson-Rezeptor-Koaktivator-Proteins TAIMAN als dominanten Suppressor des *In(1)w^{m4h}*-PEV-Systems konnte ein möglicher Kontrollfaktor identifiziert werden (Apelt, 2005).

taiman (tai) wurde erstmals identifiziert als Faktor, welcher das Migrationsverhalten von Border-Zellen in Ovarien beeinflusst (Bai et al., 2000). Das Protein ist verwandt mit p160-Steroidhormon-Rezeptor-Koaktivatorproteinen und homolog zum humanen AIB1 (SRC-3), welches in vielen steroid-abhängigen Krebsarten vermehrt exprimiert vorliegt (Bai et al., 2000; Anzick et al., 1997).

Der *Drosophila* Ecdyson-Rezeptorkomplex besteht aus den dimerisierenden Proteinen Ecdysonrezeptor (EcR) und Ultraspiracle (USP), welche durch die Ligand-abhängige Bindung des Steroidhormons Ecdyson zur Transkription aktiviert werden (Yao et al. 1992 und 1993). Der Koaktivator TAIMAN kann weiterhin durch seine Assoziation die Transkription des Heterodimers verstärken (Bai et al., 2000).

Das Protein kodiert für eine basic-Helix-Loop-Helix (bHLH)-Domäne, 2 PAS-Domänen und mehreren LXXLL-Motiven, welche die Ligand-abhängige Bindung an den Rezeptor vermitteln (McInerney et al., 1998). Die bHLH-Domäne beinhaltet eine besondere Funktion, denn über diese kann TAI mit dem BTB-Protein ABRUPT (AB) interagieren. Diese Interaktion zieht bei UAS-*abrupt*-Überexpressionslinien in Germarien eine Inhibierung der Border-Zell-Migration nach sich (Jang et al., 2009). Da *tai*-Mutationen ebenfalls zu Defekten der Border-Zell-Migration führen, liegt die Vermutung nahe, dass AB mittels TAI als Repressor für Ecdyson-Signalling wirkt (Bai et al. 2000; Jang et al. 2009). Weiterhin befinden sich im Protein mehrere Polyglutamin-Motive, welche benötigt werden, um die transkriptionelle Aktivierung zu vermitteln (Bai et al., 2000).

Ecdyson ist das Haupt-Steroidhormon in *Drosophila*. In adulten Fliegen wird es nur in Weibchen produziert und löst hier vermutlich die Vitellogenese aus (Bownes, 1989; Riddiford, 1993). In Embryos steigt der Ecdyson-Titer ab 2 Stunden nach Eiablage langsam an und erreicht den embryonalen Höhepunkt bei 8h (Richards, 1981; Maroy et al., 1988). In der Larve und Puppe entfaltet Ecdyson seine bekannteste Funktion, es steuert die Metamorphose. Hier findet die Ecdysonsynthese in den Prothorax-Drüsen statt und die s.g. Halloween Gene bilden die P₄₅₀-Hydroxylasen, die die Syntheseschritte katalysieren (Gilbert, 2004). Zu diesen Genen gehören *spook* (*spo*), *spookier* (*spok*), *phantom* (*phm*), *disembodied* (*dib*) und *shadow* (*sad*). Sie wurden charakterisiert als embryonisch letal und in die Kutikulaformation involviert (Jürgens et al., 1984; Wieschaus et al., 1984; Nüsslein-Volhard et al., 1984). Des Weiteren beeinflussen noch einige Gene den Syntheseweg indirekt. Hierzu gehören *neverland* (*nvd*), *shroud* (*sro*), *without children* (*woc*) und *ecdysoneless* (*ecd*).

Lange war unklar welchem Zweck der embryonale Ecdyson-Puls dient. Er ist am höchsten bevor die Kutikuladeposition beginnt (Hillman & Lesnick, 1970). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ecdyson auch während der Embryogenese die Morphogenese, nämlich die Keimband-Retraktion, Kopf-Involution und morphogenetische Bewegungen welche die erste Larve bedecken, koordiniert (Kozlova & Thummel, 2003).

Der EcR-USP-Rezeptor ist in der emtraembryonischen Amnioserosa erstmals aktiviert. Diese scheint die Quelle für aktives Ecdysteroid in frühen Embryonen darzustellen (Kozlova & Thummel, 2003). Da gerade in der frühen Embryogenese die Differenzierung des Chromatins stattfindet und auch ein Zusammenhang zwischen *tai*

und Heterochromatisierung gezeigt wurde (Apelt, 2005; Lein, 2011), sollte dieser Sachverhalt weiterhin untersucht werden.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass TAIMAN sich in polytären Speicheldrüsenchromosomen in Interbanden befindet (Lein, 2011). Außerdem konnte der beobachtete Suppressoreffekt von *tai*-Mutanten auf das *In(1)w^{m4h}*-PEV-System mittels ChIP-Experimenten begründet werden. Der am *w^{m4h}*-Locus vorliegende H3K9me2-Gradient ist signifikant reduziert in der hypomorphen *tai*-Insertionsmutante *5-SZ-3139r* (Lein, 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nicht nur *taiman*, sondern auch andere am Ecdyson-Signalling beteiligte Faktoren (*EcR*, *dib* und *woc*) dominante Suppressoren für *In(1)w^{m4h}*-PEV und somit in die Kontrolle der Heterochromatinbildung und Etablierung des heterochromatischen *Gensilencings* involviert sind (Lein, 2011). Das ebenfalls untersuchte *sad* stellte allerdings keinen dominanten Suppressor für *In(1)w^{m4h}*-PEV dar (Apelt, persönliche Mitteilung).

So wirkt sich die Reduktion von Ecdyson-Signalling drastisch auf die frühe Embryonalentwicklung aus. Die Embryonen der *tai*-Mutanten *5-SZ-3139r* und *Df(2L)tai2* zeigen eine verminderte H3K9 Trimethylierung, sowie verstärkte H3K9 Acetylierung, H3K4 Trimethylierung und H3K27 Trimethylierung. Da die Methylierungsstufen des Histons H3K4me1 und -me2 unverändert vorliegen, H3K4me3 aber signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist, wurden die Mutanten auf die H3K4me3-spezifische Demethylase LID untersucht (Lein, 2011). In Embryonen ergab sich eine Reduktion der LID-Proteinmenge im Vergleich zum Wildtyp (Lein, 2011). Ebenso konnte eine verstärkte Bindung der H3K9-spezifische Acetyltransferase RPD3 an das Chromatin festgestellt werden (Lein, 2011).

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb weitere Kenntnisse zum Zusammenhang des Ecdyson-Signallings und der Etablierung heterochromatischen *Gensilencings* gewonnen werden. Hierzu sollte ein *Microarray* mit verschiedenen Mutanten Hinweise auf Zielgene des Ecdyson-Signallings in frühen Embryonen liefern und weitere transkriptionelle Untersuchungen dieser folgen.

In den letzten Jahren konnten auch immer mehr nicht-kodierende Transkripte als involviert in die Genregulation und damit auch die Zustandsänderung von Chromatin identifiziert werden. RNAs wurden seit dem Konzept der messengerRNAs (mRNAs) als Zwischenstufe zwischen der kodierenden DNA und dem Effektorprotein angesehen (Jacob & Monod, 1961). Als einzige Ausnahmen galten später kleine RNAs, die strukturelle Komponenten der Zellorganellen darstellen, wie tRNAs und rRNAs. Eine nicht-kodierende RNA in Eukaryoten wurde erstmals 1990 in Mäusen beschrieben, die große RNA *H19* (Brannan, 1990). Seither wuchs die Anzahl entdeckter und charakterisierter nicht-kodierender RNAs stetig. Man geht sogar so weit zu schätzen,

dass lediglich weniger als 2% des menschlichen Genoms für Proteine kodieren und die Mehrheit nicht-kodierende RNAs darstellen (Djebali, 2012).

Nicht-kodierende RNAs haben eine hohe Dichte an Stopp-Codons und ihnen fehlen somit umfangreiche ORFs. Sie werden nach ihrer Größe und Funktion eingeteilt in microRNAs (ca. 23nt), piRNAs (26-31nt), smallRNAs (20-300nt) und largeRNAs (300-10000nt).

MicroRNAs regulieren mittels *post-transcriptional silencing* hunderte von Genen. Sie können an komplementäre Basen im 3'UTR von mRNAs binden und reprimieren so die Translation oder induzieren Degradation der mRNA (Bartl, 2004; Krol et al., 2010). Die erste charakterisierte miRNA war *lin-4* aus *C.elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Danach folgte im gleichen Locus die Identifikation der *let-7* miRNA (Reinhardt et al., 2000). Beide haben wichtige Funktionen in der Steuerung von Entwicklungsprozessen wie der Metamorphose und für beide konnten sowohl in *Drosophila* als auch in anderen Spezies Homologe identifiziert werden (Pasquinelli et al., 2000).

Piwi-interacting RNAs (piRNAs) wurden durch ihre Assoziation mit PIWI benannt (Girard et al., 2006). Sie sind keimbahnspezifisch und spielen eine Rolle beim *Repeat Silencing* und der Regulation von DNA-Methylierung im Zusammenhang mit Genexpression (Brennecke et al., 2007). Zu smallRNAs lassen sich siRNAs, snoRNAs und rasiRNAs zählen.

Die Mitglieder der Gruppe der langen nicht-kodierenden RNAs (lncRNAs) sind sowohl in der Größe als auch funktionell sehr heterogen. Viele können auch als *messenger-like* ncRNAs (mlncRNAs) bezeichnet werden, denn sie werden durch RNA-PolymeraseII transkribiert, gecapped, polyadenyliert und oft gespleißt (Erdmann et al. 2000; Rymarquis et al., 2008; Carninci et al. 2005; Kapranov et al. 2007; Ponjavic et al. 2007). Sie können sowohl Vorläufer-RNA für smallRNAs sein, als auch ihre Funktion als große RNA ausüben. Vielfach werden lncRNAs zu den regulatorischen RNAs gezählt, da sie in sehr unterschiedlichen Weisen die Genregulation von Effektorgenen beeinflussen.

In ihrer Wirkweise können lncRNAs sowohl lokal (*in cis*) auf andere Gene wirken, als auch *in trans* auf weit entfernte genomische Bereiche. Häufig wirken sie in Zusammenarbeit mit Chromatin-modifizierenden Enzymen, um den Chromatinzustand zu verändern und dadurch Genexpression zu kontrollieren. Ein sehr bekanntes Beispiel ist dabei die ncRNA *Xist*, welche *in cis* die X-Inaktivierungen bei weiblichen Säugern induziert (Clemson et al., 1996). Nachgewiesene Akkumulierung der H3K27 Trimethylierung legen eine Verbindung der *Xist* Funktion mit epigenetischen Faktoren nahe (Rouquelle et al., 2004). Weiterhin bekannt sind die langen ncRNAs *roX1* und

roX2 in *Drosophila*, welche zusammen mit dem Gendosiskomplex bei der Dosiskompensation in Männchen wirken (Amrein & Axel, 1997; Meller et al., 1997).

In der Abteilung Bioinformatik der Universität Leipzig (Prof. Dr. P. Stadler) wurde die Suche nach kleinen konservierten Introns im *Drosophila* Genom als Mittel zur Vorhersage von neuen putativen Transkripten genutzt. Da die überwiegende Zahl an protein-kodierenden Genen schon bekannt ist, durch verschiedenste andere Untersuchungen, zielte dieses Experiment eher auf die Vorhersage unbekannter, vornehmlich nicht-kodierender Gene ab. Da miIncRNAs wenig sequenzielle Konservierungen aufweisen allerdings, ebenso wie proteinkodierende Gene, meist konservierte Intronpositionen besitzen (Rodriguez-Trelles et al., 2006; Ponjavic et al., 2007), bot die Intron-Vorhersage eine gute Möglichkeit unbekannte miIncRNA Gene zu identifizieren. Hierzu wurden die Sequenzen von allen 12 sequenzierten *Drosophila*-Arten herangezogen und in jeder Art individuell die Introns vorhergesagt. Durch genomweite *Alignments* zwischen den Arten wurden orthologe Introns identifiziert, welche in mindestens 2 Arten in Donor- und Akzeptor-Stellen übereinstimmen mussten. Anschließend wurden diese Introns in falsch-positive und positive Introns mittels für Introns charakteristischen Eigenschaften sortiert (Hiller et al., 2009; Rose, 2010).

In der vorliegenden Arbeit sollten die erworbenen Daten molekular verifiziert werden, indem einige Kontrollintrons sowie die wahrscheinlichsten Kandidatenintrons mittels RT-PCR hinsichtlich Transkription überprüft werden sollten. Weiterführende Untersuchungen an putativen miIncRNAs sollten folgen und gegebenenfalls miIncRNAs funktionell charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Genetische Methoden

2.1.1 Anzucht der Fliegen

Alle *Drosophila*-Stämme wurden auf Ampicillin-haltigem (100mM) Futter gehalten. Dieses bestand aus 1% Agar-Agar, 5% Sirup, 4% Rosinen, 3,8% Grieß, 5% Bierhefe, 0,1% Propionsäure und 0,6% Nipagin. Die Haltung der Stämme erfolgte bei 18°C. Kreuzungen wurden bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt.

Das Medium für Eiablagen zur Mikroinjektion oder Materialsammlung bestand aus 2% Agar, 10% Zucker, 0,1% Essigsäure und Aktivkohle.

2.1.2 Verwendete Fliegenstämme

Durch P-Element-Vektoren hergestellte transgene Linien sind in Tab.2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Verwendete Konstrukte zur Herstellung transgener Linien.

P-Element-Vektor	Stammbezeichnung
<i>pGS{mlncRNA42E5-1_3MS2S1}10</i>	TG10/1-13
<i>pGS{mlncRNA42E5-1_5MS2S1}6</i>	TG6/1-13
<i>pUASTattB{MS2-EGFP}2</i>	MS2-EGFP
<i>pGX-attP{Δ42E5-1}6</i>	EO42E5-1/1-9

Die verwendeten Stämme und Stabilisierungschromosomen sind in Lindsey und Zimm, 1992, bzw. FlyBase (2013) beschrieben und in Tab.2.2 aufgelistet.

Tab. 2.2: Verwendete Fliegenstämme. Aufgeführt sind Bezeichnung des Fliegenstammes, Genotyp und Herkunft. BL#=Bloomington Drosophila Stock Center, K#=Kyoto DGRC.

Stammbezeichnung	Genotyp	Herkunft
Isogener Stamm	$w^{1118}_{iso}; 2_{iso}; 3_{iso}$	BL#5905
zh-86Fb	$P\{hsp70-flp\}1, y^1 w^*; M\{3xP3-RFP.attP\}ZH-86Fb; M\{vas-int.B\}ZH-102D$	BL#23648
Balancer 2.Chr.	$w^{1118}; SM6a/Sco$	
Balancer 2./3.Chr.	$w^{1118}; SM6a/Sco; TM2, Ubx/TM6c, Sb$	
Balancer 3.Chr.	$w^{1118}; TM2, Ubx/TM6c, Sb$	
FLP für 2.Chr.	$y^1 w^{1118} P\{ry^{+7.2}=FLP\}3F_{iso}/Dp(1;Y)y^+ Y_{iso}; sna^{Sco}/SM6a; 3_{iso}$	BL#6416
Cre-Rekombinase	$y^1 w^{67c23} P\{y^{+MDint2}=Crey\}1b; sna^{Sco}/CyO$	BL#766
Transposase	$pn^1; ry^{506} Dr^1 P\{ry^{+7.2}=\Delta 2-3\}99B/TM6$	BL#1429

Stammbezeichnung	Genotyp	Herkunft
6935-hid	$y^1 w^*/Dp(2;Y)G, P\{w^{+mC}=hs-hid\}Y;$ $P\{ry^{+7.2}=70FLP\}23 P\{v^{+1.8}=70I-Scel\}4A/TM3,$ $P\{w^{+mC}=hs-hid\}14, Sb^1$	BL#25679
$tail^{61G1}$	$dp^{ov1} tail^{61G1} P\{neoFRT\}40A/CyO$	BL#6379
ab^1	ab^1	BL#203
ab^2	$ab^2 ix^2 bw^1 sp^2/In(2L)Cy, In(2R)Cy, Cy^1 dp^{v1}$ $Bl^1 L^4 sp^2$	BL#205
ab^{clu-1}	$w^*; ab^{clu-1} b^1 pr^1 c^1 px^1 sp^1/CyO$	BL#9585
5-HA-2891	$w^{1118}; P\{RS5\}ab^{5-HA-2891}$	K#125732
5-HA-2281	$w^{1118}; P\{RS5\}tail^{5-HA-2281}$	K#125583
CB-5878-3	$w^{1118}; P\{RS5\}tail^{CB-5878-3}$	K#123862
5-SZ-4051	$w^{1118}; P\{RS5\}tail^{5-SZ-4051}$	K#126310
5-SZ-3139	$w^{1118}; P\{RS5\}tail^{5-SZ-3139}$	K#125914
5-HA-1532	$w^{1118}; P\{RS5\}tail^{5-HA-1532}$	K#125240
CB-5460-3	$w^{1118}; P\{RS3\}tail^{CB-5460-3}$	K#123638
$Df(2L)tail2$	$w^{1118}; tail^{Df(2L)tail2}$	Apelt, 2005
Dp12	$w^{1118}; Dp(2L)12$	G.Reuter
Dp86	$w^{1118}; Dp(2L)86$	C.Nickel
dib^{e01927}	$w^{1118}; PBac\{RB\}dib^{e01927}$	BL#18000
$woc^{EY23360}$	$y1 w^{67c23}; P\{EPgy2\}woc^{EY23360}$	BL#22626
EcR^{Q50st}	$EcR^{Q50st}/SM6b$	BL#4895
EcR^{M554fs}	$EcR^{M554fs}/SM6b$	BL#4894
EcRE-lacZ 2	$y^* w^*; P\{EcRE.lacZ\}SS4$	BL#4516
EcRE-lacZ 3	$w^*; P\{EcRE.lacZ\}SS3$	BL#4517

2.1.3 Generierung transgener Fliegenstämme

Durch flankierende P-Element-*Repeats* können DNA-Moleküle in das Genom von *Drosophila melanogaster* integriert werden (Rubin und Spradling, 1982). Hierbei wichtig ist die Gabe einer Transposasequelle in Form eines zweiten Plasmids ($pP\{ry^+ \Delta 2-3\}$, Robertson et al., 1988), welche die zufällige Insertion des P-Elements ins Genom ermöglicht, aber aufgrund fehlender *P-Repeats* selbst nicht ins Genom integrieren kann. Der P-Element-Vektor mit dem gewünschten DNA-Molekül und die Transposasequelle werden in den posterioren Pol der Embryonen injiziert und die Insertion in das Genom der Keimzellen kann stattfinden.

Im Falle der Vektoren $pPGS$ und $pGX-attP$ (Tab.2.1) fand eine zufällige Integration ins Genom statt. Die aus der Injektion resultierenden Tiere wurden mit Balancerchromosomen gekreuzt um über das Segregationsverhalten den Integrationsort auf das Chromosom einzugrenzen. Zur genaueren Lokalisation wurden inverse PCRs durchgeführt (siehe 2.2.8).

Eine weitere Möglichkeit zur Integration gewünschter DNA-Elemente in das Genom ist die Sequenz-spezifische Rekombination mit dem Φ C31-System (Bischof et al., 2007). Die Φ C31-Integrase vermittelt hierbei eine Rekombination zwischen 2 verschiedenen *attachement*-Sequenzen. Die eine Sequenz (attP) befindet sich bereits an einer bekannten Stelle im Genom, die andere (attB) wird vor das zu integrierende DNA-Stück gelegt. Der gewünschte Vektor (*pUASTattB*, siehe Tab.2.1) wird ebenfalls in den posterioren Pol der Embryonen injiziert. Der dabei verwendete Stamm zh-86Fb (Tab.2.2) enthielt neben der attP-Stelle in der zytologischen Bande 86Fb auch eine Integrasequelle. Durch das folgende Rekombinationsereignis kommt es zur Integration des gewünschten DNA-Fragmentes in die Keimbahnzellen.

Die verwendeten Vektoren trugen als Markergen das *mini-white*-Gen, wodurch nach Rückkreuzung mit dem Ausgangsstamm eine erfolgreiche Integration im *white*¹¹¹⁸-Hintergrund durch Veränderung der Augenfarbe zu orange bis rot sichtbar wurde.

Transgene Fliegenlinien wurden für ein *mlncRNA42E5-1-S1MS2*, das Bindeprotein MS2-EGFP und ein Konstrukt zu Herstellung einer *mlncRNA42E5-1*-Deletion erstellt (Tab.2.1).

2.1.4 Generierung rekombinanter Fliegenstämme

Rekombinante Chromosomen wurden erzeugt durch Kreuzung der beiden gewünschten genetischen Elemente *in cis*. Diese transheterozygoten Weibchen wurden dann mit *w*¹¹¹⁸/Y; SM6a,Cy/Sco Männchen gekreuzt und die männlichen Nachkommen hinsichtlich beider genetischen Elemente untersucht. Wenn eine phänotypische Unterscheidung nicht möglich war, wurden Männchen einzeln mit *w*¹¹¹⁸; SM6a,Cy/Sco Jungfrauen verkreuzt und nach Befruchtung der Weibchen mittels genomischer DNA-Präparation und PCR Analysen auf das Vorhandensein beider genetischer Elemente untersucht. Aus den Nachkommen positiv getesteter Männchen wurden Stämme aufgebaut und das rekombinante Chromosom über ein *Balancerchromosom* stabilisiert.

2.1.5 Gal4-UAS-kontrollierte Transgenexpression

Die kontrollierte Transgenexpression in *Drosophila melanogaster* erfolgte nach dem Gal4/UAS-Prinzip. So genannte Treiberlinien ermöglichen, es durch gewebes- oder entwicklungsabhängige Promotoren, das *Gal4*-Gen kontrolliert zu exprimieren. Das dadurch entstehende GAL4-Protein bindet an den UAS-Promotor, der vor dem

Transgen gelagert ist, und die Expression des Transgens ist somit kontrollierbar. Verwendete Treiberlinien und deren Spezifikationen sind in Tab.2.3 aufgeführt.

Tab.2.3: Verwendete Gal4-Treiberlinien. Aufgeführt sind Bezeichnung des Fliegenstammes, Expressionsangaben, das inserierte P-Element sowie die Herkunft. BL#=Bloomington Drosophila Stock Center.

Bezeichnung	Expression	P-Element	Herkunft
actinGal4 2.Chromosom	ubiquitär, konstitutiv	$P\{w[+mC]=Act5C-GAL4\}25FO1$	BL#4414
actinGal4 3.Chromosom	ubiquitär, konstitutiv	$P\{w[+mC]=Act5C-GAL4(FRT.CD2).P\}S$	BL#30558

2.1.6 Herstellung einer Deletion durch P-Element-Ausbau

Zur Herstellung von Deletionen wurde im Falle von *taiman* ein P-Elementausbau gewählt. Hierbei wurde mittels Einkreuzen einer Transposasequelle ($\Delta 2-3Dr$) der Ausbau des P-Elements *CB-5460-3* induziert. Dieser Ausbau kann vollständig oder unvollständig erfolgen und bei einem kleinen Anteil können Teile der umgebenden DNA mit herausgerissen werden. Diese Fälle waren erwünscht und wurden mittels PCR auf ihre Größe hin untersucht und sequenziert.

2.1.7 Herstellung einer *mlncRNA42E5-1* Nullmutante durch homologe Rekombination

Um eine Deletion des *mlncRNA42E5-1*-Gens herzustellen, wurde die „ends-out“ Methode nach Huang et al., 2009 angewandt. Hierbei wurden sowohl 3' als auch 5' flankierende Bereiche der gewünschten Deletion kloniert und über den Vektor *pGX-attP* mittels Keimbahntransformation (siehe 2.1.3) ins Genom inseriert. Durch eine Flipase-Reaktion wurde die integrierte Fremd-DNA (Donor-Fragment) freigesetzt und es konnte eine homologe Rekombination mit dem ursprünglichen Wildtyp-Chromosomenstück (Target-Gen) stattfinden, welche zum Verlust des durch die flankierenden Bereiche begrenzten Chromosomenteils führt.

Hierbei wurden die Primer 5'PrimNotlfwd und 5'PrimNhelrev (Anhang Tab.S6) zur Generierung des 5' flankierenden Bereichs und 3'PrimSgslfwd2 und 3'PrimXholrev (Anhang Tab.S6) zur Generierung des 3' flankierenden Bereichs verwendet und über die im Primer integrierten Restriktionsschnittstellen in den *pGX-attP* Vektor kloniert (Abb.2.1A und B). Anschließend wurden mittels Keimbahntransformation transgene Fliegenlinien aufgebaut und die Insertion lokalisiert.

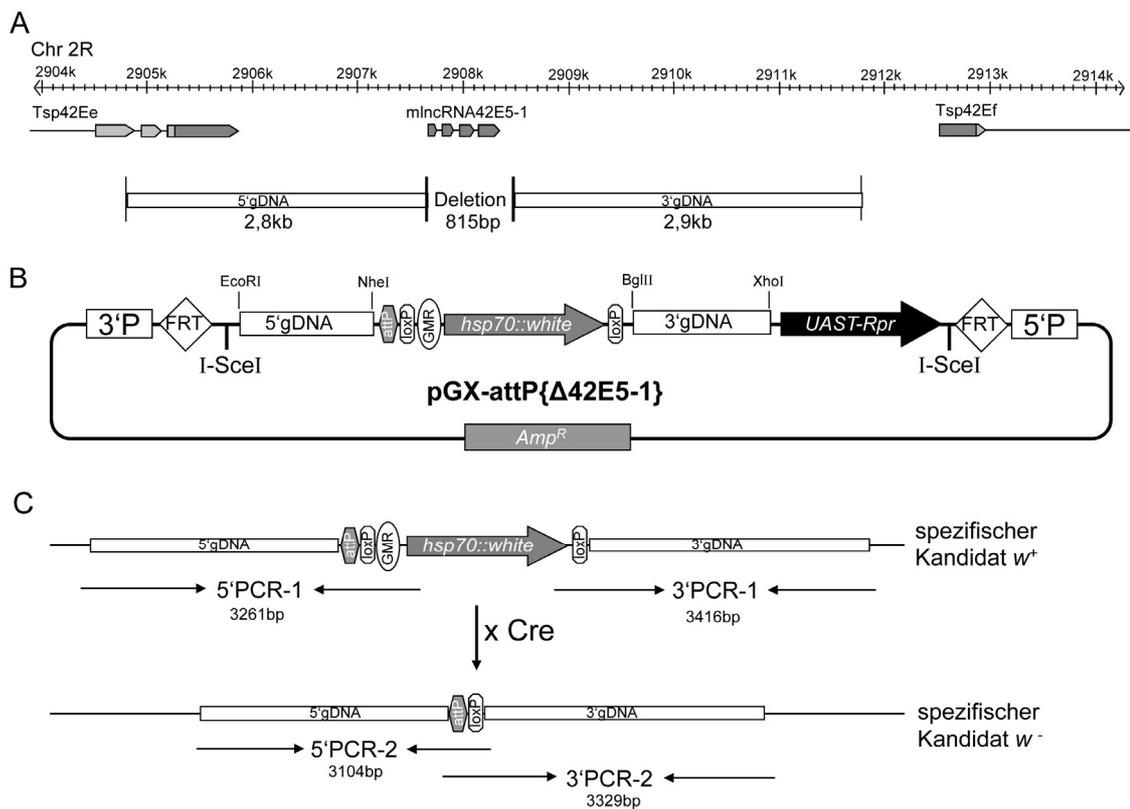


Abb.2.1: Konstruktion einer Deletion mittels homologer Rekombination. Zur Herstellung des Transformationsvektors *pGXattP{Δ42E5-1}* wurden die Bereiche 3' und 5' der gewünschten Deletion per PCR amplifiziert (**A**) und über Restriktionsschnittstellen in den Vektor kloniert (**B**). Mittels Keimbahntransformation wurde das Konstrukt ins *Drosophila melanogaster*-Genom integriert. Bei erfolgter homologer Rekombination zwischen freigesetzter Vektor-DNA und Genom entstand eine spezifische Kandidatenlinie, welche *white*-markiert war. Durch anschließende *Cre*-Rekombinase-Reaktion konnte dieses Markergen wieder eliminiert werden (spezifischer Kandidat w⁻). Die genetisch überprüften „spezifische Kandidaten“-Stämme wurden mittels verschiedener PCRs, sowohl in w⁺, als auch in w⁻, auf ihre korrekten Umbauten hin überprüft (**C**).

Zur weiteren Bearbeitung wurde die transgene Linie EO4 (*p{Δ42E5-1}*^{Rpr+w⁺}) herangezogen. Diese war auf dem 3. Chromosom lokalisiert und mittels *Reaper* (*Rpr*) und *white* (*w*) markiert (Abb.2.1; Anhang Tab.S1).

Wie aus dem Kreuzungsschema (Abb.2.2) ersichtlich, wurde die transgene Linie mit dem Stamm 6935-*hid* verkreuzt (*Targeting* Kreuzung). Dieser trug sowohl das zum Transgen-Ausbau wichtige hitzeschockinduzierte *SceI*, als auch das Gen *head involuted defective* (*hid*), welches bei Hitzeschock-induzierter Expression tödlich für die Embryonen ist. Da sich dieses Gen auf dem Y-Chromosom befand, konnten keine männlichen Nachkommen entstehen, was die Anzahl der zur Verfügung stehenden jungfräulichen Weibchen erhöhte. Die verkreuzten Weibchen wurden nach einem Tag vom Medium genommen und die Embryonen noch einen weiteren Tag bei 25°C inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock für 90 min. bei 38°C im Wasserbad. Die aus dieser Kreuzung entstandenen Weibchen wurden mit *Balancer*-Männchen für das Zielchromosomen verkreuzt, wobei in diesen Weibchen das Donor-DNA-Fragment vorübergehend freigesetzt war, und somit das erwünschte Rekombinationsereignis

stattfinden konnte (*Screening Kreuzung*). Die Nachkommen mit w^+ -Augenphänotyp waren daher von besonderem Interesse, denn hier hatte sich das Donor-DNA-Fragment in das Genom integriert.

Targeting-Kreuzung:

$$\frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{P\{\Delta 42E5-1\}^{Rpr+ w^+}}{P\{\Delta 42E5-1\}^{Rpr+ w^+}} \times \frac{yw}{Y, hs-hid}; \frac{+}{+}; \frac{hs-FLP, hs-I-SceI}{TM3, Sb hs-hid}$$

Hitzeschock 38°C

Screening-Kreuzung:

$$\frac{yw}{w}; \frac{+}{+}; \frac{P\{\Delta 42E5-1\}^{Rpr+ w^+}}{hs-FLP, hs-I-SceI} \times \frac{w}{w}; \frac{SM6, Cy}{Sco}; \frac{+}{+}$$

Donor-DNA-Fragment vorübergehend freigesetzt → homologe Rekombination

Mapping-Kreuzung:

$$\frac{w}{w}; \frac{SM6, Cy}{Sco}; \frac{+}{+} \times \frac{w}{w}; \frac{Ziel^{*w^+}}{SM6, Cy}; \frac{?}{+}$$

w^+ -Marker ist auf 2. Chromosom?

nein

falsch-positiver Kandidat

ja

vorläufiger Kandidat

Eliminierungs-Kreuzung:

$$\frac{w}{w}; \frac{actGal4}{SM6, Cy}; \frac{+}{+} \times \frac{w}{w}; \frac{Ziel^{*w^+}}{SM6, Cy}; \frac{+}{+}$$

$$\frac{w}{w}; \frac{actGal4}{Ziel^{*w^+}}; \frac{+}{+}$$

Rpr⁺: nicht spezifische Kandidaten

Rpr⁺: spezifische Kandidaten

Cy⁺-Tiere sind lethal oder zeigen aufgeblasene Flügel Phänotypen

Cy⁺-Tiere zeigen keine Lethalität

Stammaufbau:

$$\frac{w}{w}; \frac{Ziel^{*w^+}}{SM6, Cy} \times \frac{w}{w}; \frac{Ziel^{*w^+}}{SM6, Cy}$$

Abb.2.2: Kreuzungsschema zur Herstellung einer *mlncRNA42E5-1* Deletion. Unter Verwendung der „ends-out“-Methode nach Huang et al, 2009 wurde ein Transgen-enthaltendes Weibchen mit einem *hs-hid*-Männchen gekreuzt und die Embryonen einem Hitzeschock ausgesetzt. Dadurch wurden das *FLP*-, das *SceI*- und das *hid*-Gen exprimiert, was zum Ausschneiden des Donor-DNA-Fragmentes (*FLP*, *SceI*) führte und zum Absterben aller männlichen Nachkommen (*Hid*). Die weiblichen Nachkommen wurden mit einem *Balancer*-Stamm für das Ziel-Chromosom gekreuzt und in den resultierenden Nachkommen war die putative homologe Rekombination zwischen freigesetzter Donor-DNA und dem Zielgen erfolgt. Durch die nun folgenden Kreuzungen wurden durch Lokalisation des *white*-Markergens und Überprüfen auf das Vorhandensein des *Rpr*-Gens falsch-positive Kandidatentiere aussortiert. Der aufgebaute Stamm der positiven Kandidaten wurde zur weiteren PCR-Verifizierung eingesetzt.

Durch Segregationsanalysen des w^+ -Markers konnte festgestellt werden, ob er sich auf dem Zielchromosom befindet.

Vorläufige Kandidaten wurden mit einer weiteren Kreuzung auf ihren korrekten Ausbau hin überprüft (Eliminierungs-Kreuzung). Mittels ubiquitär *Gal4*-exprimierender Treiberlinie wurden dabei die Kandidaten auf das Vorhandensein des UAS-kontrollierten *Rpr*-Gens untersucht (Abb.2.2). Bei korrekter homologer Rekombination sollte es sich nicht mehr im Genom befinden. *Rpr*⁺-Tiere sind letal oder zeigen aufgeblasene Flügel-Phänotypen. Diese Stämme wurden verworfen. Spezifische Kandidaten (*Rpr*⁻), welche keine Letalität zeigten, wurden mittels PCR genauer auf ihren Ausbau hin untersucht (Abb.2.1C) und gleichzeitig wurden die putativen Mutanten durch *Balancer*-Chromosomen stabilisiert (Abb.2.2).

2.1.8 Herstellung von w Duplikationen mittels Inversionen

Mit Hilfe der DrosDel-P-Element Kollektion lassen sich mittels FRT-Rekombinationen Deletionen und Duplikationen herstellen (Golic & Golic, 1996). Es sollte auf eine neue Methode zur w Duplikationsherstellung zurückgegriffen werden, da Tandem-Duplikationen schon als instabil charakterisiert wurden (Sturtevant, 1925; Tsubota, 1991; Peterson & Laughnan, 1963).

Hierzu wurden zunächst *cis*-Kombinationen von zwei *remnant* P-Insertionslinien hergestellt und mittels PCR auf das Vorhandensein beider Elemente überprüft. Hierbei war es wichtig, dass ihre FRT-Stellen entgegengesetzt orientiert waren (Abb.2.3). In dieser Konstellation kommt es bei Flipase gesteuerter FRT-Rekombination, ausgelöst durch Hitzeschock in Embryonen, zur Inversion der zwischen den FRT-Stellen gelegenen Sequenzen (Golic & Golic, 1996). Diese hitzegeschockten Fliegen wurden anschließend mit einem Balancer-Tier, z.B. w ; *SM6a,Cy/Sco*, gekreuzt und so die w^+ -Inversion in den Nachkommen stabilisiert.

Durch Kombination von passenden Inversionen *in trans* und Rekombination zwischen den Schwesterchromosomen, konnten Duplikationen isoliert werden indem die w^- Nachkommen der Kreuzung w ; *Inversion 1/Inversion 2* mit w ; *SM6a,Cy/Sco* selektiert und mit Balancerchromosomen stabilisiert wurden. Welche Inversionen miteinander kombiniert werden können, ist abhängig von ihrer Richtung und Lage der FRTs im *white*-Marker (Ryder et al., 2007).

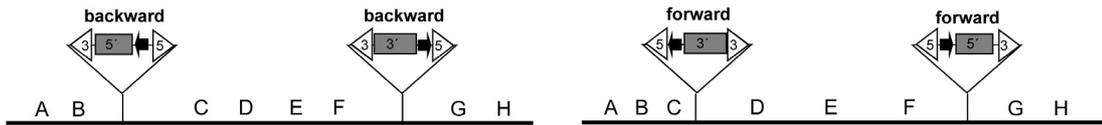
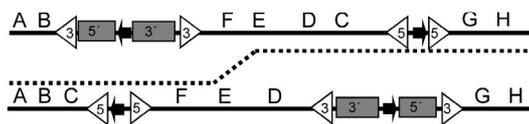
Cis-Kombinationen:**Inversionen: w^+** **Rekombination:****Duplikation: w** 

Abb.2.3: Schematische Übersicht zur Herstellung von w Duplikationen mittels Inversionen. Hierzu wurden *cis*-Kombinationen aus *remnant* P-Insertionslinien hergestellt. Bei entgegengesetzter Konstellation der FRT-Stellen kommt es bei durch Hitzeschock ausgelöster Flipase FRT-Rekombination zur Inversion der zwischen den FRT-Stellen gelegenen Sequenzen. Durch Kombination von passenden Inversionen *in trans*, können mittels Rekombination w Duplikationen isoliert werden. Die duplizierten Bereiche sind eingekreist.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA wurden die *E.coli*-Stämme DH5- α und Top10 (Invitrogen) verwendet (Tab.2.4).

Die Klonierungen von PCR-Produkten wurden mit den Vektoren *pGEM[®]-T* (Promega), *pCRTOPO[®]* (Invitrogen) und *pZerO[®]* (Invitrogen) durchgeführt.

Zur Transformation von *Drosophila* wurden die Vektoren *pPGS{UAS; w^+ }* (Schotta & Reuter, 2000), *pUASTattB* (Bischof et al., 2007) und *pGX-attP* (Huang et al., 2009) verwendet.

Tab.2.4: Zur Transformation verwendete Bakterienstämme und deren Genotypen.

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> DH5 α (Invitrogen)	<i>F⁻ Φ80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF)U169recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ^-</i>
<i>Escherichia coli</i> TOP10 (Invitrogen)	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (<i>Str^R</i>) endA1 nupG</i>

2.2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) oder im Großmaßstab mittels NucleoSpin® Plasmid Midipräparationskit (Macherey-Nagel) jeweils nach Angaben des Herstellers.

Restriktionen wurden mit Enzymen der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit (Macherey-Nagel) bzw. für Fragmente kleiner als 50 bp der Quiaex II-Kit (Quiagen) benutzt.

Für PCR-Reaktionen wurden GoTaq® DNA-Polymerase (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für PCR-Reaktionen, bei welchen eine *Proofreading*-Funktion der Polymerase erwünscht war, wurde iProof High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad) oder Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) anhand Herstellerangaben eingesetzt. Sequenzreaktionen wurden mit dem ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit nach Herstellervorgaben durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit dem Staden-Package, Version 2001.0 bzw. GCG-Package, Version 10.2. (Stratagene) nach Standardprotokoll (Saiki, 1988).

Alle verwendeten Primer inklusive Sequenzen sind im Anhang Tab.S6 aufgeführt.

2.2.3 Isolation genomischer DNA

Für eine Isolation von DNA aus einzelnen Tieren wurde die *single fly prep*-Methode verwendet (Gloor & Engels, 1992).

Zur Isolation größerer Mengen DNA aus mehreren Tieren fand die *Quick fly genomic prep* Anwendung (Huang & Rehm et al., 2009). Wobei die DNA letztlich in 2 µl H₂O pro eingesetzter Fliege, Larve oder Puppe resuspendiert wurde.

2.2.4 Isolation genomischer RNA

Die Isolation von RNA erfolgte unter RNase-freien Bedingungen. Fünfzig Fliegen, Larven, Puppen oder 1 mg Embryonen wurden in 1 ml TRIzol-Reagenz (Invitrogen) homogenisiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 0,2 ml Chloroform überschichtet. Nach 30 sec schütteln folgte eine Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur. An die 15 minütige Zentrifugation der Proben bei 13000xg und 20°C schloss sich die Fällung des Überstandes in frischen 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit

0,7 Vol Isopropanol für 15 min auf Eis und 30 min bei 13000xg und 4°C an. In einem Waschschrift wurde das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol 5 min bei 4°C und 7500xg zentrifugiert und danach die Flüssigkeit gründlich abpipettiert. Nach anschließendem 1-2 minütigem Trocknen wurde das Pellet in DEPC-behandeltem Wasser für 10 min bei 50°C gelöst und die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.5 Reverse Transkription

Für den Einsatz der RNA zur reversen Transkription musste sie zusätzlich DNase-behandelt werden. Hierzu wurde die RNA-Lösung mit DEPC-behandeltem Wasser, 10xDNase-Puffer und DNase (1 µl/µgRNA; Promega) versetzt und das Gemisch 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde pro 10 µl-Reaktion 1 µl DNase-Stop-Solution (Promega) zugegeben und 10 min. bei 65°C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren.

Die Reaktion aus dem DNase-Verdau wurde danach mit Random-Primer (0,5 µg/µg RNA) oder Oligo-dT-Primer (0,5 µg/µg RNA) versetzt und für 5 min auf 70°C erhitzt. Anschließend wurden dem Reaktionsgemisch auf Eis 5x Reaktionspuffer, 2,5 µl dNTPs (10 mM, Fermentas), 40 u RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega) und 1 u M-MLV-Reverse Transkriptase (Promega) zugegeben und das Gemisch mit DEPC-Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Die Reverse Transkription erfolgte bei 37°C für 60 min.

Für semiquantitative oder quantitative RNA-Analysen wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) laut Herstellerangaben zur Reversen Transkription verwendet. Im Anschluss wurde die cDNA mit dH₂O 1:10 verdünnt.

Jeweils 1-5 µl der somit hergestellten cDNA wurden für weitere PCR-Analysen eingesetzt.

2.2.6 RACE

Mit Hilfe der *Rapid Amplification of cDNA ends* (RACE)-Technik lassen sich durch spezielle PCR-Schritte die genauen 5' sowie 3' Enden von RNA-Transkripten bestimmen. Zunächst wurde die Gesamt-RNA einer Dephosphorylierung und einem Decapping unterzogen, damit anschließend ein RNA-Oligo mit bekannter Sequenz an das 5'-Ende ligiert werden konnte. Nach reverser Transkription konnten nun die bekannte Oligo-Sequenz (für das 5'-Ende), sowie der vorhandene Poly-A-Schwanz (für das 3'-Ende) als Anlagerungsstellen für Primer verwendet werden. Zusammen mit

internen genspezifischen Primern können dann verschachtelte PCRs durchgeführt und deren Produkte sequenziert werden.

Hierfür wurde das GeneRacer™ Kit (Invitrogen) laut Herstellerangaben genutzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in den *pGEM*[®]-*T* Vektor kloniert, in *E.coli* TOP10-Zellen transformiert und anschließend sequenziert. Die Sequenz wurde mit der Flybase-Datenbank verglichen und ausgewertet.

2.2.7 Real-time-PCR

Zur quantitativen Analyse der Transkriptmengen von Genen wurden quantitative Real-time-PCRs (qPCRs) durchgeführt. Hierfür wurde das IQ™SYBR®Green Supermix-PCR Kit und der IQ™5 Cyclor von BioRad entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Durch Messung der Fluoreszenz des SYBR®Greens nach jedem Zyklus der PCR können direkt Rückschlüsse auf die Ausgangskonzentrationen der Transkripte getroffen werden.

Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige biologische Replikate verwendet. Für jedes Primerpaar wurde die PCR-Effizienz ermittelt und für das Produkt eine Schmelzkurve erstellt. Die Auswertung der Messungen erfolgte mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl, 2001) und als Referenzgen diente *RpL32*. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Replikate als relative Expressionsrate im Vergleich zum Kontrollgenotyp. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels t-Test ermittelt und signifikante Ergebnisse entsprechend der p-Werte markiert: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

2.2.8 Inverse PCR

Zur Identifikation von unbekanntem Insertionsorten der P-Elemente wurde die Methode der inversen PCR nach Huang et al., 2000 angewendet. Es wurden die Restriktionsenzyme Hin6I, MspI und MboI zum Verdau der genomischen DNA verwendet. Nach der Selbstligation wurden die Primer 5`Pforw1 und 5`Prev1 und in der sich anschließenden verschachtelten PCR die Primer 5`Pforw2 und 5`Prev2 benutzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in *pGEM*[®]-*T* kloniert und vollständig sequenziert. Durch Sequenzvergleich mit der Flybase-Datenbank konnten die genauen Insertionsorte identifiziert werden.

2.2.9 Microarray

Mit den Mutanten $w^{m4h};5\text{-SZ-3139r}$ und $w^{m4h};Df(2L)tai2$ sowie mit dem Wildtyp $w^{m4h};+/+$ wurde ein *Microarray* mit einem Datensatz von kodierenden und nicht-kodierenden Transkripten in Zusammenarbeit mit Dr. J. Hackermüller (Fraunhofer IZI, Leipzig) und Prof. Dr. P. Stadler (Universität Leipzig) durchgeführt. Verwendet wurden immer 0-4h alte Embryonen, wobei im Falle der Mutante $w^{m4h};Df(2L)tai2$ homozygote Embryonen aus einer Kreuzung von $w^{m4h};Df(2L)tai2/Df(2L)tai2$ mit $w^{m4h}/Y;Df(2L)tai2/Df(2L)tai2$ gesammelt wurden.

Hierarchisches *Clustering* und Erstellung einer *Heatmap* wurde mit Genesis Version 1.7.6 (<http://genome.tugraz.at/genesisclient/>; Sturn et al., 2002) durchgeführt.

2.2.10 RNA-Seq

Mittels RNA-Seq wurden die Transkriptome von Männchen der Deletionsmutante $w;K166w$ und dem Wildtyp $w_{iso};+/+$ sowie 0-4h alte Embryonen der Deletionsmutante $w^{m4h};Df(2L)tai2$ und dem Wildtyp $w^{m4h};+/+$ verglichen. Hierfür wurde die RNA mittels Trizol-Methode extrahiert (2.2.4), von der Gruppe Dr. Krohn (Universität Leipzig) weiter aufgereinigt und ein polyA-primed RNA-Seq Protokoll durchgeführt. Von je drei Replikaten pro Genotyp wurde eine *Library* angefertigt, anschließend wurden diese gepoolt, um Datenverlust zu vermeiden. Die bioinformatischen Analysen wurden folgendermaßen von G. Hönig ausgeführt: Die sequenzierten *Read*-Bibliotheken der RNA-Seq wurden mit dem Adapter AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCC AGTCAC-Index-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG am 3' Ende der Sequenz *geclippt* und gegen das annotierte Referenzgenom (Lin et al., 2007, Stapleton et al., 2002) Flybase Release 5.54 (St. Pierre et al., 2014) von *Drosophila melanogaster* gemappt. Anschließend wurde die Anzahl der gemappten *Reads* aller Exons pro Gen extrahiert und als *Readcount* pro Gen für die Expressionsanalyse genutzt. *Clipping* und *Mapping* erfolgten mit der CLC Genomics Workbench (CLC Genomics Workbench 6.5.1 2014).

Die Expressionsanalyse der Daten erfolgte mittels dem Programm R (R Core Team 2013) unter Nutzung des Paketes EdgeR (McCarthy et al., 2012, Robinson et al., 2010, Robinson & Smyth 2007, Robinson & Smyth 2008). Dabei wurden die Expressionsdaten mittels *trimmed mean of M-Values* (Robinson & Oshlack 2010) normiert, die *common* und *tagwise dispersion* mithilfe der biologischen Replikate bestimmt und anschließend durch den *exactTest* (Robinson & Smyth 2007) entschieden, ob ein Gen differential exprimiert ist.

2.2.11 Klonierung von Fusionskonstrukten

Zur Untersuchung der Funktion und der Lokalisation eines Gens ist es von Vorteil es mit einem *tag* zu versehen. Da es sich beim untersuchten Gen um ein höchst wahrscheinlich nicht-kodierendes Gen handelte, konnten keine Protein-*tags* verwendet werden. Es wurde eine Kombination aus 2 RNA-*tags* verwendet. Diese RNA-Sequenzen bilden Sekundärstrukturen aus, welche an Proteine binden können. Somit wurde die Kombination aus einem 3xMS2-Hüllenproteinbindenden Hairpin (bindet das MS2-Hüllenprotein) und einem Streptavidin RNA-Aptamer (bindet Streptavidin) gewählt. Der *tag* (S1, MS2) wurde als 5`-3` und 3`-5` komplementäre Oligonukleotide synthetisch hergestellt von MWG bestellt und miteinander *annealed*. Hierzu wurden beide Oligonukleotide in einer Finalkonzentration von 100 nmol/ml zusammen mit 1x Annealing Puffer (10x=100 mM Tris-HCl, pH7; 1 M NaCl und 10 mM EDTA) in ein Reaktionsgefäß gegeben und 10 min auf eine 10°C höhere Temperatur erhitzt als die Schmelztemperatur der Oligos. Anschließend wurde das Gemisch zu RT gestellt, damit es langsam abkühlen konnte (ca. 1 h). Die erhaltenen dsDNA-Oligos wurden nachfolgend in den Vektor *pGEM*[®]-*T* zwischenkloniert. Durch verschachtelte PCR mit den Primern S1_fwd/S1_MS2_rev und MS2_S1_fwd/MS2_rev und anschließend S1_fwd/MS2rev (Anhang Tab.S6) konnte ein Fusions-PCR-Produkt aus MS2- und S1-Sequenz hergestellt werden.

Das Zielgen *mlncRNA42E5-1* wurde in *pGEM*[®]-*T* zwischenkloniert und mittels „*Quik ChangeII site directed Mutagenesis Kit*“ von Stratagene *in vitro* sowohl 5` als auch 3` vor dem putativen Poly-A-Signal mit einer SrfI-Restriktionsstelle versehen. Über diese wurden durch eine Ligation in Anwesenheit von SrfI die *tags* per Blunt-end-Ligation in das Gen eingebracht (abgewandelt von pCR-Script[®]-Prinzip, Stratagene). Diese Art der Ligation ist effektiv, da selbstligierte Plasmide immer erneut vom Restriktionsenzym erkannt und geschnitten werden. Plasmid, welches das gewünschte Fragment eingebaut hat hingegen, besitzt keine Restriktionsschnittstelle mehr und wird nicht erneut geschnitten. Hierzu wurden 1 µl 10x Puffer Universal SrfI (Stratagene), 1 µl 5 mM rATP, 0,2 µl SrfI (Stratagene) und 1,3 µl T4 DNA-Ligase (3 u/µl, Promega) zusammen mit Plasmid und Oligonukleotid in einen 10 µl Ansatz gegeben und 1,5 h bei RT inkubiert. Es folgte ein 10 min Hitzeschock bei 65°C um die Enzyme zu deaktivieren und danach die Transformation in *E.coli* mit 5 µl des Ansatzes.

Damit ein Nachweis des *getaggen* Transkripts möglich ist, muss das Bindeprotein ebenfalls *in vivo* exprimiert werden. Es kann die RNA-*hairpins* binden und dann selbst mittels Antikörper nachgewiesen werden. Somit wurde ein weiteres Fusionskonstrukt von *MS2-EGFP* benötigt. Mit den Primern EcoRIEGFP_fwd und MS2_XhoIrev wurde

an dem Plasmid *pEGFP-C1{MS2}* (S. Binder & F. Horn, Universität Leipzig) eine PCR durchgeführt. Das Produkt wurde dann in den Transformationsvektor *pUASTattB{w⁺}* kloniert und zur Keimbahntransformation mittels *attP-landing* Linien verwendet.

2.3 Immunzytologische Methoden

Immunmarkierung von Embryonen

Zur immunzytologischen Untersuchung von *Drosophila*-Embryonen wurden diese nach Rothwell und Sullivan (2000) mit folgenden Änderungen behandelt. Die Embryonen wurden von den Ablageplatten in ein Gefäß mit Waschpuffer (0,7% NaCl, 0,05% Triton X-100) gesammelt und dechorionisiert mittels Natriumhypochlorid. In 10 ml 100°C heißem Waschpuffer wurden die Embryonen anschließend fixiert und durch die Zugabe von 40 ml eiskaltem Waschpuffer wieder abgekühlt. Mit Zugabe von je 700 µl N-Heptan und Methanol und anschließendem Schütteln wurden die Embryonen devitellinisiert. Die obere N-Heptanschicht wurde abgenommen, die Embryonen mit frischem Methanol gewaschen und anschließend rehydriert oder bei 4°C über Nacht aufbewahrt.

Zur Rehydrierung der Embryonen wurde das Methanol entfernt und 250 µl frisches Methanol und vorsichtig 250 µl PBTA (PBS, 1% BSA, 0.05% Triton X-100, 0.02% Natriumazid) zugegeben. Durch Invertieren wurden die Phasen vermischt und anschließend die Flüssigkeit abgenommen. Danach folgte die Rehydrierung durch 15 minütige Inkubation in PBTA. Der primäre Antikörper (Tab.2.5) wurde verdünnt in PBTA über Nacht mit den Embryonen auf einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen dreimal in PBTA gewaschen und für 1 h auf einem Drehrad inkubiert. Danach folgte die Färbung mit dem sekundären Antikörper verdünnt in PBTA für 2 h bei RT. Nach wiederum drei Waschschritten mit PBTA wurde die DNA mittels DAPI (0,5µg/ml) in *Mounting*-Lösung (PBS/50% Glycerol) angefärbt. Die Präparate wurden mit einem Deckglas abgedeckt, mittels Nagellack fixiert und anschließend am konfokalen Lasermikroskop LSM510 (Zeiss) ausgewertet.

Tab. 2.5: verwendete Antikörper für biochemische und immunzytologische Analysen.

Antikörper	Herkunft	Produktnummer	Lot-Nummer	Verdünnung
polyklonal	P. Becker	-	-	1:400
MOF				
GAR488	Invitrogen	A11008	1073082	1:100

3. Ergebnisse

3.1 Neue mlncRNA-ähnliche Transkripte

3.1.1 Identifikation neuer mlncRNA-ähnlichen Transkripte in *Drosophila melanogaster*

In Zusammenarbeit mit der Abteilung Bioinformatik der Universität Leipzig (Prof. Dr. P. Stadler) wurden mittels bioinformatischer Analysen Intronstrukturen als Mittel zur Vorhersage von neuen putativen *messenger-like-ncRNA* (mlncRNA) Transkripten genutzt. Da mlncRNAs, ebenso wie proteinkodierende Gene, meist konservierte Intronpositionen besitzen (Rodriguez-Trelles et al., 2006; Ponjavic et al., 2007), sollte die genomweite Identifizierung kleiner konservierter Introns genutzt werden, um neue mlncRNA Gene zu identifizieren. In allen 12 sequenzierten *Drosophila*-Arten wurden hierfür die Introns in jeder Art separat vorhergesagt. Genomweite *Alignments* zwischen den Arten identifizierten orthologe Introns, welche in mindestens 2 Arten in Donor- und Akzeptor-Stellen übereinstimmen mussten. Anschließend wurden diese mit Hilfe charakteristischer Eigenschaften von Introns in positive und falsch-positive Introns sortiert (Hiller et al., 2009; Rose, 2010).

Es konnten dabei insgesamt 369 konservierte und außerhalb bisher annotierter kodierender Transkripte liegende Introns identifiziert werden. Von diesen wurden 131 durch ESTs oder *noncoding* FlyBase-Transkripte unterstützt. Die restlichen 238 neuen Introns waren zur Hälfte mit annotierten oder unannotierten proteinkodierenden Genen in translatierten oder untranslatierten Genbereichen assoziiert, und zur anderen Hälfte (129) wurden diese als authentische, größtenteils unstrukturierte mlncRNAs vorhergesagt. Da 29 von diesen auch orthologe Introns in Arten außerhalb der „*Sophophora* Untergruppe“ zugewiesen werden konnten (Hiller et al., 2009; D. Rose, 2010), sollten diese Kandidaten genauer untersucht werden.

Zwölf ausgesuchte Introns wurden mit RT-PCR in 5 *Drosophila*-Stadien (Embryos 0-4h, 3. Larven, Puppen, Männchen, Weibchen) auf das Vorliegen der putativen Transkripte getestet. Dafür wurden jeweils für die Bereiche 5' und 3' der vorhergesagten Introns Primer abgeleitet und RT-PCR Analysen vorgenommen. Bei diesen Arbeiten konnten für sieben der zwölf Kandidaten-Introns die entsprechenden Transkripte verifiziert werden (Abb.3.1). Über die Intronbereiche hinweg wird demnach transkribiert und die Introns herausgespleißt. Die verwendeten Primer und die genauen Intronpositionen sind im Anhang Tab.S2 aufgelistet. Durch Sequenzierung der Transkripte konnten die vorhergesagten Spleißstellen bestätigt werden.

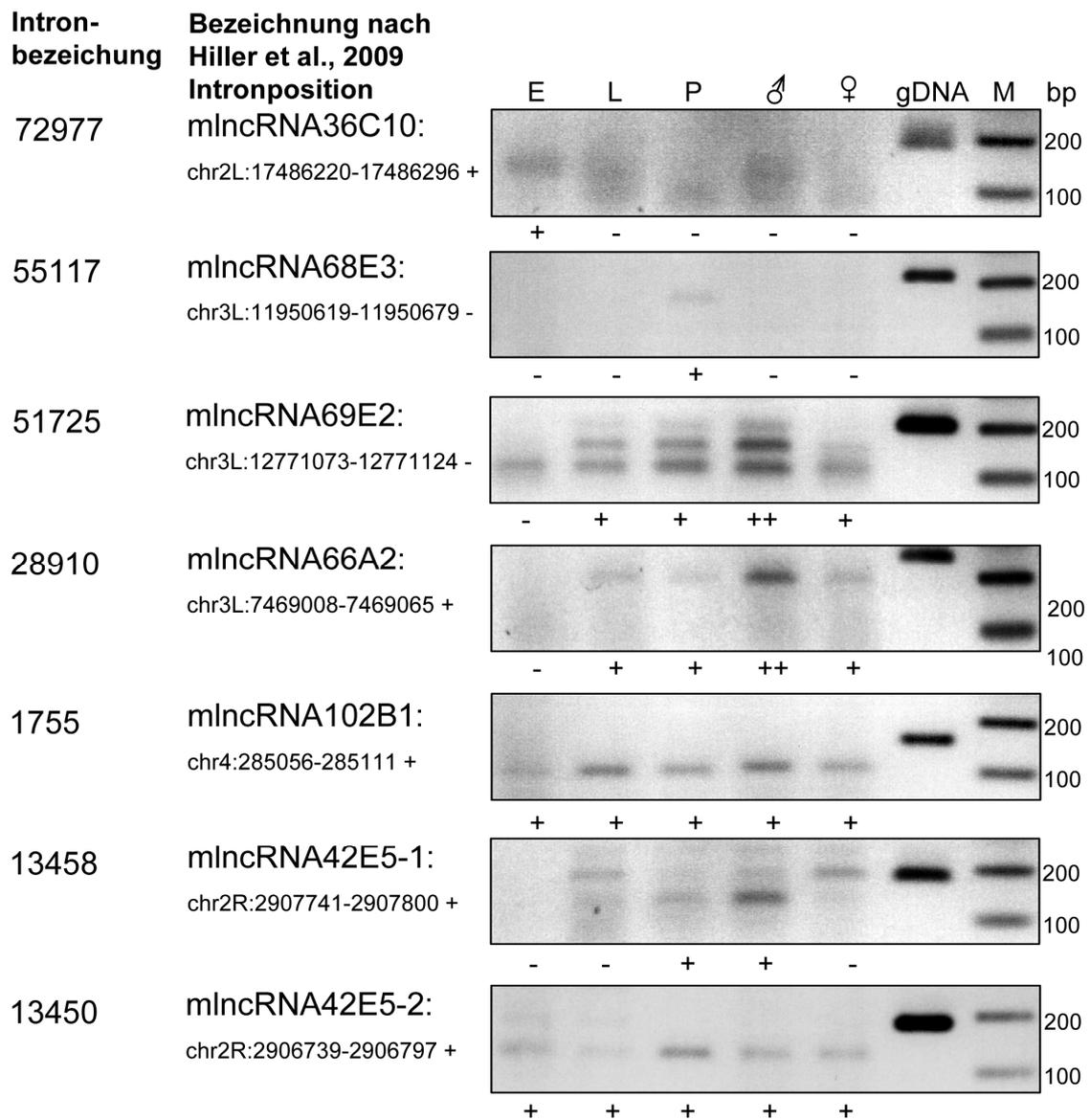


Abb.3.1: Expressionsnachweis der vorhergesagten Transkripte. Jeweils 3' und 5' der vorhergesagten Introns bindende Primer wurden zur RT-PCR verwendet. Hierzu wurde jeweils cDNA von 0-4h alten Embryonen (E), 3. Larven (L), Puppen (P) und männlichen (♂) und weiblichen (♀) Adulten hergestellt. Die Intensität der semiquantitativ nachgewiesenen Transkripte wurde unterhalb schematisch dargestellt (kein (-) Transkript; wenig (+) Transkript; viel (++) Transkript).

Die Transkriptionsmengen der sieben bestätigten Transkripte waren sehr gering, was bei sehr vielen mIncRNAs der Falls ist (Ravasi et al. 2006). Außerdem zeichnete sich eine stadienspezifische Expression der meisten neuen Transkripte ab. So war das Transkript bei Intron 55117 nur im Puppenstadium detektierbar.

Für das Intron 51725 konnte alternatives Spleißen nachgewiesen werden (Abb.3.1). Das vorhergesagte 51 bp Intron wurde bestätigt und ein zweiter Spleißakzeptor nachgewiesen, durch welchen ein 99 bp Intron entsteht.

Ebenso wurden 17 Introns welche putativ zu kodierenden Transkripten gehören untersucht. Von diesen konnten 11 verifiziert werden (Anhang Tab.S2).

3.1.2 Neue putative mlncRNA-Transkripte sind konserviert

Um die Konservierung der nachgewiesenen neuen Transkripte zu untersuchen, wurden einige *Drosophila*-Arten der *melanogaster*-Untergruppe (*D.simulans*, *D.sechellia*, *D.erecta*) und der *obscura*-Untergruppe (*D.pseudoobscura*) hinsichtlich der Expression der orthologen Transkripte untersucht.

Tab.3.1: Konservierung der orthologen Transkripte. Die Arten der *melanogaster*- und der *obscura*-Untergruppen wurden mittels RT-PCR auf die Expression der vorhergesagten Transkripte untersucht. Hierzu wurden jeweils 3` und 5` der Introns abgeleitete Primer verwendet. Expression wurde mit einem „+“ und nicht nachweisbare Expression mit einem „-“ gekennzeichnet. Für *mlncRNA69E2* wurden beide alternative Transkripte aufgeführt.

Transkript	mlncRNA 102B1	mlncRNA 68E3	mlncRNA 69E2	mlncRNA 42E5-1	mlncRNA 42E5-2	mlncRNA 66A2	mlncRNA 36C10
Art							
<i>D.mel</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>D.sim</i>	kein Ortholog	+	+	+	+	+	+
<i>D.sec</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>D.ere</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>D.pse</i>	+	+	+	-	+	+	+

Die meisten orthologen Transkripte konnten hierbei bis in die *obscura*-Untergruppe nachgewiesen werden (Tab.3.1). In *D.simulans* (*D.sim*), welche mit *D.melanogaster* (*D.mel*) am nächsten verwandt ist, konnten alle vorhergesagten Introns bestätigt werden. Bei allen Arten der *melanogaster*-Untergruppe konnte alternativ gespleißtes *mlncRNA69E2* nachgewiesen werden (Tab.3.1). Diese beiden Spleißakzeptoren scheinen also hochkonserviert zu sein.

Die Sequenzen, welche die Introns umgeben, sind weitgehend unstrukturiert und weder sequenziell, noch in ihrer Sekundärstruktur konserviert. Lediglich die Intron-Spleißakzeptoren und –donoren weisen eine Konservierung auf (Rose, 2010). Allerdings zeigte sich mittels RT-PCR bei vielen Transkripten zwischen den Arten eine ähnliche stadienspezifische Transkription, was die Vermutung nahe legt, dass die Transkriptionskontrollmechanismen der Gene ebenfalls konserviert sind (Tab.S3; Abb.3.2). Exemplarisch zeigt Abb.3.2 die RT-PCR-Bilder des neuen Transkripts *mlncRNA66A2* der verschiedenen Spezies. Erkennbar ist eine gute Konservierung des Expressionsmusters vom Larven- bis zum Adultstadium (Abb.3.2).

Bei den Arten *Drosophila sechellia* (*D.sec*), *Drosophila erecta* (*D.ere*) und *Drosophila pseudoobscura* (*D.pse*) waren jeweils einige Transkripte nicht nachweisbar (Tab.3.1). Die verwendeten Primer sind im Anhang in Tab.S6 aufgelistet.

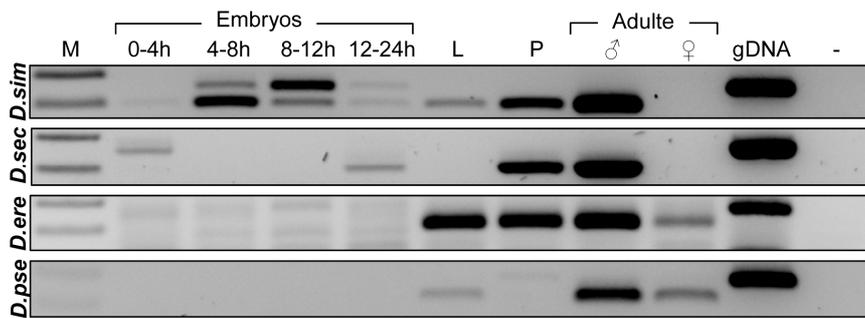


Abb.3.2: Konservierung des Transkripts *mlncRNA66A2*. Mittels RT-PCR wurde das Transkript *mlncRNA66A2* mit dem Intron 28910 in den Spezies *D.sim*, *D.sec*, *D.ere* und *D.pse* in Embryos, 3. Larven (L), Puppen (P), adulten Männchen (♂) und Weibchen (♀) untersucht.

3.1.3 Identifikation nicht-kodierender Transkripte

3.1.3.1 Fünf neue transkribierte Bereiche gehören zu annotierten Genen

Um Transkriptionsstart- und Endpunkte der neuen *Drosophila melanogaster* Transkripte zu ermitteln, wurden 5' und 3' RACE-Analysen durchgeführt. Durch Ligation eines speziellen RNA-Oligos an das 5'-Ende der mRNA wird eine bekannte Anlagerungsstelle für Primer geschaffen, welche dann zusammen mit den genspezifischen Primern ein PCR-Produkt ergeben können. Das gleiche Prinzip wird auch für das 3'-Ende mit den PolyA-Schwänzen angewendet, welche ebenfalls als Anlagerungspunkt für Primer genutzt werden können (Abschnitt 2.2.6).

Fünf neue transkribierte Bereiche wurden durch diese Untersuchungen bekannten Protein-kodierenden Genen zugeordnet. So sind die zwei Transkripte der Introns 55117 und 51725 Bestandteil der 5' Bereiche der Gene *CG11570* und *CG32106*, welche somit einen größeren untranslatierten Bereich und auch kodierende Sequenz aufweisen (Abb.3.3 und 3.4).

Mittels 5' RACE, RT-PCRs und Sequenzierungen konnten das Intron 55117 und zusätzlich ein 3' davon gelegenes weiteres vorhergesagtes Intron, 55115, verifiziert werden. Beide gehören zum Gen *CG11570* und stellen somit keine eigenständige mlncRNA dar (Abb.3.3). Das Gen wird hauptsächlich während des Puppenstadiums exprimiert. Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass das Transkript von *CG11570* und das Transkript über das Intron 55117 ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen (Abb.3.3B). Bei beiden Transkripten, sowie auch beim Gesamttranskript (*CG11570fwd2/55117rev2*), wurde die Höchstmenge im Puppenstadium detektiert (Abb.3.3B). Im Gegensatz zur älteren Annotation des Gens, wird bei der neuen ein 48AS längeres Protein gebildet, welches ein zusätzliches N-terminales Signalpeptid enthält.

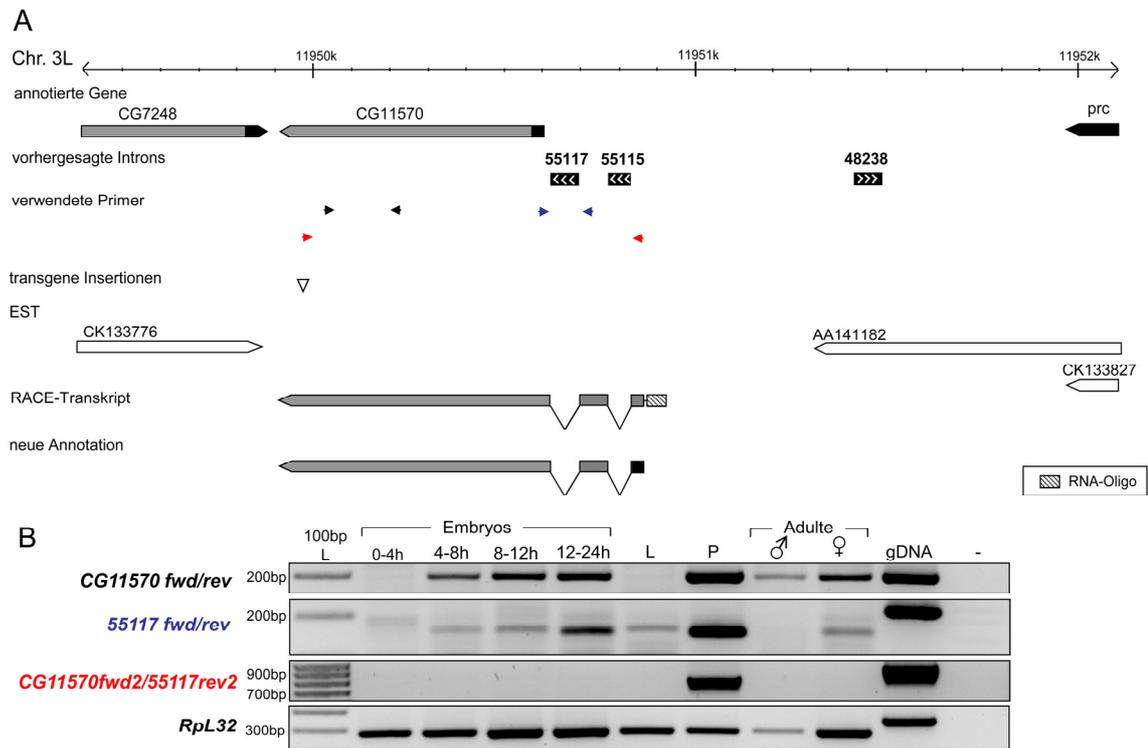


Abb.3.3: Das Intron 55117 ist Bestandteil des CG11570 Gens. Systematische Übersicht über die in der Region des Introns 55117 gelegenen Gene (graue Pfeile) sowie die vorhergesagten Introns (schwarze Blöcke) und annotierten ESTs (weiße Pfeile). Des Weiteren sind die Bindestellen der verwendeten Primer verzeichnet (Pfeilspitzen) und die Ergebnisse des RACE Experiments schematisch dargestellt. Das Intron 55117 wurde, ebenso wie ein weiteres vorhergesagtes Intron (55115), dem Transkript des Gens CG11570 zugeordnet (**A**). RT-PCRs mit cDNA aus verschiedenen Stadien von *Drosophila melanogaster* zeigten die stadienspezifische Expression des neuen transkribierten Bereiches (55117fwd/rev), des CG11570-Transkripts (CG11570fwd/rev) und des zusammenhängenden Transkripts (CG11570fwd2/55117rev2). RpL32 diente hier als Ladekontrolle (**B**).

Für das vorhergesagte Intron 51725 wurde schon anfänglich ein alternativ gespleißtes Intron nachgewiesen (Abb.3.1). Durch RT-PCRs mit verschiedenen Primerkombinationen und anschließender Sequenzierung wurde festgestellt, dass der transkribierte Bereich über das Intron 51725 Teil der mRNA von CG32106 ist (Abb.3.4A). Die Annotation des Gens konnte somit korrigiert und die Proteinsequenz um 350AS erweitert werden. Dennoch konnten keine bekannten Domänenstrukturen festgestellt werden.

Wie aus der *modEncode*-Datenbank hervorgeht, ist das Gen CG32106 ab dem Stadium der dritten Larve exprimiert und dann hauptsächlich in Testis der Männchen. Sowohl das CG32106-Transkript, als auch das CG32106-Transkript mit zusätzlichem Intron 51725 konnte lediglich für Männchen nachgewiesen werden, während die mRNA für den 51725-Bereich auch im Larven- und Puppenstadium nachweisbar war (Abb.3.4B). Dieses Expressionsmuster entspricht dem annotierten *modEncode*-Expressionsmuster.

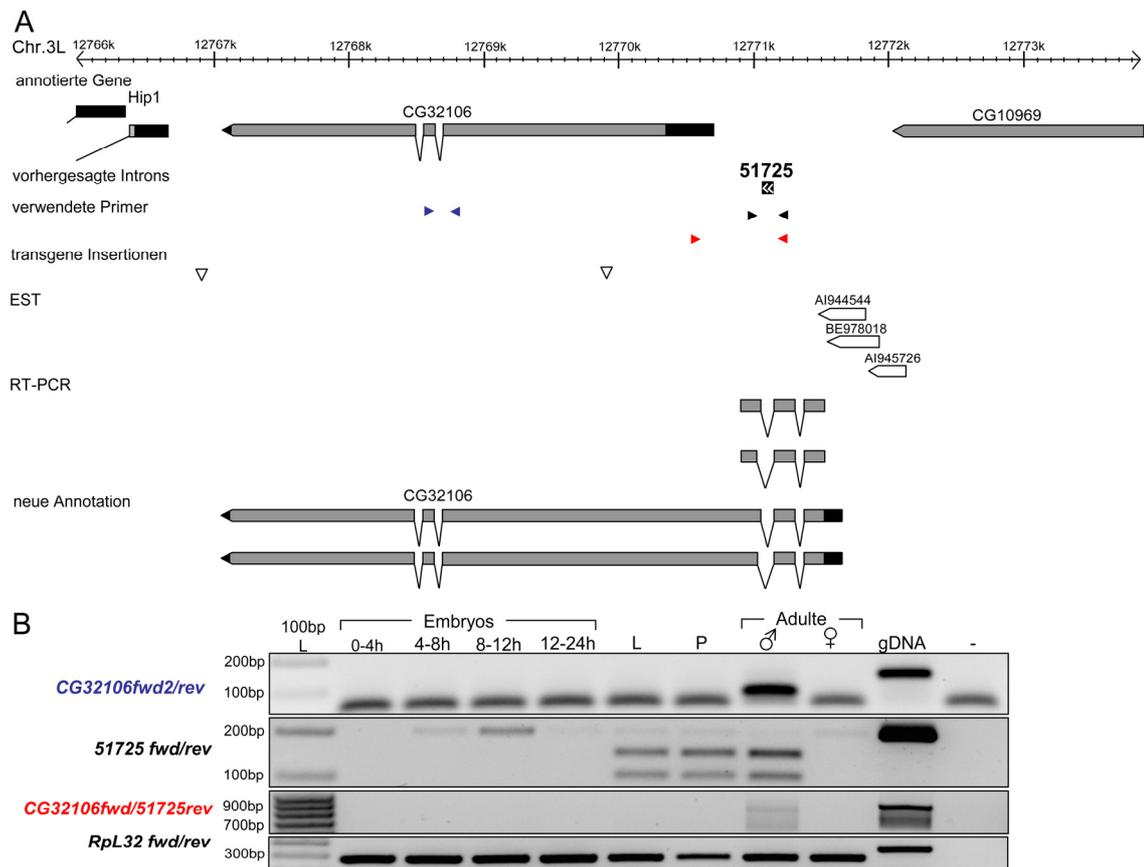


Abb.3.4: Das Intron 51725 ist dem Gen CG32106 zugehörig. Systematische Übersicht über die genomische Region des Introns 51725 mit annotierten Genen (graue Pfeile) sowie vorhergesagten Introns (schwarze Blöcke) und annotierten ESTs (weiße Pfeile). Weiterhin dargestellt sind die Primerbindestellen (Pfeilspitzen) der verwendeten Primer sowie die schematischen Ergebnisse der RT-PCR-Untersuchungen **(A)**. RT-PCRs mit cDNA aus verschiedenen Stadien von *Drosophila melanogaster* zeigen die stadienspezifische Expression des neuen transkribierten Bereiches (*51725fwd/rev*), des Transkripts von *CG32106* (*CG32106fwd2/rev*) und des zusammenhängenden Transkripts (*CG32106fwd/51725rev*). *RpL32* diente hier als Ladekontrolle **(B)**.

Im Gegensatz zu diesen Introns verlängern drei weitere neue Transkripte den 3' Bereich von bereits annotierten Genen. Hierzu gehören die Transkripte um die Introns 1755, 13450 und 72977.

RhoGAP102A ist in allen Stadien des Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster* exprimiert (Abb.3.5B). Es gewinnt durch Transkription über das Intron 1755 zusätzlich vier Exons (Abb.3.5A). Hier konnte nachgewiesen werden, dass auch ein weiteres Intron (1757) im transkribierten Bereich liegt und herausgespleißt wird. Diese Verlängerung des *RhoGAP102A*-Transkripts wurde auch von vorhandenen ESTs unterstützt. RT-PCRs mit Primern spezifisch für das *RhoGAP102A*-Gen und das 1755-Transkript zeigten mehrere Transkriptvarianten, die z.T. auch stadienspezifisch auftreten (Abb.3.5B). 3' RACE Untersuchungen ergaben mindestens vier verschiedene *RhoGAP102A*-Isoformen, mit unterschiedlichen kodierenden Regionen. Zusätzlich zu den beiden annotierten Isoformen existieren mindestens zwei längere Isoformen (Abb.3.5A), welche über keine zusätzlichen bekannten Domänenstrukturen verfügen.

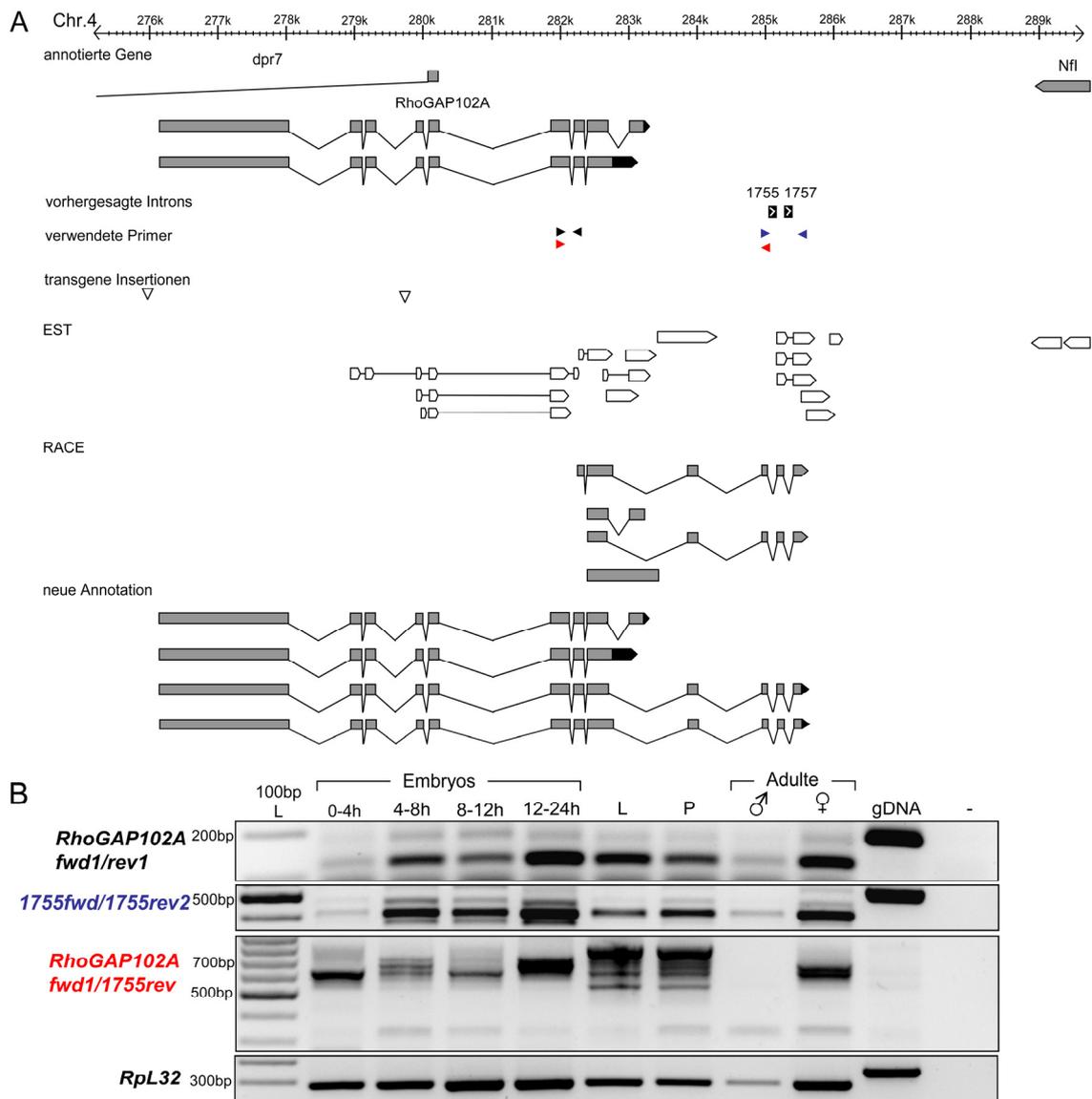


Abb.3.5: Intron 1755 gehört zu neuen *RhoGAP102A*-Isoformen. Schematische Übersicht über die in der Region des Introns 1755 gelegenen Gene (graue Pfeile) sowie die vorhergesagten Introns (schwarze Blöcke) und vorhandene ESTs (weiße Pfeile). Die Bindestellen der verwendeten Primer wurden eingezeichnet (Pfeilspitzen) und die Ergebnisse der RACE Experimente schematisch dargestellt. Das Intron 1755 konnte, ebenso wie Intron 1757, dem Transkript des Gens *RhoGAP102A* zugeordnet werden. Dieses hat somit neben den bereits annotierten Isoformen mind. zwei weitere (**A**). Mittels RT-PCRs an cDNA aus verschiedenen Stadien von *Drosophila melanogaster* wurde die stadienspezifische Expression des neuen transkribierten Bereiches (*1755fwd/rev2*), des *RhoGAP102A*-Transkripts (*RhoGAP102A**fwd1/rev1*) und des zusammenhängenden Transkripts (*RhoGAP102A**fwd1/1755rev*) nachgewiesen. *RpL32* diente hier als Ladekontrolle (**B**).

Das neue Intron 13450 befindet sich auf Chromosom 2R in der Nähe des *Tsp42Ee*-Gens. Ein weiteres Intron (13448) ist ebenfalls für diese Region vorhergesagt worden (Abb.3.6A). Verschiedene RT-PCR Untersuchungen bestätigten, dass auch dieses Intron am gleichen Transkript beteiligt ist. Hier wurde zusätzlich alternatives Spleißen festgestellt, denn es konnte ein Transkript mit und eines ohne herausgespleißtem Intron 13448 nachgewiesen werden.

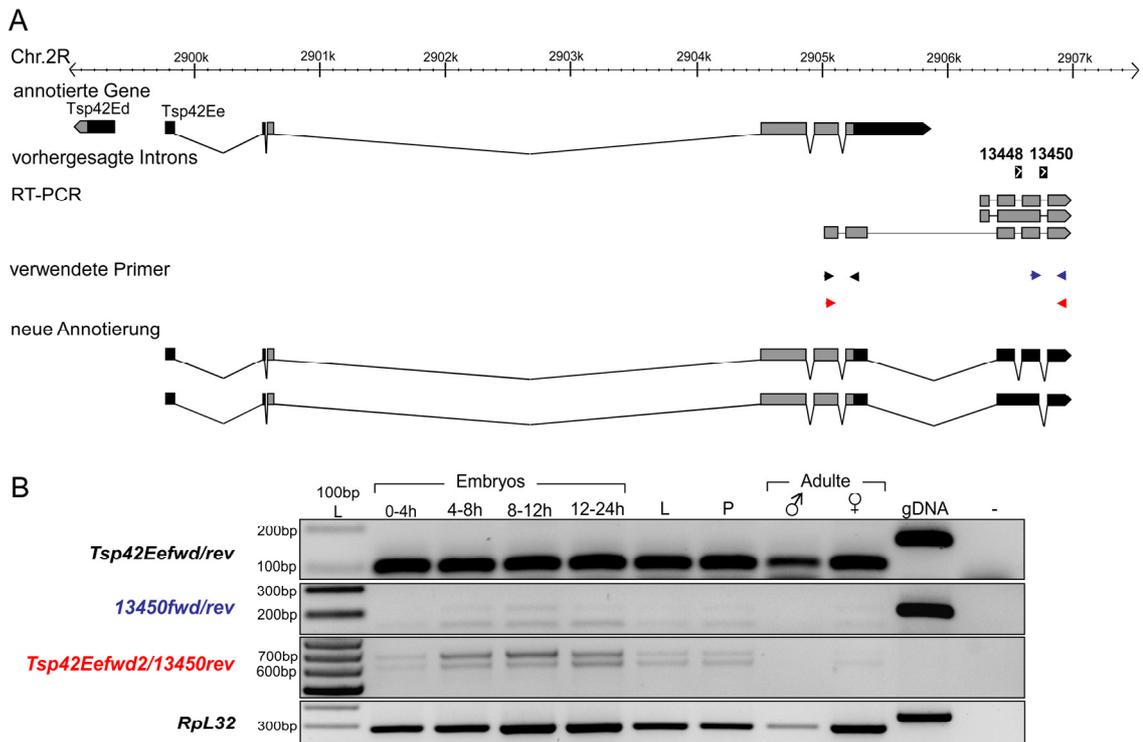


Abb.3.6: Das neue Intron 13450 gehört zum Gen *Tsp42Ee*. Schematische Übersicht über die *Tsp42Ee*-Genregion mit annotierten Genen (graue Pfeile), vorhergesagten Introns (schwarze Blöcke) und Bindestellen der verwendeten Primer (Pfeilspitzen). Die schematisch dargestellten RT-PCR Untersuchungen bestätigten, dass auch Intron 13448 am gleichen Transkript wie Intron 13450 beteiligt ist und sie zum Transkript von *Tsp42Ee* gehören. Es wurde alternatives Spleißen festgestellt (**A**). Durchgeführte RT-PCRs wiesen die transkriptionelle Verbindung des neuen Transkripts zum schon annotierten Gen *Tsp42Ee* nach. Es wird in allen untersuchten Stadien exprimiert. *Rpl32* diente hier als Ladekontrolle (**B**).

RT-PCR-Analysen und Sequenzierungen zeigten, dass der neu entdeckte transkribierte Bereich die Verlängerung von *Tsp42Ee* bildet und aufgrund alternativem Spleißens zusätzlichen zwei bzw. drei nichtkodierende Exons hinzukommen. Sowohl das *Tsp42Ee*- als auch das 13450-Transkript sind in allen untersuchten Stadien nachweisbar (Abb.3.6B). Auch zwei zusammenhängende und alternativ gespleißte Transkripte konnten nachgewiesen und sequenziert werden (Abb.3.6B). Sie entsprechen den alternativen Spleißformen, bei welchen Intron 13448 entweder herausgespleißt wird oder nicht (Abb.3.6A).

Das neue Intron 72977, befindet sich in einer kleinen intergenischen Region zwischen den Genen *CG5131* (plus-Strang) und *qua* (minus-Strang) auf dem Chromosom 2L. Es wurde anfänglich als embryonal exprimierte putative *mIncRNA36C10* nachgewiesen (Abb.3.1). RT-PCR-Analysen zeigten, dass kein transkriptioneller Zusammenhang mit dem ebenfalls in der Region vorhergesagten Intron 72979 besteht (Daten nicht gezeigt).

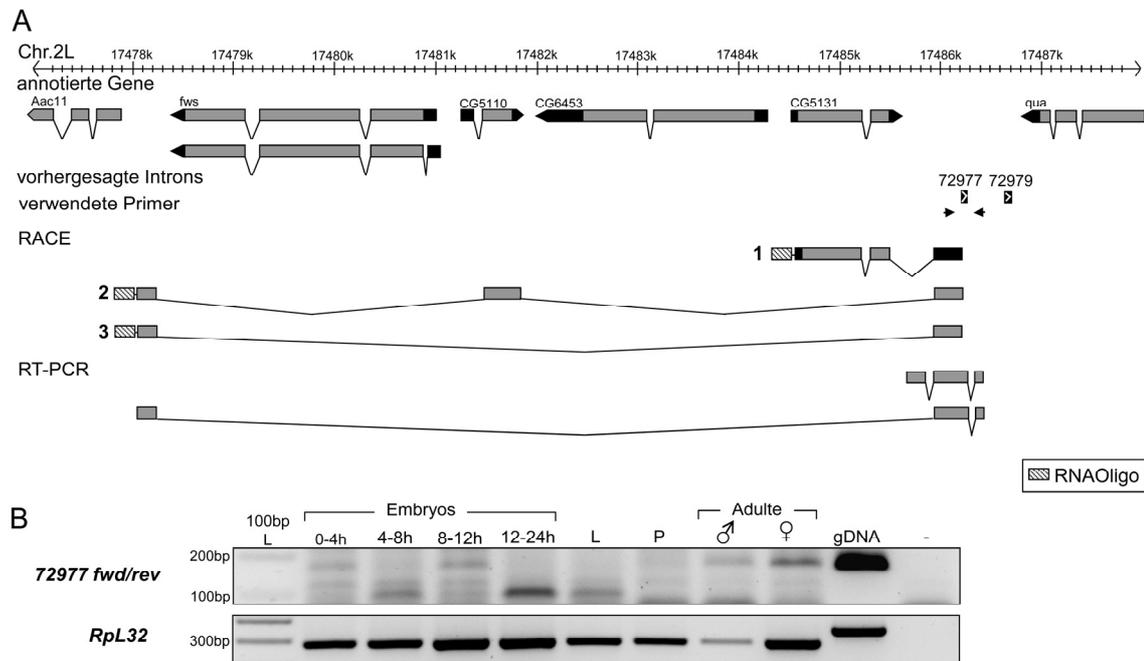


Abb.3.7: Übersicht über den Locus des Introns 72977. Schematische Übersicht über die Genregionen (graue Pfeile) und vorhergesagten Introns (schwarze Blöcke). Die RT-PCR Untersuchungen zeigten, dass Intron 72979 nicht am gleichen Transkript beteiligt ist. Die RACE-Untersuchung ergab eine Verbindung des neuen Transkripts mit mehreren bekannten und unbekanntem Exons (**A**). Das neue Transkript weist eine geringe stadienspezifische Expression in Embryos und Larven auf. *RpL32* diente hier als Ladekontrolle (**B**).

Ein 5' RACE für die putative *mIncRNA36C10* ergab mehrere verschiedene Transkripte. Zunächst konnte ein Spleißen des Transkripts an das *upstream* von ihm gelegenen Gen *CG5131* gezeigt werden (Transkript 1; Abb.3.7A). Ein weiteres beinhaltete ein Exon im intergenischen Bereich *upstream* von *fws* zusammen mit einem Exon des Gens *CG5110* (Transkript 2; Abb.3.7A). Beim dritten Transkript war das Exon *upstream* von *fws* direkt an den neuen transkribierten Bereich gespleißt (Transkript 3; Abb.3.7A). Die 3' Enden der Transkripte konnten lediglich mittels RT-PCR eingegrenzt werden (Abb.3.7A). Die erhaltenen 5' RACE Produkte liegen vermutlich in zu geringer Menge vor, um mittels RT-PCR amplifiziert und so bestätigt zu werden.

Weitere Untersuchung der Expression ergaben sowohl in Embryos als auch Larven geringe Expression (Abb.3.7B). In weiteren untersuchten *Drosophila*-Spezies konnte das Transkript um das Intron 72977 nicht nur im Embryo detektiert werden. So lag es beispielsweise in *D.pseudoobscura* ubiquitär exprimiert vor (Tab.S3).

Um zu bestimmen, ob die Transkripte kodierendes Potential besitzen, wurde der *Coding Potential Calculator (CPC)* (Kong et al., 2007) verwendet. Mit einem score kleiner als 0 ist Transkript 3 eindeutig als nicht-kodierend klassifiziert worden. Die Transkripte 1 und 2 wurden als kodierend eingestuft, da sie glaubwürdige ORFs, allerdings ohne bekannte Domänen, besitzen.

3.1.3.2 Identifizierung zweier mlncRNA kodierender Loci

Zwei der vorhergesagte nicht-kodierenden Transkripte, *mlncRNA66A2* (Intron 28910) und *mlncRNA42E5-1* (Intron 13458), konnten nach eingehenden Studien als vollkommen neue, putativ nicht-kodierende Transkripte identifiziert werden. Hierfür wurden sowohl RT-PCRs als auch 3' und 5' RACE-Analysen durchgeführt.

Das Gen *mlncRNA66A2* liegt in einer intergenischen Region der zytologischen Bande 66A2 des Chromosoms 3L (Abb.3.8A). In diesem Bereich liegen zwei weiterhin vorhergesagte Introns. Durch RT-PCR und RACE konnte nachgewiesen werden, dass alle drei zu einem Transkript gehören. Das Gen wird ausschließlich in Larven, Puppen und Männchen exprimiert (Abb.3.8B).

Mit einem *CPC coding potential score* unter null wird das Transkript als nicht-kodierend eingestuft. Es könnte sich dennoch um ein proteinkodierendes Gen handeln, denn es enthält einen ORF. Das Protein wäre 142AS lang und hätte keinen bekannten Domänenstrukturen. Lediglich in den *Drosophilidae* lassen sich ähnliche Proteine bei den orthologen Genen finden, jedoch beträgt schon bei *D.pse* die Aminosäureidentität mit *D.mel* nur 29% (Abb.3.9). Mit *D.sim* hat es 97% und mit *D.ere* 54% der Aminosäuren gemein. Diese geringe Aminosäurekonservierung ist mit der sehr geringen Sequenzkonservierung (Rose, 2010) begründbar.

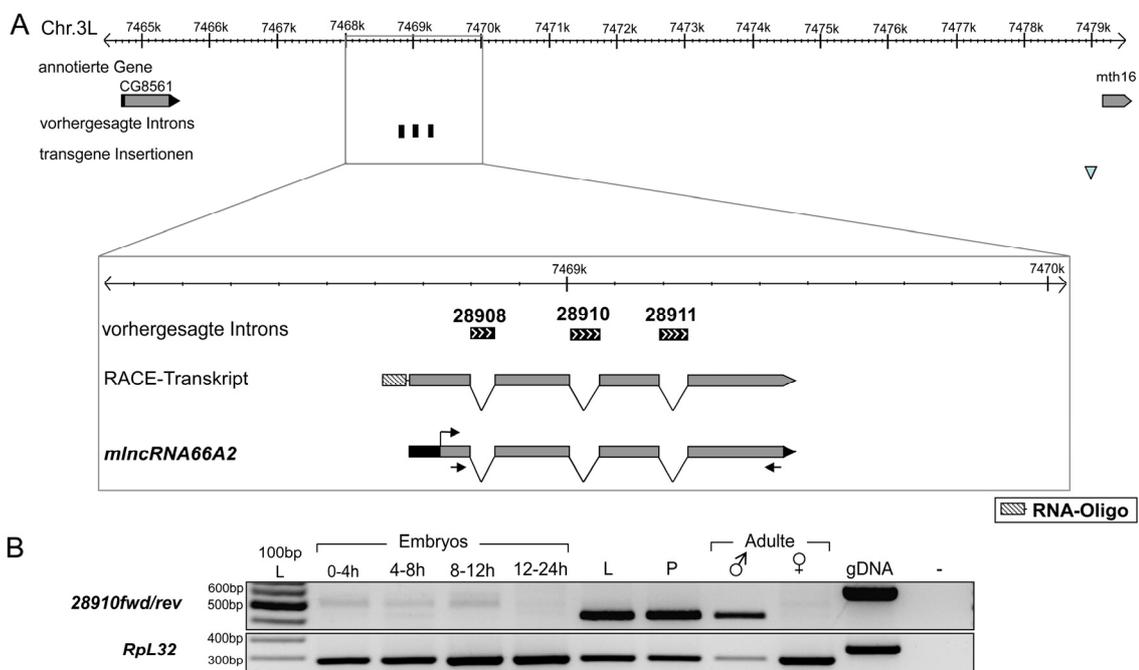


Abb.3.8: Das neue Gen *mlncRNA66A2*. Schematische Übersicht über die Genregionen (graue Pfeile) und vorhergesagten Introns (schwarze Blöcke). Der vergrößerte Bereich zeigt weiterhin die Ergebnisse der RACE-Experimente, sowie die Bindestellen der für die RT-PCR verwendeten Primer (**A**). Die RT-PCR mit cDNA verschiedener *Drosophila melanogaster* Stadien zeigt, dass sich die Expression des Transkripts auf Larven, Puppen und Männchen beschränkt. *RpL32* diente hier als Ladekontrolle (**B**).

```

Dmel1  MCVCPLLLLKIALLMVIFPTIAVNIMEVIY--NGVNSKAEAHQIAINLNLVACFIALLSL 58
Dpse   MCFCTVLVLKISVVLISILLVLFNVLDIIEGVQNLNEVTMKGKLLLVVCFVLSFLIAIL 60
      **.*. *:***: : * : .*: : * : : : : * : : *

Dmel1  AFGIYGTIMNTIFIIRLLMFVLITFCLFKIVMWIVYKNLSPMSAEDVTHFWFQLNTGLSI 118
Dpse   CAGLYAAIRQNLKLMQMLIFALVSYFLGKMSLVIVAGNQQGVVELVVTHHWYKLTVAAV 120
      . *:*. : : : : : : : : * * : : * * . : : * : : : : . : :

Dmel1  TCSVLTVIFCMRLHEQTRQFQLGY 142
Dpse   ICILLTFCFLRVKDDDDGEDPPFR 144
      * : * . ** : * : : : : :

```

Abb.3.9: Alignment der putativen AS-Sequenzen der homologen *mlncRNA66A2* Gene der Arten *D.melanogaster* (*Dmel*) und *D.pseudoobscura* (*Dpse*). Erstellt wurde das Alignment mittels EMBL-EBI ClustalW2 Programm.*= identisch in allen Sequenzen; :=sehr ähnlich, konserviert; .= schwach konserviert.

Das zweite neue Transkript ist im Bereich des Introns 13458 auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms gelegen und in seiner unmittelbaren Umgebung wurden noch zwei weitere Introns vorhergesagt. Durch RACE und RT-PCRs verifiziert, gehören diese beiden auch zum Transkript des neuen Gens *mlncRNA42E5-1* (Abb.3.10). Die Existenz des Transkripts wurde weiterhin unterstützt durch schon vorhandene EST-Sequenzen (Abb.3.10).

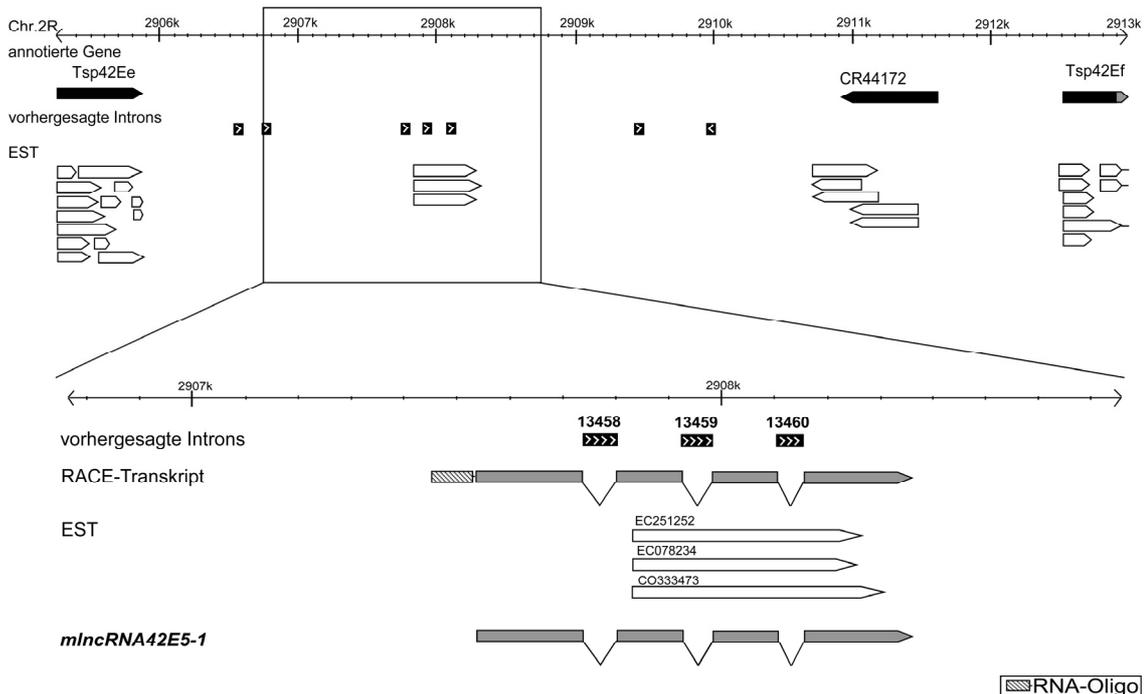


Abb.3.10: Das neue Intron 13458 gehört zum nicht-kodierenden Gen *mlncRNA42E5-1*. Schematische Übersicht über die Genregionen (graue Pfeile), vorhergesagten Introns (schwarze Blöcke) und annotierte ESTs (weiße Pfeile). Sowohl das Intron 13458 als auch die zwei am nächsten gelegenen Introns konnten mittels RT-PCR und RACE dem Transkript zugeordnet werden.

Es besteht aus vier Exons und mit einem *CPC coding potential score* unter null gilt auch dieses Gen als nicht-kodierend. Ein ORF, welcher in 124AS resultieren würde, wird als sehr unwahrscheinlich eingestuft. Somit ist davon auszugehen, dass es sich

mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein nicht-kodierendes Gen handelt. Deshalb wurde dieses Transkript für weitergehende Analysen ausgewählt.

3.1.4 Funktionelle Analyse des neuen miRNA Transkripts *miRNA42E5-1*

3.1.4.1 *miRNA42E5-1* zeigt stadienspezifische Expression

Die transkribierte Region von *miRNA42E5-1* ist 673bp lang, wobei die drei Introns mit einer Gesamtlänge von 170bp herausgespleißt werden. Die Expression des Gens ist schwach, aber entwicklungspezifisch gesteuert (Abb.3.11C). Zwar ließ sich in allen Entwicklungsstadien ein Transkript nachweisen (Abb.3.11B), jedoch zeigten qPCR-Analysen, dass in Männchen die Expressionsrate von *miRNA42E5-1* am höchsten ist (Abb.3.11C).

Die Untersuchung der Expression des Gens in anderen *Drosophila*-Spezies zeigte ebenfalls differentielle Expressionsmuster (Abb.3.11D). In Männchen wurde in den meisten Spezies eine ausreichende Menge an Transkript detektiert. Lediglich in *D.pseudoobscura* konnte mit den vorhandenen Primern kein Transkript amplifiziert werden. Diese Spezies ist verwandtschaftlich am weitesten von *D.melanogaster* entfernt. Während *D.mel*, *D.sim*, *D.sec* und *D.ere* zur *melanogaster*-Gruppe gehören ist *D.pse* ein Vertreter der *obscura*-Gruppe und hatte somit vor ca. 54,9 Mio. Jahren den letzten gemeinsamen Vorfahren mit *D.mel* (Tamura et al., 2004).

Ebenso ist die Sequenz des Gens nicht konserviert, sondern nur die Spleißdonor und – akzeptorstellen (Hiller et al., 2009). Daher weichen die Primersequenzen und – bindestellen zwischen den Spezies ebenfalls stark voneinander ab.

In Abb.3.11E ist die von *RNAfold* (Hofacker & Stadler, 2006) vorhergesagte Sekundärstruktur der RNA dargestellt. Diese ist laut *RNAz*-Programm nicht strukturiert und nicht konserviert (persönliche Mitteilung, P. Stadler). Sie zeigt keine Ähnlichkeit zu bekannten RNA-Familien aber es befinden sich zwei snRNP (*small nuclear ribonucleic particles*) -Bindemotive in ihr. Dies könnte auf eine katalytische Funktion der RNA hinweisen, da diese Motive in RNAs zu finden sind, welche in RNA-Proteinkomplexen wie dem Spleißosom benötigt werden.

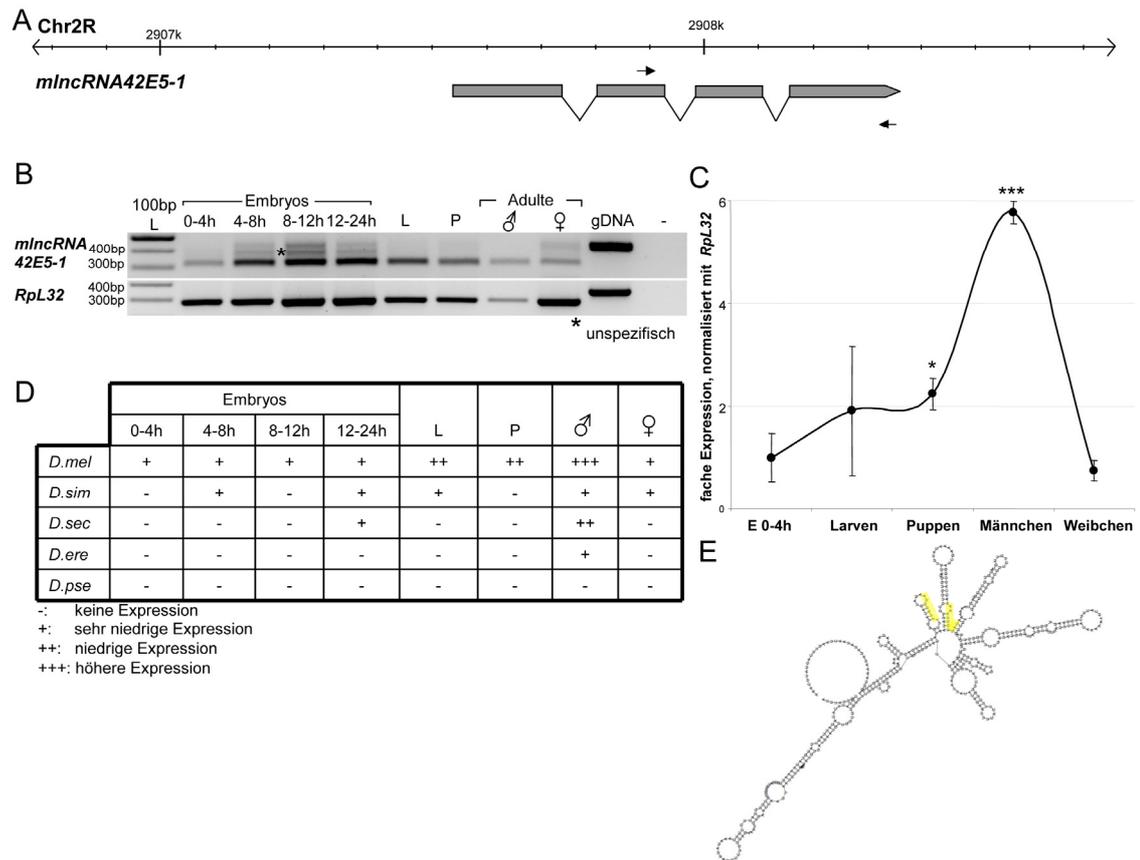


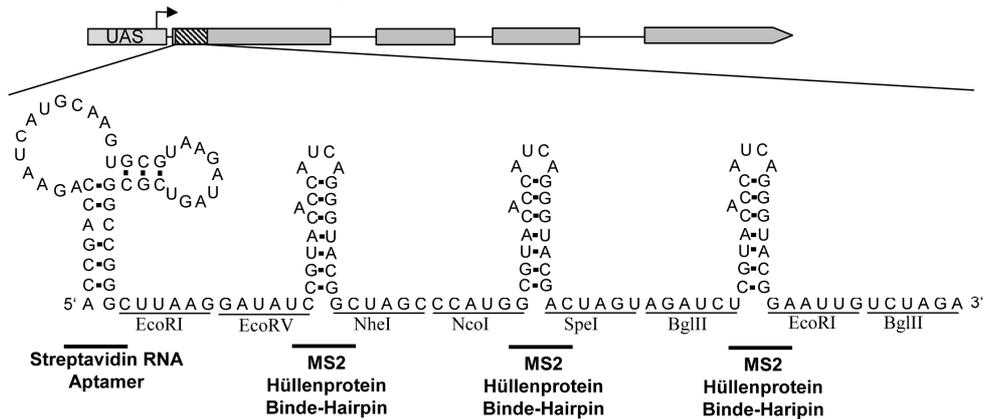
Abb.3.11.: *mIncRNA42E5-1* ist stadienspezifisch differentiell reguliert. Übersicht über das Gen und die verwendeten Primer *13458fwd/rev* (Pfeile) (A). RT-PCR Analysen des Gens ergaben eine differentielle Expression in Embryo, Larven (L), Puppen (P) und Adulten (♂, ♀), wobei *RpL32* als Ladekontrolle diente (B). Durch quantitative PCR wurde im Wildtyp die Menge an *mIncRNA42E5-1*-Transkript in 0-4h alten Embryonen, Puppen, Männchen und Weibchen relativ quantifiziert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005 (C). Weitere Untersuchungen in *Drosophila simulans* (*D.sim*), *D.sechellia* (*D.sec*), *D.erecta* (*D.ere*) und *D.pseudoobscura* (*D.pse*) zeigten ebenfalls differentielle Expressionsmuster (D). Die von dem Programm *RNAfold* vorhergesagte Sekundärstruktur zeigt mehrere *stem-loops* und enthält zwei snRNP-Motive (gelb markiert) (E).

3.1.4.2 Generierung eines *mIncRNA42E5-1*-S1MS2-Fusionstranskripts

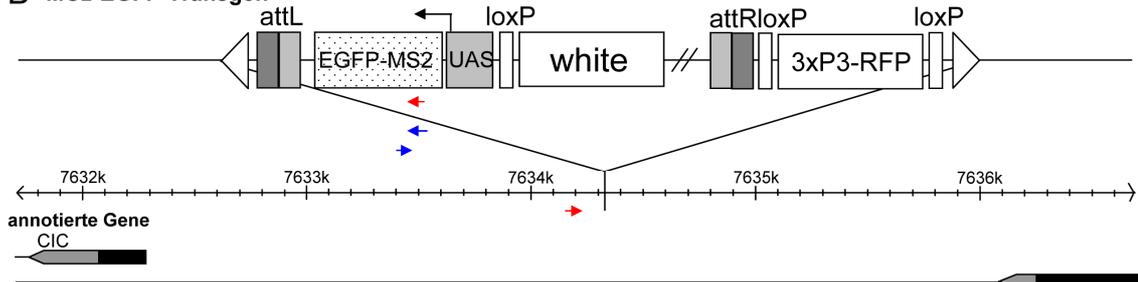
Das neu isolierte Gen *mIncRNA42E5-1* ist höchst wahrscheinlich ein nicht-kodierendes Gen. Deshalb kommen übliche, zur Lokalisation von Proteinen benutzte *tags* nicht in Frage um das Genprodukt im Organismus zu lokalisieren. Somit wurde ein nicht-kodierender *tag*, S1-MS2, gewählt. Dieser besteht aus bekannten Basenfolgen, welche in ihrer Sekundärstruktur nutzbare Eigenschaften besitzen.

Der S1-MS2-*tag* besteht aus einem Aptamer, welches in der Lage ist Streptavidin zu binden, und dreimal hintereinander klonierten MS2-Binde-*Hairpins*, welche an das Hüllprotein des MS2-Phagen binden können (Abb.3.12A). Die Sequenz beider *tags* wurde 3' und 5' in das *mIncRNA42E5-1*-Gen kloniert (siehe Abschnitt 2.2.10). Mittels Keimbahntransformation wurden transgene Fliegen hergestellt.

A *mlncRNA42E5-1-5MS2S1* Transgen



B *MS2-EGFP* Transgen



C Insertionsnachweis:

landing86Fb_fwd/MS2gene_fwd
1,89kb



Transgennachweis:

MS2gene_fwd/MS2gene_rev
397bp

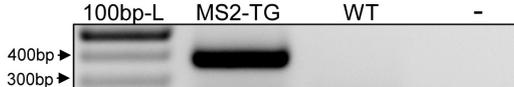


Abb.3.12: Aufbau des Streptavidin-MS2-Hüllenprotein-Bindehairpin-tags und des MS2-EGFP-Transgens. Ein tag mit bekannten RNA-Sekundärstrukturen zur Bindung von Proteinen wurde 5' in das nichtkodierende Gen *mlncRNA42E5-1* kloniert. Die Hairpinstrukturen des dreimal hintereinander klonierten MS2-Bindemotivs können das Hüllenprotein des MS2-Phagen binden (A). Das mit EGFP fusionierte MS2-Hüllenproteingen wurde in den Vektor *pUASTattB{w+}* kloniert und mittels Φ C31-System in einen bekannten Insertionsort integriert (B). Sowohl das Transgen selbst (mit internen Primern im Fusionskonstrukt, blaue Pfeile), als auch die Insertion am Insertionsort (mit Primern im Genom und im Transgen, rote Pfeile) wurden im transgenen Stamm (MS2-TG) nachgewiesen (C).

Für das 5' mit S1MS2-tag versehene Gen konnten 13 zufallsgemäße Insertionen etabliert und 12 genau lokalisiert werden (Anhang Tab.S1). Hiervon befindet sich eine Insertion in einem intergenischen Bereich und vier in Intron-Bereichen. Bei den 13 3' mit S1MS2-tag markierten Transgenen waren fünf intergenisch und sechs intronisch inseriert (Tab.S1). Die Transgenexpression des 3' markierten Gens konnte mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden, sodass diese Linien nicht weiter untersucht wurden (Daten nicht gezeigt).

Da die Analyse der Lokalisation des *mlncRNA-42E5-1* Transkripts mittels tag auch die gleichzeitige Expression des Bindeproteins MS2 erfordert, wurden auch MS2-Transgene angefertigt (siehe Abschnitt 2.2.10). Es wurde ein Fusionskonstrukt aus MS2-Gen und EGFP in den Vektor *pUASTattB{w+}* kloniert und mittels Φ C31-System

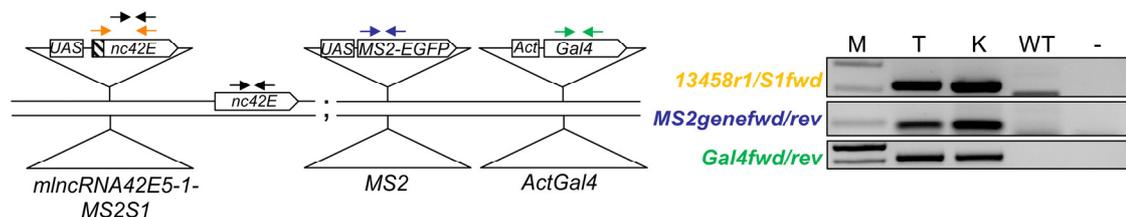
gerichtet ins *Drosophila*-Genom inseriert (Abb.3.12B). Das Transgen und die Insertion konnten im aufgebauten Stamm MS2-TG bestätigt werden (Abb.3.12C).

Für weiterführende Untersuchungen sollte ein Stamm mit *MS2-EGFP*-Transgen und dem markierten *mlncRNA42E5-1* Transgen aufgebaut und die Transgene mittels Actin-Gal4 zur Expression gebracht werden. Hierzu wurden das *MS2* und das *ActinGal4* Transgen (beide auf dem 3. Chromosom) mittels homologer Rekombination *in cis* kombiniert (siehe 2.1.4) und anschließend das „*mlncRNA42E5-1-5 MS2S1*“ Transgen (6/2, auf dem 2. Chromosom) eingekreuzt und über die Balancerchromosomen SM6 und TM6 stabilisiert.

Später wurde ein Stamm aufgebaut, bei welchem alle Transgene homozygot vorlagen [*w*; *p{w⁺, mlncRNA42E5-1-5 MS2S1}*6/2; *p{w⁺, MS2}*86Fb + *p{w^{+mC} Act5CGal4(FRT.CD2).P}}*S] und diese mittels PCR nachgewiesen (Abb.3.13A).

Sowohl der heterozygote als auch der homozygote Stamm wurden mit RT-PCR auf die Expression der Transgene (Primer *13458r1/S1fwd*; *MS2genefwd/rev*) sowie des *mlncRNA42E5-1*-Gens allgemein (Primer *13458f1/r1*) untersucht. Hierbei ergab sich eine stark erhöhte Expression des *mlncRNA42E5-1*-Gens im Vergleich zum Wildtyp (Abb.3.13B).

A Transgennachweis



B Expressionsnachweis:

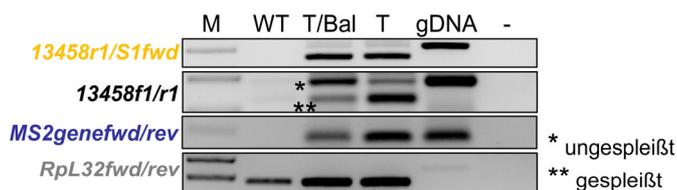


Abb.3.13: Transgen- und Expressionsnachweis der kombinierten transgenen Linie *w*; *p{w⁺, mlncRNA42E5-1-5 MS2S1}*6/2; *p{w⁺, MS2}*86Fb + *p{w^{+mC} Act5CGal4(FRT.CD2).P}}*S. Aus transgenen Linien und ActGal4-Treiber wurde ein Stamm aufgebaut. Dieser wurde mittels PCR auf das Vorhandensein der Transgene *mlncRNA42E5-1-5 S1MS2* (Primer *13458r1/S1fwd*), *MS2* (Primer *MS2genefwd/rev*) und *Gal4* (Primer *Gal4fwd/rev*) überprüft (A). Die Expression der Transgene (Primer *13458r1/S1fwd* und *MS2genefwd/rev*) sowie des *mlncRNA42E5-1*-Gens allgemein (Primer *13458f1/r1*) der Linie wurden im heterozygoten (T/Bal) und homozygoten (T) Zustand mit dem Wildtyp (WT) verglichen (B)

T= Testlinie [*w*; *p{w⁺, mlncRNA42E5-1-5 MS2S1}*6/2; *p{w⁺, MS2}*86Fb + *p{w^{+mC} Act5CGal4(FRT.CD2).P}}*S]

K= Transgenkontrollstamm, jeweils *w*; *p{w⁺, mlncRNA42E5-1-5 MS2S1}* oder *p{w⁺, MS2}*86Fb oder *w*; *p{w^{+mC} Act5CGal4(FRT.CD2).P}}*S.

WT=Wildtyp, *w_{iso}*; untersucht wurden jeweils Männchen.

M=Marker, 100bp Ladder.

Dies bietet eine gute Grundlage, um weiterführend mit Hilfe von *in vivo* EGFP-Signal oder auch einer Antikörperfärbung mit MS2-Antikörper das Transkript der *mlncRNA42E5-1* zu lokalisieren. Ebenso könnten mittels MS2- oder EGFP-Antikörper eventuelle Bindungspartner von *mlncRNA42E5-1* kopräzipitiert und somit identifiziert werden.

3.1.4.3 Generierung einer *mlncRNA42E5-1* Deletion

Zur Untersuchung der Funktion eines Gens ist eine Nullmutante immer von Vorteil. Sie ermöglicht es, bei gleichbleibendem genetischen Hintergrund, direkte oder indirekte Auswirkungen des Genverlustes zu beobachten.

Da sich keine P-Insertionen in der Nähe von *mlncRNA42E5-1* befinden, welche für die Herstellung einer Mutante geeignet wären, sollte eine Mutante mittels homologer Rekombination hergestellt werden. Dazu wurde der Transformationsvektor *pGX-attP{Δ42E5-1}* erstellt, welcher die 5'- und 3'-Bereiche der gewünschten Deletion beinhaltet (Abb.2.1B, Abb.3.14A und B, Herstellung des Vektors siehe auch Abschnitt 2.1.7). Mittels Keimbahntransformation konnten 9 transgene Linien (w^+) aufgebaut werden (EO1-9, siehe Anhang Tab.S1). Die Insertionslinie EO4 wurde für die Herstellung der Deletion verwendet, weil der Insertionsort auf dem linken Arm des 3. Chromosoms (3L, Nt: 22093634) lokalisiert war und sich das Zielgen *mlncRNA42E5-1* auf dem 2. Chromosomen befindet.

Um die gewünschte Deletion herzustellen, wurden analog Huang et al. (2008) Kreuzungen durchgeführt (Abschnitt 2.1.7), welche durch Flipase-Rekombination zum Ausschneiden des transgenen DNA-Abschnittes führten (Abb.2.2). Zwischen diesem DNA-Stück, welches homologe flankierende Bereiche der gewünschten Deletion trug, und der genomischen Zielregion der Fliege konnte es nun zur Rekombination der homologen Abschnitte kommen. Da im transgenen DNA-Stück die gewünschte Deletionsregion durch ein Markergen ersetzt war, würde eine erfolgreiche homologe Rekombination zur Deletion im Genom des Tiers führen. Eine erfolgreiche Integration des DNA-Stücks war anhand des *white*-Markers zu erkennen.

Von 20200 Nachkommen der *Screening*-Kreuzung ergaben sich 351 w^+ -markierte Kandidaten (Männchen und Jungfrauen), bei welchen putativ die homologe Rekombination erfolgt war. Diese wurden in der *Mapping*-Kreuzung daraufhin untersucht, auf welchem Chromosom sich das *white*-Markergen befand. So konnten 349 Kandidaten auf dem 3. Chromosom, unausgebaute Ursprungsinsertionen oder Fehlinsertionen, und zwei auf dem 2. Chromosom (Zielchromosom) lokalisiert werden.

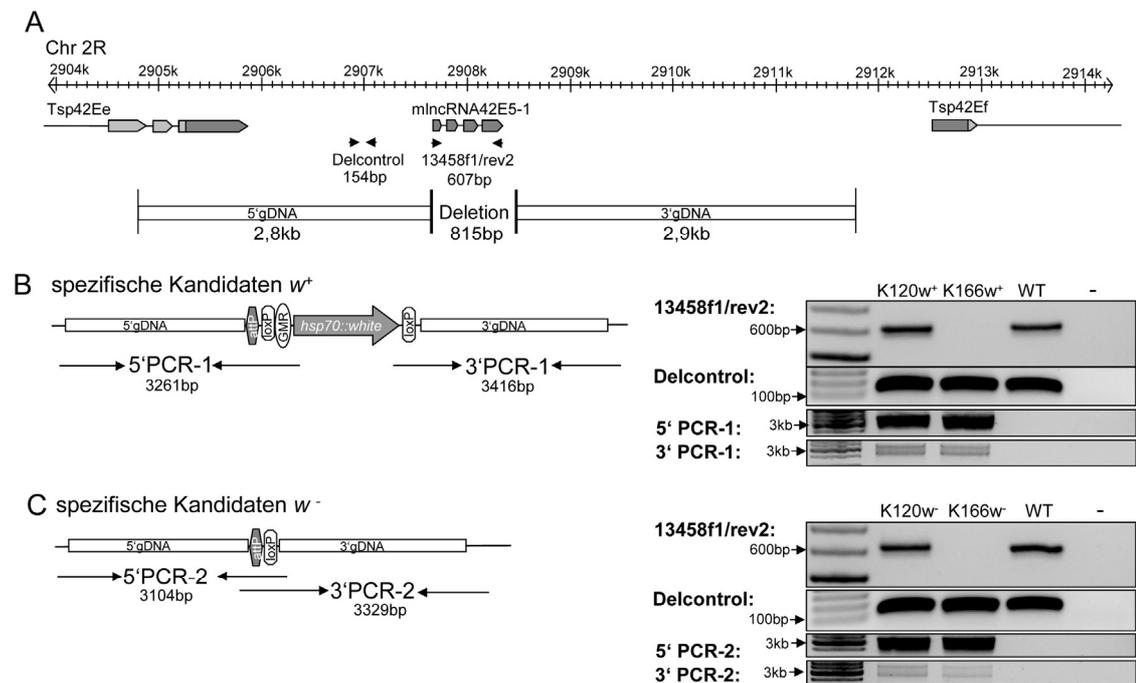


Abb.3.14: Konstruktion und Untersuchung der *mIncrNA42E5-1* Deletionskandidaten. Zur Konstruktion des Transgens wurden die flankierenden Bereiche der gewünschten Deletion kloniert. Eingezeichnet sind ebenso die Bindestellen der zur Überprüfung der Kandidaten verwendeten Primer (**A**). Die mittels homologer Rekombination hergestellten spezifischen Deletionskandidaten K120 und K166 wurden sowohl in ihrer w^+ -Variante (**B**) als auch in ihrer w^- -Variante (**C**) hinsichtlich ihrer korrekten Umbauten per PCR überprüft. Zunächst wurden die Linien auf das Vorhandensein der zu deletierenden Region mit dem Primerpaar *13458f1/rev2* und auf eine außerhalb liegende Kontrollregion (*Delcontrolfwd/rev*) hin untersucht. Des Weiteren wurden auch PCRs über die Orte der Rekombination hinweg durchgeführt (5'PCR und 3'PCR). Die erhaltenen Banden wurden zusätzlich sequenziert.

Diese zwei putativen Deletionskandidaten (spezifische Kandidaten) wurden zusätzlich mittels Kreuzung mit einem ActGal4-Treiber-Transgen hinsichtlich des Vorhandenseins des *Reaper (Rpr)*-Gens untersucht. Bei beiden Kandidaten (K120 und K166) war das *Rpr*-Gen als Bestandteil des Transgens korrekt ausgebaut und führte somit nicht zur Gal4-aktivierten Transkription des *Rpr*-Gens und somit zur Letalität oder Flügelphänotypen in den Stämmen.

Die anschließende Untersuchung der w^+ -Kandidatenstämme mittels PCR mit den Primern *13458f1/rev2* zeigte, dass bei K120 immer noch das WT-DNA-Fragment amplifiziert werden konnte und bei K166 eine Deletion dieses Bereiches vorlag (Abb.3.14B). Allerdings konnten bei beiden Kandidaten die 5' und 3' PCR-Produkte zum Nachweis des erfolgten Rekombinationsereignisses und das Kontrollfragment „*Delcontrol*“ erfolgreich nachgewiesen werden (Abb.3.14B).

Die PCR-Untersuchungen der w^- -Kandidatenstämme bestätigte, dass ausschließlich K166 eine Deletion des Bereiches darstellte und K120 keine echte Deletion verkörpert (Abb.3.14C). Somit wurde ausschließlich K166 für weitere Untersuchungen genutzt.

3.1.4.4 Eine Deletion für *mlncRNA42E5-1* ist ein rezessiver PEV Suppressor und beeinflusst die Expression benachbarter Gene

Die Deletion des Gens *mlncRNA42E5-1* K166 ist homozygot lebensfähig und fertil und zeigte auch keine anderen phänotypischen Effekte (Abb.3.15B).

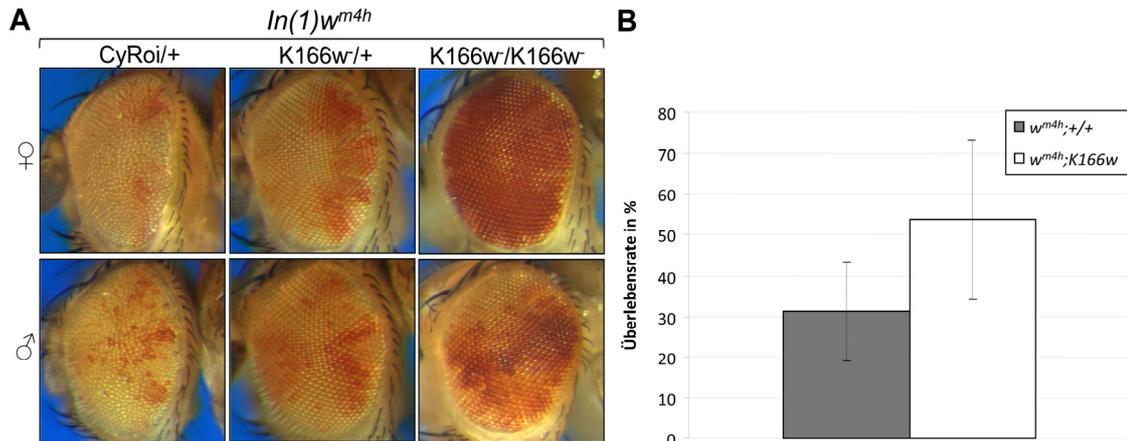


Abb.3.15: Die *mlncRNA42E5-1* Deletion K166 hat einen rezessiven Suppressoreffekt auf das *In(1)w^{m4h}*-System. Augen der F₁-Generation aus der Kreuzung $w^{m4h};+/+$ mit $w^{m4h}/Y;K166w/CyRoi$ und der Kreuzung $w^{m4h};K166w/CyRoi$ mit $w^{m4h}/Y;K166w/CyRoi$. Die Tiere, welche die Deletion für *mlncRNA42E5-1* heterozygot trugen, zeigten keine Unterschiede bezüglich der *white* Genaktivität zu den Kontrolltieren. Tiere mit einer homozygoten Deletion wiesen einen leichten Suppressoreffekt auf *In(1)w^{m4h}* auf (A). Deletionstiere zeigten bezüglich der Überlebensrate keinerlei signifikante Veränderungen gegenüber dem Kontrollgenotyp (B).

Die Analyse des möglichen Einflusses der Deletion auf Auswirkungen auf die *white*-Variegation (Gensilencing) ergab, dass die *mlncRNA42E5-1*-Deletion heterozygot keinen Effekt auf *In(1)w^{m4h}* ausübt (Abb.3.15A). Im homozygoten Zustand konnte allerdings ein leichter Suppressoreffekt beobachtet werden (Abb.3.15A).

Es wurden zur genaueren Charakterisierung im Genlocus des *mlncRNA42E5-1* Gens verschiedene qRT-PCRs durchgeführt um zu prüfen, ob umliegende Gene von der Deletion beeinflusst werden. Das *upstream* der Deletion gelegenen Gen *Tsp42Ee* (Primerpaar *PP1* und *PP2*) und die *downstream* gelegenen Gene *CR44172* (Primer *CR44172fwd/rev*) und *Tsp42Ef* (Primer *Tsp42Effwd/rev*) wurden in der homozygoten Mutante $w;K166w$ untersucht und mit dem Wildtyp w_{iso} verglichen. Diese Untersuchungen wurden in verschiedenen *Drosophila*-Stadien durchgeführt, da *mlncRNA42E5-1* auch einer differentiellen Regulation unterliegt (3.1.1). Das nicht-kodierende Gen *CR44172* weist laut *modEncode*-Daten lediglich im Puppenstadium eine geringe Expression auf, weshalb dieses Gen nur in Puppen untersucht wurde.

Wie zu erwarten, war in allen untersuchten Stadien eine signifikant drastische Verringerung des *mlncRNA42E5-1*-Transkripts zu erkennen (Abb.3.16B-E). Hierdurch ist die Deletion K166 erneut bestätigt worden.

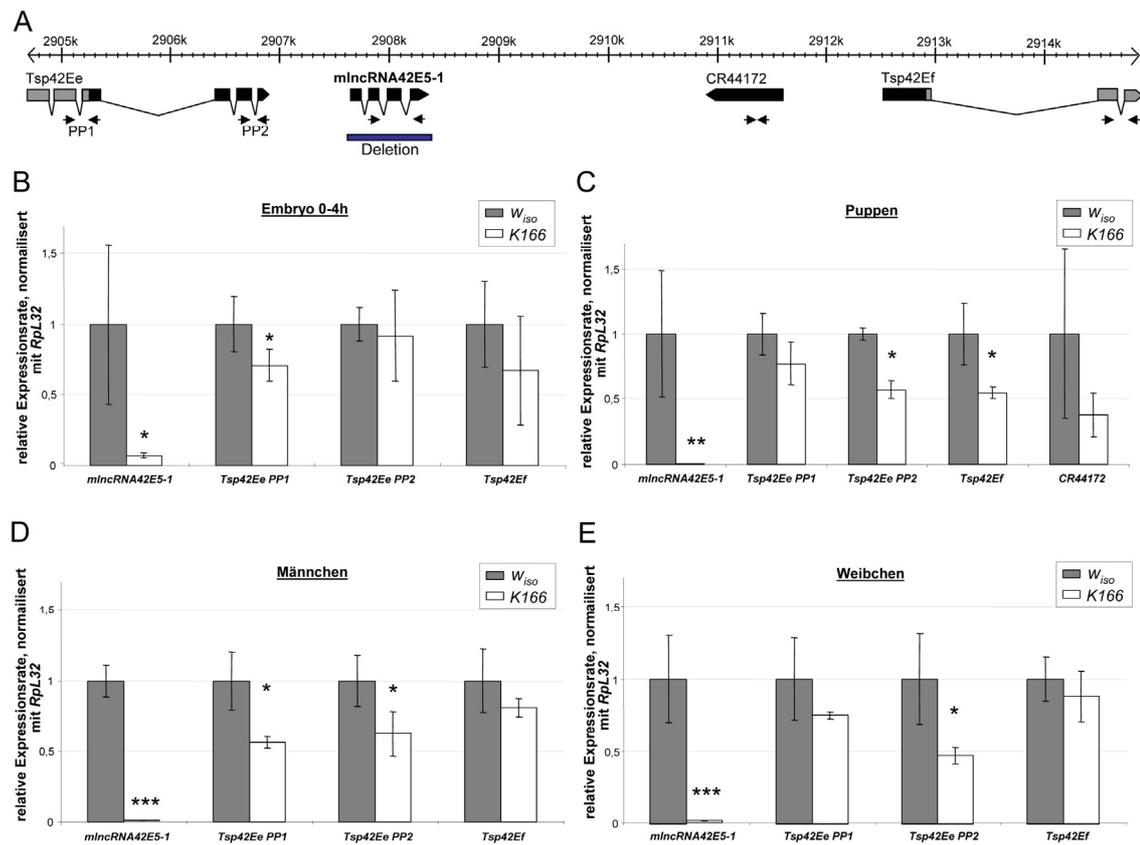


Abb.3.16: Die Deletion von *mlncRNA42E-1* beeinflusst die Genexpression benachbarter Gene. Übersicht über die untersuchte Genregion mit Bindestellen der verwendeten Primer (Pfeile) und Lage der Deletion (blauer Kasten) (A). Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Untersuchungen der Gene *Tsp42Ee*, *mlncRNA42E5-1*, *CR44172* und *Tsp42Ef* in den Entwicklungsstadien 0-4h alte Embryonen (B), Puppen (C), Männchen (D) und Weibchen (E) der Deletionsmutante *K166* im Vergleich zum Wildtyp w_{iso} . Die nicht-kodierende RNA *CR44172* zeigte nur in Puppen eine Expression, weshalb diese nur in diesem Stadium untersucht wurde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005.

Weiterhin ergab sich in Puppen und Männchen (*PP2*), als auch in Embryos und Männchen (*PP1*) ebenfalls eine signifikante Reduktion des *Tsp42Ee*-Transkripts, *upstream* der Deletion gelegen (Abb.3.16B-D). Zusätzlich wurde in Puppen eine signifikante Reduktion des *Tsp42Ef* Transkripts detektiert (Abb.3.16C). Offenbar hat das *mlncRNA42E5-1*-Transkript einen Einfluss auf die Transkription der Gene in seiner Umgebung.

Die *Tsp42Ee* und *Tsp42Ef*-Gene gehören zu den Tetraspaninen. Diese sind in den meisten eukaryotischen Organismen von Vertebraten über Insekten, Pflanzen bis zu Pilzen nachgewiesen (Huang et al., 2005). Bei Menschen sind derzeit 33 Mitglieder der Proteinfamilie bekannt, bei *Drosophila* dagegen 36 (Huang et al., 2005). Typischer Weise bestehen sie aus vier Transmembran-Domänen, einem kleinen (EC1) und einem großen (EC2) extrazellulären Loop, einem kleinen intrazellulären Loop (IL) und kürzeren zytoplasmatischen Schwänzen (Stipp et al., 2003). Charakteristisch sind weiterhin die 4-6 konservierten extrazellulären Cysteine und die polaren Reste in den Transmembrandomänen, welche die Tetraspanine von anderen Proteinen mit 4

Transmembrandomänen abgrenzen (Stipp et al., 2003). Funktionell sind die Tetraspanine in vielen unterschiedlichen Zelltypen wichtig, um Membran-Mikrodomänen für ein Multiproteinnetzwerk zu organisieren, das s.g. Tetraspanin-Netz (Hemler, 1998; Kawakami et al., 2002). Ermöglicht wird dies durch zahlreiche Interaktionen der Tetraspanine mit Integrinen und Signalproteinen (Stipp et al., 2003). Die bekanntesten Vertreter sind wohl die menschlichen Zelloberflächenproteine CD9, CD81 oder CD151.

Die hier untersuchten Gene befinden sich alle im s.g. DmTSP42E-Tetraspanin-Cluster, eine 63kb große Region in welcher sich 18 *Drosophila*-exklusive Tetraspanine befinden (Huang et al., 2005). *Tsp42Ee* wird in Embryonen vor allem in Motoneuronen exprimiert (Fradkin et al., 2002).

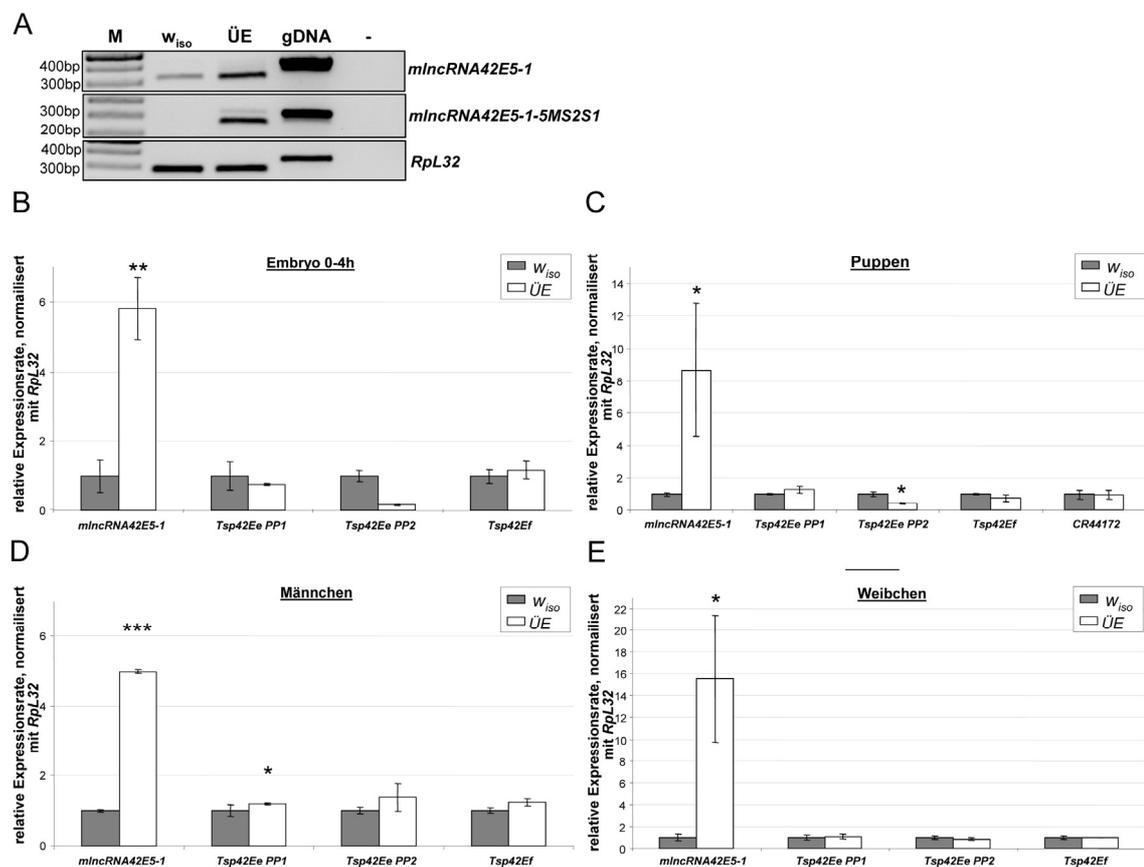


Abb.3.17: Überexpression von *mIncrNA42E5-1* beeinflusst geringfügig die lokale Genexpression. Mit cDNA von Männchen der Überexpressionslinie (ÜE) und WT (w_{iso}) wurde das *mIncrNA42E5-1* Transkript und *mIncrNA42E5-1-MS2S1* semiquantitativ untersucht. Als Ladekontrolle diente *Rpl32* (A). Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Untersuchungen der Gene *Tsp42Ee*, *mIncrNA42E5-1*, *CR44172* und *Tsp42Ef* in den Entwicklungsstadien 0-4h alte Embryonen (B), Puppen (C), Männchen (D) und Weibchen (E). *CR44172* zeigte nur in Puppen eine Expression, weshalb diese nur in diesem Stadium untersucht wurde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; ***:p<0,005.

Während *Tsp42Ee* weiterhin in fast allen Entwicklungsstufen sehr hoch exprimiert ist, wurde für *Tsp42Ef* eine eher moderate Expression gefunden (*modEncode*). Zwei Deletionen, die die Hälfte des Tetraspaninclusters inklusive *Tsp42Ee* und *Tsp42Ef* einschließen, sind homozygot lebensfähig und fertil (Fradkin et al., 2002).

Mit Hilfe der *mlncRNA42E5-1* Transgene mit *MS2S1-tag* war es möglich eine Überexpressionslinie aufzubauen. Diese beinhaltete zwei homozygote UAS-getriebene Transgene und trug somit zusätzlich 4 Kopien *mlncRNA42E5-1-5 MS2S1*. Der Stamm hatte folgende Konstitution: $w^{1118}; P\{w^{mini}, UAS-mlncRNA42E5-1-5 S1MS2\}6/1; P\{w^{mini}, UAS-mlncRNA42E5-1-5 S1MS2\}6/3 + P\{w^{+mC}=Act5C-GAL4(FRT.CD2).P\}S$.

RT-PCRs zeigten in Männchen einen deutlichen Anstieg der *mlncRNA42E5-1* Transkriptmenge im Überexpressionsstamm (Abb.3.17A). Durch quantitative RT-PCRs konnte die Überexpression in allen untersuchten Stadien bestätigt und quantifiziert werden. So konnte die 5-15 fache Menge des Wildtyps erreicht werden (Abb.3.17B-E). Analog zur Deletion wurde auch die Expression der benachbarten Gene im Genlocus überprüft. Hier ergaben sich geringe Erhöhungen der Transkriptmengen von *Tsp42Ee* in Männchen und Verringerungen in Embryos und Puppen (Abb.3.17D; B; C).

3.1.4.5 *mlncRNA42E5-1* beeinflusst genomweite Expression in *Drosophila*

Da bereits lokale Auswirkungen auf Genexpression bei der *mlncRNA42E5-1* Deletion und Überexpression festgestellt wurden (Abb.3.16; 3.17), sollten auch auf genomweiter Ebene Einflüsse auf Transkription untersucht werden. Hierfür wurden, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Krohn (Universität Leipzig), mit Männchen der *mlncRNA42E5-1* Deletionsmutante *w;K166w* sowie dem Kontrollstamm *w_{iso}* RNA-Seq Protokolle durchgeführt. Im Vergleich zu *w_{iso}* wies *K166w* 632 signifikant runter- und 646 signifikant hochregulierte Gene auf (Abb.3.18A). Betrachtet man nur Gene mit einem logFC von über 2 oder unter -2, dann fallen lediglich 68 in diese Kategorie.

Angeereicherte *GO-terms* wurden mit Hilfe des Programms AmiGO (version1.8; release 2014-04-26) erfasst. Bezüglich der molekularen Funktion waren beispielsweise in der Gruppe hochregulierter Gene GO:0003824 (katalytische Aktivität) und G:0016491 (Oxidoreduktaseaktivität) überrepräsentiert (Anhang Tab.S4). Hinsichtlich biologischer Prozesse waren vor allem *GO-terms* verstärkt vorhanden, welche den Umgang mit Stress, beispielsweise Gifte oder xenobiotischen Stress, betreffen (Tab.S4). Bei den herunterregulierten Genen konnten nur bezüglich biologischer Prozesse die *GO-terms* GO:0000003 (Reproduktion) und CG:0032504 (Reproduktion multizellulärer Organismen) als überrepräsentiert registriert werden (Tab.S5).

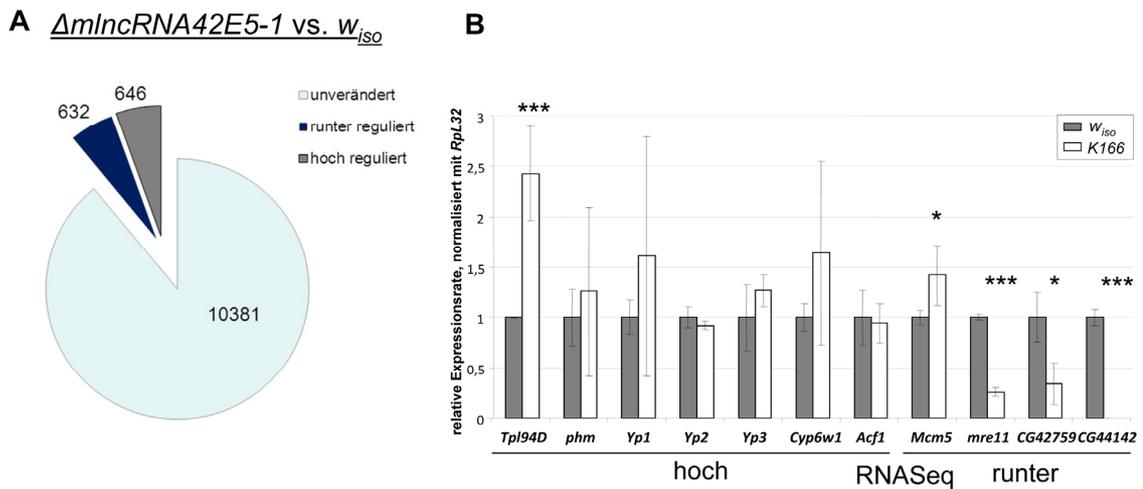


Abb.3.18: Expressionsprofil der Deletion von *mlncRNA42E5-1*. Die Männchen der Deletion *K166w* wiesen in einem durchgeführten RNA-Seq-Experiment gegenüber dem Kontrollgenotyp w_{iso} 632 signifikant runter- und 646 signifikant hochregulierte Gene auf (A). Die Kandidatengene *Tpl94D*, *mre11*, *CG42759* und *CG44142* konnten mittels quantitativer RT-PCR als differentiell reguliert in *K166* bestätigt werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$. (B).

Die Regulation ausgewählter Gene sollten anschließend mittels qRT-PCR verifiziert werden. Die Transkriptmengen des Chromatinassembly-Faktors *Acf1*, der Yolkprotein-Gene 1-3 (*Yp1-3*), der Cytochrom P450-Gene *Cyp6w1* und *phantom* (*phm*) konnten mittels qRT-PCR nicht als signifikant erhöht bestätigt werden (Abb.3.18B). Das *Transition protein like 94D*-Gen (*Tpl94D*) wurde hingegen als hochreguliertes Gen bestätigt. Es war mit durchschnittlich 2,4 fach höherer Expression als der Kontrollstamm w_{iso} signifikant verändert (Abb.3.18B).

Die aus der RNA-Seq als herunterreguliert ausgesuchten Gene konnten weitestgehend als differentiell reguliert in der Mutante *K166* bestätigt werden. Lediglich *Minichromosom maintenance 5* (*Mcm5*) zeigte in der Mutante den gegenteiligen Effekt und war um 1,4 fach höher exprimiert als im Kontrollstamm (Abb.3.18B). Die Herunterregulation der Gene *meiotic recombination 11* (*mre11*), *CG42759* und *CG44142* konnte als signifikant bestätigt werden (Abb.3.18B).

Während *Mre11* im MRN-Komplex ein zentraler Bestandteil bei der Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche ist (Assenmacher & Hopfner, 2004), sind die Funktionen von *CG42759* und *CG44142* unbekannt. Beide sind mit einer Größe von 359bp und 334bp sehr kleine Gene und würden mit 70 bzw. 83AS auch nur für kleine Proteine kodieren. Laut CPC Score ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es sich bei diesen um nicht-kodierende Gene handelt.

Beide sind laut *modENCODE* eher ab den späteren Lebensstadien also Puppen- oder Adultstadium exprimiert und bei beiden konnten keine Orthologe außerhalb der *Drosophiliden* identifiziert werden.

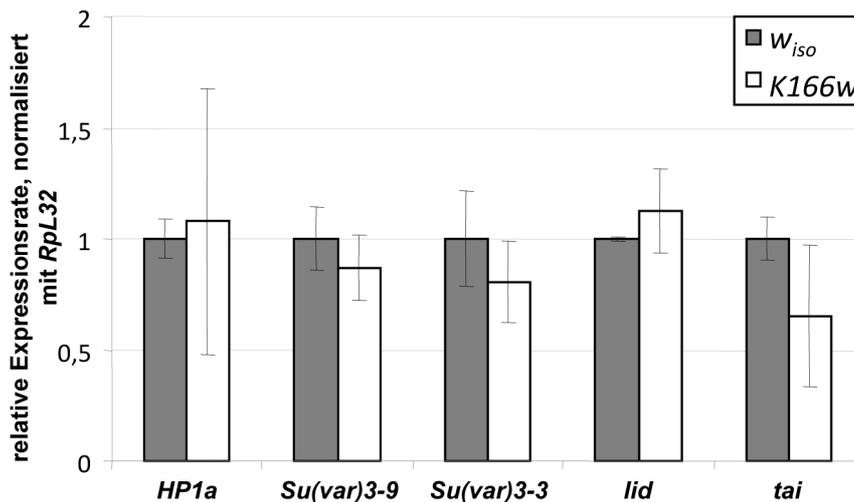


Abb.3.19: Verschiedene PEV-Modifikatoren sind nicht differentiell reguliert in der Deletion von *mIncRNA42E5-1*. Mittels qRT-PCR konnten die Gene *HP1a*, *Su(var)3-9*, *Su(var)3-3*, *lid* und *tai* als in *K166w*-Männchen nicht differentiell reguliert klassifiziert werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005.

Da die *mIncRNA42E5-1* Deletion einen rezessiven Suppressoreffekt auf PEV zeigte (Abb.3.15A), wurde ebenfalls die Expression einiger bekannter PEV-Modifikatoren untersucht. Weder bei *HP1a*, *Su(var)3-9*, *Su(var)3-3*, *lid* oder *tai* konnten signifikante Expressionsänderungen festgestellt werden (Abb.3.19).

Eine direkte Beeinflussung dieser epigenetischen Faktoren scheint demnach auf transkriptioneller Ebene nicht stattzufinden. Folglich wäre eine Zusammenarbeit von *mIncRNA42E5-1* mit Faktoren der Chromatindifferenzierung wie SU(VAR)3-9 denkbar, die bei der Deletion von *mIncRNA42E5-1* zu veränderten Histonmodifizierungen am w^{m4h} -Locus führen und somit den rezessiven Suppressoreffekt begründen würde.

3.2 Ecdyson-Signalling und die Kontrolle epigenetischer Effekte

Die frühembryonale Differenzierung von Eu- und Heterochromatin ist in *Drosophila* ein vielfältig kontrollierter Mechanismus. Bereits mehrere *Su(var)* und *E(var)*-Gene konnten identifiziert werden, welche diesen Vorgang beeinflussen. Die H3K4-Demethylasen SU(VAR)3-3 und LID beispielsweise beeinflussen die H3K9-Methylierungen an den Grenze von Eu- und Heterochromatin und sorgen so mittels verschiedener Interaktionspartner für die Differenzierung der Chromatinzustände (Rudolph et al., 2007; Baisch, 2010).

In einem Deletions- und Duplikations-Screen mittels der DrosDel-P-Elementkollektion wurde der Ecdysonrezeptor-Koaktivator TAIMAN als dominanter Suppressor für *In(1)w^{m4h}*-PEV identifiziert (Apelt, 2005). Mit diesem Faktor konnte erstmals gezeigt werden, dass molekulare Signale (Hormonsignale) für die Initiation der Chromatindifferenzierung von Bedeutung sind (Lein, 2011).

3.2.1 P-Insertionsmutanten beeinflussen die Transkriptmenge von *taiman*

Das *taiman*-Gen (*tai*) befindet sich auf dem linken Arm des 2. Chromosoms und besitzt zwei Transkriptvarianten, welche sich im 5' Bereich unterscheiden (Abb.3.20A). Laut bioinformatischen Vorhersagen liegt bei beiden der Translationsstart im gleichen Exon, dem fünften, und sie teilen somit die gleiche Proteinsequenz.

Von den vorliegenden sechs P-Insertionen innerhalb des Genbereiches wurden fünf als PEV-Suppressormutationen identifiziert (*5-HA-2281*, *CB-5878-3*, *5-HA-1530*, *5-SZ-4051* und *5-SZ-3139*). Diese sind in ihrer *remnant* Form (*r*, das Markergen *white* wurde durch Flipase-Rekombination zerstört) dominante Suppressoren für PEV (Lein, 2011) und homozygot lebensfähig. Die P-Insertion *CB-5460-3r* im Intron zwischen den Exons 6 und 7 zeigt keinen Suppressoreffekt (Apelt, persönliche Mitteilung).

Durch die Flipaseinduzierte *site*-spezifische Rekombination der DrosDel-Elemente wird jeweils ein Teil des Markergens *white* aus dem Transgen entfernt. Zurück bleibt, je nach Lage der FRT-Stellen des P-Elements, der 5' oder der 3' Teil des *white* Gens. Dadurch liegen innerhalb der P-Elemente freie Spleißdonoren oder -akzeptoren an den *white*-Exons vor und es sollte untersucht werden, ob diese eventuell zu nicht-natürlichen chimären Transkripten führen könnten (Abb.3.20A).

Mittels RT-PCR und Sequenzierung konnten chimäre Transkripte zwischen dem *white*- und dem *taiman*-Gen nachgewiesen werden. So wird in Linie *5-HA-2281r* das erste Exon des *white*-Gens an das fünfte Exon des *taimans* gespleißt (Abb.3.20B).

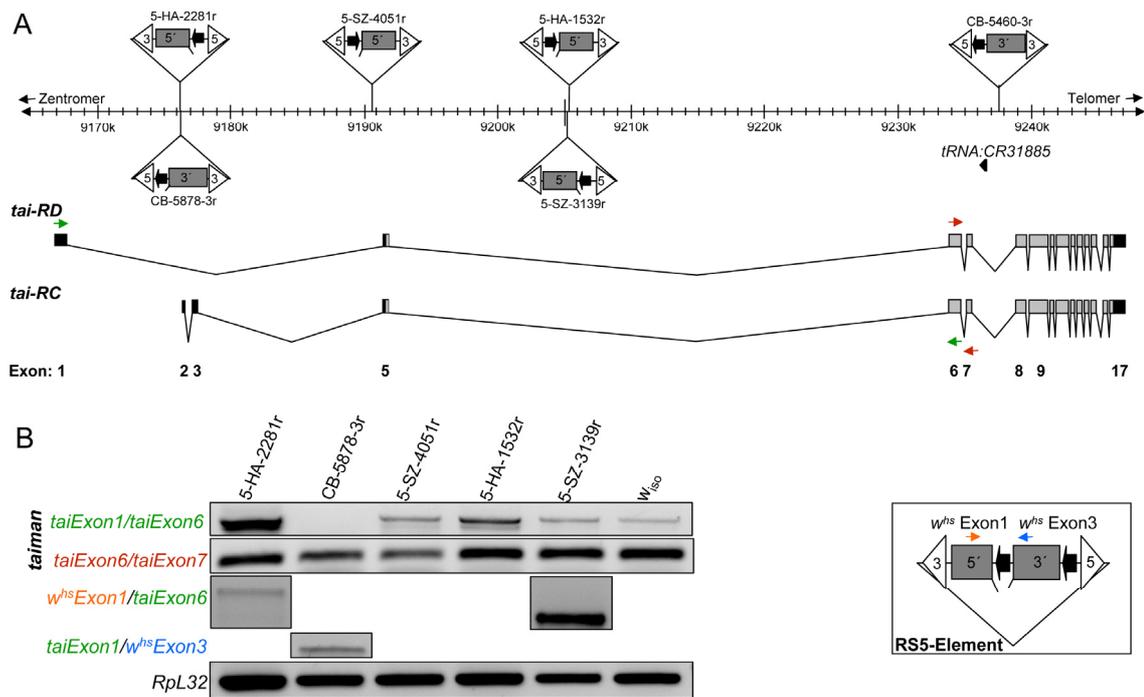


Abb.3.20: Die P-Insertionen im Genbereich des *taiman* Gens. *taiman* und die in seinem Genbereich inserierten DrosDel-P-Insertionen mit schematischem Aufbau der *remnant* P-Elemente. Die Pfeile stellen die Bindestellen der zur semiquantitativen RT-PCR verwendeten Primer dar (A). So wurden mittels RT-PCR die zwei Spleißvarianten von *taiman* und auch die chimären Spleißformen zwischen *taiman* und *white* der P-Elemente nachgewiesen. Untersucht wurden homozygote Männchen (B). Die Bezeichnung der Exons erfolgte analog der *Flybase2013_01*-Annotation.

Linie *CB-5878-3r* weist ein chimäres Transkript zwischen erstem *tai*-Exon und den 3' Exonen des *white* Gens auf und auch in Linie *5-SZ-3139r* konnte Spleißen zwischen dem ersten Exon des *white* Gens und dem sechsten Exon von *tai* nachgewiesen werden (Abb.3.20B). Bei allen weiteren Linien schließen sich solche artifizien Transkripte aus, da dort Spleißdonoren an Spleißdonoren angrenzen würden.

Des Weiteren wurde untersucht, ob das Vorhandensein der chimären Transkripte einen Einfluss auf die Quantität der *taiman*-Transkripte in frühen Embryonen hat. Hierfür wurden für quantitative RT-PCRs verschiedene Primerkombinationen gewählt, welche die Transkripte *tai*-RD (*tai*-Exon1fwd/*tai*Exon5rev), *tai*-RC (*tai*Exon2/3fwd/*tai*Exon5rev) und *tai*-Gesamt (*tai*Exon6fwd/*tai*Exon7rev) nachweisen können.

Die *taiman*-Expression beider Transkripte ist in der Insertionsmutante *5-HA-2281r* deutlich reduziert im Vergleich zum Kontrollstamm *w^{m4h};+/+* (Abb.3.21). Das bereits erwähnte chimäre Transkript aus *white* und *taiman* (Abb.3.20B) ist höchst wahrscheinlich ursächlich für die unveränderte Gesamttranskriptmenge, detektiert mittels Primern im 6. und 7. Exon (Abb.3.21). Da im P-Element-Konstrukt ein konstitutiv exprimierender *Hsp70*-Promotor dem *white*-Gen vorgelagert ist, wird das chimäre Transkript verstärkt gebildet und somit bleibt die Gesamttranskriptmenge

gemessen an Exons 6/7 gleich, obwohl die Transkription der ersten Exons deutlich reduziert ist gegenüber dem Kontrollstamm.

Durch das Spleißen des 3' Teils des *white* Gens an das erste *tai*-Exon in Linie *CB-5878-3r*, wird die Transkriptmenge des *tai-RD* im Vergleich zum Kontrollstamm um fast 100% drastisch reduziert (Abb.3.20B und Abb.3.21). Die andere Spleißvariante *tai-RC* liegt allerdings in erhöhter Menge (4,3 fach) vor (Abb.3.21). So kommt es bei der Messung der Gesamtmenge an Transkript zu einer minimalen Erhöhung (Abb.3.21).

Die Linien *5-HA-1532r* und *5-SZ-4051r* zeigten kaum Änderungen der Transkriptmengen (Abb.3.21). Da es sich bei den in Frage kommenden Exons/Introns wie oben erwähnt immer um freie Spleißdonorstellen handelt, ist auch kein Spleißvorgang zwischen *taiman* und *white* möglich. Die Effekte dieser Mutanten lassen sich somit nicht mit Spleißdefekten oder Unterschieden in der Transkriptmenge von *tai* erklären.

Die Insertionsmutante *5-SZ-3139r* zeigte für alle Primerkombinationen keinen signifikanten Expressionsunterschied zum Kontrollstamm (Abb.3.21). Das bereits erwähnte nachgewiesene chimäre Transkript mit dem ersten Exon des *white*-Gens und dem sechsten Exon des *taiman*-Gens (Abb.3.20B) führte demnach nicht zur erwarteten Erhöhung der Gesamttranskriptmenge in Embryonen (Abb.3.21).

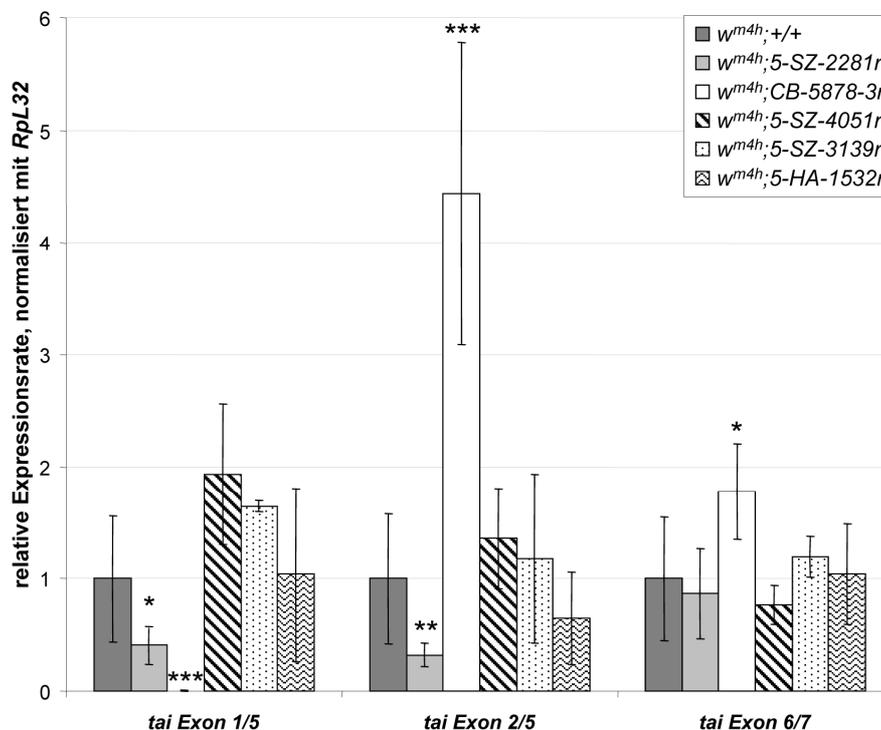


Abb.3.21: Relative Expression der *taiman*-Transkripte verschiedener Insertionsmutanten.

Die *taiman*-Expression in den Insertionsmutanten im Vergleich zum Kontrollstamm $W^{m4h};+/+$ wurde untersucht mit Primern, welche in den Exons 1 und 5 (*tai-RD*), 2 und 5 (*tai-RC*) und 6 und 7 (Gesamttranskript) binden. Die RNA wurde aus 0-4h alten homozygoten Embryonen der Mutantenstämme ($W^{m4h};Insertion/Insertion$) gewonnen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$.

Zusammenfassend lässt sich auf Grund der Effekte auf PEV sagen, dass alle Mutanten einen Einfluss auf die *tai*-Funktion ausüben. Die meisten Insertionsmutanten scheinen lediglich die Quantität an Wildtyp-*tai* zu beeinflussen (Abb.3.21) und somit sind alle homozygot lebensfähig und hypomorph.

3.2.2 Charakterisierung der Deletion *Df(2L)tai2*

Mittels der P-Insertionen *5-SZ-4051r* und *5-HA-1530r* wurde durch Flipase-Rekombination die 14,5kb große, interne semiletale Deletionsmutante *Df(2L)tai2* hergestellt (Abb.3.22C; Apelt, persönliche Mitteilung). Diese deletiert das Exon 5 und einen Teil Intron und weist ebenfalls einen dominanten Suppressoreffekt auf *In(1)w^{m4h}* auf (Abb.3.22A; B). Durch einen 5' RACE mit Embryonen der homozygoten Deletionsmutante konnte gezeigt werden, dass immer noch *tai*-Transkript gebildet wird. Es wurde ein Transkript nachgewiesen, welches aus den Exons eins, sechs und sieben besteht und ein zweites mit den Exons zwei, drei, sechs und sieben (Abb.3.22D).

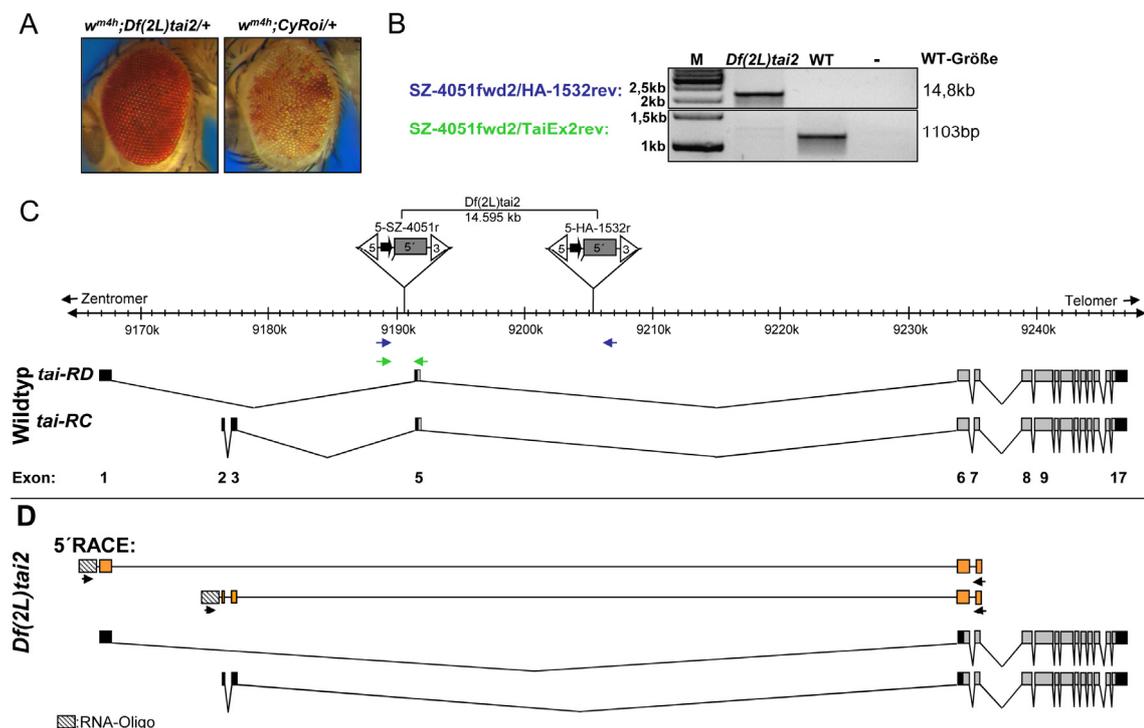


Abb.3.22: Molekulare Charakterisierung der Deletionsmutante *Df(2L)tai2*. *Df(2L)tai2* ist ein dominanter Suppressor des *In(1)w^{m4h}*-PEV-Systems (**A**). PCRs mit verschiedenen Primern (Pfeile, blau und grün) und anschließende Sequenzierungen zeigen eine Deletion von 14595bp, welche das Exon 5 und Intronanteile einschließen (**B**). Übersicht über die Genstruktur von *tai* mit seinen zwei Transkriptvarianten *tai-RC* und *tai-RD* (**C**). Mittels 5' RACE mit Hilfe der eingezeichneten Primer (Pfeile, schwarz) wurden homozygote Embryonen der *Df(2L)tai2* hinsichtlich des *tai*-Transkripts untersucht. In den Mutantentranskripten werden das 1. bzw. das 2. und 3. Exon direkt an das Exon 6 gespleißt (**D**).

Trotz sehr großer genomischer Distanz zwischen ihnen, werden das erste Exon (*tai-RD*) bzw. das dritte Exon (*tai-RC*) an das sechste Exon gespleißt (Abb.3.22D). Da das Exon 5 die Translationsstartsequenz des Gens enthält, fehlt dem *Df(2L)tai2*-Transkript diese.

Weiterhin zeigte eine quantitative RT-PCR mit frühen Embryonen, dass durch das Fehlen des fünften Exons die Transkriptvarianten, welche dieses einschließen, nicht nachweisbar sind (Abb.3.23A). Die Menge an Gesamttranskript (beide Transkriptvarianten zusammen, gemessen an Exon 6/7) ist signifikant reduziert in *Df(2L)tai2* auf etwa 60% des Kontrollstamms *w^{m4h};+/+* (Abb.3.23A). Dass noch eine erhebliche Menge an Gesamttranskript nachweisbar war, ist durch die nachgewiesen weiterhin stattfindende Transkription der Mutantentranskripte erklärbar.

Das TAI-Protein umfasst 2047AS und enthält neben einer Helix-Loop-Helix-Domäne und zwei PAS-Domänen auch mehrere LXXLL-Motive und Poly-Glutamin Bereiche (Abb.3.23B; Bai et al., 2000). Es besteht die Möglichkeit, dass unter Nutzung eines *in-frame*-befindlichen ATGs im sechsten Exon von *tai* auch in der Mutante *Df(2L)tai2* ein Protein translatiert wird. Diesem würden N-terminale AS fehlen, es wäre 1826AS groß und würde alle bekannten Proteinstrukturen enthalten (Abb.3.23B).

Mit einem polyklonalen TAIMAN-spezifischen Antikörper konnte in immunzytologischen Färbungen der larvalen Speicheldrüsen der Mutanten *5-SZ-3139r* und *Df(2L)tai2* eine stark verringerte Färbung beobachtet werden (Lein, 2011).

Es ist also davon auszugehen, dass entweder kein *taiman*-Transkript translatiert wird, oder das Mutanten-Protein nicht funktionell und somit nicht am Chromatin gebunden ist.

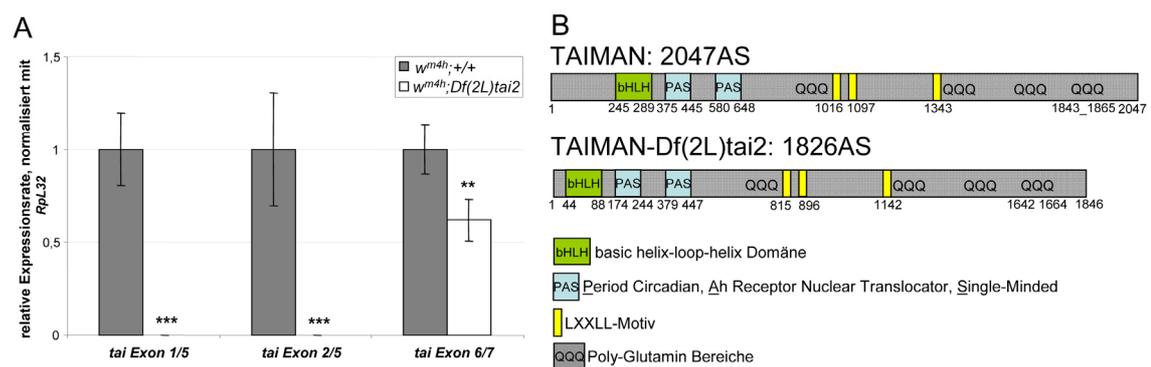


Abb.3.23: Charakterisierung der *tai-Df(2L)tai2*-Transkripte. Relative Quantifizierung der *tai*-Transkripte *tai-RD* (Exons 1/5) und *tai-RC* (Exons 2/5) und Gesamt-*tai* (Exons 6/7) der Mutante *Df(2L)tai2* im Vergleich zum Wildtyp *w^{m4h};+/+*. Transkripte, welche das Exon 5 enthalten, können in der Mutante nicht nachgewiesen werden. Die Menge an Gesamttranskript ist signifikant reduziert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005 (A). Das putativ translatierte Protein der *Df(2L)tai2* könnte durch Nutzung eines *in-frame*-befindlichen ATGs im 6. Exon wildtypähnlich sein. Alle bekannten Domänenstrukturen wären weiterhin enthalten, aber ein Teil des N-Terminus würde fehlen (B).

Des Weiteren wurde die Mutante *Df(2L)tai2* hinsichtlich ihrer Letalität untersucht. Hierzu wurden Eiablagen des Kontrollstamms $w^{m4h};+/+$ und der Deletion *Df(2L)tai2* ausgezählt und die Nachkommen weiter beobachtet. Es zeigte sich, dass die Anzahl der abgelegten Eier der *Df(2L)tai2*-homozygoten Weibchen bei einer Temperatur von 25°C höher ist als bei 18°C (Abb.3.24A). Damit legen diese Weibchen durchschnittlich nur 83% bei 25°C oder 23% bei 18°C der Menge abgelegter Eier des Kontrollstamms.

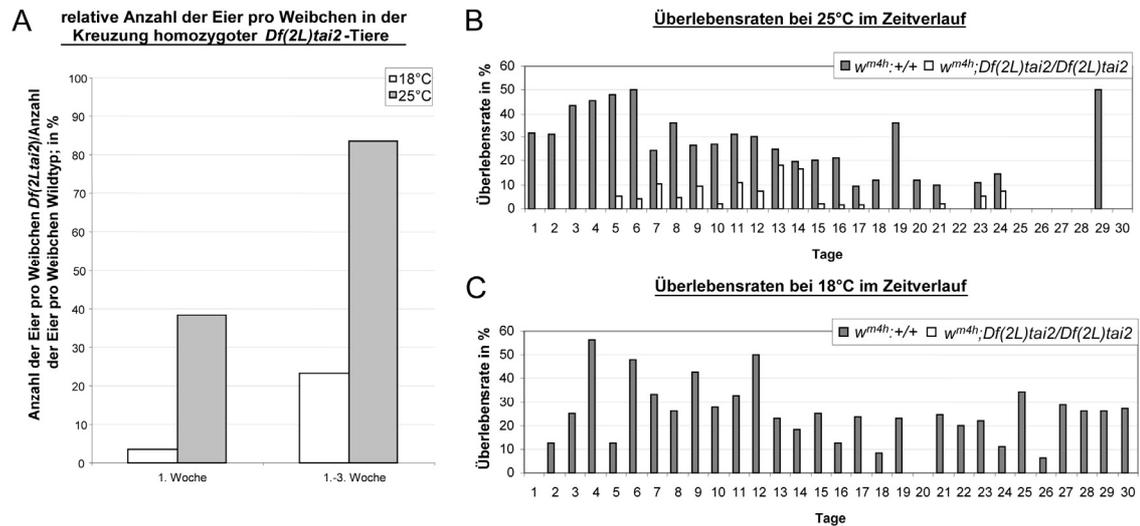


Abb.3.24: Eiablage und Überlebensraten der Mutante *Df(2L)tai2*. Die Anzahl der abgelegten Eier der Kreuzung von homozygoten *Df(2L)tai2* Weibchen und Männchen bezogen auf die Anzahl der Weibchen ist bei einer Temperatur von 25°C erhöht im Vergleich zu 18°C. Bei beiden Temperaturen ist die Eiablage deutlich verringert gegenüber dem Wildtyp $w^{m4h};+/+$ (A). Die Überlebensrate der Mutante *Df(2L)tai2* ist stark reduziert gegenüber dem Wildtyp. Bei 25°C-Bedingungen können bis zu 18% der Mutanten-Embryonen das Adultstadium erreichen (B). Bei 18°C konnten keine Mutantentiere beobachtet werden, welche das Adultstadium erreichen (C).

Zieht man nur die erste Woche in die Betrachtung ein, dann verringern sich die relativen Ablagezahlen auf 38% bei 25°C und 2,8% bei 18°C (Abb.3.24A). Offenbar brauchen die gleichalten homozygoten Mutantentiere der *Df(2L)tai2* längere Zeit als der Kontrollstamm um größere Ablegeraten zu erzielen. Nach ca. 2 Wochen sind sie bei optimalen Bedingungen von 25°C in der Lage bis zu 83% der Eiablagemenge des Kontrollstammes zu erreichen.

Ausschließlich bei 25°C können einige wenige Embryonen der Deletionsmutante überleben und zu adulten Tieren heranreifen (durchschnittlich 5,7%; Abb.3.24B, C). Bei 18°C konnten keinerlei erste Larven beobachtet werden. Die Mutantenlinie *Df(2L)tai2* ist demnach temperatursensibel und semiletal. Bei Embryonenfärbungen konnte beobachtet werden, dass die meisten homozygoten *Df(2L)tai2*-Embryonen sehr früh in ihrer Entwicklung sterben.

3.2.3 Deletionen im *taiman*-Gen sind dominante Suppressoren für PEV

Da gezeigt wurde, dass bei der Mutante *Df(2L)tai2* noch ein verkürztes Transkript entstehen kann, sollten weitere Mutanten hergestellt werden, die den 3' Bereich des Gens betreffen. Durch einen P-Element-Ausbau der Insertion *CB-5460-3* wurde dieses realisiert. Die Remobilisierung dieses Elements mittels Transposase wurde gezielt auf ungenaue Ausbauten selektiert, welche somit eine *taiman*-Mutante darstellen könnten (siehe 2.1.6). Mit den verschiedenen Primerkombinationen *taidel7fwd/rev* und *taidel8fwd/rev* wurden die putativen Deletionsmutanten untersucht und sequenziert. Aus 110 w Ausnahmetieren konnten die vier Revertantenlinien R66, 74, 82 und 95 als Deletionen isoliert werden (Abb.3.25). Bis auf die Linie R74 sind alle homozygot letal. Offenbar verursachen diese Mutationen einen starken Effekt auf die *taiman*-Funktion so dass es zu einer frühembryonalen Letalität kommt. Die Deletionen R66 und R82 weisen eine gleiche Deletion von 3693bp auf, welche dem Intron entspricht. Obwohl bei R95 nur 3302bp deletiert sind und keinerlei Exonsstrukturen betroffen sind, zeigt auch diese Linie eine homozygote Letalität.

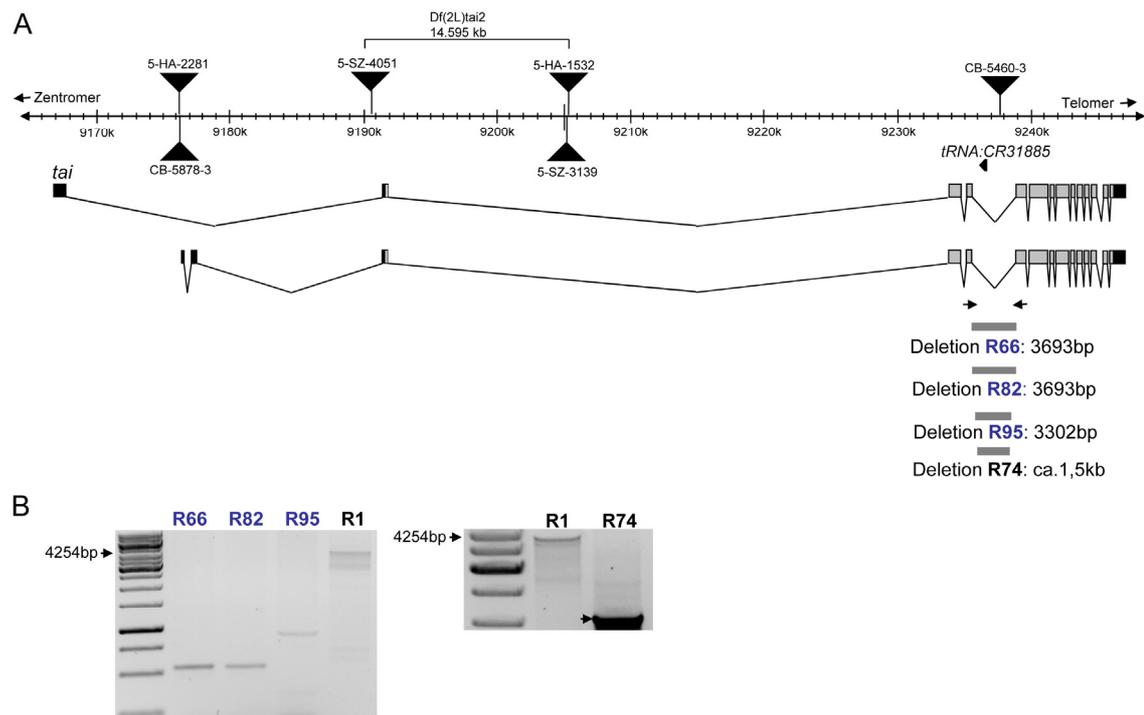


Abb.3.25: Revertanten der *CB-5460-3*-Remobilisierung. Genomische Übersicht über den *taiman*-Locus mit Lage aller vorhandenen Insertionen und Mutationen. Ebenso sind die Deletionen verzeichnet, welche durch P-Element-Remobilisierung des Elements *CB-5460-3* erstellt wurden (R66, 82, 74, 95, graue Balken) (A). Sie wurden mittels PCR und Sequenzierung hinsichtlich ihres Ausbaus untersucht. Das Wildtypfragment der PCR betrug 4254bp und liegt in den Deletionslinien deutlich verkürzt vor (B). blau: homozygot letal, schwarz: homozygot lebensfähige Deletionen, R1: vollständige Revertante mit exakter Reversion (wurde als Kontrolle mitgeführt).

Es konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass *taiman*-Mutanten dominante Suppressoren für PEV sind und dass der am w^{m4h} -Locus vorliegende Histon 3 Lysin 9 Dimethyl-Gradient signifikant reduziert ist in der hypomorphen Mutante 5-SZ-3139r (Lein, 2011).

Durch die Kreuzungen von $w^{m4h}/w^{m4h};+/+$ mit $w^{m4h}/Y;Deletion/CyRoi$ und der reziproken Kreuzung $w^{m4h}/w^{m4h};Deletion/CyRoi$ mit $w^{m4h}/Y;+/+$ sollte der Effekt der Deletionen auf die Reprimierung des *white* Gens in der Inversion $In(1)w^{m4h}$ untersucht werden.

Hierbei zeigten sich, unabhängig davon ob die Revertante maternal oder paternal in die Kreuzung eingebracht wurde, dominante Suppressoreffekte in allen Revertanten (Abb.3.26A, B).

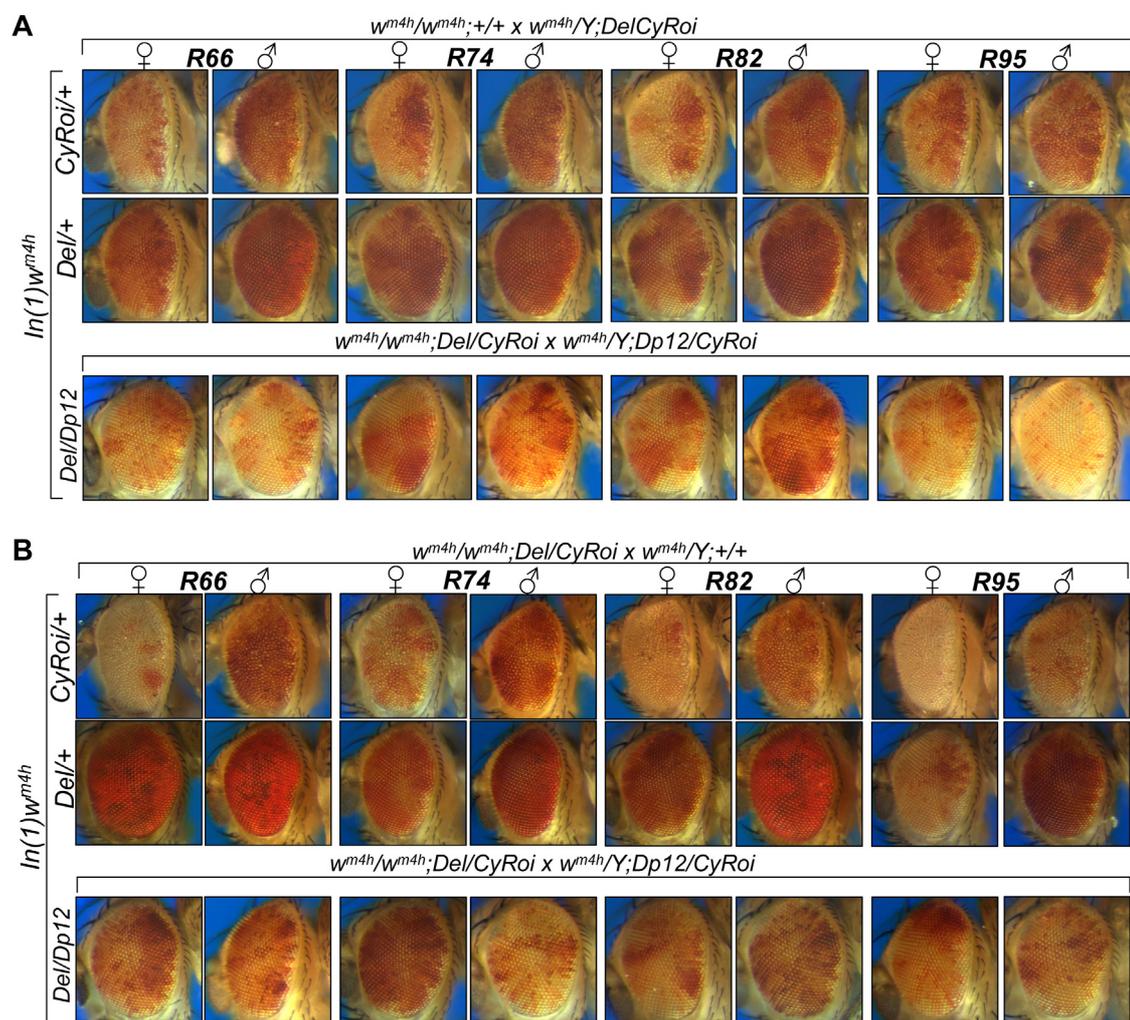


Abb.3.26: Deletionen im *tai* Gen sind dominante Suppressoren für PEV. Augen der F_1 -Generation der Kreuzung von $w^{m4h}/w^{m4h};+/+$ mit den Deletionsstämmen ($w^{m4h}/Y;Del/CyRoi$). Der dominante Suppressoreffekt kann durch Einkreuzen einer Duplikation (Dp12), welche das *taiman*-Gen einschließt, wieder gerettet werden (**A**). Augen der F_1 -Generation der Kreuzung der Deletionsstämmen ($w^{m4h}/Y;Del/CyRoi$) mit $w^{m4h}/w^{m4h};+/+$. Der dominante Suppressoreffekt kann durch Einkreuzen einer Duplikation (Dp12), welche das *taiman*-Gen einschließt, wieder gerettet werden (**B**).

Durch Einkreuzen einer zusätzlichen Genkopie von *taiman* in Form einer Duplikation (Dp12, Chr. 2L: Nt 8415721-9581740 dupliziert), ließ sich der dominante Suppressoreffekt in beiden Kreuzungen bei allen Revertanten retten (Abb.3.26A, B).

3.2.4 Die *taiman*-Mutante tai^{61G1} zeigt einen maternalen Suppressoreffekt

Die erste Mutante für *taiman*, tai^{61G1} , wurde im Zuge eines Screenings nach Defekten im Migrationsverhalten von Border-Zellen der Germarien isoliert (Bai et al., 2000). Aufgrund der vorhandenen Daten zu *taimans* Einfluss auf heterochromatisches Gensilencing (Apelt, 2005; Lein, 2011; Abb. 3.26A, B), wurde auch das mittels EMS-Mutagenese erzeugte tai^{61G1} -Allel im $In(1)w^{m4h}$ -System untersucht.

Das Allel tai^{61G1} weist keinen dominanten Effekt in Bezug auf die *white* Genaktivierung in $In(1)w^{m4h}$ auf, wenn es paternal eingekreuzt wird (Abb.3.25A). Wird das Allel allerdings von maternaler Seite eingekreuzt, zeigt sich ein leichter Suppressoreffekt auf $In(1)w^{m4h}$, welcher in Männchen stärker ausgeprägt ist (Abb.3.27B). Durch Einkreuzen einer Duplikation, welche das *taiman*-Gen beinhaltet, lässt sich dieser Suppressoreffekt wieder retten (Abb.3.27B unten). Diese Analysen zeigen, dass auch die Mutante tai^{61G1} einen maternalen Effekt auf PEV hat.

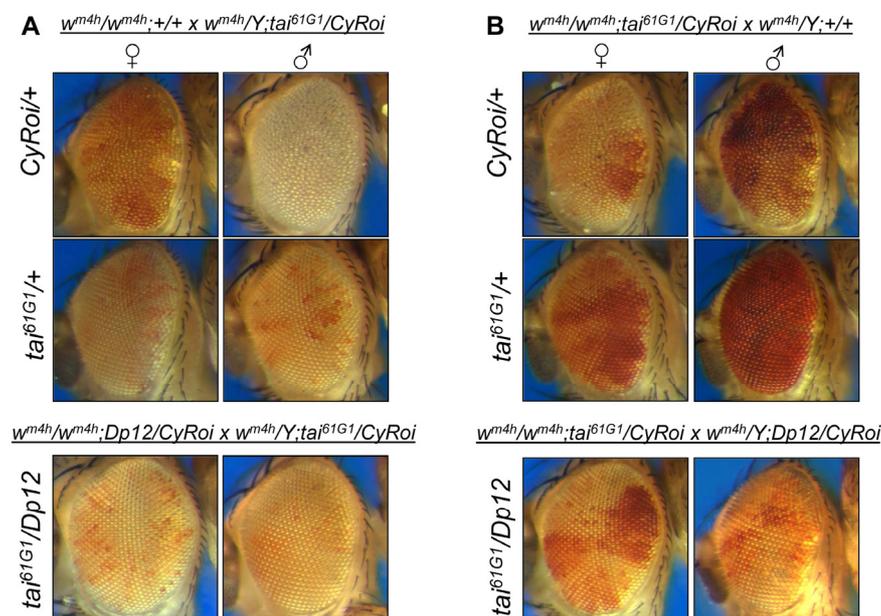


Abb.3.27: tai^{61G1} hat einen maternal dominanten Suppressoreffekt auf PEV. Die F_1 -Generation aus der Kreuzung $w^{m4h}/w^{m4h};+/+$ mit $w^{m4h}/Y; tai^{61G1}/CyRoi$ zeigt keinen Unterschied zu den Kontrolltieren $CyRoi/+$. Die Rettungskreuzung mit der Duplikation 12 lässt auch keinen Effekt auf das $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement erkennen (A). Die Tiere der F_1 -Generation aus der reziproken Kreuzung $w^{m4h}/w^{m4h}; tai^{61G1}/CyRoi$ mit $w^{m4h}/Y; +/+$ weisen einen dominanten Suppressoreffekt auf. Dieser kann durch die zusätzliche *tai*-Genkopie in der Duplikation 12 gerettet werden (B).

Des Weiteren wurden transheterozygote Tiere ($w^{m4h};tai^{61G1}/Df(2L)tai2$) hergestellt. Hierfür wurden die Stämme $w^{m4h};tai^{61G1}/CyRoi$ und $w^{m4h};Df(2L)tai2/CyRoi$ miteinander verkreuzt. Die Transheterozygoten wurden anschließend untereinander verkreuzt, um sie hinsichtlich Sterilitätsphänotypen zu untersuchen. Ebenso wurden ihre Augenphänotypen dokumentiert.

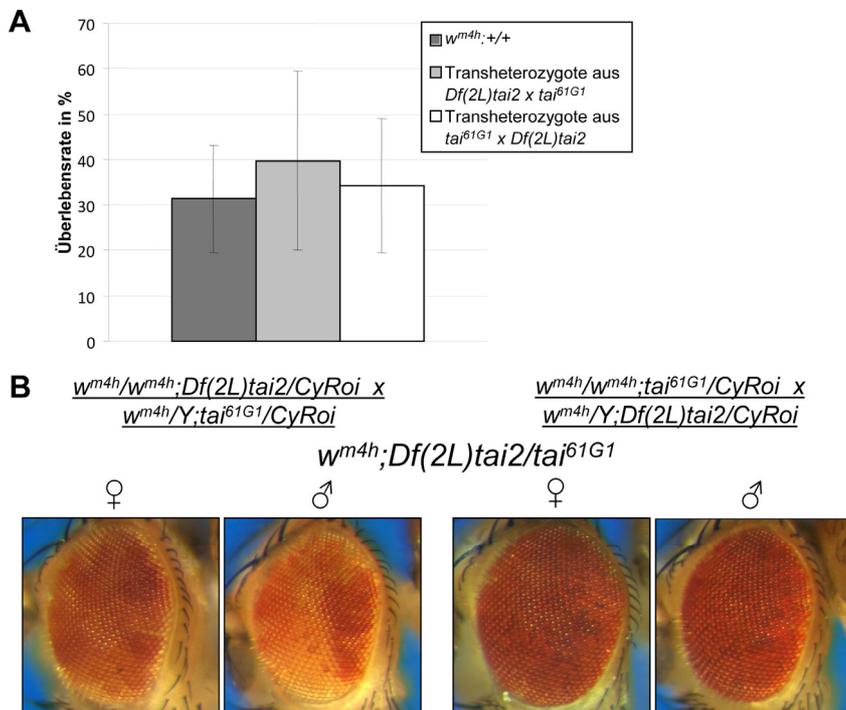


Abb.3.28: $Df(2L)tai2/tai^{61G1}$ transheterozygote Tiere zeigen keine reduzierte Fertilität jedoch Effekte auf $In(1)w^{m4h}$ PEV. Die Transheterozygoten $w^{m4h};Df(2L)tai2/tai^{61G1}$ Tiere weisen keine reduzierte Fertilität gegenüber dem Kontrollstamm $w^{m4h};+/+$ auf (**A**). Transheterozygote Weibchen der Kreuzung $w^{m4h};Df(2L)tai2/CyRoi$ mit $w^{m4h}/Y;tai^{61G1}/CyRoi$ zeigten einen Suppressoreffekt auf $In(1)w^{m4h}$ PEV. Bei der reziproken Kreuzung wird in beiden Geschlechtern das *white Gensilencing* in $In(1)w^{m4h}$ supprimiert (**B**).

Es zeigte sich, dass die Transheterozygoten aus beiden Kreuzungen keine signifikant veränderte Fertilität gegenüber dem Kontrollstamm $w^{m4h};+/+$ aufwiesen (Abb.3.28A).

Transheterozygote Weibchen der Kreuzung $w^{m4h};Df(2L)tai2/CyRoi$ mit $w^{m4h}/Y;tai^{61G1}/CyRoi$ zeigten einen Suppressoreffekt auf $In(1)w^{m4h}$ PEV. Bei der reziproken Kreuzung wurde in beiden Geschlechtern reduziertes *white Gensilencing* in $In(1)w^{m4h}$ beobachtet (Abb.3.28B).

3.2.5 *EcR*-Suppressoreffekt Rettung

Das Protein des Ecdyson-Rezeptor-Gens *EcR*, homolog zum humanen Östrogenrezeptor 1, ist Teil des heterodimeren Ecdyson-Rezeptor-Komplexes. Zusammen mit seinem Interaktionspartner Ultraspiracle (USP), dem Hormon Ecdyson

und einem weiteren Ligand bindet der Komplex an *Ecdyson Responsive Elements* (*EcREs*) und steuert so die Expression von Zielgenen (Riddihough & Pelham, 1987, Cherbas et al., 1991, Dobens et al. 1991). Durch verschiedene Koaktivatoren und Korepressoren wird die gewebespezifische und entwicklungspezifische Wirkweise des Komplexes ermöglicht (Bai et al., 2000, Sedkov et al., 2003, Jang et al., 2009, Francis et al., 2010). Einer dieser Koaktivatoren ist TAIMAN, welcher als essentieller Faktor für die Wanderung der Border-Zellen in *Drosophila* Ovarien charakterisiert wurde (Bai et al., 2000).

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass nicht nur *tai*-Mutanten einen Effekt auf heterochromatisches *Gensilencing* haben, sondern auch Mutationen des *Ecdyson-Rezeptors*. Das Allel *EcR^{M554fs}* zeigt einen dominanten Suppressoreffekt auf das *In(1)w^{m4h}*-PEV System, unabhängig ob maternale oder paternale Vererbung der Mutante vorlag (Lein, 2011; Abb.3.29B).

Mittels einer zusätzlichen Genkopie des *EcR*-Gens sollte dieser Effekt gerettet und so bestätigt werden, dass die *EcR*-Mutation Auslöser des Effekts war. Hierfür wurde die Kreuzung von *w^{m4h}/W^{m4h}*; *EcR^{M554fs}/CyRoi* mit *w*; *Dp86/SM6* durchgeführt (Dp86: Chr2L Nt 1589631-2389467 dupliziert).

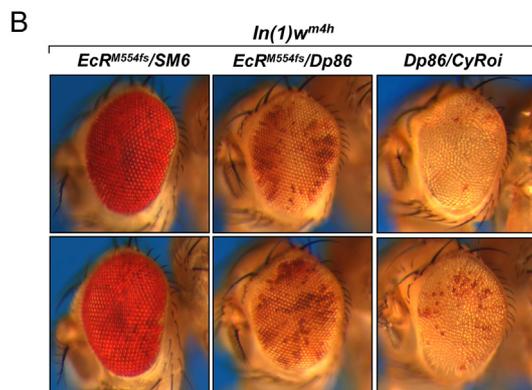
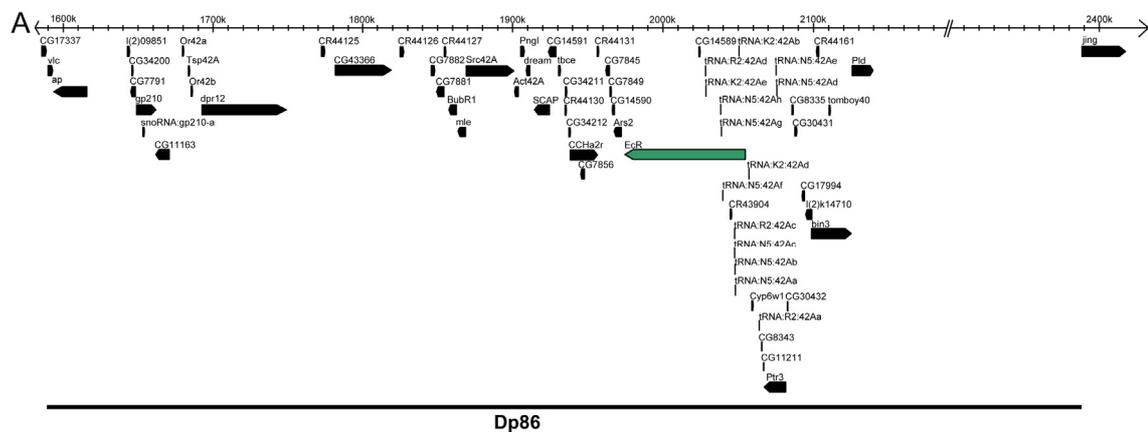


Abb.3.29: Der dominante Suppressoreffekt von *EcR*-Mutanten kann durch zusätzliche Genkopien gerettet werden. *EcR*-Genlocus mit Duplikation 86 (schwarzer Balken) und *EcR*-Gen (grüner Pfeil) (A). Augen der F₁-Generation aus der Kreuzung *w^{m4h}/W^{m4h}*; *EcR^{M554fs}/CyRoi* mit *w*; *Dp86/SM6*. Das Allel *EcR^{M554fs}* weist einen dominanten Suppressoreffekt auf, welcher durch die Duplikation Dp86 gerettet werden kann (B).

Der Suppressoreffekt des Allels *EcR^{M554fs}* konnte durch die Duplikation, welche eine zusätzliche Genkopie *EcR* enthält, gerettet werden (Abb.3.29B). *EcR* hat demnach einen Einfluss auf das heterochromatische *Silencing* des *white*-Gens im *In(1)w^{m4h}*-System.

3.2.6 Mutanten des Ecdyson-Signallings beeinflussen Ecdyson-abhängige Expression

Der Ecdyson-Rezeptor-Komplex bindet (zusammen mit Koaktivatoren oder Korepressoren) an *Ecdyson Responsive Elements (EcREs)* und beeinflusst dadurch die Transkription von Zielgenen (Riddihough & Pelham, 1987, Cherbas et al., 1991, Dobens et al., 1991). Mit Hilfe eines Transgens, welches *EcRE*-Elemente 5' eines *lacZ*-Gens beinhaltet (*7xEcRE-lacZ*, Kozlova & Thummel, 2003), kann die Wirkweise verschiedenster Mutanten des *Ecdyson-Signallings* entwicklungsabhängig untersucht werden.

Hierzu wurden Stämme aufgebaut, welche die bereits als dominante Suppressoren bekannten Mutanten *Df(2L)tai2* und *EcR^{Q50st}* (Lein, 2011) und das Transgen *7xEcRE-lacZ* trugen.

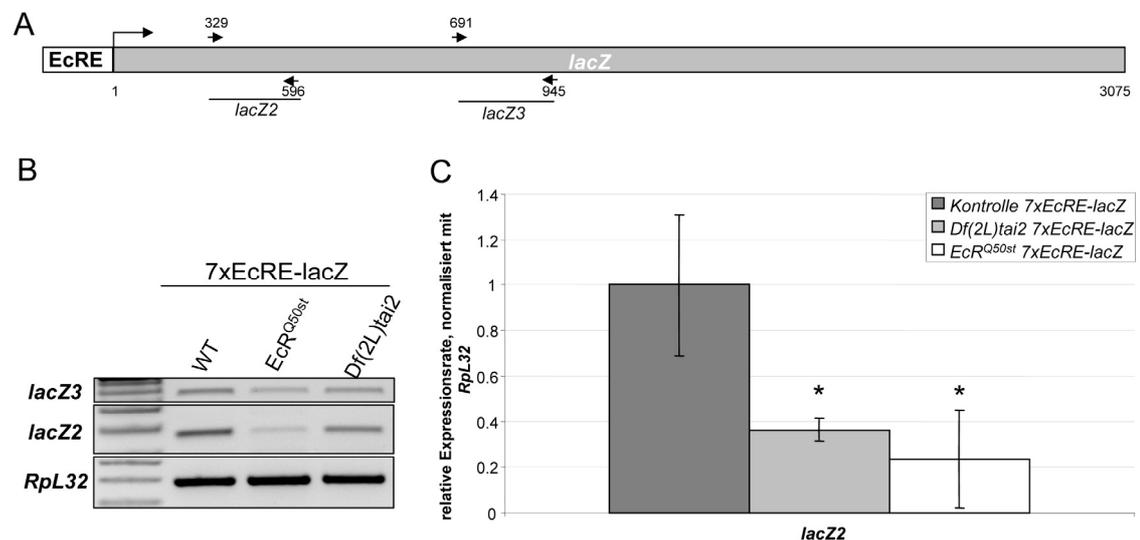


Abb.3.30: EcRE-kontrollierte lacZ-Transgen Expression. Schematische Darstellung des *7xEcRE-lacZ*-Transgens mit eingezeichneten Bindestellen der verwendeten Primerpaare (Pfeile) (**A**). Semiquantitative RT-PCR-Analysen zeigten eine Expression des Ecdyson-gesteuerten *lacZ*-Transgens in 0-4h alten Embryonen und eine Verringerung der Transgenexpression in den Mutantenlinien *Df(2L)tai2* und *EcR^{Q50st}* (**B**). Relative Quantifizierung der *lacZ*-Transkripte ergab eine signifikante Reduktion der Transkripte in *Df(2L)tai2/SM6;7xEcRE-lacZ* und *EcR^{Q50st}/SM6;7xEcRE-lacZ* im Vergleich zum Kontrollstamm *7xEcRE-lacZ*. Die Mutanten *Df(2L)tai2* und *EcR^{Q50st}* hemmen offenbar dominant die Ecdyson-Rezeptor-Komplex gesteuerte Transkription des *lacZ*-Transgens. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05 (**C**).

Diese rezessiven Mutationen wurden jeweils mit einem Balancerchromosomen stabilisiert und das *EcRE-lacZ*-Transgen homozygot etabliert. Es wurden jeweils 0-4h alte Embryonen von *w; Df(2L)tai2/SM6; 7xEcRE-lacZ/7xEcRE-lacZ* oder *w; EcR^{Q50st}/SM6; 7xEcRE-lacZ/7xEcRE-lacZ* im Vergleich zum Kontrollstamm *w; +/+; 7xEcRE-lacZ/7xEcRE-lacZ* untersucht.

Bereits in frühen Embryonen ist eine Aktivierung des Ecdyson-gesteuerten Transgens anhand der *lacZ*-Expression detektierbar (Abb.3.30B). Somit liegt schon in diesen Stadien eine Ecdyson-abhängige Transkriptionskontrolle von Zielgenen durch den Ecdyson-Rezeptorkomplex vor. In den Mutanten *Df(2L)tai2* und *EcR^{Qst}* konnte eine signifikant verringerte Expression des *lacZ*-Transgens im Vergleich zum Kontrollstamm beobachtet werden (Abb.3.30B und C). Die transkriptionelle Kontrolle des Transgens durch den Ecdyson-Rezeptorkomplex während der frühen Embryonalentwicklung ist somit TAIMAN-abhängig.

3.2.7 Differentielle Expression von kodierenden und nicht-kodierenden RNAs in Embryonen von *taiman*-Mutanten

In Zusammenarbeit mit Dr. J. Hackermüller (Fraunhofer IZI, Leipzig) und Prof. Dr. P. Stadler (Universität Leipzig) wurden *Microarray*-Analysen mit RNA von 0-4h alten Embryonen des Wildtyps *w^{m4h};+/+* und der Mutanten *w^{m4h};5-SZ-3139r* und *w^{m4h};Df(2L)tai2* durchgeführt, um generelle Zielgene des *taiman*-gesteuerten Ecdyson-*Signallings* identifizieren zu können. Der *Microarray* beinhaltete sowohl annotierte proteinkodierende Gene, als auch nicht-kodierende RNAs, sowie 129 neu vorhergesagte putative mlncRNA-Proben.

Die bioinformatische Auswertung der Daten ergab eine große Anzahl an Expressionsänderungen in beiden Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp (Tab.3.2). In *Df(2L)tai2/Df(2L)tai2* Embryonen waren mehr Gene dereguliert, als in *5-SZ-3139r/5-SZ-3139r* Embryonen. Trotz Wirkweise des TAIMAN als transkriptioneller Kofaktor fällt auf, dass sowohl zahlreiche hoch- als auch runterregulierte Gene nachgewiesen wurden. Dies lässt darauf schließen, dass viele Zielgene über sekundär wirkende Kontrollwege beeinflusst werden müssten.

Tab.3.2: Anzahl der signifikant hoch- und runterregulierten Proben in den *tai*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp, angepasst nach Benjamini und Hochberg $p \leq 0,01$.

	<i>5-SZ-3139r</i>	<i>Df(2L)tai2</i>
weniger	1017	1804
0	1535	615
höher	1244	1429

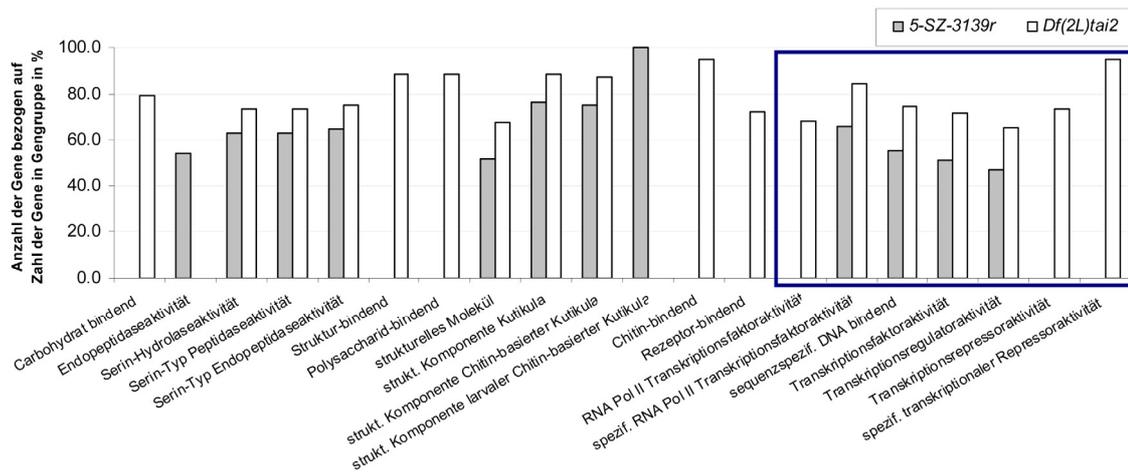


Abb.3.31: Ergebnisse der GO-term Anreicherungsanalyse bei Genen mit verringerter Expression aus genomweiter Expressionsanalyse von *taiman*-Mutanten. Das Diagramm zeigt angereicherte GO(MF)-basiert klassifizierte Gengruppen, welche in den Mutanten $w^{m4h}; 5\text{-SZ-3139r}$ und $w^{m4h}; Df(2L)tai2$ geringere Expression als der Wildtyp $w^{m4h}; +/+$ aufweisen ($p < 0,001$). Dargestellt ist die Anzahl veränderter Gene im Verhältnis zur Gesamtanzahl der Gene in der GO(MF)-Gengruppe. Der blaue Rahmen hebt alle Gengruppen mit transkriptionsregulierenden Funktionen hervor.

Die Analyse signifikant überrepräsentierter GO-terms durch die Arbeitsgruppe Hackermüller zeigte Unterschiede aber auch Gemeinsamkeiten zwischen beiden Mutanten (Abb.3.31). Erneut erwies sich die Mutante *Df(2L)tai2* als stärkere Mutante als die Insertionsmutante *5-SZ-3139r* (Tab.3.2, Abb.3.31). Unter den Proben, welche eine geringere Expression als der Wildtyp aufwiesen, befand sich eine große Anzahl an Faktoren, die Genaktivitäten kontrollieren, wie Transkriptionsfaktoren, -regulatoren und -repressoren (Abb.3.31). Dies zeigt, dass durch Transkriptionsregulation auch sekundäre Zielgene beeinflusst werden können, welche nicht direkt durch den Ecdyson-Rezeptorkomplex mit TAIMAN und Ecdyson reguliert sind. In der Mutante *Df(2L)tai2* sind z.B. 94% aller als spezifische transkriptionelle Repressoren sowie 72% aller als Transkriptionsrepressoren klassifizierten Gene runterreguliert. Auch von den spezifischen RNA-Polymerase II Transkriptionsfaktor-Genen sind in *5-SZ-3139r* 65% bzw. in *Df(2L)tai2* 84% runterreguliert (Abb.3.31).

Betrachtet man nur epigenetische Faktoren dann ist erkennbar, dass hier ebenfalls viele dereguliert sind. Von 1129 solcher Proben sind in *5-SZ-3139r* 23 runter und 57 hochreguliert und in *Df(2L)tai2* 95 runter und 190 hochreguliert.

In Abb.3.32 sind alle veränderten chromatinmodifizierenden Gene mittels *Heatmap geclustert* dargestellt. Erkennbar sind starke Veränderungen sowohl hoch-, als auch runterregulierter Gene in den Mutanten $w^{m4h}; 5\text{-SZ-3139r}$ (SZ) und $w^{m4h}; Df(2L)tai2$ (Df) im Vergleich zum Wildtyp $w^{m4h}; +/+$ (Wt). Ebenfalls auffällig, dennoch konsistent mit vorangegangenen Beobachtungen ist, dass $w^{m4h}; Df(2L)tai2$ stärkere Effekte zeigte als $w^{m4h}; 5\text{-SZ-3139r}$ (Abb.3.32).

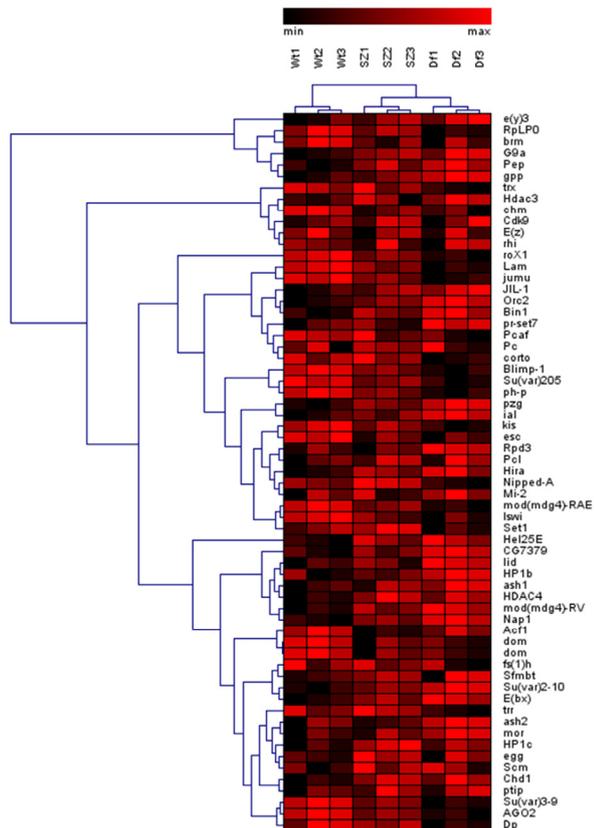


Abb.3.32: Clusteranalyse veränderter Chromatingene. Gezeigt sind in Clustern geordnete veränderte Chromatingene in den Mutanten $w^{m4h};5\text{-SZ-3139r}$ (SZ) und $w^{m4h};Df(2L)tai2$ (Df) im Vergleich zum Wildtyp $w^{m4h};+/+$ (Wt). Die Übersicht wurde erstellt mit *Hierarchical Clustering* des Genesis-Programms. Schwarz zeigt geringe, rot hohe Genexpression.

Es wurden auch Proben untersucht, welche Transkripte nachwiesen, die durch Intron-Vorhersagen detektiert wurden (Hiller et al. 2009). Die Proben wurden jeweils innerhalb eines Rahmens von 200bp *up-* und *downstream* des vorhergesagten Introns gesetzt und in den *Microarray* integriert. Insgesamt wurden so 1399 Probenpaare erstellt und eingesetzt (J. Hackermüller, persönliche Mitteilung). Es zeigte sich, dass auch einige dieser unannotierten, putativ nicht-kodierenden RNAs, in den verschiedenen Mutanten differentiell exprimiert waren.

Eine besonders stark veränderte Probe stellte hier beispielsweise das Transkript um das Intron 21710 dar. In der Mutante *5-SZ-3139r* ergab sich eine 0,66 fache und in der Mutante *Df(2L)tai2* eine 0,17 fache Expression des Wildtyps. Quantitative RT-PCR-Untersuchungen konnten diese Ergebnisse bestätigen. Die Expression, gemessen mit intronüberspannenden Primern, ist in der *tai*-Mutante *Df(2L)tai2* signifikant verändert und auf die 0,1 fache Expression des Kontrollstammes reduziert (Abb.3.33).

Unter den 7 neuen nicht annotierten Transkripten aus Kapitel 3.1 konnten keine als differentiell reguliert in *tai*-Mutanten festgestellt werden.

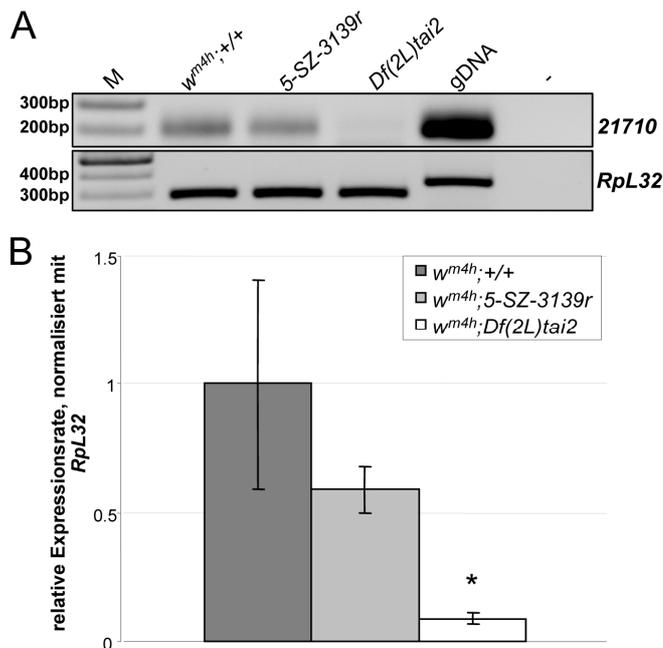


Abb.3.33: Das nicht annotierte Transkript 21710 ist differentiell reguliert. Semiquantitative RT-PCRs an Extrakten von 0-4h alten Embryonen des Wildtyps $w^{m4h};+/+$ und der Mutanten $w^{m4h};Df(2L)tai2$ und $w^{m4h};5\text{-SZ-3139r}$ zeigten eine Reduktion an 21710-Transkript bei $Df(2L)tai2$. RpL32-Transkript diente hierbei als Ladekontrolle (A). Die qRT-PCR detektierte eine signifikante Transkriptreduktion bei $Df(2L)tai2$ gegenüber dem Kontrollstamm. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005 (B).

Zur weiteren Analyse der Defizienz $Df(2L)tai2$ wurde, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Krohn (Universität Leipzig), ein RNA-Seq-Experiment mit 0-4h alten $w^{m4h};Df(2L)tai2$ Embryonen und dem Wildtyp $w^{m4h};+/+$ durchgeführt. Im Vergleich zum Wildtyp wies $Df(2L)tai2$ 856 runter- und 429 hochregulierte Gene auf (Abb.3.34).

Angeereicherte GO-terms wurden mit Hilfe des Programms AmiGO (version 1.8; release 2014-04-26) erfasst. Bezüglich der molekularen Funktion waren in der Gruppe der hochregulierten Gene nur GO:0005198 (strukturelle Moleküle) überrepräsentiert. Bei den herunterregulierten Genen waren vor allem transkriptionsregulierende Faktoren überrepräsentiert (GO:0000987; GO:0001071; GO: 0003700; GO:0043565; GO:0003705; GO:0001012; GO:0000977; GO:0035326; GO:0001158; GO:0044212; GO:0001067; GO:0000975; GO:0000982; GO:0000976; GO:0000980).

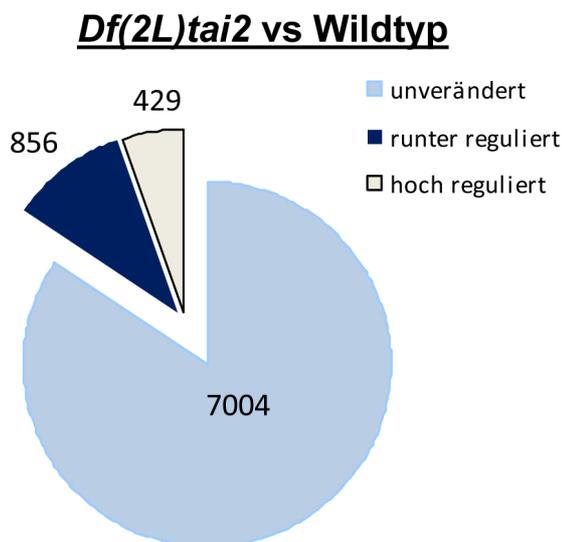


Abb.3.34: Expressionsprofil der tai-Mutante Df(2L)tai2. Die Embryonen der Deletion $Df(2L)tai2$ wiesen in einem durchgeführten RNASeq-Experiment gegenüber dem Kontrollgenotyp $w^{m4h};+/+$ 856 signifikant runter- und 429 signifikant hochregulierte Gene auf.

Im Vergleich zum durchgeführten *Microarray* fällt auf, dass bei der RNA-Seq weniger signifikant veränderte Gene auftraten. Da die RNA-Seq Daten auf das annotierte Referenzgenom gemappt wurden (2.2.10) und im *Microarray* auch unannotierte Proben verwendet wurden, führte dies wahrscheinlich zur vorliegenden Abweichung. In beiden Experimenten waren 448 Gene gleichermaßen dereguliert. Vor allem die Gene der embryonalen Achsenbildung (3.2.15) wurden mit beiden Methoden als signifikant deregulierte Gene gefunden. 35 Gene waren nur beim RNA-Seq Experiment signifikant verändert, im *Microarray* jedoch nicht und 1525 lagen nur im *Microarray* dereguliert vor und im RNA-Seq Experiment nicht.

3.2.8 *tai*an-Mutanten weisen veränderte Expression der H3K4me3 spezifischen Demethylase LID auf

Methylierung des Histons 3 am Lysin 4 sowie Acetylierung von H3K9 sind typische Markierungen, die aktives Chromatin charakterisieren (Wang et al., 2001; Zhang & Reinberg, 2001; Santos-Rosa et al., 2002; Ebert et al., 2004). Durch immunzytologische Färbungen von Zyklus 14 Embryonen der *tai*-Mutanten *5-SZ-3139r* und *Df(2L)tai2* wurde eine verminderte H3K4 Trimethylierung sowie verstärkte H3K9 Acetylierung festgestellt (Lein, 2011). Da jedoch die Methylierungsstufen von H3K4me1 und -me2 unverändert vorlagen, wurden die Mutanten zusätzlich in Bezug auf die H3K4me3-spezifische Demethylase LID untersucht (Lein, 2011).

In Embryonen ergab sich eine Reduktion der LID-Proteinmenge in *tai*-Mutanten-Embryonen im Vergleich zum Wildtyp (Lein, 2011). Deshalb sollte überprüft werden, ob dieser Effekt durch expressionelle Kontrolle des *lid*-Gens verursacht wird.

Hierzu wurden zunächst semiquantitative Analysen mit 0-4h alten Embryonen der Mutanten *5-SZ-3139r* und *Df(2L)tai2* durchgeführt. Es konnte eine Reduktion des *lid*-Transkripts im Vergleich zum Kontrollstamm detektiert werden (Abb.3.35A). Zusätzlich sollte durch quantitative RT-PCR die Reduktion quantifiziert werden. Dabei konnte kein signifikanter Mengenunterschied des *lid*-Transkripts in beiden Mutanten festgestellt werden (Abb.3.35B). Zusätzlich wurden zwei weitere Insertionsmutanten, *5-HA-2281r* und *CB-5878-3r* getestet, welche nachweislich veränderte *tai*-Expressionsphänotypen aufweisen (Abb.3.21). In der Mutante *5-HA-2281r* konnte eine signifikant reduzierte *lid*-Transkriptmenge festgestellt werden (Abb.3.35B).

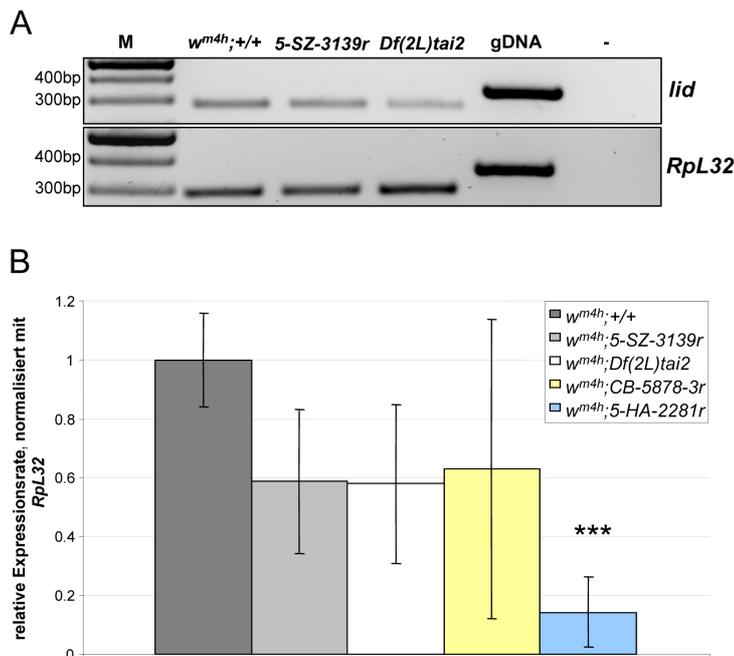


Abb.3.35: *lid*-Transkript liegt in *tai*-Mutanten reduziert vor. Semiquantitative RT-PCRs an Extrakten von 0-4h alten Embryonen der Mutanten $w^{m4h};5\text{-SZ-3139r}$ und $w^{m4h};Df(2L)tai2$ zeigten eine Reduktion an *lid*-Transkript im Vergleich zum Kontrollstamm $w^{m4h};+/+$. *RpL32*-Transkript diente hierbei als Ladekontrolle (**A**). Mittels qPCR wurde die relative *lid*-Transkriptmenge der Mutanten $w^{m4h};5\text{-SZ-3139r}$, $w^{m4h};Df(2L)tai2$, $w^{m4h};CB\text{-5878-3r}$ und $w^{m4h};5\text{-HA-2281r}$ bestimmt. Bei $w^{m4h};5\text{-HA-2281r}$ konnte ein signifikanter Mengenunterschied des *lid*-Transkripts im Vergleich zum Kontrollstamm nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005 (**B**).

3.2.9 Transkriptionsanalysen von *nejire* und *Rpd3* in *taiman*-Mutanten

In *tai*-Mutanten ließ sich immunzytologisch eine erhöhte Menge an H3K9-Acetylierung und auch eine drastisch erhöhte Menge der Histondeacetylase RPD3 in frühen Embryonen beobachten (Lein, 2011). Aus *lid*^{null}-Mutanten ist bekannt, dass eine verringerte H3K4 Trimethylierung sowie reduzierte H3K9 Acetylierung durch eine erhöhte RPD3-Menge bedingt wird (Baisch, 2010). Dieser Reaktionsweg kann bei *taiman*-Mutanten anscheinend nicht angenommen werden, da hier trotz erhöhter RPD3-Menge die Acetylierung des H3K9 verstärkt vorliegt.

Es sollte überprüft werden, ob die erhöhte RPD3-Menge transkriptionell bedingt ist. Hierbei konnte mittels quantitativer PCR in keiner der verwendeten Mutanten eine signifikante Erhöhung der *Rpd3*-Transkription beobachtet werden (Abb.3.36).

In Menschen konnte bereits gezeigt werden, dass das humane Homologe zu *Rpd3* *HDAC1* posttranskriptionell von einer microRNA beeinflusst werden kann. Die miRNA *miR449a* bindet an die *HDAC1*-mRNA und reprimiert damit ihre Translation (Noonan et al., 2009). Sollte also dieser microRNA-Kontrollmechanismus in *Drosophila* ebenfalls vorliegen, wäre es vorstellbar, dass in *tai*-Mutanten diese miRNA in geringerer Menge

vorliegt und die erhöhte Menge an RPD3 in diesen Mutanten erklärt. Die erhöhte Menge an H3K9 Acetylierung wäre damit allerdings nicht erklärbar.

Des Weiteren ist bekannt, dass HDAC1 die Expression vom Zell-Zyklus-inhibierenden Protein *p27* hemmt (Lagger et al., 2002). Im durchgeführten *Microarray* (Abschnitt 3.2.9) konnte für das *p27* homologe *Drosophila*-Gen *dacapo* (*dap*) in 0-4h alten Embryonen ebenfalls eine differentielle Expression festgestellt werden. So ist in der Mutante *5-SZ-3139r* *dap* 1,3 fach und in *Df(2L)tai2* 0,08 fach im Vergleich zum Kontrollstamm exprimiert. Daher ist anzunehmen, dass die erhöhte RPD3-Proteinkonzentration in der *Df(2L)tai2*-Mutante sekundär zur transkriptionellen Repression von *dap* (*Drosophila p27*) führt.

Dennoch scheint RPD3 seine Deacetylasefunktion nicht ausführen zu können. Evtl. fehlt ein nötiger Komplexpartner im ING2-RPD3-Komplex oder andere Faktoren inhibieren das verstärkt vorhandene RPD3. Möglicherweise sind auch andere Acetyltransferasen, wie MOF, dGCN5 oder dTip60 involviert.

Für murines und humanes TAI wurde bereits eine Interaktion mit CBP/p300 nachgewiesen (Korzus et al., 1998; Chen et al., 1997). Dies ist eine Acetyltransferase und ein transkriptionaler Koaktivator, da es mit Transkriptionsfaktoren interagiert (Bantignies et al., 2000). Deshalb sollte dieses *Drosophila CREB-binding* Protein, kodiert von *nejire* (*nej*), an *tai*-Mutanten ebenfalls untersucht werden

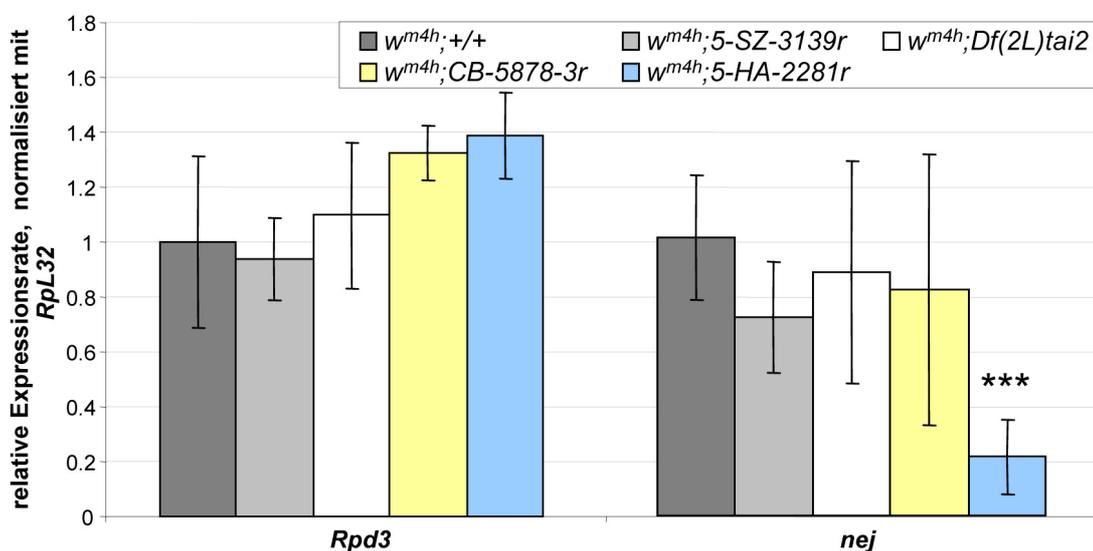


Abb.3.36: Quantifizierung von Transkripten der Deacetylase *Rpd3* und der Acetyltransferase *nejire* in *tai*-Mutanten. Mittels quantitativer Real-time PCR an cDNA von 0-4h alten Embryonen der Mutanten *w^{m4h};5-SZ-3139r*, *w^{m4h};Df(2L)tai2*, *w^{m4h};CB-5878-3r* und *w^{m4h};5-HA-2281r* wurden die relativen Transkriptmengen der Gene in Bezug auf den Wildtyp *w^{m4h};+/+* bestimmt. In *w^{m4h};5-HA-2281r* konnte ein signifikanter Mengenunterschied des *nej*-Transkripts im Vergleich zum Kontrollstamm nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005.

In *5-HA-2281r* zeigte sich eine signifikante Verringerung des *nej*-Transkripts (Abb.3.36). Die durchschnittliche Menge an Transkript ist in den anderen Mutanten zwar verringert, aber nicht signifikant. Trotzdem lässt sich vermuten, dass die leicht verringerten Transkriptmengen in den anderen Mutanten dennoch biologische Relevanz haben kann.

3.2.10 Transkriptionsanalysen von Histonmethyltransferase- und Histodemethylasegenen in *tai*-Mutanten

Zusätzlich zur Erhöhung der aktivierenden Histonmodifizierungen H3K4-Trimethylierung und H3K9-Acetylierung wurde in vergleichenden immunzytologischen Färbungen embryonaler Kerne des 14. Mitosezyklus und larvalen Speicheldrüsen sowie Western Blot-Analysen festgestellt, dass die repressive Markierungen H3K9me2 und H3K9me3 in den Mutanten *5-SZ-3139r* und *Df(2L)tai2* verringert vorliegen und H3K27me3 stark erhöht ist (Lein, 2011; Apelt, persönl. Mitteilung). Offensichtlich sind einige Methylierungsmarkierungen von Histonen völlig dereguliert in *tai*-Mutanten. Deshalb sollten weitere Histonmethyltransferasen und Histodemethylasen hinsichtlich einer differentiellen Genregulation in *tai*-Mutanten untersucht werden.

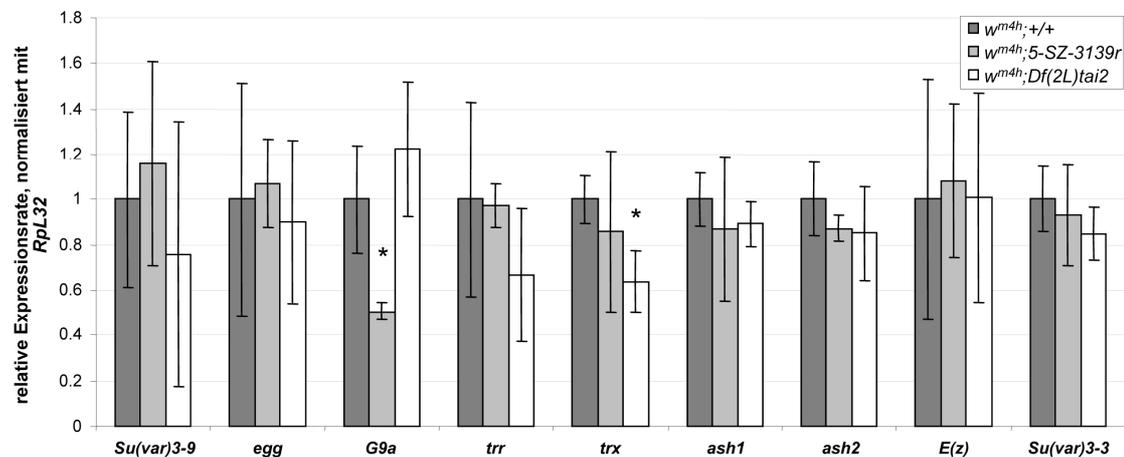


Abb.3.37: Quantifizierung von Transkripten von Histon-Methyltransferase- und Histon-Demethylasegenen in *tai*-Mutanten. Mittels quantitativer RT-PCR an cDNA von 0-4h alten Embryonen der Mutanten *w^{m4h};5-SZ-3139r* und *w^{m4h};Df(2L)tai2* wurden die Transkriptmengen der Gene in Bezug auf den Wildtyp bestimmt. Die meisten Gene zeigen keine signifikanten Mengenunterschiede der Transkripte in *tai*-Mutanten. Signifikante Veränderungen wurden für *trx* bei *Df(2L)tai2* und für *G9a* bei *5-SZ-3139r* beobachtet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005.

Bei den H3K9-spezifischen Methyltransferasen *Su(var)3-9*, *eggless (egg)*, der H3K27-spezifischen Methyltransferase *Enhancer of zeste [E(z)]*, den H3K4-spezifischen Methyltransferasen *trithorax-related (trr)*, *absent small or homeotic discs 1 (ash1)* und

absent small or homeotic discs 2 (ash2) sowie bei der H3K4me2 und me1-spezifischen Demethylase *Su(var)3-3* konnten keine signifikanten Veränderungen der Transkriptmengen in *tai*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb.3.37).

Die H3K4-spezifische Methyltransferase *trithorax (trx)* zeigt eine leicht signifikante Verringerung ihres Transkripts in *Df(2L)tai2* und die H3K9-spezifische Methyltransferase *G9a* in *5-SZ-3139r* (Abb.3.37).

3.2.11 *Su(var)3-7, Su(var)2-1, HP1a, HP1b* und *HP1c* sind nicht differentiell reguliert in *taiman*-Mutanten

Für den Aufbau und die Etablierung von Heterochromatin sind mehrere Nicht-Histon-Proteine von großer Wichtigkeit. Die Proteine der Heterochromatinprotein 1 Familie können bestimmte Histonmodifikationen erkennen und dann an diese binden. So ist HP1a (auch SU(VAR)2-5) am perizentromeren Heterochromatin lokalisiert und in der Lage di- und trimethyliertes H3K9 mit seiner Chromodomäne zu binden (Lachner et al., 2001). Ebenfalls wurde bereits ein Komplex aus SU(VAR)3-9, SU(VAR)3-3 und RPD3 in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila* nachgewiesen (Rudolph et al., 2007).

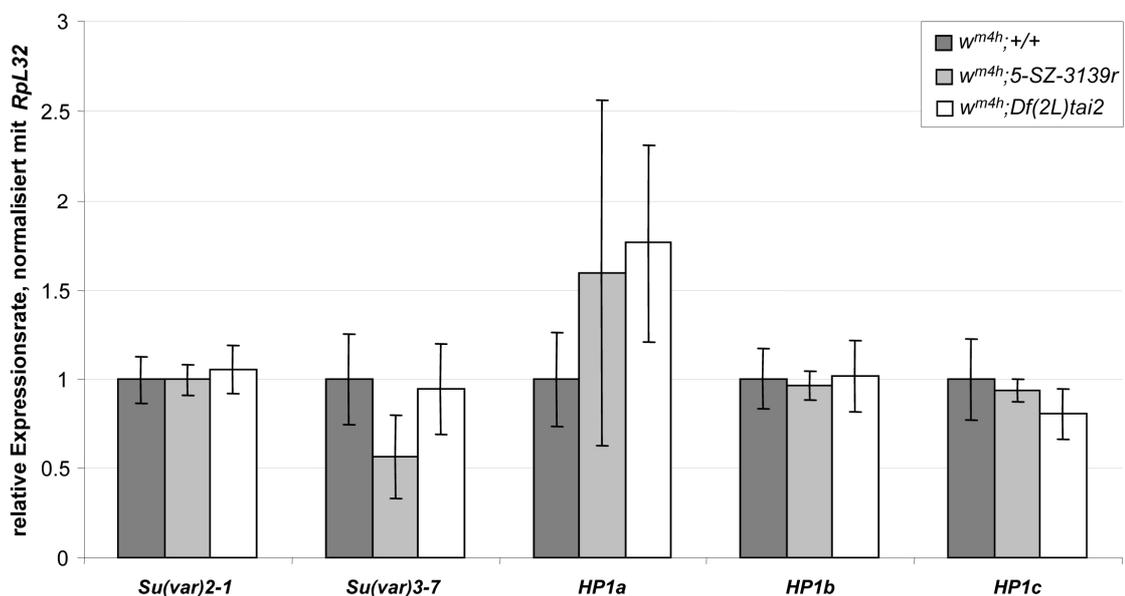


Abb.3.38: Quantifizierung von *Su(var)2-1, Su(var)3-7, HP1a, HP1b* und *HP1c* Transkripten in *tai*-Mutanten. Mittels quantitativer RT-PCR an cDNA von 0-4h alten Embryonen der Mutanten *w^{m4h};5-SZ-3139r* und *w^{m4h};Df(2L)tai2* wurden die Transkriptmengen der Gene *Su(var)2-1, Su(var)3-7, HP1a, HP1b* und *HP1c* in Bezug auf den Wildtyp *w^{m4h};+/+* bestimmt. Es wurden keine signifikanten Veränderungen gegenüber dem Wildtyp detektiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005.

HP1b dagegen scheint den HP1a Funktionen entgegenzuwirken und bindet sowohl in euchromatischen als auch in heterochromatischen Regionen (Smothers & Henikoff, 2001; Zhang et al., 2010).

Das Heterochromatinprotein 1c (HP1c) ist wiederum ausschließlich in euchromatischen Regionen lokalisiert (Smothers & Henikoff, 2001). Es konnten Interaktionen des Proteins mit dem Ecdyson-Biosyntheseenzym Without Children (WOC) und Relative Of WOC (ROW) nachgewiesen werden, sowie auch eine Funktion in der Zusammenführung des Histon-Chaperon Komplexes FACT mit der RNA Polymerase II (Font-Burgada et al., 2008; Kwon et al., 2010).

SU(VAR)3-7, welches ebenfalls im perizentrischen Heterochromatin lokalisiert, wurde als PEV-Suppressor und Bindungspartner verschiedener Chromatinproteine identifiziert (Reuter et al., 1990; Schotta et al., 2003; Eissenberg et al., 1990; Jaquet et al., 2002). Das *Su(var)2-1* Gen ist erst kürzlich lokalisiert worden und hat Einfluss auf Acetylierungsvorgänge an Histonen (M. Walther, pers. Mitteilung).

Alle diese Gene wurden in *tai*-Mutanten mittels quantitativer RT-PCR hinsichtlich einer differentiellen Regulation untersucht. Es wurden keine signifikanten Mengenunterschiede ihrer Transkripte in *taiman*-Mutanten festgestellt (Abb.3.38). Somit sind sie in diesem Mutantenhintergrund nicht differentiell reguliert.

3.2.12 Die Transkription des PRDM-Familienproteins *Blimp-1* ist in *Df(2L)tai2* beeinflusst

Unter den 50 am stärksten signifikant differentiell exprimierten Genen des durchgeführten *Microarrays* (3.2.8) befand sich auch das PRDM-Familienprotein *Blimp-1*, dessen Transkript in beiden *tai*-Mutanten in reduzierter Menge vorlag. In *5-SZ-3139r* ergab sich eine 0,7 fache und in *Df(2L)tai2* eine 0,16 fache Transkriptmenge im Vergleich zum Kontrollstamm. Eine weitere Überprüfung mittels qRT-PCR zeigte, dass in der Tat *Blimp-1*-Transkript in der *tai*-Mutante *Df(2L)tai2* signifikant verringert vorlag (Abb.3.39).

Blimp-1 ist homolog zum Säuger *Blimp-1/PRDI-BF1*, einem transkriptionellen Repressor (Agawa et al., 2007). Es enthält neben 5 C2H2 Zink-Finger-Motiven auch eine der SET-Domäne verwandte *positive regulator*-Domäne I (PR-Domäne). Da dieser die konservierte SET-spezifische NHSC(I) Sequenz fehlt, geht man davon aus, dass die PR-Domäne keine Methyltransferaseaktivität besitzt (Rea et al., 2000; Kouzarides, 2002).

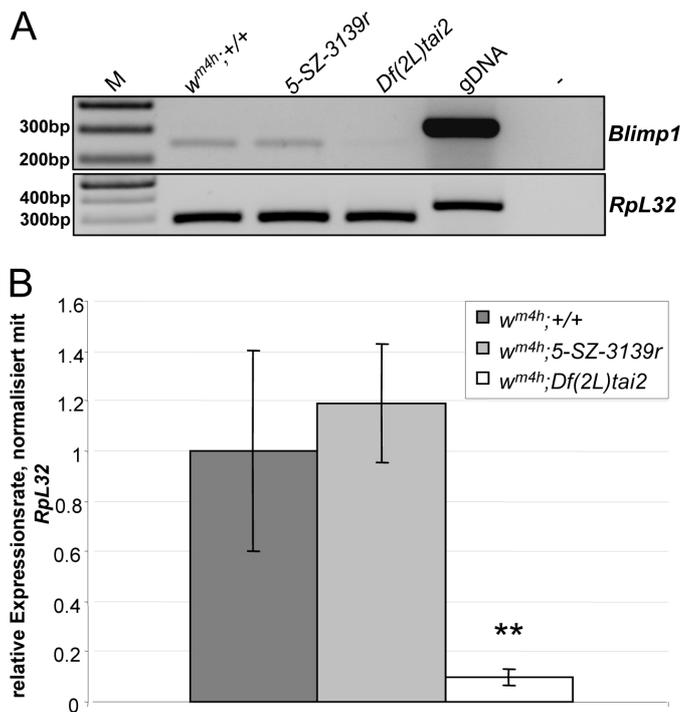


Abb.3.39: Quantifizierung der *Blimp-1* Transkripte in *tai*-Mutanten. Semiquantitative RT-PCR an cDNA von 0-4h alten Embryonen von $w^{m4h};5-SZ-3139r$ und $w^{m4h};Df(2L)tai2$ zeigt eine verringerte Menge an *Blimp-1*-Transkript in $Df(2L)tai2$ gegenüber $w^{m4h};+/+$. *RpL32* diente hierbei als Ladekontrolle (**A**). Mittels qRT-PCR wurde in $Df(2L)tai2$ signifikant weniger *Blimp-1* Transkript detektiert als im Kontrollstamm $w^{m4h};+/+$. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005 (**B**).

Funktionell ist BLIMP-1 schon vielfach als transkriptioneller Repressor charakterisiert worden. In humanen B-Zellen z.B. reprimiert es die *c-myc*, *Pax5* und *CIITA* Transkription (Lin et al., 1997; Shaffer et al., 2002). In *Drosophila* reguliert es die Differenzierung des Trachealen Systems und beeinflusst die Metamorphose durch Repression des *ftz-f1*-Gens (Ng et al., 2006; Agawa et al., 2007).

Da solche Vorgänge häufig mittels Änderung des lokalen Chromatinzustandes durch Histonmodifizierungen gesteuert sind und BLIMP-1 keine Methyltransferaseaktivität besitzt, muss diese Funktion demnach auf anderem Wege ausgeführt werden. Durch verschiedenste Interaktionspartner scheint BLIMP-1 seine Repressorfunktion auszuüben. So wurde bei humanen Zelllinien BLIMP-1 in einem Methyltransferaseaktivität zeigenden Komplex mit der Histonmethyltransferase G9a nachgewiesen (Gvory et al., 2004).

Ebenfalls wurde im Zusammenhang mit B-Zell-spezifischer *c-myc* Repression eine Interaktion von BLIMP-1 mit HDAC1/2 gezeigt (Yu et al., 2000). In Verbindung mit der Stilllegung von *CIITA* in humanen Zelllinien wurden die Veränderungen der lokalen Chromatinmodifizierungen auf eine Interaktion zwischen BLIMP-1 und der Demethylase LSD1 zurückgeführt (Su et al., 2009).

Weiterhin wurde in *Drosophila*-Larven bereits die Ecdyson-abhängige Expression von *Blimp-1* gezeigt sowie seine embryonale Expression und Bedeutung für die Entwicklung des Trachealen Systems nachgewiesen (Agawa et al., 2007; Ng et al., 2005).

3.2.13 Die Transkription des BTB-Proteins Abrupt ist in *Df(2L)tai2* beeinflusst

Das Gen *abrupt* liegt auf dem linken Arm des 2. Chromosoms und ist ein Repressor für Ecdyson-Signalling und Border-Zell-Migration (Jang et al., 2009). Über seine BTB-Domäne interagiert Abrupt mit der bHLH-Domäne von TAI, was zur Repression des Ecdyson-Signalling führt (Jang et al., 2009).

In der *EcR^{DN}*, sowie auch in der *tai^{61G1}*-Mutante konnten Jang et al. des Weiteren zeigen, dass die nukleäre Abrupt-Konzentration in den Border-Zellen der Germarien anstieg im Vergleich zum Wildtyp. Eine Funktion des Ecdyson-Signalling könnte demnach sein, die Konzentration von Abrupt in Border-Zellen zu verringern (Jang et al. 2009).

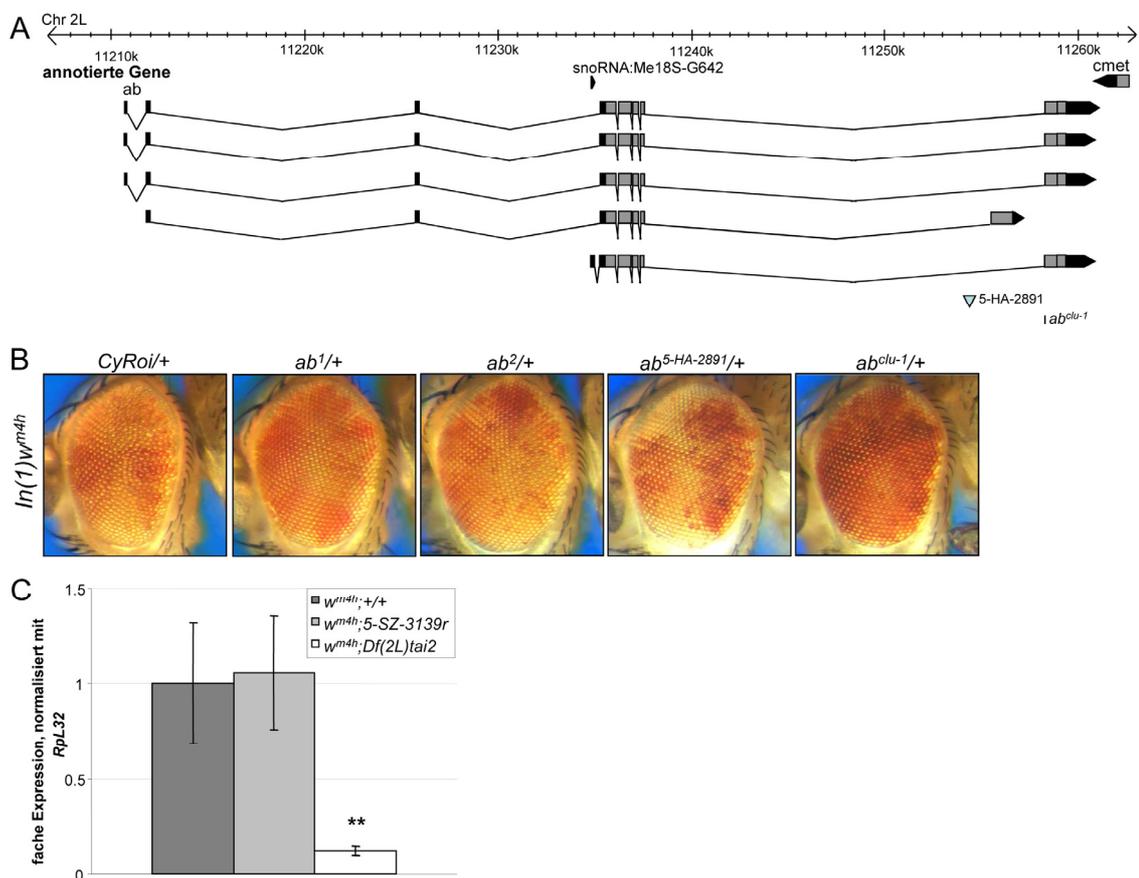


Abb.3.40: Das *abrupt*-Transkript liegt in *Df(2L)tai2* in verringerter Menge vor. Übersicht über die Genregion des *abrupt*-Gens mit verzeichneten Transgen-Insertionsstellen und bekannten Mutationspunkten (**A**). Allein das Allel *ab^{clu-1}* des *abrupt*-Gens zeigt einen leichten Suppressoreffekt im *In(1)w^{m4h}*-PEV-System (**B**). Die 0-4h alten Embryonen der *tai*-Mutanten 5-SZ-3139r und *Df(2L)tai2* wurden mittels qRT-PCR hinsichtlich ihrer *abrupt*-Expression untersucht. Es zeigt sich in *Df(2L)tai2* eine signifikante Reduktion der Expression auf die 0,1fache Expression des Kontrollstammes *w^{m4h};+/+*. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005 (**C**).

Eine Verringerung der Gendosis von *abrupt* konnte den Border-Zell-Migrationsphänotyp von *EcR^{DN}* teilweise retten, was wiederum für einen Zusammenhang von Ecdyson-Signalling und Abrupt Protein-Konzentration spricht (Jang et al., 2009). Da Ecdyson-Signalling eher auf transkriptioneller Ebene wirken kann, liegt die Annahme nahe, dass es ein indirekter Effekt ist, der Ecdyson-abhängig Abrupt-Protein Konzentrationen beeinflusst. Aufgrund dieser Tatsachen sollte ein Zusammenhang zwischen *taiman*-Mutanten und *abrupt* Expression auch in Embryonen untersucht werden.

Zunächst wurden verschiedene *abrupt*-Mutanten mittels *In(1)w^{m4h}*-PEV-System hinsichtlich eines Einflusses auf heterochromatisches *Gensilencing* untersucht. Bei den Mutanten *ab¹*, *ab²*, *ab^{5-HA-2891}* konnte kein dominanter Supressoreffekt im Vergleich zum Kontrollgenotyp *CyRoi/+* festgestellt werden (Abb.3.40B). Das Allel *ab^{clu-1}* wies hingegen einen leichten Supressoreffekt auf (Abb.3.40B).

In einem *Microarray* mit 0-4h alten Embryonen (Abschnitt 3.2.9) konnte eine Verringerung der *abrupt*-Expression in den zwei Mutanten *5-SZ-3139r* (0,87fach) und *Df(2L)tai2* (0,31fach) im Vergleich zum Kontrollstamm *w^{m4h};+/+* festgestellt werden. Dies konnte im Fall von *Df(2L)tai2* auch mittels quantitativer RT-PCR bestätigt werden (Abb.3.40C). Es ergab sich eine signifikante Verringerung der *abrupt*-Expression um bis zu 90%.

Das *taiman*-gesteuerte Ecdyson-Signalling während der frühen Embryonalentwicklung scheint demnach die Expression des Repressorgens *abrupt* zu beeinflussen. Ein vergleichbarer Effekt wie in Border-Zellen liegt offenbar in Embryonen nicht vor.

3.2.14 *taiman*-Mutanten zeigen veränderte Expression von Kontrollfaktoren der Dosiskompensation

Ausgehend von einem *Microarray* (Abschnitt 3.2.9), der mit den beiden Mutanten *w^{m4h};5-SZ-3139r* und *w^{m4h};Df(2L)tai2* durchgeführt wurde, konnte das nicht-kodierende Gen *roX1* als potentiell *taiman*-reguliertes Gen identifiziert werden. In der Defizienz *Df(2L)tai2* ist es nur ca. 0,08 fach im Vergleich zum Kontrollstamm exprimiert (Tab.3.3). Bemerkenswert ist, dass auch andere Komponenten des Dosiskompensations-Komplexes beeinflusst sind (Tab.3.3).

Somit scheint die korrekte Funktion von *taiman* in frühen Embryonen auch Einfluss auf die Dosiskompensation zu haben. Diese Funktion ist nötig, um den Ausgleich der X-chromosomalen Expression in hemizygoten Männchen im Vergleich zu Weibchen zu bewirken.

Tab.3.3: Dosiskompensations-Komponenten mit ihrer log2-fachen Expressionsänderung beim Microarray in den Mutanten $w^{m4h};5\text{-SZ-3139r}$ (SZ) und $w^{m4h};Df(2L)tai2$ (Df) im Vergleich zum Kontrollstamm $w^{m4h};+/+$ (WT). n.s.=nicht signifikant ($p>0,01$).

Gen	Abkürzung	SZ vs. WT	Df vs. WT
<i>RNA on the X 1</i>	<i>roX1</i>	0,47	0,08
<i>RNA on the X 2</i>	<i>roX2</i>	n.s.	n.s.
<i>males absent in the first</i>	<i>mof</i>	n.s.	n.s.
<i>maleless</i>	<i>mle</i>	1,3	1,74
<i>male-specific lethal 1</i>	<i>msl-1</i>	n.s.	n.s.
<i>male-specific lethal 2</i>	<i>msl-2</i>	0,58	0,34
<i>male-specific lethal 3</i>	<i>msl-3</i>	n.s.	n.s.

Hierfür bildet sich der *Male Specific Lethal* (MSL)-Komplex bestehend aus *roX1*, *roX2*, MSL-1, MSL-2, MSL-3, MLE und der Acetyltransferase MOF, durch welche die Transkription durch Acetylierung am H4 Lysin 16 am X-Chromosom in Männchen aktiviert wird (Akhtar & Becker, 2000).

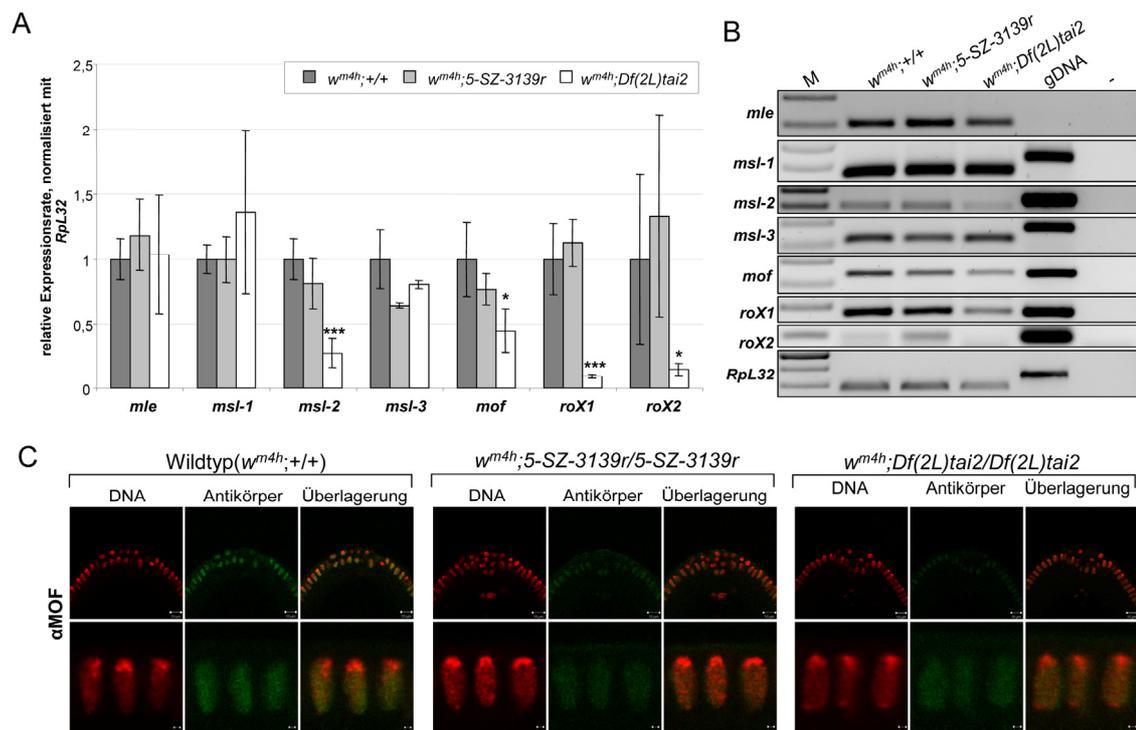


Abb.3.41: Expressions- und Proteinmengenmessung von Gendosis-Komponenten in *taiman*-Mutanten. Die 0-4h alten Embryonen der Mutanten *5-SZ-3139r* und *Df(2L)tai2* wurden mittels qPCR hinsichtlich der relativen Expression von Gendosis-Komponenten untersucht. Es zeigte sich in *Df(2L)tai2* eine signifikante Reduktion der Expression der Gene *msl-2*, *mof*, *roX1* und *roX2* im Vergleich zum Kontrollstamm $w^{m4h};+/+$. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,005$ (A) Ebenso wurden semiquantitative PCRs mit den gleichen Primerkombinationen durchgeführt (B). Immunzytologische Färbungen mit MOF-Antikörper an Embryonen von *taiman*-Mutanten und Wildtyp zeigen eine verminderte Bindung von MOF-Protein am Chromatin früher Embryonen von *Df(2L)tai2*. Die obere Reihe zeigt den posterioren Pol der Embryonen (Messbalken 10 μm), darunter sind 3 Zellen vergrößert abgebildet (Messbalken 1 μm) (C).

Alle Komponenten wurden mittels quantitativer RT-PCR auf ihre Expression überprüft und die *roX1*-Missregulation in der *Df(2L)tai2* konnte bestätigt werden (Abb.3.41A und B). Es wurde eine signifikante Expressionsreduktion auf die 0,09 fache Menge des Kontrollstammes beobachtet. Auch die Expression von *roX2* sank signifikant auf das 0,1 fache und die von *mSl-2* auf das 0,17 fache des Kontrollstammes (Abb.3.41A).

Das Gen für die Acetyltransferase des (MSL)-Komplexes *mof* lag ebenfalls mit signifikant reduzierter Expression vor (Abb.3.41A). Bei einer weiteren qPCR mit der Insertionsmutante *5-HA-2281r* konnte auch dort eine signifikante Veränderung der *mof*-Expression auf das 0,27 fache des Kontrollstammes festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Reduktion konnte auf Proteinebene auch mittels immunzytologischer Antikörperfärbung von Zyklus 14 Embryonen der *Df(2L)tai2* bestätigt werden (Abb.3.40C). Alle weiteren Dosiskompensations-Komponenten zeigten auf transkriptioneller Ebene keine signifikanten Veränderungen.

Es wurde gezeigt, dass MOF aber nicht nur die H4K16 Acetylierung am X-Chromosom von Männchen kontrolliert, sondern auch für genomweite H4K16 Acetylierung verantwortlich ist (Conrad et al, 2011). Denn MOF ist noch in einem weiteren Komplex involviert, dem *Non Specific Lethal* (NSL)-Komplex. Dieser befindet sich hauptsächlich an aktivem Chromatin markiert mit H3K4me2 und H3K9ac, vor allem an Transkriptionsstartstellen von hauptsächlich ubiquitär exprimierten Genen (Lam et al., 2012). Damit ist auch die MOF-Antikörper-Bindung über das gesamte Euchromatin erklärbar (Abb.3.41C).

3.2.15 *taiman*-Mutanten weisen veränderte Expression von Faktoren der embryonalen Achsenbildung auf

Beginnend mit maternalem Einfluss werden mittels verschiedener Protein- und mRNA-Gradienten die Dorso-Ventral sowie die Anterio-Posterior Achsen der embryonalen Zygote präzise bestimmt. Das dorso-ventrale Muster wird mit dem sequenzspezifischen Transkriptionsfaktor Dorsal (DI) etabliert. Dieser wird im syncytiellen Embryo in einem breiten Gradienten, von ventral viel bis dorsal wenig, verteilt und steht am Anfang eines Netzwerks der Dorso-Ventral-Achsenbildung (Simpson, 1983; Ip et al., 1991). Durch konzentrationsabhängige Effekte werden zygotische Gene, welche aktivierend oder reprimierend wirken können, exprimiert. Die meisten davon kodieren für weitere Transkriptionsfaktoren oder Komponenten von Zellsignalwegen (Strathopoulos & Levine, 2004). *Twist* (*twi*) und *snail* (*sna*) gehören zu den frühesten Zielgenen von Dorsal, deren Expression mittels Enhancern des Typ 1

durch hohe DI-Level ventral ausgelöst wird (Thisse et al., 1991; Ip et al., 1992, Zeitlinger et al., 2007).

Twist als bHLH-Protein stellt einen Aktivator und Snail als Zink-Finger Protein einen Repressor für Genexpression dar (Thisse et al., 1988; Hemavathy et al., 2000). Die Hälfte aller Dorsal kontrollierten gewebsspezifischen Enhancer haben auch Bindestellen für Twist und oder Snail (Stathopoulos et al., 2002; Markstein et al., 2004).

Per CHIP-Chip Untersuchungen wurden an den bekannten Enhancern von *twi*, *sna*, *mircoRNA-1 (miR-1)*, *CG12177* und *Peptidylglycine- α -hydroxylating monooxygenase (Phm)* Anreicherungen von Di, Twi und Sna gefunden (Zeitlinger et al., 2007).

Das im *Microarray* (Abschnitt 3.2.9) am stärksten veränderte Gen in *Df(2L)tai2* stellte *twist* dar, mit 0,05 facher Expression des Kontrollstamms. Auch *snail* rangierte mit 0,11 facher Expression weit vorn in der Liste der differentiell regulierten Gene in *Df(2L)tai2*. Viele weitere Dorsal-regulierte Gene sind stark herunter reguliert in *5-SZ-3139r* und stärker in *Df(2L)tai2*, darunter auch ein weiteres in den Top10 der Liste, *Insulin-like-peptid 4 (Ilp4)* mit 0,05 facher Expression im Vergleich zum Kontrollstamm. Auch die Überprüfung mittels qRT-PCR zeigte eine signifikante Herabregulation von *twist* (0,01 fach) und *snail* (0,012 fach) in Embryonen der *tai*-Mutante *Df(2L)tai2* im Vergleich zum Kontrollstamm (Abb.3.42). Ebenso liegt die premRNA von *miR-1* erwartungsgemäß um 97,3% reduziert vor (Abb.3.42). Das Transkript des *dorsal* selbst erscheint jedoch als nicht signifikant verändert im *Microarray*.

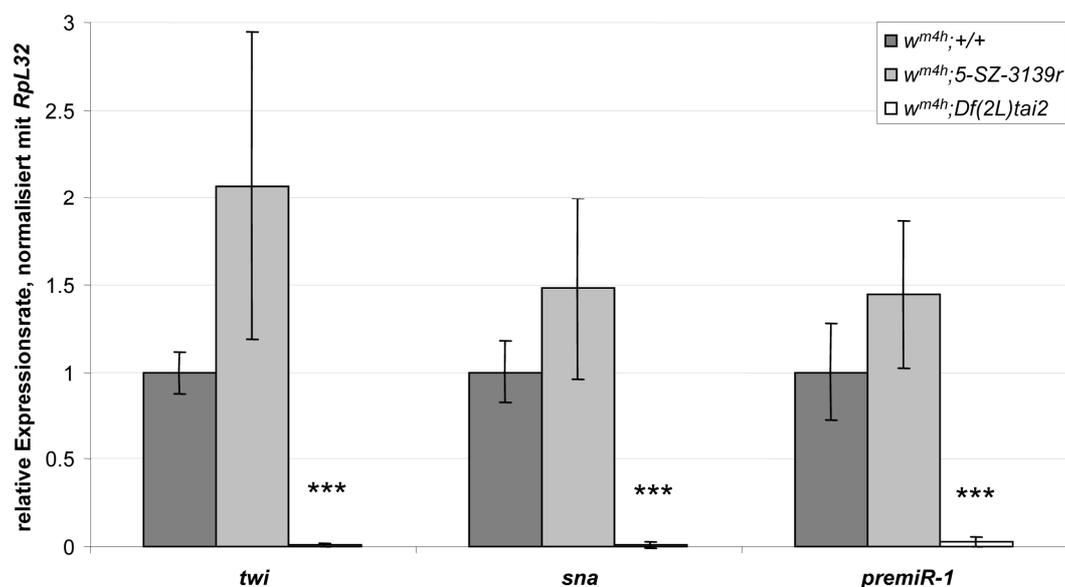


Abb.3.42: Quantifizierung der *twist*, *snail* und *premiR-1* Transkripte in *tai*-Mutanten. Mit cDNA 0-4h alter Embryonen der Mutanten *5-SZ-3139r* und *Df(2L)tai2* wurden die Dorsal-kontrollierten Transkripte *twist*, *snail* und *premiR-1* im Verhältnis zum Kontrollstamm *w^{m4h};+/+* quantifiziert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,005.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch die Anterio-Posteriore Achsenbildung bzw. Segmentierung durch das Dorso-Ventral-Netzwerk moduliert wird (Carroll et al., 1987; Liaw & Lengyel, 1993). So konnten mittels ChIP-Chip für *ocelliless (oc)*, *tailless (tll)*, *hairy (h)*, *knirps (kni)* und *runt (run)* ebenfalls Dorsal, Twist und Snail-Bindestellen nachgewiesen werden (Zeitlinger et al., 2007). Sie sind zwar nicht ausschließlich Dorsal-reguliert, einige Anterio-Posterior Regionen scheinen allerdings vom Dorso-Ventralen Netzwerk beeinflusst zu werden.

Unter den 100 am stärksten signifikant differentiell regulierten Genen in *Df(2L)tai2* im durchgeführten *Microarray* (3.2.9) befanden sich einige herunter regulierte Segmentierungsgene, darunter *odd paired (opa)*, *wingless (wg)*, *fushi-tarazu (ftz)*, *giant (gt)* und *runt (run)*. In Tab.3.4 sind die Daten der bekannten Lücken-, Paarregel- und Segmentpolaritätsgene aufgelistet mit deren dazugehörigen Expressionswerten des *Microarrays* von *tai*-Mutanten in 0-4h alten Embryonen. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse der RNA-Seq mit 0-4h alten Embryonen von *Df(2L)tai2* hinzugefügt.

Tab.3.4: Segmentierungsgene und ihre log₂-fache Expressionsänderung beim *Microarray* in den Mutanten *w^{m4h};5-SZ-3139r* (SZ) und *w^{m4h};Df(2L)tai2* (Df) gegenüber dem Kontrollstamm *w^{m4h};+/-* (WT) sowie im Vergleich dazu die log₂-fache Expressionsänderung in der RNA-Seq von *w^{m4h};Df(2L)tai2* gegenüber dem Kontrollstamm *w^{m4h};+/-*. n.s.=nicht signifikant (p>0,05).

Gen	Abkürzung	SZ vs. WT	Df vs. WT	RNA-Seq Df vs. WT
maternal				
<i>bicoid</i>	<i>bcd</i>	+0,47	+0,82 +0,98	+0,35
<i>nanos</i>	<i>nos</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>caudal</i>	<i>cad</i>	+0,69	+0,18	n.s.
Lücken-Gene				
<i>hunchback</i>	<i>hb</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>krüppel</i>	<i>kr</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>knirps</i>	<i>kni</i>	-0,48	-1,51	-1,87
<i>giant</i>	<i>gt</i>	-0,35	-2,2	-2,39
<i>tailless</i>	<i>tll</i>	n.s.	n.s.	-1,95
<i>huckebein</i>	<i>hkb</i>	n.s.	n.s.	-1,94
<i>ocelliless</i>	<i>oc</i>	-0,17	-1,1	-2,05
<i>buttonhead</i>	<i>btd</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>cap-n-collar</i>	<i>cnc</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>knot</i>	<i>kn</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>crocodile</i>	<i>croc</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>empty spiracles</i>	<i>ems</i>	-0,37	-2,0	-2,44
Paar-Regel-Gene				
<i>hairy</i>	<i>h</i>	n.s.	n.s.	-2,06
<i>even-skipped</i>	<i>eve</i>	-0,57	-2,4	-1,79

Gen	Abkürzung	SZ vs. WT	Df vs. WT	RNA-Seq Df vs. WT
<i>runt</i>	<i>run</i>	-0,56	-2,69	-2,88
		-0,4	-2,65	
<i>fushi tarazu</i>	<i>ftz</i>	-0,34	-0,77	-2,37
		-0,71	-3,46	
<i>odd-skipped</i>	<i>odd</i>	-0,4	-1,4	-2,22
<i>paired</i>	<i>prd</i>	-0,23	-1,25	-2,16
<i>Tenascin major</i>	<i>Ten-m</i>	-0,35	-1,1	n.s.
<i>sloppy paired1</i>	<i>spl1</i>	-0,14	-1,2	n.s.
<i>sloppy paired2</i>	<i>spl2</i>	-0,39	-2,02	n.s.
<i>odd paired</i>	<i>opa</i>	-1,02	-4,09	-2,03
Segmentpolaritätsgene				
<i>engrailed</i>	<i>en</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>wingless</i>	<i>wg</i>	-1,37	-3,7	n.s.
<i>hedgehog</i>	<i>hh</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>cubitus</i>	<i>ci</i>	-0,8	-2,3	-1,82
<i>interruptus</i>				
<i>patched</i>	<i>ptc</i>	-0,2	-2,7	-1,85
<i>gooseberry</i>	<i>gsb</i>	-0,8	-1,9	-4,33

Dabei fällt auf, dass maternale Komponenten wie *bicoid* und *caudal* eher hochreguliert sind, hingegen zygotische Komponenten wie Paar-Regel-Gene und Segmentpolaritätsgene teilweise stark reprimiert wurden (Tab.3.4). Auch das für die *bicoid*-Lokalisation notwendige *exuperantia (exu)* ist in *tai*-Mutantenembryonen dereguliert (Berleth et al., 1988; Cha et al., 2001). In den *Microarray*-Daten ist es in 5-SZ-3139r 3,2 und in *Df(2L)tai2* 4,9 fach exprimiert im Vergleich zum Kontrollstamm. Somit ist es wahrscheinlich, dass auch *bicoid* misslokalisiert im *tai*-Mutantenembryo vorliegt.

Auch das Transkript des Transkriptionsfaktors *fushi-tarazu (ftz)* war in den beiden *taiman*-Mutanten signifikant unterrepräsentiert im Vergleich zum Kontrollstamm *w^{m4h};+/-*. In der Mutante 5-SZ-3139r war hier das Transkript nur 0,6 fach und in der Mutante *Df(2L)tai2* nur 0,09 fach konzentriert im Vergleich zum Wildtyp. Die Regulation dieses Paar-Regel-Gens ist gut untersucht und so ist bekannt, dass es durch die Proteine Runt und Hairy, beides Paar-Regel-Gene, in seiner Expression kontrolliert wird (Tsai & Gergen, 1995). Wobei Hairy als Repressor und Runt als Aktivator der Expression für die streifenweise Expression des *ftz*-Gens sorgen (Tsai & Gergen, 1995).

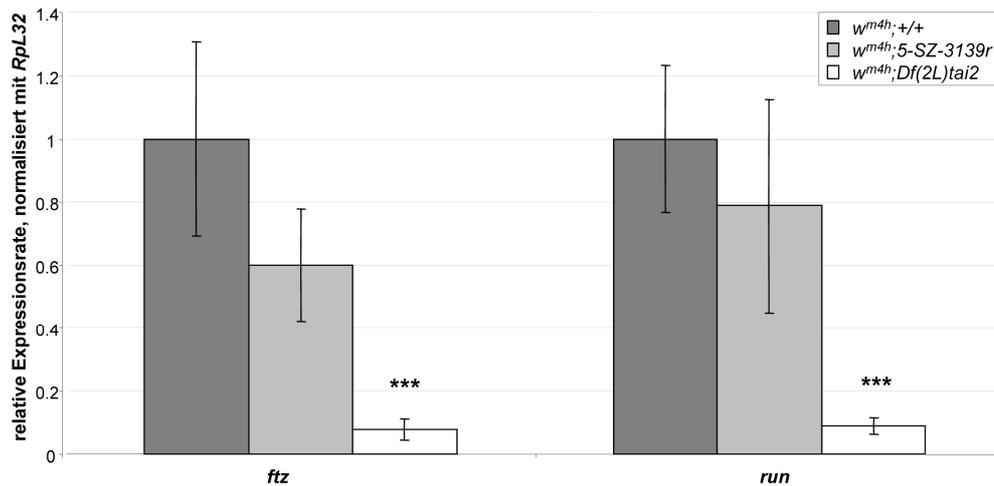


Abb.3.43: Quantitative Bestimmung der Transkriptmenge von *fushi-tarazu* und *run* bei *tai*-Mutanten. Die 0-4h alten Embryonen der Mutanten *5-SZ-3139r* und *Df(2L)tai2* wurden mittels qRT-PCR hinsichtlich der Expression der Gene *fushi-tarazu* und *run* untersucht. Bei der Mutante *Df(2L)tai2* konnte eine signifikante Reduktion der Expression beider Gene im Vergleich zum Kontrollstamm $w^{m4h};+/+$ nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$.

Das *run*-Gen zeigte in den *Microarray*-Untersuchungen eine Verringerung seiner Expression (Tab.3.4). Diese Veränderung in der Expression beider Gene konnte mittels qRT-PCR quantifiziert und bestätigt werden (Abb.3.43). In der Mutante *Df(2L)tai2* ist *ftz* lediglich 0,07 fach und *run* 0,08 fach im Vergleich zum Wildtyp exprimiert (Abb.3.43). Sowohl *hairy* als auch *run* sind durch die *DI*, *Twi* und *Sna* Bindestellen in ihren Enhancern (Zeitlinger et al., 2007) dorsal-kontrollierte Gene. Da diese Kontrollwege nachweislich in *tai*-Mutanten dereguliert sind (Abb.3.41), ist die Herunterregulation von *ftz* nicht überraschend.

3.2.16 *taiman* beeinflusst TGF β -Signalling

Bei niedrigen Dorsal-Konzentrationen werden die den TGF β Signalweg im frühen Embryo beeinflussenden Gene *decapentaplegic* (*dpp*), *short gastrulation* (*sog*) und *tolloid* (*tld*) exprimiert (Zeitlinger et al., 2007). Alle sind in *tai*-Mutantenembryonen im Vergleich zum Wildtyp in stark verminderter Konzentration vorhanden (*dpp*: SZ 0,74/ Df 0,59; *sog*: SZ 0,65/ Df 0,38; *tld*: SZ 0,82/ Df 0,14 fach).

DPP gehört zu den Bone Morphogenic Protein (BMP)-Liganden der TGF β -Superfamilie und stellt einen wichtigen Liganden des TGF β Signalwegs dar, der als Morphogen bei der Dorso-Ventral-Musterbildung, im Besonderen bei der Bildung der Amnioserosa und der dorsalen Epidermis, wirkt (Ferguson & Anderson, 1992). Es bildet mit Screw (*Scw*) einen Komplex, dessen Rezeptorbindung durch die Bindung von *Sog* und *Twisted Gastrulation* (*Tsg*) verhindert wird (Arora et al., 1994; Yu et al., 2004; Chang et al.,

2001). Wird Sog von der Metalloprotease Tolloid (Tld) degradiert, wird der DPP-Scw-Komplex freigesetzt und kann nun den Rezeptor bestehend aus Punt (Put) und Thickveins (Tkv) oder Saxophone (Sax) binden (Marques et al., 1997; Shimmi et al., 2005; Nguyen et al., 1998). Nach der Phosphorylierung des SMAD-Moleküls Mothers-Against-DPP (Mad) innerhalb der Zelle gelangt pMad bis in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt (Kim et al., 1997; Xu et al., 1998).

Mittels quantitativer RT-PCR wurde *dpp* hinsichtlich seiner Expression in 0-4h alten Embryonen von *taiman*-Mutanten untersucht und analog dem *Microarray* ergab sich eine signifikante Reduktion des Transkripts in beiden Mutanten (Abb.3.44). Die Transkription des SMAD-Effektorgens *Mad* war allerdings unbeeinflusst in *tai*-Mutanten (Abb.3.44).

Hohe DPP-Level in der Amnioserosa sind notwendig für eine Expression des Homeodomänen-Transkriptionsfaktors *zerknüllt* (*zen*) (Ray et al., 1991), welches auch einen Enhancer mit DI-Bindestellen besitzt (Zeitlinger et al., 2007). Somit ist es nicht verwunderlich, dass es in *tai*-Mutanten ebenfalls weniger exprimiert wird (SZ: 0,58 fach und Df 0,11fach im Vergleich zum Kontrollstamm).

Auch die microRNA *miR-184* wurde als Dorsal-gesteuert prognostiziert (Zeitlinger et al., 2007). Sie ist in ihrer Funktion als posttranskriptionaler Regulator ebenfalls in die dorso-ventrale Polarisierung des Embryos involviert (Iovino et al. 2009). Durch Steuerung des DPP-Signalwegs ist dieses maternal und zygotisch exprimierte Gen für die Keimbahn- und Embryonalentwicklung sehr wichtig.

MicroRNAs binden an spezifische Target-Sequenzen im 3'UTR von mRNAs und verursachen dadurch eine Degradation der mRNA oder eine Inhibierung der Translation (Filipowicz et al., 2008). Die miRNA *miR-184* hat z.B. Bindestellen in seiner Target-mRNA *saxophone* (*sax*), dessen Protein einen Teil eines TGF β -Rezeptors darstellt, an den DPP bindet (Iovino et al, 2009). Ist *miR-184* deletiert, liegt SAX in erhöhter Menge und mislokalisiert vor (Iovino et al, 2009). Dies führt zu einem verstärkten DPP-Signal und letztendlich zur Runterregulation von *bag of marbles* (*bam*) in Germarien (Iovino et al., 2009). Durch das Regeln des DPP-Rezeptorlevels kontrolliert *miR-184* somit die Keimbahnzellendifferenzierung.

Wie die durchgeführten qRT-PCR-Analysen zeigen, liegt auch in 0-4h alten Embryonen der *taiman*-Mutante *Df(2L)tai2* das *miR-184* Transkript signifikant reduziert gegenüber dem Kontrollstamm vor (Abb.3.44). Das DPP-Signal wird also durch 2 Wege in *Df(2L)tai2* beeinflusst. Zum einen durch Dorsal-verursachte transkriptionelle Runterregulation von *dpp* und zum anderen durch Verlust posttranskriptioneller Kontrolle des Rezeptortranskripts *sax* aufgrund transkriptioneller Runterregulation von *miR-184*.

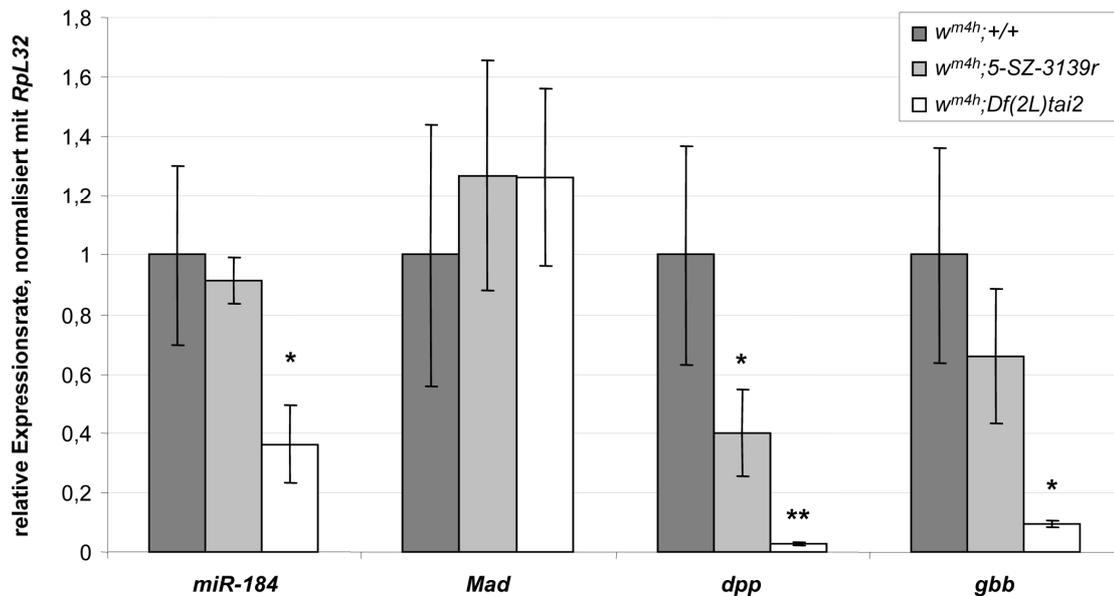


Abb.3.44: Relative Quantifizierung der *miR-184*, *Mad*, *dpp* und *gbb* Transkripte in *tai*-Mutanten. Die cDNA aus 0-4h alten Embryonen der Mutanten *5-SZ-3139r*, *Df(2L)tai2* wurde mittels qRT-PCR hinsichtlich der Expression der *miR-184*, *Mad*, *dpp* und *gbb* Gene untersucht. Bei der Mutante *Df(2L)tai2* konnte eine signifikante Reduktion der *miR184*- und der *gbb*-Expression im Vergleich zum Kontrollstamm $w^{m4h};+/+$ nachgewiesen werden. Bezüglich des *dpp*-Transkripts zeigten beide *tai*-Mutanten eine signifikante Reduktion. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der 3 biologischen Replikate dar. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt markiert: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,005$.

Ebenfalls ein Bestandteil des TGF β -Signalwegs ist das Protein kodiert vom Gen *glass bottom boat* (*gbb*). Wie DPP ist GBB ein BMP-Ligand der TGF β -Superfamilie. Beide sind an der Entwicklung bestimmter embryonaler Gewebe beteiligt, einige Funktionen übt GBB aber unabhängig von DPP aus (Wharton et al., 1999). Im Embryo ist *gbb* wichtig für die Mitteldarmmorphogenese und die Telsonbildung (Wharton et al., 1999). Mutanten von *gbb* sterben meist erst im Larvenstadium, in welchem sie auch den namensgebenden transparenten Phänotyp entfalten (Khalsa et al, 1998). Diese Larven haben mehrere morphologische und kutikuläre Defekte wie z.B. reduzierte Imaginalscheiben (Wharton et al., 1999). Wie aus Abb.3.44 zu entnehmen, liegt auch *gbb* in frühen Embryonen der *tai*-Mutanten signifikant reduziert vor.

Das Transkript des dritten BMP-Liganden in *Drosophila* SCW ist laut *Microarray* in *Df(2L)tai2* auch um die Hälfte in der Menge reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Mit DPP, SCW und GBB sind somit alle BMP-Liganden der TGF β -Superfamilie in *tai*-Mutanten transkriptionell beeinflusst, welche von großer Wichtigkeit für die embryonale Entwicklung sind.

4. Diskussion

4.1. Nachweis und Analyse nicht-kodierender polyadenylierter RNAs

4.1.1 Bioinformatisch vorhergesagte neue Introns gehören zu proteinkodierenden Transkripten

Die Vorhersage von kleinen Introns durch die Arbeitsgruppe Stadler stellte eine erfolgreiche Methode zur Transkriptvorhersage dar. Mit Positivkontrollen und bereits annotierten Genen konnte die Funktionalität der Methode verifiziert werden (Hiller et al., 2009). Es wurden neue proteinkodierende Gene, sowie neue UTRs und putative *mlncRNAs* (*messenger like noncoding RNAs*) vorhergesagt.

Sieben dieser putativen *mlncRNA* Transkripte konnten als echte Transkripte bestätigt werden (Abb.3.1). Außerdem konnte, abgesehen von *mlncRNA42E5-2*, für alle diese neuen Transkripte eine Konservierung der Expression bis *D.pseudoobscura* gezeigt werden (Tab.3.1). Trotz geringer Konservierung der Exonsequenzen, waren sowohl die Exon-Intron-Übergänge als auch die entwicklungspezifischen Expressionsprofile und somit die Promotorelemente, zwischen anderen *Drosophila*-Arten konserviert. Dies lässt einen gewissen Selektionsdruck auf diese Transkripte vermuten (Ponjavic et al., 2007).

Die 7 nachgewiesenen neuen Introns bzw. Transkripte waren größtenteils anderen, schon bekannten proteinkodierenden Genen zugehörig. Die Introns 55117 und 51725 stellen Teile der 5' Bereiche der Gene *CG11570* und *CG32106* dar und die Introns 1755 und 13450 erweitern die 3' Bereiche der Gene *RhoGAP102A* und *Tsp42Ee*. Durch die zusätzlichen Introns und Exons gewinnen alle diese Gene nicht nur an UTR, sondern auch an kodierender Sequenz dazu (Abb.3.3; 3.4; 3.5; 3.6). Die Annotation der Gene konnte demnach mit keinen gängigen Vorhersagemethoden korrekt nachgewiesen werden. Die Vorhersage kleiner Introns kann also auch zur ergänzenden Annotation von proteinkodierenden Genen verwendet werden.

Ein unerwartetes Beispiel stellte Intron 72977 (putative *mlncRNA36C10*) dar. Es zeigte sich, dass es Bestandteil mehrerer Transkripte des plus-Strangs in der Region 36C10 des 2L Chromosoms ist (Abb.3.7A). So konnten sowohl Exons der Gene *CG5131* als auch *CG5110* in Transkripten mit Intron 72977 mittels RACE nachgewiesen werden. Aber auch eine Region 5' des *fws* Gens wurde in einem Transkript mit 72977 gefunden (Abb.3.7A). Denkbar wäre es, dass es sich um ein großes Gen mit verschiedenen

alternativen Spleißformen handelt. Die Expression der Transkripte war sehr gering und lediglich im Embryostadium vorhanden (Abb.3.7B). Vermutlich ist die geringe Expression auch der Grund warum ein Überprüfen der RACE-Ergebnisse mittels RT-PCR scheiterte.

Möglich wäre auch, dass die Exons eine große ncRNA darstellen. Dieses Gen könnte die Transkription in seinem Locus entweder mittels epigentischer Vorgänge steuern (Nagano et al., 2008; Pandey et al., 2008; Wang et al., 2011), oder auch mittels transkriptioneller Interferenz beeinflussen (Petruk et al., 2006). Bei transkriptioneller Interferenz würde ein Transkriptionsprozess einen anderen Transkriptionsprozess *in cis* beeinflussen. Da alle Transkripte auf dem plus-Strang transkribiert werden, wäre es z.B. möglich, dass die Promotoren mit den Promotoren anderer Gene des minus-Strangs überlappen und so transkriptionelle Interferenz wirken könnte. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Transkripte 2 und 3 (Abb.3.7A) keine ORFs enthalten. Lediglich das Transkript 1 mit *CG5131* (Abb.3.7) enthält den ORF des annotierten *CG5131*. Im Bereich der neuen Exons wäre keine weitere kodierende Sequenz enthalten (Abb.3.7A).

4.1.2 Identifizierung von neuen putativ nicht-kodierenden Transkripten

Zwei weitere neue putative *mlncRNA* Transkripte aus der Intronvorhersage stellen wahrscheinlich neue nicht-kodierende RNAs dar.

Das Gen *mlncRNA66A2* beinhaltet das vorhergesagte Intron 28910, schließt auch 2 weitere vorhergesagte Introns ein und liegt in einer intergenischen Region der zytologischen Bande 66A2 des Chromosoms 3L (Abb.3.8A). Es wird ausschließlich in Larven, Puppen und Männchen exprimiert (Abb.3.8B) und wird mit einem *CPC coding potential score* unter null als nichtkodierend eingestuft. Wenn es doch für ein Protein kodieren sollte, dann würde dieses aus 142AS bestehen und hätte keine bekannten Domänenstrukturen. Ähnliche kleine putative Proteine, mit geringer Aminosäureidentität, lassen sich nur in *Drosophilidae* finden (Abb.3.9). Bevor weitere Analysen bezüglich einer nicht-kodierenden Funktion gemacht werden können, sollte mittels eines Antikörpers überprüft werden, ob *mlncRNA66A2* translatiert vorliegt oder nicht.

Das zweite neue Transkript *mlncRNA42E5-1* ist auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms lokalisiert und beinhaltet 3 vorhergesagte Introns (Abb.3.10). Durch Analysen von modENCODE RNASeq Daten konnte das Transkript sowie seine Klassifikation als ncRNA mittlerweile bestätigt werden (Young et al., 2012). Die Analysen identifizierten 1119 neue *long intergenic ncRNAs* (*lincRNAs*) und

mlncRNA42E5-1 wurde hierbei als *lincRNA.258* vorhergesagt. Somit ist die Möglichkeit, dass es proteinkodierend ist, sehr unwahrscheinlich. Die *mlncRNA42E5-1* wurde daher für weitergehende Studien ausgewählt.

4.1.3 *mlncRNA42E5-1* ist ein rezessiver PEV-Suppressor und beeinflusst Genexpression

Die putativ nicht-kodierende RNA *mlncRNA42E5-1* auf dem Chromosomenarm 2R konnte transkriptionell in allen untersuchten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden (Abb.3.11B). Besonders hohe Expression ließ sich im Männchen detektieren (Abb.3.11C). Auch andere Arten der *melanogaster*-Gruppe, wie *D.simulans*, *D.sechellia* und *D.erecta*, zeigten vorrangig in Männchen eine Expression der homologen Transkripte (Abb.3.11D). Die Konservierung der Sequenz von *mlncRNA42E5-1* ist sehr gering und nur an Spleißdonor und –akzeptorstellen ausgeprägt. Auch die Sekundärstruktur ist nicht konserviert und unstrukturiert (pers. Mitteilung, P. Stadler) und es bestehen keine Ähnlichkeiten zu bekannten RNA-Familien.

Eine neu erzeugte Deletion von *mlncRNA42E5-1* zeigte in Embryos, Puppen, Männchen und Weibchen eine signifikante Reduktion des benachbarten *Tsp42Ee*-Transkripts (Abb.3.16A-D). Das Gen liegt *upstream* der Deletion und ist, ebenso wie *mlncRNA42E5-1*, auf dem plus-Strang kodiert. Das *downstream* gelegene *Tsp42Ef* Gen wies in Puppen eine leicht signifikante Reduktion der Transkriptmenge auf (Abb.3.16C).

Eine Überexpressionlinie, hergestellt aus mehreren S1/MS2-getaggten *mlncRNA42E5-1*-Transgenen, zeigte ebenfalls geringfügige Änderungen in der lokalen Genexpression umliegender Gene (Abb.3.17). Im Stadium der höchsten *mlncRNA42E5-1*-Expression (adulte Männchen) lag das Transkript des Gens *Tsp42Ee* in der Deletion signifikant verringert und in der Überexpression signifikant erhöht vor (Abb.3.16D; Abb.3.17D). Diese Tatsache könnte für eine Funktion der nicht-kodierenden *mlncRNA42E5-1* bei der Transkriptionskontrolle von *Tsp42Ee* sprechen.

Die Deletion von *mlncRNA42E5-1* zeigte weiterhin einen rezessiven Suppressoreffekt auf das *white* Gensilencing der *In(1)w^{m4h}* (Abb.3.15A). Neben der Beeinflussung der Genexpression in Region 42E5 durch *mlncRNA42E5-1*, welche in der Deletion und der Überexpression beobachtet wurden (Abb.3.16; 3.17), hat *mlncRNA42E5-1* demnach auch Auswirkungen auf das perizentrische Heterochromatin. Die Wirkweise scheint sich also nicht nur auf *in cis* Vorgänge zu beschränken.

In *cis* wäre es denkbar, dass *mlncRNA42E5-1* Transkript spezifische Proteine zu benachbarten Genen rekrutiert, welche deren Transkription aktivieren können. Es sind bereits mehrere nicht-kodierende Transkripte beobachtet worden, welche zur Aktivierung oder Repression der Transkription bestimmter Gene beitragen. Beispielsweise wird das RNA-bindende Protein TLS durch lncRNA Transkripte an den Promotor von *CCND1* rekrutiert und verursacht dort eine Repression des Gens (Wang et al., 2008). Andere, wie die *Heat-shock RNA-1 (HSR1)*, können bei Hitzeschock ihr Effektormolekül HSF1 zur Trimerisierung und so zur Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene stimulieren (Shamovsky et al., 2006). Die lncRNA *Evf-2* der Maus beispielsweise bildet einen Ribonukleoprotein Komplex mit einem Homeodomänenprotein, welcher die Enhanceraktivität zweier weiterer Homeodomänen-Gene in der Genregion von *Evf-2* erhöht (Feng et al., 2006).

Auch nur Transkription allein kann einen aktiven Chromatinstatus lokal initiieren. *Polycomb group responsive elements* (PREs) können sowohl aktivierend, kontrolliert durch Trithorax-Gruppen Proteine, oder reprimierend, kontrolliert durch Polycomb-Gruppen Komplexe, wirken (Klymenko & Müller, 2004; Sengupta et al., 2004;). Es wurde andauernde Transkription über PREs hinweg benötigt, um den Zugang von PcG Komplexen an die PREs zu verhindern und einen aktiven Chromatinstatus zu erhalten (Schmitt et al., 2004). Im Bithorax Komplex (BX-C) von *Drosophila* wird dies mittels nicht-kodierenden intergenischen RNAs bewerkstelligt (Cumberledge et al., 1990).

Zur weiterführenden funktionellen Untersuchung von *mlncRNA42E5-1* wurde mit der Nullmutante ein RNASeq Protokoll durchgeführt, um eventuelle Zielgene des Transkripts zu identifizieren. Überrepräsentierte GO-terms beschränkten sich auf Gene mit katalytischer Aktivität oder Gene, die bei Stressreaktionen eine Rolle spielen, sowie Reproduktionsgene (Tab.S4; S5). Außerdem konnten einige hochregulierte Gene der RNASeq nicht mittels qRT-PCR bestätigt werden. Das *Transition protein like 94D*-Gen (*Tpl94D*), *meiotic recombination 11 (mre11)*, *CG42759* und *CG44142* konnten als signifikant verändert bestätigt werden. Bei *CG42759* und *CG44142* könnte es sich auch um nicht-kodierende Gene handeln. *Mre11* spielt eine Rolle bei der Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche und *Tpl94D* ist wichtig für den Austausch von Nucleosomen durch Protamine während der Spermiogenese (Rathke et al., 2007).

Da ein rezessiver Suppressoreffekt auf das *white-Gensilencing* in *In(1)w^{m4h}* beobachtet wurde, könnte auch *mlncRNA42E5-1* eine Funktion bei der Kontrolle perizentrischen Heterochromatins besitzen. Erste ChIP Untersuchungen an der den proximalen Bruchpunkt flankierenden, ca. 200 kb großen *white-roughest*-Region im *In(1)w^{m4h}*-Rearrangement zeigten, dass in der Nullmutante der H3K9me2 Gradient reduziert ist (Daten nicht gezeigt). Sogar die heterochromatischen R1-Elemente und die 359bp-Satellitenregionen wiesen weniger H3K9me2 auf, als der Wildtyp. Bei *Su(var)3-9*

Mutanten ist dies ebenfalls der Fall (Rudolph et al., 2007; Lein, 2011). Somit liegt die Vermutung nahe, dass *mlncRNA42E5-1* eine Funktion bei der Etablierung von heterochromatischem *Gensilencing* eine Rolle spielt. Beispielsweise wäre ein Ribonukleoprotein-Komplex mit Heterochromatinproteinen möglich, welcher in der *mlncRNA42E5-1*-Deletion nicht zu stande käme. Diese Chip-Untersuchungen sollten wiederholt und auch mit anderen Histonmarkierungen wie H3K9me1 und -me3 oder H3K9ac durchgeführt werden, um aufzuklären in welchen Reaktionswegen *mlncRNA42E5-1* eingreift. Auch immunzytologische Färbungen von Embryonen oder Speicheldrüsenchromosomen mit Histonmarkierungs-Antikörpern wären hierbei hilfreich. Ein transkriptioneller Einfluss von *mlncRNA42E5-1* auf bekannte PEV-Modifikatoren konnte sowohl durch RNASeq als auch durch qRT-PCR der Nullmutante ausgeschlossen werden (Abb.3.18).

Um nun eventuelle Ribonukleoprotein-Komplexe von *mlncRNA42E5-1* zu identifizieren, wurden spezielle Transgene in *Drosophila* etabliert (Abb.3.12A). Bestimmte *hairpin*-Strukturen dieser *mlncRNA-42E5-1*-Fusionstranskripte sind in der Lage Streptavidin und das MS2-Hüllenprotein zu binden mit Hilfe derer *mlncRNA42E5-1*-Proteinkomplexe isoliert werden könnten. Die Koexpression von einem MS2-EGFP Fusionsprotein, welches dann endogen an die *hairpins* der *mlncRNA42E5-1*^{5S1}-MS2 binden kann, wurde ebenfalls durchgeführt (Abb.3.12B). Transkriptionell konnten die Transgene bestätigt werden (Abb.3.13B), jedoch ein EGFP-Signal des MS2-EGFP-Proteins wurde nicht detektiert. Sollte das Fusionsprotein aus MS2-EGFP nicht funktionell sein, dann könnte für die Aufreinigung des *mlncRNA42E5-1*-Komplexes auch ein MS2-Antikörper oder Streptavidin mit Antikörper verwendet werden.

4.2 TAIMAN und die frühe Embryonalentwicklung

Parallel zu den Untersuchungen neuer *mlncRNA*-ähnlicher Transkripte wurde auch an der funktionellen Analyse des Ecdyson-Rezeptor-Koaktivators TAIMAN und seiner Auswirkung auf frühembryonale Chromatindifferenzierung gearbeitet.

4.2.1 TAIMAN ist in frühembryonales Ecdyson-Signalling involviert

Im Laufe der frühembryonalen Ontogenese ist eine gesteuerte Genexpression zur Zelldifferenzierung unbedingt notwendig. Gesteuert wird diese anfänglich durch maternale Proteine und mRNAs, welche während der Oogenese in die sich entwickelnde Eizelle geschleust werden. In der frühen Zygote wird dann schon zeitig

eine Differenzierung des Chromatins (in Eu- und Heterochromatin) etabliert, welche schon im 14. Kernteilungszyklus, dem syncytiellen Blastoderm, sichtbar ist. Die Identifikation vom Ecdyson-Rezeptor-Koaktivatorgen *taiman* (*tai*) als dominanten Suppressor für PEV zeigte, dass Hormonsignale eine wichtige Funktion bei der frühen Chromatindifferenzierung ausüben (Apelt, 2005; Lein, 2011).

Die Analyse der zur Verfügung stehenden *taiman*-Mutanten ergab, dass sie die *taiman* Genfunktion beeinflussen (Abb.3.19; Abb.3.21), wobei schon geringe Abweichungen in der Genfunktion wie bei einigen Mutanten, offenbar zu einem dominanten PEV-Suppressorphänotyp führen (Lein, 2011, Abb.3.20A; Abb.3.24). Auch andere Gene, welche am Ecdyson-Signalling beteiligt sind, wie *without children* (*woc*), *disembodied* (*dib*), *ecdysoneless* (*ecd*) und auch der *Ecdysone receptor* (*EcR*) selbst, weisen dominante Suppressoreffekte auf PEV auf (Apelt, pers. Mitteilung; Lein, 2011). Die Heterochromatinetablierung scheint somit nachhaltig durch das Ecdyson-Signalling beeinflusst zu sein.

Zur Charakterisierung des *tai*-Gens wurden mehrere Mutanten erstellt. Die Insertionsmutanten *5-SZ-2281r*, *CB-5878-3r*, *5-HA-4051r*, *5-SZ.3139r* und *5-HA-1532r* sind DrosDel P-Elementlinien. Mittels Flipase-gesteuerter Rekombination wurde eine Deletion *Df(2L)tai2*, welche Exon 5 und Intronbereiche betrifft, erstellt (Apelt, 2005). Weiterhin konnten durch P-Element-Remobilisierung 4 weitere Deletionen zwischen Exon 7 und 8 isoliert werden (R66, R74, R82, R95). Alle Mutanten prägen einen dominanten Suppressorphänotyp auf *In(1)w^{m4h}* aus (Apelt, pers. Mitteilung; Lein, 2011; Abb.3.22A; Abb.3.26). Des Weiteren sind alle Insertionsmutanten sowie die Deletion R74 homozygot lebensfähig. Die Deletionen R66, R82 und R95 sind homozygot früh embryonal letal. Die Tiere, welche homozygot die Deletion *Df(2L)tai2* tragen, sind zwar lebensfähig, können aber nur begrenzt Nachkommen produzieren. So erreichen durchschnittlich 5,7% der Embryonen bei optimalen Bedingungen das adulte Stadium (Abb.3.24). Diese Mutante ist demnach semiletal. Sie eignet sich trotzdem gut für Untersuchungen, da sie starke Veränderungen der Chromatinmodifizierungen aufweist (Lein, 2011) und dennoch durch Kreuzung der homozygoten Adulten homozygote Embryonen für Experimente gewonnen werden können. In diesen Embryonen liegt *tai* nicht nur in verkürzter Form vor, sondern weist auch eine reduzierte Transkriptmenge von ca. 60% des Wildtyps auf (Abb.3.22D; Abb.3.23A). Durch vorrangegangene Studien mit einem polyklonalen TAI-Antikörper in Speicheldrüsen ist auch anzunehmen, dass in *Df(2L)tai2* *tai* entweder nicht translatiert wird oder das Mutantenprotein nicht am Chromatin binden kann (Lein, 2011). Die EMS-Mutante *tai^{61G1}* (Bai et al., 2000) hat einen maternal dominanten Suppressoreffekt auf PEV (Abb.3.27). Die transheterozygoten Tiere *w^{m4h};tai^{61G1}/Df(2L)tai2* waren fertil und prägten ebenfalls einen Suppressorphänotyp aus (Abb.3.28).

Der Ecdyson-Rezeptor-Komplex, bestehend aus EcR, Usp, dem Hormon Ecdyson und einem Koaktivator (TAI), bindet sequenzspezifisch an s.g. *EcRE*-Elementen in Promotoren seiner Zielgene (Riddihough & Pelham, 1987; Yao et al. 1992 und 1993; Bai et al., 2000). Mit einem *EcRE*-aktivierten *lacZ*-Transgen konnte mittels RT-PCR gezeigt werden, dass schon in frühen Embryonen (0-4h) eine Transgenaktivierung messbar war (Abb.3.30B). Demnach ist schon in syncytiellen Embryonen eine ecdysonabhängige Transkriptionskontrolle von Zielgenen durch den Ecdysonrezeptorkomplex möglich. Obwohl der embryonale Ecdysonpuls seinen Höhepunkt erst bei einem Embryoalter von 8h hat (Richards, 1981; Maroy et al., 1988), ist eine funktionsfähige Menge in 0-4h alten Embryonen offenbar schon vorhanden (Abb.3.30B). Während der Mitte der Embryogenese konnte Ecdyson bereits eine Funktion bei der Koordination der Keimband-Retraktion, Kopf-Involution und morphogenetischen Bewegungen zugeordnet werden (Kozlova & Thummel, 2003). Eine weitere Funktion schon in der frühen Embryogenese scheint mit den vorliegenden Daten sehr wahrscheinlich. Die extraembryonische Amnioserosa gilt als Quelle für aktives Ecdysteroid im Embryo, demnach ist auch hier der Rezeptorkomplex erstmals aktiviert (Kozlova & Thummel, 2003).

Die Mutanten des Ecdyson-Signalling *Df(2L)tai2* und *EcR^{Qst}* verringerten heterozygot signifikant die Expression des *EcRE*-gesteuerten *lacZ*-Transgens im Vergleich zum Kontrollstamm (Abb.3.30C). Dies zeigte, dass die Transgenaktivierung nicht nur sehr früh stattfindet, sondern auch TAIMAN-abhängig ist. Demnach wird die Vermutung untermauert, dass *taiman* an der ecdysonabhängigen Expressionkontrolle früher embryonaler Gene (auch chromatinetablierender Gene) beteiligt ist.

4.2.2 TAIMAN-abhängiges Ecdyson-Signalling beeinflusst die Expression Chromatin-modifizierende Enzyme

Unterschiede an Histonmodifizierungen früher Embryonen in Mutanten von *tai* und *EcR* im Vergleich zum Wildtyp zeigen weiterhin, dass Ecdyson-Signalling an der Chromatindifferenzierung entscheidend beteiligt ist (Lein, 2011). Es wurde bereits festgestellt, dass an Imaginalscheiben *in vitro* Ecdyson das Ausmaß heterochromatischen *Gensilencings*, vermutlich über Veränderungen der Histonacetylierungen, beeinflussen kann (Lu et al., 1998).

Die Embryonen der *tai*-Mutante *Df(2L)tai2* weisen erhöhte Mengen an H3K27 Trimethylierung auf (Lein, 2011). Die H3K4 Trimethylierung, jedoch nicht die Mono- und Dimethylierung, ist ebenfalls erhöht, was durch eine geringere Expression und folglich geringere Menge an Protein der H3K4me3-spezifischen Demethylase LID

erklärt werden kann (Lein, 2011; Abb.3.35). Ebenso lassen sich trotz erhöhter Menge der Deacetylase RPD3 am Chromatin erhöhte Mengen H3K9 Acetylierung feststellen, welche eine Verringerung der H3K9 Di- und Trimethylierung nach sich zieht (Lein, 2011). Allerdings konnte hier keine expressionelle Ursache für die erhöhten Mengen an RPD3 am Chromatin gefunden werden (Abb.3.36). Von *lid^{null}*-Mutanten ist bekannt, dass eine erhöhte H3K4 Trimethylierung zu einer erhöhten Menge an RPD3 führt und somit zur Reduktion der H3K9 Acetylierung (Baisch, 2010). Trotz erhöhter H3K4 Trimethylierung und erhöhter RPD3-Menge liegt in frühen Embryonen von *tai*-Mutanten aber eine erhöhte H3K9 Acetylierungsmenge vor (Lein, 2011). Die Deacetylase RPD3 wird also verstärkt rekrutiert, führt aber keine Deacetylierung aus.

Bei Menschen ist bereits eine posttranskriptionelle Beeinflussung von HDAC1 (hRPD3) durch die microRNA *miR449a* bekannt (Noonan et al., 2009). Durch Bindung der miRNA an die HDAC1-mRNA wird die HDAC1-Translation reprimiert (Noonan et al., 2009). Eine ähnliche Funktion einer miRNA in *Drosophila* wäre denkbar. Diese könnte in *tai*-Mutanten in verringerter Menge vorliegen und somit die erhöhte RPD3-Proteinmenge ohne Erhöhung der Transkription erklären. Die erhöhte Menge an H3K9 Acetylierung wäre damit allerdings nicht erklärbar. Möglicherweise kann RPD3 seine Deacetylasefunktion nicht ausführen.

Aus Hefen und Säugern ist bekannt, dass HDAC1 und ING1/2 in einem *Silencing* Komplex mit SIN3 wirken (Laherty et al 1997; Zhang et al 1997; Skowyra et al., 2001; Kuzmichev et al., 2002; Doyon et al., 2006). Evtl. fehlt in *tai*-Mutanten ein nötiger Komplexpartner im ING2-RPD3-*Silencing* Komplex oder andere Faktoren inhibieren das verstärkt vorhandene RPD3. Die vorhandenen Orthologen der weiteren Bestandteile des Komplexes wie SAP30 (CG4756), SUDS3/SAP45 (CG14220), SAP130 (dSAP130), SAP180, RBP1 und BRMS1 (CG4400) (Alland et al., 1997; Hassig et al., 1997; Lechner et al., 2000; Fleischer et al., 2003; Meehan et al., 2004; Shio et al., 2006; Zang et al., 2006) sollten demnach in *tai*-Mutanten hinsichtlich ihrer Expression untersucht werden. Möglicherweise sind auch andere Acetyltransferasen, wie MOF, dGCN5 oder dTip60 bei der vorliegenden H3K9ac Erhöhung in *tai*-Mutanten involviert.

Zielgene von RPD3 scheinen jedoch in frühen Embryonen der *tai*-Mutanten durch die erhöhte RPD3-Menge beeinflusst zu werden. Das Zell-Zyklus-inhibierende Gen *p27* wird nachweislich durch HDAC1 im Menschen in seiner Expression gehemmt (Lagger et al., 2002). Die *Microarray*-Daten zeigen, dass das *p27* homologe *Drosophila*-Gen *dacapo* (*dap*) bei der erhöhten RPD3-Menge in *Df(2L)tai2* stark reduzierte Expression aufweist (Abschnitt 3.2.9).

Die Acetyltransferase CBP/p300 wirkt als transkriptioneller Kofaktor indem es mit Transkriptionsfaktoren interagiert (Bantignies et al., 2000). Auch mit murinem und

humanem TAI wurden bereits CBP/p300-Interaktionen gezeigt (Korzus et al., 1998; Chen et al., 1997). In frühen Embryonen der *tai*-Mutante *5-HA-2281r* liegt die Expression des homologen Gens *nejire* (*nej*) signifikant verringert vor (Abb.3.36). In späteren Entwicklungsstadien wirkt Nej auch in Neuronen als Koaktivator von EcR-B1, welcher aktivierende H3K27 Acetylierung am Zielgen *sox14* in der frühen Metamorphose setzt (Kirilly et al., 2011). Dies geschieht in einem Ecdyson-abhängigen Prozess, sodass eine Ecdyson-abhängige Rolle von Nej in frühen Embryonen ebenfalls denkbar wäre. Als einzige Deacetylase bewirkte RPD3 bei Überexpression eine verringerte Expression des Nej-EcR-B1 Zielgens *sox14* in Neuronen, da es die Acetylierungen von Nej wieder signifikant reduzierte (Kirilly et al., 2011). Die Expression von *nej* blieb dagegen unbeeinflusst. In RNAi *nej*-Knockdown Experimenten in Neuronen konnte allerdings eine erhöhte RPD3 Proteinmenge festgestellt werden (Kirilly et al., 2011). Eventuell könnte also auch durch die verringerte *nej*-Transkription in *tai*-Mutanten (Abb.3.36) die erhöhte RPD3-Menge in *tai*-Mutantenembryonen erklärt werden. Die Erhöhung der H3K9 Acetylierung in *tai*-Mutanten jedoch bleibt weiterhin ungeklärt.

Das menschliche TAI-Homologe AIB1 kann auch mit CBP (hNej) und einer weiteren Acetyltransferase P/CAF interagieren, wodurch womöglich die Effekte der Histonedecetylase des *nuclear receptor corepressor complex* revidiert werden können (Chen et al., 1997). Diese Funktion wäre somit aufgrund der verringerten *nej*-Transkriptmenge ebenfalls in *tai*-Mutanten beeinflusst.

Der durchgeführte *Microarray* mit *taiman*-Mutanten konnte weiterhin einige Anhaltspunkte für die *taiman*-gesteuerte Expressionskaskade liefern. So ergab sich eine große Anzahl an Expressionsänderungen in beiden Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp (Tab.3.2). Auch hier stellte sich die Mutante *Df(2L)tai2* als stärkere Mutante heraus. Die Gene mit geringerer Expression wiesen eine große Anzahl an transkriptionsregulierenden Faktoren auf (Abb.3.31). Diese Tatsache könnte durch sekundäre Effekte dieser Transkriptionsfaktoren, -regulatoren oder -repressoren auch die in *tai*-Mutanten gefundenen Genexpressionserhöhungen erklären. Die Fehlregulation epigenetischer Modifikatoren in *tai*-Mutanten (Abb.3.32) ist ebenfalls ein Anhaltspunkt dafür, dass der frühembryonale Ecdysonpuls eine wichtige Rolle in der Regulation der Etablierung eu- und heterochromatischer Chromatinzustände spielt.

In vergleichenden Färbungen von frühen Embryonen und larvalen Speicheldrüsen sowie Western Blot-Analysen wurde festgestellt, dass die repressiven Markierungen H3K9 Di- und Trimethylierung in den Mutanten *5-SZ-3139r* und *Df(2L)tai2* verringert vorliegen und H3K27me3 stark erhöht ist (Lein, 2011; Apelt pers. Mitteilung). Offensichtlich führt nicht-funktionelles Ecdyson-Signalling zur Deregulation des Chromatins. Die H3K9-spezifischen Methyltransferasen *Su(var)3-9*, *eggless* (*egg*), die

H3K27-spezifische Methyltransferase *Enhancer of zeste (E(z))*, die H3K4-spezifischen Methyltransferasen *trithorax-related (trr)*, *absent small or homeotic discs 1 (ash1)* und *absent small or homeotic discs 2 (ash2)* sowie die H3K4me2 und me1-spezifische Demethylase *Su(var)3-3* wiesen keine signifikanten Veränderungen der Transkriptmengen in *tai*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb.3.37). Die H3K4-spezifische Methyltransferase *trithorax (trx)* zeigte eine leicht signifikante Verringerung ihres Transkripts in *Df(2L)tai2* und die H3K9-spezifische Methyltransferase *G9a* in *5.SZ-3139r* (Abb.3.37). Die genannten Veränderungen in den Histonmethylierungsstufen sind also wahrscheinlich nicht durch expressionelle Veränderungen der Effektorgene verursacht.

Weitere an der Heterochromatinetablierung beteiligte Faktoren [*Su(var)2-1*, *Su(var)3-7*, *HP1a*, *HP1b*, *HP1c*] waren ebenfalls nicht signifikant in ihrer Expression in *tai*-Mutanten verändert (Abb.3.38).

Das in Larven Ecdyson-abhängig exprimierte BLIMP-1 gehört zu den PRDM-Familienproteinen, welche eine der SET-Domäne verwandte *positive regulator-Domäne I* (PR-Domäne) enthalten (Agawa et al., 2007). Durch Fehlen der SET-spezifischen NHSC(I) Sequenz, ist eine Methyltransferaseaktivität der Proteine unwahrscheinlich (Rea et al., 2000; Kouzarides, 2002). Die Expression in frühen Embryonen (Stadium 4) konnte schon mittels *in-situ*-Hybridisierung gezeigt werden (Flyexpress) und wurde nun mittels RT-PCR bestätigt (Abb.3.39A). Diese ist ebenfalls abhängig von TAI-gesteuertem Ecdyson-*Signalling*, denn in *Df(2L)tai2*-Embryonen liegt das *Blimp-1* Transkript um 90% verringert vor (Abb.3.39B).

Um seine Funktion als transkriptioneller Repressor verschiedener Gene zu bewerkstelligen, interagiert BLIMP-1 mit einigen chromatinmodifizierenden Enzymen. Ein BLIMP-1-Komplex mit Methyltransferaseaktivität enthielt beispielsweise die Histonmethyltransferase *G9a* (Gvory et al., 2004), außerdem wurden auch schon Interaktionen mit HDAC1/2 im humanen System gezeigt (Yu et al., 2000). Su et al. konnten weiterhin eine Interaktion mit der Histondemethylase LSD1 in Zelllinien nachweisen und eine unterstützende Wirkung von LSD1 für den BLIMP-1 abhängigen Genrepressionskomplex feststellen (Su et al., 2009). Somit scheint BLIMP-1 einen Repressor darzustellen, der Chromatinmodifizierende Enzyme rekrutiert und dadurch die Chromatinstruktur beeinflusst. Da es offensichtlich TAI-gesteuert exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass BLIMP-1 eine zentrale Bedeutung in der Ecdyson- ausgelösten Expressionskaskade, sowohl während der Embryogenese, als auch bei der Metamorphose, innehat.

Als Repressor für Ecdyson-*Signalling* kann Abrupt (Ab) direkt mit TAI interagieren (Jang et al., 2009). *EcR*- sowie *tai*-Mutanten wiesen in Border-Zellen der Germarien eine erhöhte nukleäre Abrupt-Konzentration auf (Jang et al., 2009). Ecdyson-*Signalling*

scheint demnach eher die Ab-Proteinkonzentration in Border-Zellen zu verringern (Jang et al., 2009). In Larven konnte Ab als *bona fide* Target der microRNA *let-7* nachgewiesen werden (Caygill & Johnston, 2008). Hier wird die Menge an Ab-Protein posttranskriptionell durch *let-7* gesteuert. Das *let-7* Transkript wird ecdysonabhängig transkribiert, beginnend mit dem Ecdysonpuls am Ende des 3. Larvenstadiums (Sempere et al., 2002 & 2003). Somit ist die Ab-Konzentration indirekt auch Ecdyson-spezifisch gesteuert. Auch in adulten Weibchen wird Ecdyson produziert, sodass eine geringe Menge *let-7* Transkript vorhanden ist (Bownes, 1998; Riddiford, 1993; Sempere et al., 2003). Vermutlich ist demnach *let-7* in den Germarien für die Mengenkontrolle des Ab-Proteins verantwortlich. Verschiedene Mutanten von *abrupt* zeigten keine dominanten Effekte auf das *In(1)w^{m4h}*-PEV-System, lediglich *ab^{clu-1}* wies einen leichten Suppressoreffekt auf (Abb.3.40B). Dieser Effekt könnte eine Beteiligung von Ab beim TAI-abhängigen heterochromatischen *Gensilencing* bedeuten, da auch *tai*-Mutanten Suppressoren des PEV sind (Lein, 2011; Abb.3.22; Abb.3.26). Denkbar wäre, dass die Mutanten *ab¹*, *ab²* und *ab^{5-HA-2891}* lediglich hypomorph sind, sodass beispielweise die Interaktion mit TAI immer noch möglich ist.

In Embryonen scheint Ecdyson-*Signalling* allerdings eine andere Wirkung auf *abrupt* auszuüben als in Germarien, denn in der *tai*-Mutante *Df(2L)tai2* ist *abrupt* signifikant expressionell herunter reguliert (Abb.3.40C). Offenbar ist Ecdyson-*Signalling* in frühen Embryonen für die Aktivierung der *abrupt*-Transkription verantwortlich. Da in Embryonen keine *let-7* Transkripte nachgewiesen wurden (Sempere et al., 2003), scheint *abrupt* hier direkt transkriptionell beeinflusst zu werden. Offenbar kontrolliert TAI-abhängiges Ecdyson-*Signalling* in Embryonen *abrupt* transkriptionell und in späteren Stadien mittels *let-7* posttranskriptionell. Eventuell ist dieses System von der Konzentration an Ecdyson abhängig.

4.2.3 TAIMAN-abhängiges Ecdyson-*Signalling* beeinflusst Dosiskompensation X-chromosomaler Gene

Dosiskompensation führt in *Drosophila*-Männchen dazu, dass die transkriptionelle Rate des hemizygoten X im Vergleich zu Weibchen verdoppelt wird. Hierfür bildet sich der *Male Specific Lethal (MSL)*-Komplex aus den Proteinen Male Specific Lethal1 (MSL1), Male Specific Lethal2 (MSL2), Male Specific Lethal3 (MSL3), der RNA/DNA-Helicase Maleless (MLE), den ncRNAs *roX1* und *roX2*, sowie der Acetyltransferase Males Absent On The First (MOF) (Palmer et al., 1994; Lyman et al., 1997; Gu et al., 1998; Meller & Rattner, 2002). Ausgehend von GA-Reichen *MSL Recognition Elementen (MRE)* breitet sich der Komplex auf X-chromosomale Gene aus und MOF acetyliert

H4K16 zur Transkriptionsaktivierung (Alekseyenko et al., 2008; Straub et al., 2008; Akhtar & Becker, 2000). Die *roX*-Gene beeinhalteten solche MREs mit sehr hoher Affinität und dienen somit auch als Ausgangspunkt der MSL-Komplex-Ausbreitung (Kelley et al., 1999). Als Transgene in Autosomen können diese auch autosomales *Spreading* des Komplexes auslösen (Kelley et al., 1999). In *roX1* und *roX2* Nullmutanten liegen die MSL Proteine fehllokalisiert auch an autosomalen Stellen vor, welche mit H4K16 Acetylierung markiert sind (Meller et al., 2002). Diese langen nicht-kodierenden RNAs sind also unerlässlich für die Gendosis-Kompensation.

Einige der MSL-Komplex-Komponenten stellten sich als TAIMAN-abhängig heraus. Nicht nur die beiden beteiligten ncRNAs *roX1* und *roX2*, sondern auch *msl-2* und die Acetyltransferase *mof* liegen in *Df(2L)tai2* in verringerter Transkriptmenge vor (Abb.3.41A). Der MSL-Komplex sollte sich demnach in *Df(2L)tai2* Mutanten nur mit verringerter Menge bilden können, zumal *roX1* und *roX2* Transkripte um 90% reduziert sind im Vergleich zum Kontrollstamm. Der transkriptionelle Ausgleich der Gendosis bei hemizyoten Männchen ist damit nicht möglich. So kann die ohnehin ebenfalls in geringerer Menge vorliegende Acetyltransferase MOF keine Acetylierungen am H4K16 des X-Chromosoms setzen und die Transkription nicht aktivieren.

Auch die Funktion des *Non Specific Lethal (NSL)*-Komplexes, an dem MOF auch beteiligt ist, könnte eingeschränkt sein. Zur Überprüfung könnten Western Blots mit Embryoextrakten oder immunzytologische Färbungen mit Antikörper gegen acetyliertes H4K16 durchgeführt werden.

4.2.4 TAIMAN-abhängiges Ecdyson-Signalling und die embryonale Achsenbildung

Große Veränderungen der expressionellen Eigenschaften konnten im Hinblick auf mehrere Gene, welche die embryonale Musterbildung steuern, festgestellt werden. Durch verringerte Expression verschiedenster Transkriptionsfaktoren der Segmentierung und Faktoren des TGF β -*Signalling* ist die frühembryonale Entwicklung der *Df(2L)tai2*-Embryos völlig gestört.

Der dorso-ventrale Gradient des maternalen Transkriptionsfaktors Dorsal (DI) löst im syncytiellen Embryo die dorso-ventrale Achsenbildung aus (Simpson, 1983; Ip et al., 1991; Rusch & Levine, 1996). Konzentrationsabhängig werden zygotische Gene aktiviert, welche ihrerseits zum nachgeschalteten Transkriptions-Netzwerk beitragen. Die Gene *twist (twi)* und *snail (sna)* als früheste Zielgene von Dorsal sind beide drastisch reduziert in ihrer Expressionsrate in *Df(2L)tai2* (Abb.3.42). Bei vielen Enhancern von Genen wirken Twi und Sna mit DI zusammen (Stathopoulos et al.,

2002; Markstein et al., 2004), daher ist in *Df(2L)tai2* mit einem beeinträchtigten Dorsal-kontrollierten Expressionssystem zu rechnen. Mit Hilfe von Chip-Chip Untersuchungen wurden an 5 bekannten Enhancern (*twi*, *sna*, *miR-1*, *CG12177* und *Phm*) Anreicherungen von Df, Twi und Sna gefunden (Zeitlinger et al., 2007). Auch für die microRNA *miR-1* konnte eine drastisch reduzierte Menge an Transkript in der *tai*-Mutante *Df(2L)tai2* nachgewiesen werden (Abb.3.42). Dies zeigt eindrücklich, dass schon sehr früh in der Embryonalentwicklung drastische Entwicklungsprobleme auftreten, denen kaskadenartig viele sekundäre folgen, beispielsweise ist auch *Insulin-like-peptid 4* stark verringert (3.2.15).

Die antero-posteriore Achsenbildung wird auch vom Dorso-Ventral-Netzwerk beeinflusst (Carroll et al. 1987; Liaw & Lengyel 1993). So besitzen die Segmentierungsgene *ocelliless (oc)*, *hairy (h)*, *kniprs (kni)* und *runt (run)* nachweislich Dorsal, Twist und Snail Bindestellen (Zeitlinger et al., 2007). Diese und auch andere Segmentierungsgene, wie *giant (gt)*, *even-skipped (eve)*, *fushi-tarazu (ftz)* oder *odd paired (opa)*, sind in *tai*-Mutanten stark in ihrer Expression vermindert (Tab.3.4; Abb.3.39). Das Beispiel des herunterregulierten Transkriptionsfaktors *ftz* zeigt anschaulich die Kaskade, welche in *tai*-Mutanten defekt ist. Df, Twi und Sna kontrollieren die Expression von *h* und *run*, welche wiederum die Transkription von *ftz* beeinflussen (Zeitlinger et al., 2007; Tsai & Gergen, 1995). Alle diese Gene sind in der *tai*-Mutante *Df(2L)tai2* drastisch in ihrer Expression eingeschränkt (Tab.3.4; Abb.3.43).

Ein weiterer Signalweg, der *transforming growth factor (TGF)* β -Signalweg, wird durch die Dorsal-gesteuerten Gene *decapentaplegic (dpp)*, *short gastrulation (sog)* und *tolloid (tld)* beeinflusst (Zeitlinger et al., 2007). Dieser spielt über die gesamte Entwicklung hinweg bei einer Vielzahl an zellulären Funktionen eine große Rolle. Während der frühembryonalen Entwicklung beeinflusst er vor allem das Morphogen DPP, welches zu den *Bone Morphogenic Protein (BMP)*-Liganden der TGF β -Superfamilie gehört, und kontrolliert somit die Dorso-Ventrale Musterbildung (Ferguson & Anderson, 1992).

Beim TGF β -Signalweg bindet ein Ligand an einen Rezeptor des Typs II, welcher daraufhin einen Rezeptor vom Typ I rekrutiert. Dieser wiederum kann das Signalmolekül Mothers-against-DPP (Mad) phosphorylieren und über dieses wird das Zellsignal bis in den Nukleus weitergetragen (Kim et al., 1997). Die BMP-Liganden DPP, Scw und GBB sind alle an der Entwicklung bestimmter embryonaler Gewebe beteiligt, einige Funktionen übt GBB aber unabhängig von DPP und Scw aus (Wharton et al., 1999). Mit Scw bildet DPP Heterodimere, die effektiver an die Rezeptoren binden als Scw- oder DPP-Homodimere allein (Shimmi et al., 2005).

Die Df gesteuerten TGF β Gene *dpp*, *sog* und *tld* (Zeitlinger et al., 2007) liegen alle transkriptionell in verminderter Konzentration in frühen *tai*-Mutantenembryonen bei

gleichbleibender *Mad*-Transkriptmenge vor (3.2.16; Abb.3.44). Auch das DPP-Zielgen *zerknüllt* und das *gbb*-Transkript konnten als signifikant reduziert in *Df(2L)tai2* nachgewiesen werden (3.2.16; Abb.3.44). Ebenso wurde eine expressionelle Reduktion des posttranskriptionellen Regulators von SAX, einem TGF β -Rezeptormolekül, *miR-184* detektiert, was eine Fehllokalisierung von SAX zu Folge haben müsste (Abb.3.40, Iovino et al., 2009).

Das TGF β -*Signalling* wird demnach durch Verringerung der Liganden DPP, GBB und SCW, als auch durch Fehllokalisierung des Rezeptors SAX, wegen fehlender posttranskriptioneller Kontrolle der miRNA *miR-184*, nachhaltig beeinflusst. Die vielfältige Rolle von *miR-184* bei der Keimbahndifferenzierung durch Kontrolle des DPP-Signals, bei der DV-Achse der Eihülle durch Regulation von *fs(1)K10* sowie bei der AP-Achse des Blastoderms durch Regulation von *Tramtrack69* (Iovino et al., 2009) lässt vermuten, dass schon in den homozygoten *Df(2L)tai2*-Weibchen die Grundlage für die embryonale Fehlregulation entsteht. Allerdings scheint in diesen noch genügend *miR-184* exprimiert zu werden, da ein kompletter Verlust von *miR-184* zum Verlust der Eiproduktion führen würde (Iovino et al., 2009) und auch keine Dorsalisierung der Eier vorliegt wie beim *fs(1)K10^{null}*-Phänotyp (Wieschaus & Szabad, 1979).

Eine wichtige Rolle bei der Dorso-ventralen Achsenbildung scheint auch die Acetyltransferase Nej einzunehmen. In frühen Embryonen wurde gezeigt, dass die *tolloid* Expression durch Nej beeinflusst wird (Lilja et al., 2007). Interessanter Weise ist diese Transkriptionsaktivierung von *tolloid* nicht abhängig von der Acetyltransferase-Domäne von Nej (Lilja et al., 2006). Bekannt ist im humanen System eher, dass CBP Transkriptionsfaktoren acetyliert (Imhof et al., 1997; Waltzer & Bienz, 1998; Martínez-Balbás et al., 2000).

Auch eine direkte Interaktion mit dem BMP-*Signalling*-Effektormolekül und Transkriptionsfaktor Mad wurde bereits nachgewiesen (Waltzer & Bienz, 1999). Selbst bei der DI-abhängigen Expression von *twist* ist Mad ein unerlässlicher Kofaktor (Akimaru et al., 1997). In *Drosophila* wurde bereits gezeigt, dass Nej-Bindestellen mit DI-Bindestellen in frühen Embryonen überlappen (Holmquist et al., 2012) und auch *in vitro* Interaktion zwischen DI und Nej wurde bereits nachgewiesen (Akimaru et al., 1997). Nejire stellt demnach einen wichtigen Faktor des Dorso-Ventralen Netzwerks dar, indem es zusammen mit Dorsal die Expression von Zielgenen wie *twist* steuert und den TGF β -Signalweg über *tolloid* beeinflusst. Da *nej* in *tai*-Mutanten (Abb.3.36) reduziert ist, wird diese Tatsache hier zur Deregulation der embryonalen Achsenbildung beitragen.

Das TAIMAN-gesteuerte Ecdyson-*Signalling* könnte schon während der Oozyten-Entwicklung in der mütterlichen Keimbahn, evtl. mittels *miR-184* und TGF β -*Signalling*, die Embryonalentwicklung steuern. Hier werden maternale mRNAs wie *bicoid*, *caudal*

und *nanos* in die Oozyte transferiert und dies führt dann in der Zygote zu ersten Proteingradienten, die die Grundlage bilden für die weitere Segmentierung. Sie scheinen zwar laut *Microarray* leicht vermehrt in *tai*-Mutanten Embryonen vorhanden zu sein (Tab.3.4), allerdings wäre es hier zusätzlich wichtig auch die Verteilung der Proteine zu untersuchen. Denn beispielsweise ist ebenfalls das für die *bicoid*-Lokalisation nötige *exuperantia (exu)* Gen (Berleth et al., 1988; Cha et al., 2001) dereguliert (hoch) in *Df(2L)tai2*-Embryonen. Somit liegen die Produkte dieser wichtigen Segmentierungsgene vermutlich fehllokalisiert vor.

In vorrangegangenen Arbeiten wurde bereits festgestellt, dass die Ovarien der homozygoten *Df(2L)tai2* Weibchen kleiner sind als im Wildtyp, die Anzahl der Ovariolen jedoch kaum reduziert ist (Mietzsch, 2012). Allerdings konnte in einigen Ovariolen eine ungewöhnliche Dekondensierung des Eizellkern-Chromatins beobachtet werden, welche dazu führt, dass diese Ovariolen keine Eier produziert (Mietzsch, 2012). Eine Erhöhung der H3K9 Acetylierung am Chromatin der adulten Keimbahnstammzellen in *Df(2L)tai2* gibt einen ersten Hinweis auf die Veränderungen, die letztendlich zu veränderten Expressionsmustern im *Df(2L)tai2*-Embryo führen könnten (Mietzsch, 2012). Ecdysteroide werden auch maternal in die Oozyte eingebracht und sind wahrscheinlich für eine normale Entwicklung des Embryos nötig (Garen et al., 1977). Ein Ecdysteroid-verwandtes Antigen konnte im Oozytenplasma in Granuli und kurz nach Eiablage im Ei in einem schwachen Gradienten verteilt beobachtet werden (Grau & Gutzeit, 1990). Später befand sich das Antigen im Yolk-enthaltenden Cytoplasma und während des syncytiellen Blastoderms konnte es in den peripheren Nuklei nachgewiesen werden (Grau & Gutzeit, 1990). Maternale Gene wie *bcd* beeinflussten zudem die Lokalisation des Antigens (Grau & Gutzeit, 1990). Möglicherweise könnten Ecdysteroide sogar einen maternal gesetzten Morphogengradienten bilden, welcher dann die Embryogenese beeinflusst.

Da der TGF β -Signalweg durch die erwähnten Veränderungen stark beeinflusst ist, ist es auch wahrscheinlich, dass nachfolgende transkriptionelle Mechanismen in Mitleidenschaft gezogen sein sollten. Beispielsweise wird in Larven sogar die Expression der neuronalen Ecdyson-Rezeptor-Isoform EcR-B1 durch TGF β gesteuert (Zheng et al., 2003).

Auch Veränderungen in der Chromatinstruktur könnten die Folge sein. SMAD Proteine können HATs oder HDACs rekrutieren um Transkription zu stimulieren oder zu stillzulegen (Massagué et al., 2005). In den meisten Fällen sind auch SWI/SNF Nukleosom Remodelling Komplexe an solchen Prozessen beteiligt (Xi et al., 2008).

5. Zusammenfassung

Die Vorhersage von kleinen Introns im *Drosophila* Genom führte zur Identifikation von sieben neuen Transkripten, mit meist konserviertem Expressionsprofil. Fünf Transkripte wurden bereits vorhandenen Genen zugeordnet, wodurch deren Genstruktur erweitert wurde und zwei neue Transkripte wurden als putativ nicht-kodierende *mlncRNAs* identifiziert.

Mit seiner unstrukturierten Sekundärstruktur besitzt *mlncRNA42E5-1* keine Ähnlichkeiten zu bekannten RNA-Familien. In *Drosophila*-Männchen ist das Gen am stärksten exprimiert und könnte hier eine transkriptionsregulierende Rolle einnehmen. Die hergestellte homozygot lebensfähige *mlncRNA42E5-1* Nullmutante wies signifikant reduzierte Expression vom Nachbarn *Tsp42Ee* auf. Die Überexpression von *mlncRNA42E5-1* zeigte dagegen signifikant erhöhte Expression vom Nachbarn *Tsp42Ee*. Mittels RNA-Seq und qRT-PCR konnten weitere Gene wie *Tp194D*, *mre11*, *CG42759* und *CG44142* als in der Nullmutante differentiell reguliert identifiziert werden. Ebenso zeigte die *mlncRNA42E5-1* Nullmutante einen rezessiven Suppressoreffekt auf *white-Gensilencing* bei *In(1)w^{m4h}*, was eine Funktion bei der Etablierung von heterochromatischem *Gensilencing* nahe legt.

Die Differenzierung des Chromatins in Eu- und Heterochromatin geschieht schon während der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila*. Hierbei scheint Hormonsignalen eine entscheidende Bedeutung zuzukommen, da der Ecdysonrezeptorkoaktivator TAIMAN als *Su(var)* identifiziert wurde. Seine Mutationen weisen veränderte Chromatinmarkierungen auf (Lein, 2011). Ursächlich hierfür scheint u.a. eine verringerte Expression der H3K4me3-spezifischen Demethylase LID zu sein. Analysen mit einem EcRE-lacZ Transgen zeigten erstmals, dass Ecdyson-Signalling schon sehr früh in der embryonalen Entwicklung wirkt und vom Kofaktor TAIMAN abhängig ist. Durch *Microarray*-Analysen konnte eine Vielzahl an kodierenden und nicht-kodierenden Genen identifiziert werden, welche durch TAIMAN-abhängiges Ecdyson-Signalling transkriptionell kontrolliert werden. Darunter befanden sich viele Gene mit transkriptionsregulierender Funktion und auch Faktoren der Dosiskompensation X-chromosomaler Gene. Ebenso liegen viele Genen, welche für die embryonale Achsenbildung verantwortlich und somit für die komplette Ontogenese essentiell sind, in *tai*-Mutanten dereguliert vor. Dies weist auf eine essentielle Rolle des Ecdyson-Signallings hin, welche schon während der Oogenese mit der Steuerung der miRNA *miR-184* und des TGFβ-Signallings beginnt. Auch konnte erstmals gezeigt werden, dass im Embryo die Expression des Repressors des Ecdyson-Signallings in der Oogenese abrupt durch TAI reguliert wird.

6. Literatur

- Agawa Y, Sarhan M, Kageyama Y, Akagi K, Takai M, Hashiyama K, Wada T, Handa H, Iwamatsu A, Hirose S, Ueda H (2007) *Drosophila Blimp-1* is a transient transcriptional repressor that controls timing of ecdysone-induced developmental pathway. *Mol Cell Biol* 27(24): 8739-3747.
- Akhtar A, Becker PB (2000) Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol. Cell* 5: 367-375.
- Akimaru H, Hou D-X, Ishii S (1997) *Drosophila* CBP is required for dorsal-dependent twist gene expression. *Nat Genet.* 17(2):211-4.
- Alekseyenko AA, Peng S, Larschan E, Gorchakov AA, Lee OK, et al. (2008) A sequence motif within chromatin entry sites directs MSL establishment on the *Drosophila* X chromosome. *Cell* 134: 599–609.
- Alland L, Muhle R, Hou H Jr, Potes J, Chin L, Schreiber-Agus N, DePinho RA (1997) Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387: 49-55.
- Amrein H, Axel R (1997) Genes expressed in neurons of adult male *Drosophila*. *Cell.* 88(4):459-69.
- Anzick, SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa O, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM und Meltzer PS (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277: 965–968.
- Apelt C (2005) Genetische Analyse neuer Chromatingene von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Arora K, Levine MS, O'Connor MB (1994) The *screw* gene encodes a ubiquitously expressed member of the TGF-beta family required for specification of dorsal cell fates in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 8:2588–2601.
- Assenmacher N, Hopfner K-P (2004) MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113(4):157-166.
- Bai J, Uehara Y, Denise J, Montell DJ (2000) Regulation of Invasive Cell Behavior by Taiman, a *Drosophila* Protein Related to AIB1, a Steroid Receptor Coactivator Amplified in Breast Cancer. *Cell* 103: 1047–1058.
- Baisch H (2010) Die H3K4me3 Histondemethylase LID reguliert die Balance zwischen Eu- und Heterochromatin in *Drosophila*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Bantignies F, Goodman RH, Smolik SM (2000) Functional interaction between the coactivator *Drosophila* CREB-Binding Protein and ASH1, a member of the thrithorax group of chromatin modifiers. *Mol Cell Biol.* 20(24):9317-9330.
- Bartolome S, Bermudez A, Daban JR (1994) Internal structure of the 30 nm chromatin fiber. *J. Cell Sci.* 107, 2983–2992.
- Berleth, T., M. Burri, G. Thoma, D. Bopp, S. Richstein Frigerio G, Noll M, Nüsslein-Volhard C (1988) The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 7: 1749–1756.
- Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(9):3312-7.
- Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM (1990) The product of the *H19* gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol.* 10(1):28-36.
- Boveri, T. (1904) Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. Jena, Germany: G. Fischer.
- Bownes, M (1989) The roles of juvenile hormone, ecdysone and the ovary in the control of *Drosophila* vitellogenesis. *J. Insect Physiol.* 35: 409-413.

- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ (2007) Discrete small RNA generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. 128(6):1089-103.
- Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V et al. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309:1559–1563.
- Carroll SB, Winslow GM, Twombly VJ, Scott MP (1987) Genes that control dorsoventral polarity affect gene expression along the anteroposterior axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 99: 327–332.
- Caygill EE, Johnston LA (2008) Temporal regulation of metamorphic processes in *Drosophila* by the *let-7* and *miR-125* heterochronic microRNAs. *Curr Biol* 18(13):943-950.
- Cha BJ, Koppetsch BS, Theurkauf WE (2001) In vivo analysis of *Drosophila bicoid* mRNA localization reveals a novel microtubule- dependent axis specification pathway. *Cell* 106: 35–46.
- Chang C, Holtzman DA, Chau S, Chickering T, Woolf EA, Holmgren LM, Bodorova J, Gearing DP, Holmes WE, Brivanlou AH (2001) Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* 410:483–487.
- Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*. 90(3):569-80.
- Cherbas L, Lee K, Cherbas P (1991) Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila Eip28/29* gene. *Genes Dev* 5: 120-131.
- CLC Genomics Workbench 6.5.1 (<http://www.clcbio.com>, 11.2.2014).
- Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB (1996) *XIST* RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol*. 132(3):259-75.
- Conrad T, Cavalli FMG, Holz H, Hallacli E, Kind J, Ilik I, Vaquerizas JM, Luscombe NM, Akhtar A (2011) The MOF chromobarrel domain controls genome-wide H4K16 acetylation and spreading of the MSL complex. *Dev. Cell* 22: 610-624.
- Cumberledge S, Zaratzian A, Sakonju S (1990) Characterization of two RNAs transcribed from the cis-regulatory region of the *abd-A* domain within the *Drosophila bithorax* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(9): 3259–3263.
- Delattre M, Spierer A, Tonka CH, Spierer P (2000) The genomic silencing of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. Interaction between the heterochromatin-associated proteins Su(var)3-7 and HP1. *J. Cell. Sci.*, 113, 4253–4261.
- Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Röder M, Kokocinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I et al. (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489(7414):101-108.
- Dobens L, Rudolph K, Berger EM (1991) Ecdysterone regulatory elements function as both transcriptional activators and repressors. *Mol Cell Biol*. 11: 1846-1853.
- Doyon Y, Cayrou C, Ullah M, Landry AJ, Côté V, Selleck W, Lane WS, Tan S, Yang XJ, Côté J (2006) ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation. *Mol Cell* 21: 51-64.
- Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T, Reuter G (2004) *Su(var)* genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev* 18: 2973-2983.
- Eissenberg JC, James T, Foster-Harnett D, Hartnett T, Ngan V, Elgin S (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl.Acad. Sci. U S A*, 87, 9923–9927.

- Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, Groot N, Barciszewski J (2000) Non-coding, mRNA-like RNAs database Y2K. *Nucleic Acids Res.* 28:197–200.
- Feng J, Bi C, Clark BS, Mady R, Shah P, Kohtz JD (2006) The *Evf-2* noncoding RNA is transcribed from the *Dlx-5/6* ultraconserved region and functions as a *Dlx-2* transcriptional coactivator. *Genes Dev.* 20(11):1470-84.
- Ferguson EL, Anderson KV (1992) Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell.* 71(3):451-61.
- Filion GJ, van Bommel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, van Steensel B. (2010) Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell.* 143(2):212-24.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.
- Fleischer TC, Yun UJ, Ayer DE (2003) Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex. *Mol Cell Biol* 23: 3456-3467.
- Foe, F. V.; G.M. Odell und B.A. Edgar (1993) Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo: point and counterpoint. In: M. Bate and A. Martinez Arias, Editors, *The Development of Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratories Press 149-300.
- Font-Burgada J, Rossell D, Auer H, Azorin F (2008) *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. *Genes Dev* 22:3007-3023.
- Fradkin LG, Kamphorst JT, DiAntonio A, Goodman CS, Noordermeer JN (2002) Genomewide analysis of the *Drosophila* tetraspanins reveals a subset with similar function in the formation of the embryonic synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21):13663-13668.
- Francis VA, Zorzano A, Teleman AA (2010) dDOR is an EcR coactivator that forms a feed-forward loop connecting insulin and ecdysone signaling. *Curr Biol.* 20(20):1799-808.
- Garen A, Kauvar L, Lepesant J-A (1977) Roles of ecdysone in *Drosophila* development *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(11):5099-103.
- Gilbert LI (2003) Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol.* 215(1-2):1-10.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA (2006) A germline specific class of small RNAs bind mammalian Piwi proteins. *Nature* 13; 442(7099):199-202.
- Gloor GB, Engels WR (1992) Single fly DNA preps for PCR. *Dros. Inform. Ser.* 71: 148-149.
- Golic KG, Golic MM (1996) Engineering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics* 144: 1693-1711.
- Grau V, Gutzeit HO (1990) Asymmetrically distributed ecdysteroid-related antigens in follicles and young embryos of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 198: 295-302.
- Gu W, Szauter P, Lucchesi JC (1998) Targeting of MOF, a putative histone acetyl transferase, to the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Dev Genet.* 22(1):56-64.
- Gyory I, Wu J, Fejer G, Seto E, Wright KL (2004) PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol* 5:299-308.
- Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, Schreiber SL, Ayer DE (1997) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *Cell* 89: 341-347.
- Hemavathy K, Ashraf SI, Ip YT (2000) Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257:1–12.
- Hemler ME (1998) Integrin-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 578–585.
- Hiller M, Findeiss S, Lein S, Marz M, Nickel C, Rose D, Schulz C, Backofen R, Prohaska SJ, Reuter G, Stadler PF (2009) Conserved introns reveal novel transcripts in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 19(7):1289-300.

- Hillman R, Lesnick LH (1970) Cuticle formation in the embryo of *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.* 131: 383-396.
- Hofacker IL, Stadler PF (2006) Memory efficient folding algorithms for circular RNA secondary structures. *Bioinformatics.* 22(10):1172-1176.
- Holmqvist PH, Boija A, Philip P, Crona F, Stenberg P, Mannervik M (2012) Preferential genome targeting of the CBP co-activator by Rel and Smad proteins in early *Drosophila melanogaster* embryos. *PLoS Genet.* 8(6):e1002769.
- Huang AM, Rehm EJ und Rubin GM (2000) Flanking P-element Insertions: Inverse PCR and Plasmid Rescue, *Drosophila Protocols*, Kap. Recovery of DNA Sequences *Cold Spring Harbor Lab Press.* 429-447.
- Huang AM, Rehm EJ, Rubin GM (2009) Quick preparation of genomic DNA from *Drosophila*. *Cold Spring Harb Protoc.* 2009(4):pdb.prot5198.
- Huang J, Zhou W, Watson AM, Jan Y-N, Hong Y (2009) Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(20): 8284–8289.
- Huang J, Zhou W, Watson AM, Jan Y-N, Hong Y (2008) Efficient ends-out gene targeting in *Drosophila*. *Genetics.* 180(1): 703–707.
- Huang S, Yuan S, Dong M, Su J, Yu C, Shen Y, Xie X, Yu Y, Yu X, Chen S, Zhang S, Pontarotti P, Xu A (2005) The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics* 86:674-684.
- Imhof A, Yang XJ, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H (1997) Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* 7:689–692.
- Iovino N1, Pane A, Gaul U. (2009) *miR-184* has multiple roles in *Drosophila* female germline development. *Dev Cell.* 17(1):123-33.
- Ip YT, Kraut R, Levine M, Rushlow CA (1991) The dorsal morphogen is a sequence-specific DNA-binding protein that interacts with a long-range repression element in *Drosophila*. *Cell* 64: 439-446.
- Ip YT, Park RE, Kosman D, Yazdanbakhsh K, Levine M (1992) *dorsal-twist* interactions establish *snail* expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 6:1518–1530.
- Jacob F, Monod J (1961) Genetic Regulatory Mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol.* 3:318-356.
- Jang AC, Chang YC, Bai J, Montell D (2009) Border-cell migration requires integration of spatial and temporal signals by the BTB protein Abrupt. *Nat Cell Biol.* 11(5):569-79.
- Jaquet Y, Delattre M, Spierer A, Spierer P (2002) Functional dissection of the *Drosophila* modifier of variegation *Su(var)3-7*. *Development* 129(17): 3975-3982.
- Jürgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, Kluding H (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193:283–95.
- Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermüller J, Hofacker IL, Bell I, Cheung E, Drenkow J, Dumais E, Patel S, Helt G, Ganesh M, Ghosh S, Piccolboni A, Sementchenko V, Tammana H, Gingeras TR (2007) RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316:1484–1488.
- Kawakami Y, Kawakami K, Steelant WF, Ono M, Baek RC, Handa K, Withers DA, Hakomori S (2002) Tetraspanin CD9 is a 'proteolipid' and its interaction with $\alpha 3$ integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J. Biol. Chem.* 277(34): 34349–34358.
- Kelley RL, Meller VH, Gordadze PR, Roman G, Davis RL, Kuroda MI (1999) Epigenetic spreading of the *Drosophila* dosage compensation complex from *roX* RNA genes into flanking chromatin. *Cell* 98:513-22.

- Khalsa O, Yoon JW, Torres-Schumann S, Wharton KA (1998) TGF-beta/BMP superfamily members, Gbb-60A and Dpp, cooperate to provide pattern information and establish cell identity in the *Drosophila* wing. *Development* 125:2723-2734.
- Kim J, Johnson K, Chen HJ, Carroll S, Laughon A (1997) *Drosophila* Mad binds to DNA and directly mediates activation of *vestigial* by Decapentaplegic. *Nature*. 388(6639):304-308.
- Kirilly D1, Wong JJ, Lim EK, Wang Y, Zhang H, Wang C, Liao Q, Wang H, Liou YC, Wang H, Yu F (2011) Intrinsic epigenetic factors cooperate with the steroid hormone ecdysone to govern dendrite pruning in *Drosophila*. *Neuron*. 6;72(1):86-100.
- Klymenko T, Müller J (2004) The histone methyltransferases Trithorax and Ash1 prevent transcriptional silencing by Polycomb group proteins. *EMBO Rep*. 5(4):373-7.
- Kong L, Zhang Y, Ye ZG, Liu XQ, Zhao SQ, Wei L, Gao G (2007) CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic Acids Res. (Web Server issue)*:W345-349.
- Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG (1998) Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science*. 279(5351):703-7.
- Kouzarides T (2002) Histone methylations in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*. 12(2):198-209.
- Kozlova T, Thummel CS (2003) Essential roles for ecdysone signaling during *Drosophila* mid-embryonic development. *Science*. 301(5641):1911-4.
- Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11:597-610.
- Kuzmichev A, Zhang Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2002) Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* 22: 835-848.
- Kwon SH, Workman JL (2010) Heterochromatin protein1 (HP1) connects the FACT histone chaperone complex to the phosphorylated CTD of RNA polymerase II. *Genes Dev* 24:2133-2145.
- Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410:116-120.
- Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G, Schüttengruber B, Hauser C, Brunmeir R, Jenuwein T, Seiser C (2002). Essential function of *histone deacetylase 1* in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J*. 21: 2672-2681.
- Lam KC, Mühlplfordt F, Vaquerizas JM, Raja SJ, Holz H, Luscombe NM, Manke T, Akhtar A (2012) The NSL complex regulates housekeeping genes in *Drosophila*. *Plos Genet*. 8(6):e1002736.
- Lechner T, Carrozza MJ, Yu Y, Grant PA, Eberharter A, Vannier D, Brosch G, Stillman DJ, Shore D, Workman JL (2000) Sds3 (suppressor of defective silencing 3) is an integral component of the yeast Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex and is required for histone deacetylase activity. *J Biol Chem* 275: 40961-40961.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-54.
- Lein S (2011) Differentielle Kontrolle von Histon-Methylierung und Demethylierung bei der Etablierung des heterochromatischen *Gensilencings* in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Liaw GJ, Lengyel JA (1993) Control of *tailless* expression by *bicoid*, dorsal and synergistically interacting terminal system regulatory elements. *Mech. Dev*. 40: 47-61.
- Lilja T, Aihara H, Stabell M, Nibu Y, Mannervik M (2007) The acetyltransferase activity of *Drosophila* CBP is dispensable for regulation of the Dpp pathway in the early embryo. *Dev Biol*. 305(2):650-8.

- Lin MF, Carlson JW, Crosby MA, Matthews BB, Yu C, Park S, Wan KH, Schroeder AJ, Gramates LS, St Pierre SE, Roark M, Wiley KL Jr, Kulathinal RJ, Zhang P, Myrick KV, Antone JV, Celniker SE, Gelbart WM, Kellis M. (2007) Revisiting the protein-coding gene catalog of *Drosophila melanogaster* using 12 fly genomes. *Genome Res* 17(12): 1823-36.
- Lin Y, Wong K, Calame K (1997) Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276:596-599.
- Lindsey DL, Zimm GG (1992) The genome of *Drosophila melanogaster*. *San Diego Academic Press* 804-1066.
- Lu BY, Ma J, Eissenberg JC (1998) Developmental regulation of heterochromatin-mediated gene silencing in *Drosophila*. *Development* 125: 2223-2234.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.
- Lyman LM, Copps K, Rastelli L, Kelley RL, Kuroda MI (1997) *Drosophila* male-specific lethal-2 protein: structure/function analysis and dependence on MSL-1 for chromosome association. *Genetics*. 147(4):1743-53.
- Markstein, M., Zinzen, R., Markstein, P., Yee, K.P., Erives, A., Stathopoulos A, Levine M (2004) A regulatory code for neurogenic gene expression in the *Drosophila* embryo. *Development* 131: 2387–2394.
- Maroy P, Kaufmann G, Dübendorfer A (1988) Embryonic ecdysteroids of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* Vol. 34 No.7, pp. 633-637.
- Marques G, Musacchio M, Shimell MJ, Wunnenberg-Stapleton K, Cho KW, O'Connor MB (1997) Production of a DPP activity gradient in the early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* 91:417–426.
- Martínez-Balbás M, Bauer U-M, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J.*, 19: 662–671.
- Massagué J, Seoane J, Wotton D (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783–2810.
- McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research* 40, 4288-4297.
- McInemey EM, Rose DW, Flynn SE, Westin S, Mullen TM, Kronen A, Inostroza J, Torchia J, Nolte RT, Assa-Munt N, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG (1998) Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 12: 3357-3368.
- Meehan WJ, Samant RS, Hopper JE, Carrozza MJ, Shevde LA, Workman JL, Eckert KA, Verderame MF, Welch DR (2004) Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription. *J Biol Chem* 279: 1562-1569.
- Meller VH, Wu KH, Roman G, Kuroda MI, Davis RL (1997) *roX1* RNA paints the X chromosome of male *Drosophila* and is regulated by the dosage compensation system. *Cell*. 21;88(4):445-57.
- Meller VH, Rattner BP (2002) The *roX* genes encode redundant male-specific lethal transcripts required for targeting of the MSL complex. *EMBO J.* 21:1084-91.
- Mietzsch S (2012) "Das unbekannte Chromatin? – Analysen zur epigenetischen Regulation in Keimbahnzellen von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Muller, H (1930) The frequency of translocations produced by X-rays in *Drosophila*. *Genetics* 16, 277–285.
- Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Ferguson-Smith AC, Feil R, Fraser P (2008) The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science* 322:1717–20.

- Ng T, Yu F, Roy S (2005) A homologue of the vertebrate SET domain and zinc finger protein Blimp-1 regulates terminal differentiation of the tracheal system in the *Drosophila* embryo. *Dev Genes Evol* 216:243-252.
- Nguyen M, Park S, Marques G, Arora K (1998) Interpretation of a BMP activity gradient in *Drosophila* embryos depends on synergistic signaling by two type I receptors, SAX and TKV. *Cell* 95:495–506.
- Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H, Giardina C, Dahiya R (2009). *miR449a* targets HDAC1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene* 28:1714-1724.
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E, Kluding H (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 183:267–82.
- Palmer MJ, Richman R, Richter L, Kuroda MI (1994) Sex-specific regulation of the male-specific lethal-1 dosage compensation gene in *Drosophila*. *Genes Dev.* 8(6):698-706.
- Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, Nagano T, Mancini-Dinardo D, Kanduri C (2008) Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol. Cell* 32:232–46.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86–9.
- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12: 1577-1589.
- Peterson HM, Laughnan JR (1963) Intrachromosomal exchange at the *Bar* locus in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50: 26-133.
- Petruk S, Sedkov Y, Riley KM, Hodgson J, Schweisguth F, Hirose S, Jaynes JB, Brock HW, Mazo A (2006) Transcription of *bxd* noncoding RNAs promoted by trithorax represses Ubx in cis by transcriptional interference. *Cell* 127:1209–1221.
- Pfaffl, MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:1-6.
- Ponjavic J, Ponting CP, Lunter G (2007) Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs. *Genome Res.* 17:556–565.
- Rathke C, Baarends WM, Jayaramaiah-Raja S, Bartkuhn M, Renkawitz R, Renkawitz-Pohl R (2007) Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J Cell Sci* 120(Pf 9):1689-1700.
- Ravasi, T., Suzuki, H., Pang, K. C., Katayama, S., Furuno, M., Okunishi, R., Fukuda, S., Ru, K., Frith, M. C., Gongora, M. M. & et al. (2006). Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome. *Genome Res*, 16, 11–19.
- Ray RP, Arora K, Nüsslein-Volhard C, Gelbart WM (1991) The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development.* 113(1):35-54.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun Z-W, Schmidt M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histon H3 methyltransferases. *Nature* 406(6796):593-599.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901–6.

- Reuter G, Guiarre M, Farah J, Gausz J, Spierer A, Spierer P (1990) Dependence of position-effect variegation in *Drosophila* on dose of a gene encoding an unusual zinc-finger protein. *Nature* 344, 219–223.
- Reuter G, Werner W, Hoffmann H-J (1982) Mutants affecting position-effect heterochromatinization in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 85: 539–551.
- Reuter G, Wolff I (1981) Isolation of dominant suppressor mutations for position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 182, 516–519.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* 12: 1591–1598.
- Richards G (1981) The radioimmune assay of ecdysteroid titres in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Endocrinol.* 21:181-197.
- Riddiford LM (1993) Hormones and *Drosophila* development. Bate, Martinez Arias, 899-939.
- Riddihough G, Pelham HR (1987) An ecdysone response element in the *Drosophila hsp27* promoter. *EMBO J* 6: 3729-3734.
- Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK, Engels WR (1988) A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 118(3):461-70.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140.
- Robinson MD, Oshlack A (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology* 11(3):R25.
- Robinson MD, Smyth GK (2007). Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. *Bioinformatics* 23, 2881-2887.
- Robinson MD, Smyth GK (2008). Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics* 9: 321-332.
- Rodriguez-Trelles F, Tarro R, Ayala FJ (2006) Origin and evolution of spliceosomal introns. *Annu Rev Genet* 40: 47–76.
- Rose D (2010) The long and the short of computational ncRNA prediction. Dissertation, Universität Leipzig.
- Rothwell WF, Sullivan W (2000) The centrosome in early *Drosophila* embryogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 49:409-447.
- Rouquelle C, Chaumeil J, Sarma K, Allis CD, Reinberg D, Avner P, Heard E (2004) Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X-chromosome. *Mol Cell Biol.* 24(12): 5474-5484.
- Rubin GM, Spradling AC (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218(4570):348-53
- Rudolph T, Yonezawa M, Lein S, Heidrich K, Kubicek S, Schäfer C, Phalke S, Walther M, Schmidt A, Jenuwein T, Reuter G (2007) Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell* 26: 103-115.
- Rusch J, Levine M (1996) Threshold responses to the dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary tissue territories in the *Drosophila* embryo. *Curr Opin Genet Dev.* 6(4):416-423.
- Ryder E, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Drummond J, Webster J, Johnson G, Morley T, Chan YS, Blows F, Coulson D, Reuter G, Baisch H, Apelt C, Kauk A, Rudolph T, Kube M, Klimm M, Nickel C, Szidonya J, Maróy P, Pal M, Rasmuson-Lestander A, Ekström K, Stocker H, Hugentobler C, Hafen E, Gubb D, Pflugfelder G, Dorner C, Mechler B, Schenkel H, Marhold J, Serras F, Corominas M, Punset A, Roote J, Russell S. (2007) The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genome-wide chromosomal deficiency resource. *Genetics* 177: 615-29.

- Rymarquis LA, Kastenmayer JP, Huttenhofer AG, Green PJ (2008) Diamonds in the rough: mRNA-like non-coding RNAs. *Trends Plant Sci.* 13:329–334.
- Saiki RK, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi RG, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419: 407-411.
- Schmitt S, Prestel M, Paro R (2005) Intergenic transcription through a Polycomb group response element counteracts silencing. *Genes Dev* 19: 697–708.
- Schotta G (2002) Struktur-Funktionsanalyse von SU(VAR)3-9, einem integralen Bestandteil von heterochromatischen Proteinkomplexen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Schotta G, Ebert A, Dorn R, Reuter G (2003) Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 14(1): 67-75.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18: 1251–1262.
- Sedkov Y, Cho E, Petruk S, Cherbas L, Smith ST, Jones RS, Cherbas P, Canaani E, Jaynes JB, Mazo A (2003) Methylation at lysine 4 of histone H3 in ecdysone-dependent development of *Drosophila*. *Nature*. 426(6962):78-83.
- Sempere LF, Sokol NS, Dubrovsky EB, Berger EM, Ambros V (2003). Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and *Broad-complex* gene activity. *Dev Biol* 259(1):9-18.
- Sengupta AK, Kuhrs A, Müller J (2004) General transcriptional silencing by a Polycomb response element in *Drosophila*. *Development*. 131(9):1959-65.
- Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltane JM, Yang L, Zhao H, Calame K, Staudt LM (2002) Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17:51-62.
- Shamovsky I, Ivannikov M, Kandel ES, Gershon D, Nudler E (2006) RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature*. 440: 556-560.
- Shiio Y, Rose DW, Aur R, Donohoe S, Aebersold R, Eisenman RN (2006) Identification and characterization of SAP25, a novel component of the mSin3 corepressor complex. *Mol Cell Biol* 26: 1386-1397.
- Shimmi O, Umulis D, Othmer H, O'Connor MB (2005) Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the *Drosophila* blastoderm embryo. *Cell*. 120(6):873-86.
- Simpson P (1983) Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* 105: 615-632.
- Skowrya D, Zeremski M, Neznanov N, Li M, Choi Y, Uesugi M, Hauser CA, Gu W, Gudkov AV, Qin J (2001) Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem* 276: 8734-8739.
- Smothers JF, Henikoff S (2001) The hinge and Chromo Shadow domain impart distinct targeting of HP1-like proteins. *Mol Cell Biol*. 21(7):2555-2569.
- Sparmann A, van Lohuizen M (2006) Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 6(11):846-56.
- Stapleton M, Carlson J, Brokstein P, Yu C, Champe M, George R, Guarin H, Kronmiller B, Pacleb J, Park S, Wan K, Rubin GM, Celniker SE (2002) A *Drosophila* fulllength cDNA resource. *Genome Biology* 3(12): research0080.1_0080.8.

- Stathopoulos A, Van Drenth M, Erives A, Markstein M, Levine M (2002) Whole-genome analysis of dorsal–ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Cell* 111:687–701.
- Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME (2003) Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* 28(2):106-112.
- St. Pierre SE, Ponting L, Stefancsik R, McQuilton P, FlyBase Consortium (2014). FlyBase 102 - advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res.* 42(D1):D780-D788. doi: 10.1093/nar/gkt1092.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
- Straub T, Grimaud C, Gilfillan GD, Mitterweger A, Becker PB (2008) The chromosomal high-affinity binding sites for the *Drosophila* dosage compensation complex. *PLoS Genet* 4: e1000302. doi:10.1371/journal.pgen.1000302.
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18(1): 207-208.
- Sturtevant AH (1925) The effects of unequal crossing over at the *Bar* locus in *Drosophila*. *Genetics* 167: 797-813.
- Su ST, Ying HY, Chiu KY, Lin FR, Chen MY, Lin KI (2009) Involvement of histone demethylase LSD1 in Blimp-1 mediated gene repression during plasma cell differentiation. *Mol Cell Biol* 29:1421-1431.
- Tamura K, Subramanian S, Kumar S (2004) Temporal patterns of fruit fly (*Drosophila*) evolution revealed by mutation clocks. *Mol. Biol. Evol.* 21(1):36-44
- Thisse B, Stoetzel C, Gorostiza-Thisse C, Perrin-Schmitt F (1988) Sequence of the *twist* gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J.* 7:2175–2183.
- Thisse C, Perrin-Schmitt F, Stoetzel C, Thisse B (1991) Sequence-specific transactivation of the *Drosophila twist* gene by the dorsal gene product. *Cell* 65:1191–1201.
- Trojer P, Reinberg D (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell.* 28(1):1-13. Review.
- Tsai C, Gergen P (1995) Pair-rule expression of the *Drosophila fushi tarazu* gene: a nuclear receptor response element mediates the opposing regulatory effects of *runt* and *hairy*. *Development* 121(2):453-462.
- Tsubota SI (1991) Unequal crossing over within the *B* duplication of *Drosophila melanogaster*: a molecular analysis. *Genet. Res.* 57: 105-111.
- Waltzer L, Bienz M (1998) *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature* 395: 521–525.
- Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y (2001) Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* 8(6):1207-17.
- Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, Lajoie BR, Protacio A, Flynn RA, Gupta RA, Wysocka J, Lei M, Dekker J, Helms JA, Chang HY (2011) A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* 472:120–24
- Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, Tempst P, Rosenfeld MG, Glass CK, Kurokawa R (2008) Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins *in cis* to inhibit transcription. *Nature.* 454(7200):126-30.
- Wang Y, Zhang W, Jin Y, Johansen J, Johansen KM (2001) The JIL-1 tandem kinase mediates histone H3 phosphorylation and is required for maintenance of chromatin structure in *Drosophila*. *Cell* 105(4):433–443.
- Wharton KA, Cook JM, Torres-Schumann S, de Castro K, Borod E, Phillips DA (1999) Genetic analysis of the bone morphogenetic protein-related gene, *gbb*, identifies multiple requirements during *Drosophila* development. *Genetics.* 152(2):629-40.

- Wieschaus E, Szabad J (1979) The development and function of the female germ line in *Drosophila melanogaster*. A cell lineage study. *Dev Biol.* 68(1):29-46.
- Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, Jürgens G (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 193:296-307.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-62.
- Xi Q, He W, Zhang XH, Le HV, Massagué J (2008) Genome-wide impact of the BRG1 SWI/SNF chromatin remodeler on the transforming growth factor- β transcriptional program. *J. Biol. Chem.* 283, 1146-1155.
- Xu X, Yin Z, Hudson JB, Ferguson EL, Frasch M (1998) Smad proteins act in combination with synergistic and antagonistic regulators to target Dpp responses to the *Drosophila* mesoderm. *Genes Dev.* 12(15):2354-70.
- Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* 71: 63-72.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993) Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes. *Nature* 366: 476-479.
- Young RS, Marques AC, Tibbit C, Haerty W, Bassett AR, Liu J-L, Ponting CP (2012) Identification and properties of 1,119 candidate lincRNA loci in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Biol. Evol.* 4(4):427-442.
- Yu J, Angelin-Duclos C, Greenwood J, Liao J, Calame K (2000) Transcriptional repression by Blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol Cell Biol* 20:2592-2603.
- Yu K, Kang KW, Heine P, Pyati U, Srinivasan S, Biehs B, Kimelman D, Bier E (2004) Cysteine repeat domains and adjacent sequences determine distinct BMP modulatory activities of the *Drosophila* Sog protein. *Genetics* 166:1323-1336.
- Zeitlinger J, Zinzen RP, Stark A, Kellis M, Zhang H, Young RA, Levine M (2007) Whole-genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 15;21(4):385-90.
- Zhang D, Wang D, Sun F (2010) *Drosophila melanogaster* heterochromatin protein HP1b plays important roles in transcriptional activation and development. *Chromosoma* 120:97-108.
- Zhang Y, Iratni R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (1997) Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89: 357-364.
- Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15: 2343-2368.
- Zheng X, Wang J, Haerry TE, Wu AY, Martin J, O'Connor MB, Lee CH; Lee T (2003) TGF-beta signaling activates steroid hormone receptor expression during neuronal remodeling in the *Drosophila* brain. *Cell* 112, 303-315.

7. Anhang

7.1 Transgene Stämme

Tab.S1: Erzeugte transgene Stämme mit ermittelten Insertionsorten, -richtungen und Fertilitätseigenschaften.

Insertion	Insertionsort, ermittelt mit Kreuzung und inverser PCR	Insertions- richtung	Fertilität
5' S1/MS2 markiertes <i>mIncrNA42E5-1</i>			
6/1	2R, start <i>CG12134</i> Nt: 5858655	rev	homoz.fertil
6/2	2R, <i>CG1888</i> –Exon Nt: 5434556	fwd	homoz.fertil
6/3	3L, upstream <i>PGRP-LF</i> Nt: 9342702	fwd	homoz.fertil
6/4	2L, <i>dp</i> -Intron, <i>HP6</i> -UTR Nt:4577674	fwd	homoz.fertil
6/5	3R, <i>fray</i> 1.Exon Nt: 14398977	rev	homoz.fertil
6/6	3R, <i>CR31044</i> Nt: 25040403	rev	homoz.fertil
6/7	2R, <i>CG30055</i> –Exon Nt: 8477226	rev	homoz.fertil
6/8	3R, <i>LK6</i> -Intron Nt: 7586485	fwd	homoz.fertil
6/9	2L, <i>numb</i> -Intron Nt: 9448732	fwd	homoz.fertil
6/10	3.Chr.; opus transp. element	?	homoz.fertil
6/11	2L, <i>daw</i> -Intron Nt:2808294	fwd	homoz.fertil
6/12	2R, <i>CG12214</i> -Exon/ <i>KCNQ</i> -Intron Nt : 6046131	fwd	homoz.fertil
6/13	2R, <i>CG42663</i> -Intron Nt: 8630840	rev	homoz.fertil
3' S1/MS2 markiertes <i>mIncrNA42E5-1</i>			
10/1	3L, <i>th</i> -Intron Nt: 16039999	rev	homoz.fertil
10/2	3R, upstream <i>CG12290</i> Nt: 22054562	fwd	homoz.fertil
10/3	3L, upstream <i>CG13895</i> Nt: 708236	fwd	homoz.fertil

10/4	3L, upstream <i>CG13895</i> Nt: 708236	fwd	homoz.fertil
10/5	3L, <i>CG18769</i> -Intron Nt: 6554215	rev	homoz.fertil
10/6	3L, <i>th</i> -Intron Nt: 16040013	rev	homoz.fertil
10/7	2L, <i>bun</i> -Intron Nt:12463628/40		homoz.fertil
10/8	2R, <i>NKAIN</i> 1.Exon Nt:20769116	rev	homoz.fertil
10/9	2R, <i>CG5036?</i>	rev	homoz.fertil
10/10	2L, upstream <i>esg</i> Nt: 15333728	rev	homoz.fertil
10/11	3L, upstream <i>Cef64C</i> Nt: 4692328	rev	homoz.fertil
10/12	X, <i>Moe</i> -Intron Nt: 8788080	fwd	homoz.fertil
10/13	2L, <i>tai</i> -Intron Nt: 9176384	rev	homoz.fertil
MS2-EGFP-Fusionskonstrukt			
MS2-EGFP	3.Chr 51D1, attP-line	rev	homoz.fertil
Transgene für homologe Rekombination			
EO1	2.Chr., repeat region	?	homoz.fertil
EO2	2R, upstream <i>jing</i> Nt: 2389410	fwd	homoz.fertil
EO3	2.Chr.	?	homoz.fertil
EO4	3L, <i>3S18β1090</i> Transposon Nt: 22093634	rev	homoz.fertil
EO5	3.Chr	?	homoz.fertil
EO6	2R, upstream <i>Rya-r44F</i> Nt: 4747874	fwd	homoz.fertil
EO7	3.Chr.	?	homoz.fertil
EO8	2R, upstream <i>FS</i> Nt: 11129126	fwd	homoz.fertil
EO9	2R, Intron <i>CG2209</i>	fwd	homoz.fertil

7.2 Intronpositionen, Oligosequenzen und Konservierung

Tab.S2: Intronpositionen und verwendete Primer zum mRNA-Nachweis vorhergesagter Transkripte, sowie Ergebnisse der Expressionsanalysen. E=0-4h alte Embryonen; L=3.Larven; P=Puppen; ♂=männliche Adulte; ♀=weibliche Adulte.

Ergebnis	Intronname Lokalisierung	Primer forward	Primer reverse	E	L	P	♂	♀
pos	72977 Chr2L:1748622- 17486296:+	aatatggactgtgtgagctg	ttgtcgtataaatcgcccaa g	+	-	-	-	-
pos	55117 chr3L:11950619 -11950679:-	ttttgcagtgcggcaagga	catcacattatggttgggatc gtc	-	-	+	-	-
pos	51725 chr3L:12771073 -12771124:-	gcctaagagatcaacagct gggaa	gctattggcttcaaacaact gcga	+	+	+	++	+
pos	28910 chr3L:7469008- 7469065:+	acctagtgcagtctcattgc	aaagtggtgacgtcctctg	-	+	+	++	+
pos	1755 chr4:285056- 285111:+	tcgaacctccgatccacgg aa	tgtcaggatcactatgatctc ttcgtt	+	+	+	+	+
pos	13458 chr2R:2907741- 2907800:+	ttttacctgcctggtgc	acgatacccacagcaatcc	-	-	+	+	-
pos	13450 chr2R:2906739- 2906797:+	cactgatcctgttcgactcc a	cctcagggttcgggtatagc	+	+	+	+	+
neg	41615 chr2R:1010635 3-10106417:-	cgaaagtcaggcactgcttc g	tcgccggaagataatgcc acc	-	-	-	-	-
neg	85884 chr3R:5977483- 5977539:-	tggtcagtggtcgtgtgca	ggaattgaactgtacgacc cgtg	-	-	-	-	-
neg	42810 chr2R:1051003 7-10510091:+	gaaattgcagacctaacct	tcacggatatcaaacggt	-	-	-	-	-
neg	15533 chrX:4142467- 4142529:+	ccctgaatagagctcagttt gc	tgttcgtcacactcagagag gac	-	-	-	-	-
neg	13487 chr2R:2911578- 2911644:+	gtttgggtggtcgaagcca	cgtaaacacaacgtacagt gtgca	-	-	-	-	-

Tab.S4: Angereicherte GO-terms unter den hochregulierten Genen der RNASeq mit Deletion *mlncRNA42E5-1 (K166w)* und dem Wildtyp (*w_{iso}*).

Biologischer Prozess				
GO Term	P-value	Sample frequency	Background frequency	Gene
GO:0009636 response to toxic substance	4.49e-05	11/499 (2.2%)	34/13761 (0.2%)	<i>Cyp313a1; kraken; Cyp6a2; phm; Cyp12d1-p; Cyp6a8; Cyp4aa1; Cyp6g1; GS; Cyp4ac1; Gr66a</i>
GO:0017085 response to insecticide	4.75e-04	9/499 (1.8%)	26/13761 (0.2%)	<i>Cyp313a1; Cyp6a2; phm; Cyp12d1-p; Cyp6a8; Cyp4aa1; Cyp6g1; Cyp4ac1; Gr66a</i>
GO:0009404 toxin metabolic process	1.07e-03	6/499 (1.2%)	10/13761 (0.1%)	<i>Cyp313a1; phm; Cyp6a8; Cyp4aa1; Cyp6g1; Cyp4ac1</i>
GO:0017143 insecticide metabolic process	1.07e-03	6/499 (1.2%)	10/13761 (0.1%)	<i>Cyp313a1; phm; Cyp6a8; Cyp4aa1; Cyp6g1; Cyp4ac1</i>
GO:0009408 response to heat	7.05e-03	14/499 (2.8%)	87/13761 (0.6%)	<i>l(2)efl; DnaJ-1; Hsp67Bc; Hsp70Ba; TotA; Hsp60D; Hsp27; Hsp70Ab; Hsp70Bc; Hsp67Bb; Hsp23; Hsp26; Hsp68; Hsp70Bb</i>
GO:0009410 response to xenobiotic stimulus	7.97e-03	6/499 (1.2%)	13/13761 (0.1%)	<i>Cyp313a1; phm; Cyp6a8; Cyp4aa1; Cyp6g1; Cyp4ac1</i>
GO:0006805 xenobiotic metabolic process	7.97e-03	6/499 (1.2%)	13/13761 (0.1%)	<i>Cyp313a1; phm; Cyp6a8; Cyp4aa1; Cyp6g1; Cyp4ac1</i>
GO:0071466 cellular response to xenobiotic stimulus	7.97e-03	6/499 (1.2%)	13/13761 (0.1%)	<i>Cyp313a1; phm; Cyp6a8; Cyp4aa1; Cyp6g1; Cyp4ac1</i>
Zelluläre Komponente				
GO Term	P-value	Sample frequency	Background frequency	Gene
GO:0005576 extracellular region	1.12e-09	79/499 (15.8%)	922/13761 (6.7%)	<i>FMRFa; yellow-k; Msi; Sfp93F; Tep2; NimB2; ImpL1; Obp19d; CG13309; CG5162; to; Obp56d; PebIII; Pxn; Met75Cb; Acp53C14c; Sfp26Ad; CG5945; Wnt6; CG42728; Spn42Da; CG18284; Cht9; CG9975; CG11854; epsilonTry; AttD; TotA; nesd; Mst57Da; Acp53C14b; lectin-37Da; Sfp24Bc; TwdIP; Yp3; PGRP-SC1a; Spn77Bc; msopa; CG11598; os; Met75Ca; CG7298; CheA86a; CG18628; Npc2g; CG6996; sphinx2; CG4546; Obp99d; CG10407; CG4270; CG16995; eys; Vago; DptB; CG17242; CG43673; CG3348; CG17843; deltaTry; PGRP-SB1; CG11037; Acp26Aa; CG10433; Gld; Spn43Ab; Acp53C14a; CG5177; LysC; ImpL2; Acp24A4; Spn28F; CG4847; Cht12; scpr-B; Obp56a; Phm; Ilp6; S-Lap7</i>

GO:0005615 extracellular space	5.09e-09	46/499 (9.2%)	394/13761 (2.9%)	<i>FMRFa; Msi; Sfp93F; Tep2; CG13309; CG5162; to; Met75Cb; Acp53C14c; Sfp26Ad; CG5945; Wnt6; Spn42Da; CG18284; Cht9; CG9975; CG11854; TotA; Mst57Da; Acp53C14b; Sfp24Bc; Spn77Bc; msopa; CG11598; os; Met75Ca; CG18628; CG4546; CG10407; eys; Vago; DptB; CG17242; CG17843; CG11037; Acp26Aa; CG10433; Spn43Ab; Acp53C14a; LysC; ImpL2; Acp24A4; Spn28F; CG4847; Phm; S-Lap7</i>
GO:0044421 extracellular region part	2.01e-07	49/499 (9.8%)	486/13761 (3.5%)	<i>FMRFa; Msi; Sfp93F; Tep2; CG13309; CG5162; to; Pxn; Met75Cb; Acp53C14c; Sfp26Ad; CG5945; Wnt6; Spn42Da; CG18284; Cht9; CG9975; CG11854; TotA; nesd; Mst57Da; Acp53C14b; Sfp24Bc; TwdIP; Spn77Bc; msopa; CG11598; os; Met75Ca; CG18628; CG4546; CG10407; eys; Vago; DptB; CG17242; CG17843; CG11037; Acp26Aa; CG10433; Spn43Ab; Acp53C14a; LysC; ImpL2; Acp24A4; Spn28F; CG4847; Phm; S-Lap7</i>
GO:0015630 microtubule cytoskeleton	6.55e-04	42/499 (8.4%)	494/13761 (3.6%)	<i>unc; cbs; CG7886; Tektin-A; CG9279; SA; DnaJ-1; CG32820; fbl; Hsp70Ba; mad2; Dhc62B; rept; cup; Osm6; CG17150; Hsp27; Yp3; CG11905; CG3085; Cka; CG17450; CG32819; Dic61B; asp; CG9313; kat-60L1; CG10859; Hsp70Ab; ncd; Hsp70Bc; Yp2; PGRP-SB1; Hsp23 Hsp26; Yp1; Hsp68; CG31275; CG8407; Hsp70Bb; cort; Trip1</i>
GO:0044430 cytoskeletal part	2.61e-03	45/499 (9.0%)	576/13761 (4.2%)	<i>unc; cbs; yuri; CG7886; Tektin-A; CG9279; SA; DnaJ-1; CG32820; fbl; Hsp70Ba; mad2; Dhc62B; rept; cup; Osm6; CG17150; Hsp27; Yp3; CG11905; CG3085; Cka; CG17450; CG32819; capu; Dic61B; asp; CG9313; kat-60L1; Rootletin; CG10859; Hsp70Ab; ncd; Hsp70Bc; Yp2; PGRP-SB1; Hsp23 Hsp26; Yp1; Hsp68; CG31275; CG8407; Hsp70Bb; cort; Trip1</i>

Molekulare Funktion

GO Term	P-value	Sample frequency	Background frequency	Gene
GO:0003824 catalytic activity	9.49e-08	218/499 (43.7%)	4134/13761 (30.0%)	<i>yellow-k; Msi; CG6295; Drat; CG5991; CG11891; Jon25Biii; CG3942; CG32445; CG6145; GstD9; CG4757; CG9235; Cyp313a1; CG5162; CG4716; CG12289; CG32500; CG7349; CG31874; CG7135; CG1441; CG10096; kraken; CG8526; CG4592; TengI2; CG17560; Ugt86De; Pxn; GstE3; sxe2; CG8299; CG9541; CG6188; Cyp6a2; CG14642; CG10512; CG11892; Phlpp; CG31871; CG7910; CG6908; CG5265; CG2604; CG13833; CG3290; Jon99Cii; phm; CG32488; CG18558; Rrp6; Jon74E; Gem3; CG18284; CG14077; CG4927; Jon65Aiv; CG8043; CG8517; Ance-5; Cht9 Hex-t2; CG5144; CG5830; fbl epsilonTry; CG12256; rngo; Cyp12d1-p; Adk3 Ppm1; GstD5; CG17196; CG2336; CG16799; Dhc62B; Cyp6a8; CG11619; Ugt86Di; CG1444; rept; Cyp4aa1; CG5626; CG7616; rumi; Cbs; CG34384; Cyp6d5; CG17150; Amyrel; Jheh2; CG7329; sad; CG18417; Ugt86Dd; GstD2; CG18130; CG18258; Ran-like; mib1; CG31089; lambdaTry; Pka-C3; CG31370; CG33970; Yp3; PGRP-SC1a; Cyp6w1; CG11703; CG11598; Cyp316a1; CG2065; Cyp6g1; GS; Ror; CG10514; CG6140; CG3483; Ugt37a1; CG18493; Pka-C2; CG18031; CG3397; GstE7; CG10472; CG34317;</i>

GO:0016491	9.45e-03	47/499 (9.4%)	643/13761 (4.7%)	CG32750; CG17571; CG7311; CG8560; CG11426; Dic61B; sphinx2; CG17224; ACXA; Jon99Ciii; Jhe; Gld2; Der-1; Jon99Fi; CG4546; Hmgs; CG3835; CG14120; CG15628; CG9313; kat-60L1; Cyp4d21; CG9222; CG15155; CG10089; CG10859; CG15534; Jon66Ci; Odc1; CG8565; ncd; CG18585; CG16749; CG10764; Yp2; CG17242; CG11407; ninaG; CG17843; CG2070; Cyp4ac1; CG8147; Rpt4R; Jon25Bii; Pp2C1; Elo68alpha; Cyp6t1; CG1494; CG12027; deltaTry; PGRP-SB1; CG42366 CG11037; CG16758; Gld; Yp1; Uro; CG8745; CG14205; CG5177; LysC; Try29F; CG10899; Prosalpha4T2; ball; Mocs1; CG4847; Cht12; CG7768; mag; Jon25Bi; CG14823; CG31275; Jon65Ai; CG31115; CG10513; CG3739; t; CG5946; CG14219; Phm; CG8407; CG4860; CG30008; ms(3)72Dt; velo; CG42816; S-Lap7; Ugt37b1; Cyp4ad1; TrxT Drat; Cyp313a1; CG4716; CG7349; CG1441; CG10096; CG17560; Pxn; Cyp6a2; CG10512; CG2604; CG13833; phm; CG14077; CG8517; Cyp12d1-p; CG2336; Cyp6a8; CG1444; Cyp4aa1; Cyp6d5; sad; GstD2; CG18130; Cyp6w1; Cyp316a1; CG2065; Cyp6g1; CG3483; CG18031; CG3397; CG7311; CG3835; Cyp4d21; ninaG; CG17843; CG2070; Cyp4ac1; Pp2C1; Cyp6t1; Gld Uro; CG5946; Phm; CG4860; Cyp4ad1; TrxT
------------	----------	------------------	---------------------	---

Tab.S5: Angereicherte GO-terms unter den runterregulierten Genen der RNASeq mit Deletion *mlncRNA42E5-1 (K166w)* und dem Wildtyp (w_{iso}).

Biologischer Prozess

GO Term	P-value	Sample frequency	Background frequency	Gene
GO:0000003 reproduction	2.58e-03	83/499 (16.6%)	122/1045 (11.7%)	<i>unc</i> ; <i>Msi</i> ; <i>Sfp93F</i> ; <i>tim</i> ; CG13309; CG5162; <i>to</i> ; <i>r-cup</i> ; <i>yuri</i> ; <i>gudu</i> ; <i>Mst98Cb</i> ; <i>fan</i> ; <i>Tpl94D</i> ; <i>snky</i> ; <i>Mst35Bb</i> ; <i>Met75Cb</i> ; <i>Acp53C14c</i> ; <i>Sfp26Ad</i> ; <i>rib</i> ; <i>phm</i> ; <i>mia</i> ; CG18284; CG17018; CG9975; <i>fbl</i> ; <i>rngo</i> ; <i>blanks</i> ; <i>Mst84Dd</i> ; <i>cup</i> ; <i>nesd</i> ; <i>Mst57Da</i> ; <i>Acp53C14b</i> ; <i>Sfp24Bc</i> ; <i>msi</i> ; <i>Yp3</i> ; <i>Spn77Bc</i> ; <i>msopa</i> ; CG11598; <i>os</i> ; <i>Met75Ca</i> ; <i>Mst84Dc</i> ; <i>orb</i> ; CG17450; CG18628; <i>capu</i> ; <i>Dic61B</i> ; <i>sphinx2</i> ; <i>ACXA</i> ; <i>His3.3A</i> ; <i>asp</i> ; <i>Jhe</i> ; <i>spin</i> ; CG4546; CG10407; <i>Cyp4d21</i> ; CG16995; <i>ms(2)35Ci</i> ; <i>sa</i> ; <i>eIF4E-3</i> ; <i>ncd</i> ; <i>Yp2</i> ; CG17242; CG17843; <i>Hsp60C</i> ; CG11037; <i>Acp26Aa</i> ; CG10433; <i>Gld</i> ; <i>Spn43Ab</i> ; <i>Yp1</i> ; <i>Acp53C14a</i> ; <i>LysC</i> ; <i>psidin</i> ; <i>ball</i> ; <i>Acp24A4</i> ; <i>Spn28F</i> ; CG4847; <i>sra</i> ; <i>Phm</i> ; <i>ms(3)72Dt</i> ; <i>cort</i> ; <i>piwi</i> ; <i>S-Lap7</i>
GO:0032504 multicellular organism reproduction	3.53e-03	77/499 (15.4%)	112/1045 (10.7%)	<i>Unc</i> ; <i>Msi</i> ; <i>Sfp93F</i> ; CG13309; CG5162; <i>to</i> ; <i>yuri</i> ; <i>gudu</i> ; <i>Mst98Cb</i> ; <i>fan</i> ; <i>Tpl94D</i> ; <i>snky</i> ; <i>Mst35Bb</i> ; <i>Met75Cb</i> ; <i>Acp53C14c</i> ; <i>Sfp26Ad</i> ; <i>phm</i> ; <i>mia</i> ; CG18284; CG17018; CG9975; <i>fbl</i> ; <i>rngo</i> ; <i>blanks</i> ; <i>Mst84Dd</i> ; <i>cup</i> ; <i>nesd</i> ; <i>Mst57Da</i> ; <i>Acp53C14b</i> ; <i>Sfp24Bc</i> ; <i>msi</i> ; <i>Yp3</i> ; <i>Spn77Bc</i> ; <i>msopa</i> ; CG11598; <i>os</i> ; <i>Met75Ca</i> ; <i>Mst84Dc</i> ; <i>orb</i> ; CG17450; CG18628; <i>capu</i> ; <i>Dic61B</i> ; <i>sphinx2</i> ; <i>ACXA</i> ; <i>asp</i> ; <i>Jhe</i> ; <i>spin</i> ; CG4546; CG10407; CG16995; <i>ms(2)35Ci</i> ; <i>sa</i> ; <i>eIF4E-3</i> ; <i>Yp2</i> ; CG17242; CG17843; <i>Hsp60C</i> ; CG11037; <i>Acp26Aa</i> ; CG10433; <i>Gld</i> ; <i>Spn43Ab</i> ; <i>Yp1</i> ; <i>Acp53C14a</i> ; <i>LysC</i> ; <i>psidin</i> ; <i>ball</i> ; <i>Acp24A4</i> ; <i>Spn28F</i> ; CG4847; <i>sra</i> ; <i>Phm</i> ; <i>ms(3)72Dt</i> ; <i>cort</i> ; <i>piwi</i> ; <i>S-Lap7</i>

7.3 Primerliste

Tab.S6: Verwendete Primer mit Sequenzen.

Primername	Sequenz
<i>mlncRNAs Arten</i>	
Dsim rp49fwd	AGATCGTGAAGAAGCGCACC
Dsim rp49rev	CGCTTGTTTCGATCCGTAACC
Dere rp49fwd	GCCCAAGATCGTGAAGAAG
Derer p49rev	GCTTGTTTCGATCCGTAACC
Dpse_lamfwd	AGCGGATATGGGAGGAGAAC
Dpse_lamrev	TTGCTCAGCTCATTGGCAC
72977simf	ACAACCAACAACATGGACTG
72977simr	AATAATCGCCAAAGTACTCCTC
72977erecf	AATATGGACTTCTGTGAACTGC
72977erecr	AATAATCGCCAAAGTACTCCTC
72977psef	CAAATCCCGCAAGTATCCAG
72977pser	AATCACCAAAGTAATCCTCGTC
55117simf	TTTTTTTTGCAGTGCGGC
55117simr	TCGGTTAGTATGGACACGAG
55117erecf3	GGCAACATCACATTGTGGTAG
55117erer3	GCCAAGCAATCAATAATCTCG
55117psef	TGGAGGTGAGGCATATAATGAC
55117pser	TGAATGGCAGTAACACAAC
51725simf	ACAGCCCTTAGATGACGATG
51725simr	GCCTTGAAACAACACTGCGAAC
51725erecf	TGAACAGCCCCTTGATGAC
51725erecr	GCCTGGAAATAGCTGGGAAC
51725psef	ACGACAATCAAGTCAAATCCC
51725pser	GACATTGCACTCGAACCAAAC
28910simf	GCACTTCTTTCTCTGGCATTG
28910simr	ACCGATAAGCCCCTGTTGAG
28910erecf	ATGCGAAAGACGAACACC
28910erecr	TGGGGACAGATTCTTACACAC
28910psef	CTTCGTCTTGAACCTCTCC
28910pser	TCCAGAGCGACATCTTCC
1755erecf	TAGTGGACCCTCAACCAAGCAG
1755erecr	GGCTTTCCGCCAGATCACTATG
1755psef	AATCATTGAGATGAGTCGTCAG
1755pser	TGACTAACAGAGCCATACCC
13458simf	TTTTTACCTTGCCTGGTGC

Primername	Sequenz
13458simr	CTGTGTAATTCGACGATACCC
13458erecf	GCCCTTTCGACTATGATGCC
13458erecr	ACAACAATCCAGTGACGCC
13458psef2	CAGTGGATATTCGTAGTGGTT
13458pser2	CCAAGAGTCTAAAGATGAGCA
13450simf	TCGACTTCCAAGGAGAACAC
13450simr	TTCGGGAATAGCTTGCGAC
13450eref2	CACCGATCGCAAGGTCACACA
13450erer2	CTGGCTTGGTTCTACACTTGT
13450psef	GTCTCAGCCTTTACTTTACCC
13450pser	CAACAAGAATCCACTACTGCC
<i>mlncRNA Dmel</i>	
RpL32_fwd	GATGACCATCCGCCAGCATA
RpL32_rev	AGTAAACGCGGTTCTGCATGAGC
CG11570fwd	CAATTTAAAGAAGCCTGGCAC
CG11570fwd2	GCATTGGGAGGACTGTTATTG
CG11570rev	TACCCCACTGCCTACCTATC
55117fwd	TTTTTGCAGTGCGGCAAGGA
55117rev	CATCACATTATGGTTGGGATCGTC
CG32106fwd	TTTCAAGTCCCATCTTTACG
CG32106fwd2	TTGCTCTGCTGTATTCGTTT
CG32106rev	TCACAGCAGAACGAAGGAAG
51725fwd	GCCTAAGAGATCAACAGCTGGGAA
51725rev	GCTATTGGCTTCAAACAACCTGCGA
1755 fwd	TCGAACCTCCGATCCACGGAA
RhoGap102a fwd1	AAGACAACGGGTTACAACAGG
RhoGap102a rev1	CATGTGGGCATGTATCAACAG
1755rev	AGATAAACTCCCTGGTTGAGG
1755rev2	GGTTCTTGGCTTATTCGTCTTG
13450fwd	CACTTGATCCTGTTTCGACTTCCA
13450rev	AAAATGCCTGAATCTTCTGGTG
Tsp42Eefwd	AGTTCGTCAATTAATGACCAC
Tsp42Eefwd2	GATCCCGACTAACTACTACCC
Tsp42Eerev	GGGAGCAGGCAAAGATAAAG
72977fwd	GACTGTTGTGAGCTGCCGGAA
72977rev	ATAATCGCCCAAGTACTCCGCA
28910fwd	AAGATCGCTCTGCTGATGG
28910rev	AACTGAAACTACGAAGTGG
13458fwd	GTGGATTGCTGTGGGTATCG
13458rev	AACTCGGCAGGACTGTTTTGG

Primername	Sequenz
<i>mlncRNA42E5-1 tagging</i>	
MS2	CTATAGGCATGTGGTAGTCCCATGCTCGATCGGGTACCGCA TGTGGTAGTCCCATGCTGATCATCTAGAGCATGTGGTAGTC CCATGCCTATAG
S1	TGGCTGGTCTTAGTACGTTACGCATTCTATCAGCGCCCGG CCC
S1_fwd	TGGCTGGTCTTAGTACGTT
S1_MS2rev	GTCGCGGGCCGGGCTTAAGGATATC
MS2_S1_fwd	CAGCGCCCGGCCGAATTCCTATAGGC
MS2_rev	AGATCTCTTAAGGCATGGGAC
Mut5prime13458fwd	CAAATTTTTTACCTTGCCCGGGCCACTGCTTCAAATATTG
Mut5prime13458rev	CAATATTTGAAGCAGTGGCCCGGGCAAGTAAAAATTTTG
Mut3prime13458fwd	ATATGATATGTGTATACGCCCGGGCAAATAACTTCCC
Mut3prime13458rev	GGGAAGTTATTTGCCCGGGCGTATACACATATCATAT
MS2_XhoI_rev	ATCTCGAGTTAGTAGATGCCGGAGTTTG
EcoRIEGFP_fwd	ATGAATTCGCTACCGGTCGCCACCATG
landing86Fb fwd	ATAAAGAGTTAGGGCCAAAGTG
MS2genefwd	CGCAAATACCCATCAAAGTC
MS2generev	CGTGGCGAAAATTGGAATGG
<i>mlncRNA42E5-1 Nullmutante</i>	
5'PrimNotI fwd	ATGCGGCCGCTGAGAACGCAATGGGAAAC
5'PrimNheI rev	ATGCTAGCTTCGGCATTATAGTCGAAAGG
3' PrimSgsl fwd2	ATGGCGCGCCTAACGGGTAAGAAGTAACGGG
3'PrimXhoI rev	ATCTCGAGTCATTAGGCGAGTACCGAG
Delcontrol fwd	GATCAGACAACCCACATCAG
Delcontrol rev	ACTTCTCGCTCGCACTAAC
5'PCR-1 fwd	CATGACCATGAGCTATGCC
5'PCR-1 rev	GACTGCTACTCGACTTAAAGG
3'PCR-1 fwd2	GCCCCCTCAAAAAGCTAATG
3'PCR-1 rev	GCGCCAATTTGAGAAACAGTAG
5'PCR-2 rev	CCGTTACTTCTTACCCGTTAG
3'PCR-2 fwd	CCCCTAACCTGTCAAATAAACC
13450rev2	TTGGAAGTCGAACAGGATCAAG
CR44172fwd	AAGGATCGCCAATGGTGAC
CR44172rev	AGATCTGTGGACACTCCTTG
Tsp42Ef fwd	TGTCCTTTGGGGATACCTG
Tsp42Ef rev	GTGATCAGCAAGTAGACGAC
<i>taiman</i>	
tai_Exon1_fwd	GCCTGCCATCTCTTATTGTC
taiExon6rev	CAGATTGACCTTTGAATCCGTCTTGC

Primername	Sequenz
tai_Exon6_fwd	ACGGCGCAAGACGGATTCAAAG
tai_Exon7_rev	GTCATATCTCCACGCTTGTTTC
whs_Exon1_fwd	TTTGAGTGATTGGGGTGGTG
whs_Exon3_rev	CCGGATAGGCCACGCCGCAAA
tai_Exon2/3_fwd	TCGTTTGATTGTTATCTATTGG
tai_Exon5_rev	CGCACGAAACGTAAATGAAG
tai-del7_fwd	TTTATCCACTCCACCCAC
tai-del7rev	TTGCTATTTCCGCCATTCG
tai-del8_fwd	CAGCCCCAATCACAAATCAAC
tai-del8_rev	AGCTCCTGCTTCTCATAGCC
Expressionsanalysen	
Tpl94D_fwd	GCCTAGAGATTCTGTGCGCCT
Tpl94D_rev	TTTTTGTGCCCGCTTGG
phm_fwd	GTTACCTGCCCTTCCTGGAC
phm_rev	GCATGTGCCAAATGTCCTC
Yp1_fwd	CGTCAACCAGGCATTGAAGC
Yp1_rev	AGCAACGGTCTTGTACCAT
Yp2_fwd	TTCTGCACTTGGGTGTTGGT
Yp2_rev	AGGAGATGAGCCTGGAGGAG
Yp3_fwd	TCCAATGACCGACTGAAGCC
Yp3_rev	TGCTTGATTTGGCCAACGTG
Cyp6w1_fwd	CAACCGCGTCCTTCAAACCTG
Cyp6w1_rev	GTACCACTGCCTAGACGCTC
Acf1_fwd	TCGGACATCCTCCTCGTTCT
Acf1_rev	CCGGTACATGACTCTCCAGC
Mcm5_fwd	TTTACCGGATGGTCTGTGCC
Mcm5_rev	GCTCCACCCTCCATGACAAA
mre11_fwd	CTCATTCCGTTGCGTCTCCT
mre11_rev	TGCAAGAGCCTTTGAGTGGA
CG42759_fwd	CCTACGGACAACCTGTTCCC
CG42759_rev	GTTAGGAAACAGCAGGGGCA
CG44142_fwd	TCGAGCATCACTATGCAGCC
CG44142_rev	GGCATATTGGTGACCGCAAC
lacZ1_fwd	TCAATCCGCCGTTTGTTC
lacZ1_rev	G TTCAGACGTAGTGTGACGC
lacZ2_fwd	TCAATCCGCCGTTTGTTC
lacZ2_rev	TCCAGATAACTGCCGTCACTCC
lid_forw	GGACTTGCACAAGCAGAAC
lid_rev	GCACATCAATGGAAGGACAATAC

Primername	Sequenz
nej_fwd	AACGACATCCAGGGCGATAC
nej_rev	GCCAGATAGAATCCAGCCAGAG
Rpd3_fwd2	CAAGGACACCAACAGCAAC
Rpd3_rev2	TCGCTCCGGCATCATTATC
Su(var)3-9fwd2	GCTTCATAATCTCAATGGCGG
Su(var)3-9rev2	GTCACGACATTCTTATGGCTAC
egg_fwd	CAACGGAAACACGATGAAGAG
egg_rev	TAGGTAGCGGTAGCGATTGG
G9a_fwd	GGGCACACGGATATAGTTAG
G9a_rev	CGTATTGTTGTCATTGTCCG
ash1_fwd	AAGGAGAAGATGGTGTGGAGGG
ash1_rev	GATATTTTCATCAGCAGTGGCGG
ash2_fwd	TGGCAAACACTACAGTGATG
ash2_rev	ACAGATGAGACTTGAAC TTGAC
Blimp-1_fwd	AGTTCACACAGTTTGTGCATC
Blimp-1_rev	TCAGTTGCTCGTAGGCTTC
Su(var)3-3fwd	TCAAATGGAGGAAACGATCAG
Su(var)3-3rev	GTGGCATTAGCAAATCCAAG
E(z)fwd2	TCGACTCGCAGTACAGATCC
E(z)rev2	CATCAAATCAGGCAGCAGAAG
trr_fwd2	ATCCAGCCGGAACATGTAG
trr_rev2	AAGCACACCATGATAATCGAG
trx_fwd	CCTCGAATGGGAATTTGTAG
trx_rev	AATATGCCGGTGAGTTGATT
Su(var)2-1_fwd	GCCACCACCTTTTGATATCTAC
Su(var)2-1_rev	TATCTGGCTCAGGGGAATCAC
Su(var)3-7fwd2	CGGCACTGTAAAACCAGAG
Su(var)3-7rev2	GGGATCAGCAATCAACCAAG
HP1a_fwd	TTAATCTTCATTATCAGAGTACCA
HP1a_rev	AGCCGCCTCCAAGAAGGATCGAC
HP1b_fwd3	TCCAGACCTGATAGCCAAC
HP1b_rev3	ATTTTTGATGCCTCCAGACC
HP1c_fwd	ATGTGACGGGCGACATCAAG
HP1c_rev	CGCAATGTGACGGGAGTAAG
ab_fwd2	CACTCACAAGGAACAGAAGCGG
ab_rev2	TGTCCAGTTCGTGTTTCGG
rox1_fwd3	ATGCGAGCGAGACAATGATACT
roX1_rev3	GACTTGCAGTCCGCCCTATG
roX2_Ex3_fwd	TCGCAATGCAAAC TGAAGTC
roX2_Ex3_rev	AGGCGCGTAAAACGTTACC

Primername	Sequenz
MOF_fwd	TCCGATACGGTAATCTGCG
MOF_rev	AGATGAAGAGGAGCTGGAATG
mle_fwd	ACGAAATCCACGAGAGAGAC
mle_rev	CTCCAAGAAAAATTGCTGCAC
msl-1_fwd	GTGATTGGGAGTTGAATGGG
msl-1_rev	AGACGATGACAGTGAAGAGG
msl-2_fwd	AGGCAGGAGGAGAACAGTATGG
msl-2_rev	TGGTGGCGAAAGTGATGGAG
msl3_fwd	TTTCCCTGTCTGAACCACTCC
msl3_rev	CATGTTCTTAAACGCATCGCC
ftz_fwd	ATCATCGAATTGTGACAGCC
ftz_rev	TGAAGTGGAACCTCTTCTCG
run_fwd	CATCACCATTGCCACCTATCC
run_rev	AAGTAGTCCGCATAGCCGTAG
twi_fwd	TCAACGACGCCTTCAAGTCC
twi_rev	CCACACCCCGAACAGATAAC
sna_fwd	CGTGACTATGTGCTGAACC
sna_rev	ATATCCCGTTGTTCTGCTGCC
pri-mir-184_fwd	TGCATTTCGTACCCTTATCATTC
pri-mir-184_rev	CCCTTATCAGTTCTCCGTCC
gbb_fwd	ACAATCCGTAAGTGCCTCAG
gbb_rev	AGAACCATTCCGAGTCCCAG
dpp_fwd	AAGATCATCATCCCCGAGCC
dpp_rev	TCTTCACGTCTGAAGTGCAG
pre-miR-1_fwd	AGCCTTTGAGAGTTCCATGCT
pre-miR-1_rev	CTCGCCAGATTTTCGCTCCAT
21710_fwd2	GTTTCCATTTGTCCACGTTTAC
21710_rev2	TTGTGGTGAAAGGAGTTAAAGG
Mad_fwd	AAATGGCGGAGTCGGATAG
Mad_rev	AGCAACGTGAACAGGAATAG
<i>P-Element-Primer</i>	
5'Pforw1	ACCCACTTTAATGATTCGCAG
5'Pforw2	ACCAGTGGGAGTACACAAACAG
5'Prev1	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG
5'Prev2	CACACAACCTTTCTCTCAAC

Publikationsliste

- Hiller M, Findeiss S, Lein S, Marz M, Nickel C, Rose D, Schulz C, Backofen R, Prohaska SJ, Reuter G, Stadler PF. (2009) Conserved introns reveal novel transcripts in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 19:1289-300.
- Ryder E, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Drummond J, Webster J, Johnson G, Morley T, Chan YS, Blows F, Coulson D, Reuter G, Baisch H, Apelt C, Kauk A, Rudolph T, Kube M, Klimm M, Nickel C, Szidonya J, Maróy P, Pal M, Rasmuson-Lestander A, Ekström K, Stocker H, Hugentobler C, Hafen E, Gubb D, Pflugfelder G, Dorner C, Mechler B, Schenkel H, Marhold J, Serras F, Corominas M, Punset A, Roote J, Russell S. (2007) The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* 177: 615-29

Danksagung

Hiermit möchte ich allen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, herzlich danken. Besonderen Dank möchte ich dabei Prof. Dr. Gunter Reuter aussprechen, der mir das interessante Thema überlassen hat, sowie die Arbeit auch methodisch und durch ständige Diskussionsbereitschaft unterstützt hat.

Prof. Dr. Peter Stadler, Dr. Michael Hiller und der gesamten Bioinformatik-Arbeitsgruppe in Leipzig möchte ich für die gute Zusammenarbeit bei dem mlncRNA-Projekt danken. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Horn für die zur Verfügung gestellten Materialien. Ich danke Dr. Sandro Lein für die gute Zusammenarbeit beim mlncRNA-Projekt, sowie ihm und Dr. Sandy Mietzsch und Christian Apelt für die intensive Zusammenarbeit bei den *taiman*-Analysen. Dr. J. Hackermüller vom Fraunhofer Institut IZI gilt mein Dank für die Durchführung und Auswertung des *Microarrays* und Gunnar Hönig danke ich für die Auswertung der RNA-Seq Datensätze.

Weiterhin gilt mein Dank Ramona Abe, Maria Kube, Melanie Klimm und Katrin Kittlaus für die stete Bereitstellung von Fliegenmaterialien und Sequenzanalysen. Dr. Veiko Krauß, Olaf Nickel, Dr. Heiko Baisch, Dr. Kathleen Gebhardt, Amit Sharma, Kristina Irmner, Matthias Walther, Jeanette Keßler und allen weiteren Kollegen danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Diskussionsbereitschaft, sowie allen Freunden für ihre Unterstützung und Freundschaft. Ganz besonders möchte ich auch meiner Familie für die fortwährende Unterstützung danken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 12.08.2014

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Lein, Claudia
Geburtsname: Nickel
Geburtsdaten: 04.12.1982 in Leipzig
Nationalität: deutsch
Zivilstand: verheiratet

Werdegang

1989 – 1993 Helmholtz-Grundschule Leipzig
1993 – 2001 Humboldt-Gymnasium Leipzig, Abitur
2001 – 2006 Studium der Biologie an der Universität Leipzig
2005 – 2006 Diplomarbeit: "Funktionelle Charakterisierung der *Dip1*-Region von *Drosophila melanogaster*" am Lehrstuhl für Genetik der Universität Leipzig
2006 – 2014 Promotionsstudium am Institut für Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg