

Tandem repetitive DNA: Stabilität und Wirkung auf die Genexpression im transgenen System

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Dipl. Biol. Ralf Schrank
geb. in Koblenz

Mainz, 1999

Dekan:

Erster Berichtstatter:

Zweiter Berichtstatter:

Jahr der mündlichen Prüfung: 2000

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	15
2.1 Versuchstiere	15
2.2 DNA-Isolation aus <i>D. melanogaster</i> -Larven und -Fliegen	15
2.3 Standardmethoden	15
2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
2.5 Klonierung von DNA in Plasmidvektoren	17
2.6 DNA-Markierung	18
2.6.1 Random-primed oligo-labeling	18
2.6.2 Nick-translation	19
2.7 Hybridisierungstechniken	19
2.7.1 Southern-Hybridisierung	19
2.7.2 Koloniefilter-Hybridisierung	19
2.7.3 <i>In situ</i> Hybridisierung	20
2.8 Untersuchung der DNA-Krümmung	20
2.9 Automatische DNA-Sequenzierung	21
2.10 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation	22
2.10.1 Vorbereitung der DNA für die Mikroinjektion	24
2.10.2 Vorbereitung der Injektionsnadel	24
2.10.3 Vorbereitung der Embryonen	24
2.10.4 Mikroinjektion	24
2.10.5 Selektion transgener Tiere und Stammanzucht	25
2.10.6 PCR-Test zur Identifikation transgener Tiere	25
2.11 Kreuzungen zur Transposition von Transgenen	26
2.12 Messung des Pigmentgehalts Drosoplerin	27
2.13 Anhang	27
2.13.1 <i>E. coli</i> -Stämme	27
2.13.2 <i>D. melanogaster</i> -Stämme	28
2.13.3 Nährmedien	28
2.13.4 Puffer und Lösungen	29
2.13.5 Bezugsquellen	31

3. Ergebnisse	32
3.1 Klonierung und Charakterisierung tandem repetitiver DNA	32
3.1.1 Cla-Elemente aus <i>C. thummi</i>	33
3.1.2 Alu-Elemente aus <i>C. piger</i>	38
3.1.3 1,688-Satelliten-DNA aus <i>D. melanogaster</i>	39
3.1.4 Artificielle trDNA aus Hsp70 Promotoren	40
3.1.5 Integration von trDNA in das Genom von <i>D. melanogaster</i>	42
3.2 Stabilität repetitiver DNA-Elemente in <i>E. coli</i>	50
3.2.1 Einfluß der Orientierung	50
3.2.2 Einfluß der Rekombinationssysteme von <i>E. coli</i>	53
3.3 Stabilität repetitiver DNA-Elemente im Genom transgener Fliegen	54
3.4 Einfluß tandem repetitiver DNA-Elemente auf die Genexpression	65
3.4.1 Bestimmung der basalen Expression des <i>miniwhite</i> -Reportergens	65
3.4.2 Artificielle tandem repetitive Hsp70 Promotoren	70
3.4.3 TrDNA aus <i>Chironomus</i>	73
3.4.4 Einfluß der Chromosomenregion auf die Genexpression	76
4. Diskussion	80
4.1 Stabilität von tandem repetitiver DNA in transgenen Organismen	82
4.1.1 Mechanismen der Stabilität von trDNA in <i>E. coli</i>	84
4.1.2 TrDNA-Cluster im transgenen Genom von <i>D. melanogaster</i>	91
4.1.3 Vergleich der trDNA-Stabilität in <i>E. coli</i> und <i>D. melanogaster</i>	95
4.2 Effekte von tandem repetitiver DNA auf die Genexpression	98
4.2.1 Einfluß der Chromosomenregion	98
4.2.2 Positive Effekte von trDNA auf die Genexpression	104
4.2.2.1 Einfluß von multimerisierten Promotor-Einheiten	105
4.2.2.2 Einfluß von trDNA-Clustern aus <i>Chironomus</i>	109
4.2.3 Tr-DNA als Stimulator der Genexpression	112
5. Zusammenfassung	117
6. Literatur	119
7. Anhang	140

Abbildungen

1: Effekt des centromerischen Heterochromatins auf das <i>white</i> -Gen	7
2: Tandem repetitive <i>miniwhite</i> -Gene führen zu PEV	8
3: Effekt von trDNA auf die Expression eines Reportergens	13
4: P-Element-vermittelte Keimbahntransformation	23
5: Der Klonierungsvektor pW8	32
6: Das Cla-Element-Cluster des Klons C2i6 aus <i>C. thummi</i>	34
7: Gel-Migrationstest zur Krümmungsanalyse verschiedener Cla-Fragmente	37
8: Das Alu-Element-Cluster des Klons ppiAlu4-105 aus <i>C. piger</i>	38
9: Das 1,688-Satelliten trDNA-Cluster aus <i>D. melanogaster</i>	39
10: Artificielle trDNA-Cluster bestehend aus Hsp70 Promotoren	41
11: Transgene in verschiedenen Chromosomenregionen von <i>D. melanogaster</i>	46-49
12: Stabilität verschiedener trDNA-Familien in <i>E. coli</i>	52
13: Southern-Analyse zum Nachweis der trDNA-Clustergröße aus Cla-Elementen	55
14: Duplikation von drei Cla-Element-Einheiten im Stamm CT8B	56
15: Southern-Analyse zum Nachweis der Stabilität von trDNA aus Cla-Elementen	57
16: Southern-Analyse zum Nachweis der trDNA-Stabilität in <i>D. melanogaster</i>	59
17: Die Organisation von trDNA-Clustern aus Hsp70 Promotoren	61
18: PCR-Analyse transgener <i>D. melanogaster</i> -Stämme	63
19: Organisation des trDNA-Clusters im Stamm Hsp27	64
20: Konstrukte zur Bestimmung der basalen Expression des <i>miniwhite</i> -Gens	66
21: PCR-Analyse der Kontrollstämme	67
22: Basale Expression des <i>miniwhite</i> -Gens	68
23: Expression des <i>miniwhite</i> -Gens unter Kontrolle des <i>white</i> -Promotors	69
24: Effekt von trDNA aus Hsp70 Promotoren auf die Genexpression	71
25: Effekt von trDNA aus <i>Chironomus</i> auf die Genexpression	74
26: Genexpression von Transgenen in telomerischer Chromosomenregion	77
27: Genexpression bei X-chromosomaler Lokalisation des Transgens	79
28: Intramolekulare Rekombination	87
29: Intermolekulare Rekombination im Stamm CT8B	93
30: Struktur und Organisation des menschlichen Kinetochors am Centromer	99
31: Promotor-Elemente des Hsp70 Promotors	105
32: Modell zur Expressionssteigerung durch tandem repetitive DNA	115

Tabellen

1: Cla-Element-Fragmente zur Bestimmung der DNA-Krümmung	35
2: Gegenüberstellung des tatsächlichen und apparenten Molekulargewichts	36
3: Die Effizienz der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation	43
4: Übersicht und Lokalisation der Transgene in <i>D. melanogaster</i>	45
5: T-Test zum Vergleich der Drosopiermenge in verschiedenen Stämmen	75
6: Gegenüberstellung der trDNA-Stabilität in <i>E. coli</i> und <i>D. melanogaster</i>	96

Abkürzungen

A. bidest.	"aqua bidestillata"
Abb.	Abbildung
APS	Amoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C.	<i>Chironomus</i>
CENP	Centromer-Protein
CHO	"chinese hamster ovary"
Chr.	Chromosom
Ci.	Curie
D.	<i>Drosophila</i>
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DNA	"deoxyribonucleic acid"
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DOT	"disruptor of telomeric silencing"
E(var)	"enhancer of variegation"
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-Puffer	Elektrophoresepuffer
FISH	"fluorescence <i>in situ</i> hybridization"
GAF	"GAGA transcription factor"
GTF	"general transcription factors"
h	Stunden
HAC	"human artificial chromosome"
HP1	Heterochromatin-Protein 1
HSE	"heat shock element"
HSF	"heat shock factor"

HSP	"heat shock protein"
ILPR	"insulin linked polymorphic region"
IPTG	Isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid
k	Retardierungsfaktor
Kbp	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LCR	"locus control region"
M	Marker
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mRNA	"messenger RNA"
NTS	nicht-transkribierter Spacer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	"phosphate-buffered saline"-Puffer
PCR	"polymerase chain reaction"
PEV	"position effect variegation"
PL	Polylinker
PM	Präinkubationsmedium
rDNA	"ribosomal DNA"
RNA	"ribonucleic acid"
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
STR	"simple tandem repeats"
su(Hw)	"suppressor of Hairy-wing"
Su(var)	"suppressor of variegation"
TAF	"TBP associated factor"
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	"TATA box binding protein"
TELT	Tris-EDTA-Lithiumchlorid-Triton X-Puffer
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TPE	"telomeric position effect"
trDNA	tandem repetitive DNA
U	"units" (Enzymeinheiten)
Upm	Umdrehungen pro Minute
VNTR	"variable number of tandem repeats"
Vol.	Volumen
w	<i>white</i>
w/v	"weight per volume"
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die Organisation von tandem repetitiver DNA im Genom von Eukaryoten

In fast allen eukaryotischen Genomen kommen nicht-kodierende, repetitive DNA-Sequenzen vor. Ein großer Anteil dieser repetitiven DNA-Sequenzfamilien besteht aus tandem repetitiver DNA (trDNA), die bei multizellulären Eukaryoten bis zu 40 % des Gesamtgenoms ausmachen können (Gvozdev et al., 1999). Die Repetitionseinheiten von trDNA-Familien können dabei zwischen 2 und ca. 2000 bp lang sein (Dover, 1989). Anhand der chromosomalen Lokalisation und der Clustergröße werden verschiedene trDNA-Klassen unterschieden (Übersicht in: Hankeln et al., 1996). Die als "Makrosatelliten" bezeichneten trDNA-Abschnitte können Genombereiche von mehreren 100 Kbp ausmachen (Fowler et al., 1988) und sind vor allem mit den Centromer- bzw. Telomerbereichen des Genoms assoziiert. (Übersicht in: Brutlag, 1980; Singer, 1982; Beridze, 1986). Die Clustergröße von "Minisatelliten" umfaßt demgegenüber nur einige Kbp. Diese kleineren trDNA-Abschnitte kommen meist an zahlreichen Loci interspergiert im Genom vor (Schmidt, 1984; Jeffreys et al., 1985b; Nakamura et al., 1987; Hankeln et al., 1994). "Mikrosatelliten", die auch "simple tandem repeats" (STR) genannt werden, besitzen Repetitionseinheiten von maximal 10 bp Länge und eine Clustergröße von nur einigen 100 bp (Tautz und Renz, 1984; Richard und Dujon, 1996; Deka et al., 1996; Michalakis und Veuille, 1996).

Eine Gemeinsamkeit dieser tandem repetitiven DNA-Abschnitte ist die häufig zu beobachtende Instabilität innerhalb des Genoms. So variiert die Organisation des menschlichen α -Satelliten chromosomenspezifisch. Dies betrifft sowohl die DNA-Sequenz selbst als auch die Anzahl der Repetitionseinheiten, die Cluster mit einer Größe zwischen 250 und 5000 Kbp bilden können (Earnshaw und Rothfield, 1985). Selbst in den homologen Chromosomen verschiedener Individuen treten massive Heteromorphismen im α -Satelliten auf. Diese deuten auf einen Verlust oder eine starke Vermehrung von trDNA in einem der homologen Chromosomen hin (Wevrick und Willard, 1989; Wevrick et al., 1990; Yurov et al., 1987). Auch die chromosomale Verteilung einer Satelliten-DNA-Familie in verschiedenen Spezies kann stark variieren. Der Maus "major satellite" ist in der Spezies *Mus musculus* centromerspezifisch, kommt in anderen Mausarten jedoch zusätzlich auf den Chromosomenarmen vor (Wong und Rattner, 1988; Wong et al., 1990a). Auch bei der Zuckmücke *Chironomus* zeigen nahe verwandte Arten massive Unterschiede in der Kopienzahl diverser

Satelliten-DNA-Familien (Schaefer und Schmidt, 1981; Schmidt, 1984; Hankeln, 1990). Die erheblichen Unterschiede im trDNA-Gehalt verwandter Genome können verantwortlich sein für das sogenannte C-Wert-Paradoxon (Cavalier-Smith, 1985). Dieser Begriff beschreibt das Phänomen sehr unterschiedlicher Genomgrößen bei nahe verwandten Arten mit ähnlicher Komplexität des Organismus. Da nahe verwandte Arten recht häufig große Unterschiede in Menge, DNA-Sequenz und chromosomaler Lokalisation der trDNA zeigen (Waye und Willard 1989; Wong et al., 1990a), wird die inhärente Dynamik der trDNA im Zusammenhang mit der Entstehung neuer Arten diskutiert (Übersicht in: Rose und Doolittle, 1983).

Die Instabilität von trDNA spielt sich allerdings nicht nur in evolutionären Zeiträumen ab, sondern kann sich auch innerhalb von wenigen Generationen ereignen, etwa im Fall der STR-Instabilität. Spontane Veränderungen der Zahl von tandem repetitiven Trinukleotiden im menschlichen Genom können dabei sogar zu Krankheiten führen. Dies betrifft tandem repetitive Trinukleotide, die sowohl in offenen Leserahmen von Genen als auch außerhalb derselben lokalisiert sind (Übersicht in: Lindblad und Schalling, 1996; Djian, 1998). Wird ein spezifischer Schwellenwert in der Clustergröße überschritten, ist dies die Ursache für erbliche Krankheiten wie z. B. das Huntington-Syndrom (Andrew et al., 1993), die Myotonische Dystrophie (Harley et al., 1992) oder das Machado-Joseph-Syndrom (Matsumura et al., 1996). Nicht die trDNA per se, sondern deren Instabilität führt somit zu genetisch bedingten Krankheiten, da sie die Eigenschaften von Genprodukten verändert (Übersicht in: Monckton et al., 1994; Sutherland und Richards, 1995; Ashley und Warren, 1995; Warren, 1996).

An den Umbauprozessen repetitiver DNA im Genom sind eine Vielzahl verschiedener Mechanismen beteiligt. Durch illegitime Rekombination zwischen Chromosomen oder Schwesterchromatiden kann es zu großräumigen Deletionen und Duplikationen der trDNA kommen (Jeffreys et al., 1990). Intrachromosomale Rekombination zwischen Repetitionseinheiten kann zu Deletionen oder Inversionen führen, abhängig von der Orientierung der an der Rekombination beteiligten trDNA-Einheiten. Replikationsfehler verlängern oder verkürzen ein trDNA-Cluster vermutlich nur im Mikromaßstab (Übersicht in: Levinson und Gutman, 1987). Weitere mögliche Mechanismen zur Ausbreitung und Vermehrung von trDNA im Genom sind die "template amplification" und die "rolling circle replication" (Hourcade et al., 1973; Dvorak et al., 1987). Für einzelne trDNA-Familien wurde zudem die Fähigkeit zur Transposition nachgewiesen (Schmidt und Godwin, 1983; Hankeln und Schmidt, 1987; Hankeln et al., 1994). Nach

der Entstehung eines trDNA-Abschnitts können sich im Laufe der Evolution Mutationen in einzelnen Wiederholungseinheiten anreichern. Abhängig von der Anzahl der Veränderungen innerhalb eines trDNA-Clusters kann es so zu der Entstehung neuer Satelliten-DNA-Klassen kommen. Andererseits kann auch eine Homogenisierung der DNA-Sequenzen durch Genkonversion stattfinden. Dies führt zu sequenzhomogenen trDNA-Clustern (Jinks-Robertson und Petes, 1985; Lassner und Dvorak, 1986). Dabei besteht eine inverse Beziehung zwischen der räumlichen Distanz verschiedener trDNA-Einheiten und dem Grad der Homogenisierung (Tulin et al., 1997).

Mögliche Funktionen tandem repetitiver DNA

Es wird nach wie vor kontrovers diskutiert, ob trDNAs im eukaryotischen Genom eine Funktion haben. Einige Autoren sehen die Hauptmasse der Satelliten-DNA als Beispiel sogenannter "junk DNA". Durch Amplifikation und Transposition sollen sich solche DNA-Sequenzen allein zufällig im Genom anreichern. Die einzige Funktion wäre die eigene Erhaltung und Vermehrung, was zu dem Begriff "selfish DNA" führte (Orgel und Crick, 1980; Doolittle und Sapienza, 1980). Es gibt jedoch experimentelle Hinweise, daß die trDNA an einigen wichtigen Funktionen in der Zelle zumindest beteiligt ist. Es wird diskutiert, daß trDNA bei der Chromosomenpaarung und Segregation eine Funktion übernimmt. Dabei wirken die Cluster von trDNA als bevorzugte Paarungsstellen der homologen Chromosomen (Dernburg et al., 1996; Ren et al., 1997). Darüber hinaus wird eine Beteiligung von trDNA bei der Bildung des Centromers im Menschen (Wevrick et al., 1990; Haaf et al., 1992; Tyler-Smith et al., 1993; Larin et al., 1994), in der Maus (Lica et al., 1986; Radic et al., 1987; Wong und Rattner, 1988) und in *Drosophila melanogaster* (Murphy und Karpen, 1995) diskutiert. Auf Grund von Analysen an menschlichen Zelllinien mit in Teilen deletierten Y-Chromosomen wird das Centromer des Y-Chromosoms auf einen 500 Kbp großen Bereich eingeschränkt. Dieser Abschnitt besteht zu großen Teilen aus α -Satelliten-DNA (Tyler-Smith et al., 1993). Eine Funktion dieser trDNA bei der Bildung von Centromeren wird auch durch den Befund unterstützt, daß artifizielle menschliche Chromosomen (HAC) in der Centromerregion beinahe ausschließlich aus menschlicher α -Satelliten-DNA bestehen (Harrington et al., 1997; Ikeno et al., 1998). Die Bedeutung von trDNA für die Centromerfunktion wird durch immer mehr experimentelle Befunde untermauert, ist jedoch nicht eindeutig. So sind die repetitiven DNA-Sequenzen in der Centromerregion eines Minichromosoms von *D. melanogaster* weder in allen Centromeren der übrigen

Chromosomen nachweisbar, noch ausschließlich auf die Centromerregion beschränkt (Sun et al., 1997). Möglicherweise ist nicht die DNA-Sequenz ausgewählter trDNAs für die Entstehung eines Centromers von Bedeutung, sondern mehr allgemeine Eigenschaften von pericentrischer trDNA, wie eine besondere Sekundärstruktur oder ein hoher AT-Gehalt (Übersicht in: Murphy und Karpen, 1998; Wiens und Sorger, 1998).

Auch die Telomere vieler Organismen enthalten trDNA. Diese scheint in unterschiedlicher Weise an der Stabilität der Telomere beteiligt zu sein. So werden "Mikrosatelliten" in den meisten Eukaryoten durch einen Telomerase-abhängigen Mechanismus spezifisch verlängert, wodurch der graduelle Verlust von DNA bei der Replikation der Chromosomenenden kompensiert wird (Übersicht in: Blackburn, 1991, 1994). Die mitochondriale DNA von *Tetrahymena* und die Telomere von *Chironomus* enthalten an ihren Chromosomenenden komplexe trDNAs. In diesem Fall wird diskutiert, daß ungleiches "crossing over" oder Genkonversion die Stabilität der Telomere erhält (Morin und Cech, 1986, 1988; Nielsen und Edström, 1993).

Neben solchen möglicherweise essentiellen Funktionen von trDNA beeinflussen bestimmte trDNA-Familien auch benachbarte Gene. So binden im 5'-Bereich des menschlichen Insulingens Transkriptionsfaktoren an einem "Minisatelliten" trDNA-Cluster ("ILPR insulin linked polymorphic region"). Im Falle einer Expansion dieses trDNA-Clusters erhöht sich die Expression des Insulingens, was als Ursache des Insulin-abhängigen Diabetes mellitus vermutet wird (Bennett et al., 1995; Kennedy et al., 1995). Krontiris et al. (1993) konnte Mutationen innerhalb eines "Minisatelliten" im 3'-Bereich des menschlichen *H-ras*-Gens mit Tumorentstehung in Verbindung bringen. TrDNA-Sequenzen kommen bei verschiedenen Spezies auch im nicht-transkribierten Spacer (NTS) von rDNA-Genen vor (Schmidt und Godwin, 1983; Schmidt, 1984). Reeder (1984) konnte zeigen, daß die 60/81 bp langen Repetitionseinheiten im Amphibien-NTS als Verstärker der Transkription wirken, womit ein klares Beispiel für den Einfluß von trDNA auf die Genexpression gegeben ist.

Bei Effekten von trDNA auf die Genexpression könnte eine besondere strukturelle Eigenschaft einiger trDNA-Familien wichtig sein. *In vitro* zeigen trDNAs verschiedener Organismen sehr häufig eine sequenzbedingte Krümmung ihrer DNA-Helix. Als Ursache wird angenommen, daß aufeinanderfolgende AT-Basenpaare nicht planar sind, sondern einen Keil bilden, so daß mehrere AT-Basenpaare eine Krümmung der Helix-Achse bewirken. Wiederholen sich diese Motive periodisch ca. alle 10 bp innerhalb der

DNA-Sequenz, summieren sich die Verschiebungen in bezug auf die Doppelhelix, und es kommt zur Krümmung des DNA-Moleküls (Diekmann und Wang, 1985; Diekmann, 1992; Koo et al., 1986). Sequenzbedingte Krümmung wurde unter anderem für den "major satellite" der Maus (Radic et al., 1987; Martinez-Balbas et al., 1990), für verschiedene trDNA-Familien in *Chironomus* (Schmidt, 1981, 1984; Hankeln, 1990), trDNA aus *D. simulans* (Lohe und Roberts, 1990) und DNA-Sequenzen aus der Ratte sowie der Grünen Meerkatze (Martinez-Balbas et al., 1990) nachgewiesen. Verschiedene Autoren (Owen-Hughes et al., 1992; Übersicht in: Harrington, 1992) vermuten, daß gekrümmte DNA-Moleküle eine spezifische Bindung bestimmter Proteine bewirken. Benachbarte Gene könnten dadurch in ihrer Transkription verstärkt oder auch reprimiert werden. Gekrümmte trDNAs kommen zudem verstärkt in genomischen Bereichen mit besonderer Chromatinstruktur vor, wie z. B. dem Centromer. Distamycin A bindet an AT-reiche DNA-Sequenzen und hebt *in vitro* die DNA-Krümmung auf. In Maus-Zelllinien bewirkt eine Behandlung mit Distamycin A die Dekondensation des centromerischen Heterochromatins (Radic et al., 1987). Dies deutet darauf hin, daß an gekrümmte Satelliten-DNA Proteine binden und die besondere Chromatinstruktur des centromerischen Heterochromatins bilden (Benfante et al., 1990; de Torre et al., 1990).

Die Struktur und Organisation von Heterochromatin

Im Genom aller eukaryotischen Organismen liegt die DNA fast immer mit Proteinen assoziiert in Form von Chromatin vor. Seit Heitz (1928) wird Chromatin in Euchromatin und Heterochromatin eingeteilt. Das Euchromatin zeichnet sich in der Interphase des Zellzyklus durch einen niedrigen Kondensationsgrad mit einem hohen Anteil an Genen aus. Das Heterochromatin erscheint im gesamten Zellzyklus stärker kondensiert, und die Gendichte ist in diesen Bereichen äußerst niedrig (John, 1988; John und Miklos, 1988; Zhang und Spradling, 1995). Sowohl das centromerische als auch das telomerische Heterochromatin enthält in allen Organismen zum überwiegenden Teil trDNA, die oft speziesspezifisch ist (Henning et al., 1970). Experimentelle Befunde zeigen, daß einige Proteine spezifisch an trDNA im Centromer und Telomer binden. Diese Proteine binden dabei an bestimmte Bereiche der Chromosomen und nehmen wiederum besondere Funktionen wahr. Das Centromer-Protein B (CENP-B) ist ein in Mäusen und Menschen konserviertes DNA-bindendes Protein (Sullivan und Glass, 1991), das am Aufbau des Centromers beteiligt ist (Earnshaw et al., 1989). Das Centromer-Protein C (CENP-C) ist in Säugern ein Bestandteil des Kinetochors

(Earnshaw et al., 1989; Yang et al., 1996). Mutationen im Centromer-bindenden Swi6p-Protein von *Schizosaccharomyces pombe* führen zu einer hohen Rate von Chromosomenverlusten in der Mitose (Ekwall et al., 1995).

Andere Proteine hingegen binden unspezifisch an heterochromatische Bereiche. In *D. melanogaster* bindet das D1-Protein (Ashley et al., 1989) an verschiedene AT-reiche trDNAs besonders im Bereich des konstitutiven Heterochromatins (Levinger und Varshavsky, 1982). Das Heterochromatin-Protein 1 (HP1) aus *D. melanogaster* (James und Elgin, 1986) sowie die homologen Proteine aus Maus und Mensch (Singh et al., 1991; Saunders et al., 1993; Wreggett et al., 1994) sind direkt am Aufbau des Heterochromatins beteiligt. Insgesamt jedoch ist das Wissen über die genaue Zusammensetzung des Heterochromatins sehr lückenhaft. Effekte des Heterochromatins indessen sind seit langem bekannt und genetisch intensiv untersucht.

Auswirkungen von Heterochromatin auf die Expression von Genen

Heterochromatin übt einen inhibierenden Einfluß auf die Expression benachbarter Gene aus. Als "position effect variegation" (PEV) wird die mosaikartige Expression eines euchromatischen Gens bezeichnet (s. Abb. 1), das durch eine chromosomale Inversion in die Nähe von Heterochromatin gebracht wird (Muller, 1930; Baker, 1968). Das "cis-spreading" Modell erklärt die mosaikartige Genaktivität mit der unterschiedlich weit reichenden Ausbreitung des Heterochromatins über das in der Nähe liegende Gen in unterschiedlichen Zellen oder Zellgruppen (Tartof et al., 1984, 1989; Locke et al., 1988). Das Modell geht davon aus, daß durch die Kondensation zu Heterochromatin die für eine Genexpression notwendigen Transkriptionsfaktoren keinen Zugang mehr zum Gen haben und so die Aktivität des Gens unterdrückt wird (Tartof et al., 1989; Übersicht in: Moehrle und Paro, 1994). Die molekularen Mechanismen der PEV werden insbesondere durch Genmutationen analysiert, die den Variegationseffekt des Heterochromatins modifizieren. Nach der Theorie kodieren Gene, deren Deletion zu einer weniger stark ausgeprägten PEV führt ("suppressor of variegation" Su(var)), für Bestandteile, die die Bildung von Heterochromatin fördern. Dies wurde z. B. für die Deletion des *HP1*-Gens nachgewiesen (Clark und Elgin, 1992). Verstärker der PEV ("enhancer of variegation" E(var)) sind vermutlich Proteine, die der inhibitorischen Wirkung des Heterochromatins entgegenwirken und die Transkription verstärken (Locke et al., 1988; Reuter et al., 1990; Sass und Henikoff, 1998; Übersicht in: Reuter und Spierer, 1992).

Abb. 1: Effekt des centromerischen Heterochromatins auf das *white*-Gen

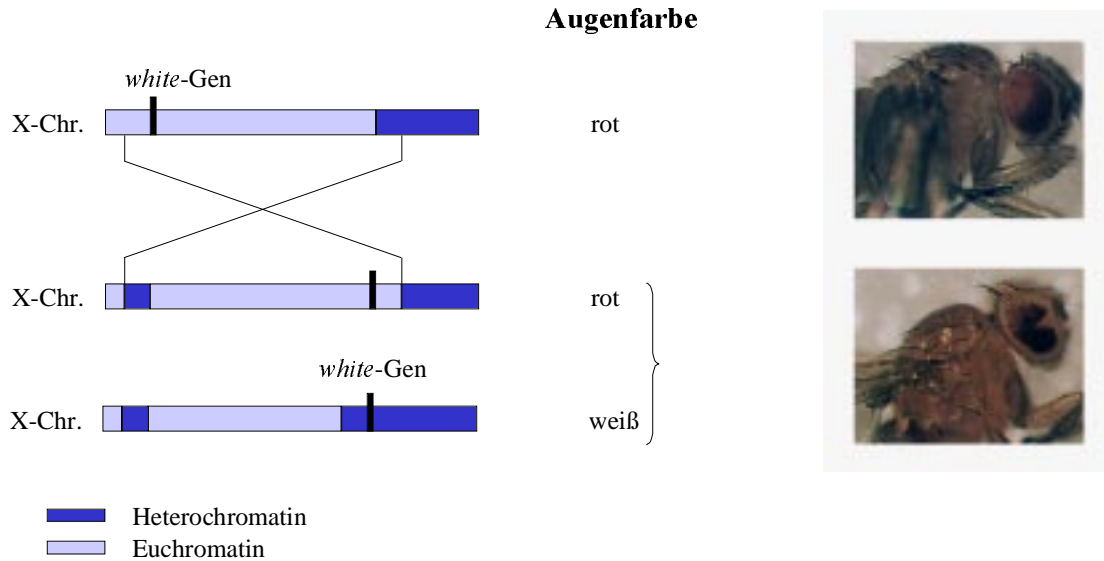


Abb. 1

In *D. melanogaster* bestimmt das X-chromosomale *white*-Gen im euchromatischen Locus die rote Augenfarbe der Fliege. Wird das Gen durch eine Inversion in direkte Nachbarschaft des pericentrischen Heterochromatins gebracht, kommt es zu einer mosaikartigen Expression des Gens im Auge der Fliege. Dies wird mit der variablen Ausbreitung des inaktivierenden Heterochromatins in verschiedenen Zellklonen erklärt. Dabei scheint der Effekt des Heterochromatins zufällig über die Zellen des Auges verteilt zu sein. In einigen Zellen wird das *white*-Gen unbeeinflusst exprimiert, während in anderen Zellen die Expression des Gens vollständig unterdrückt wird. Dies führt zu dem mosaikartigen Phänotyp im Fliegenauge.

Sowohl die Effekte von E(var)- als auch von Su(var)-Mutationen sind abhängig von der Dosis des jeweiligen Proteins (Reuter et al., 1990). Eine Überexpression von HP1 führt zu einer Verstärkung der PEV (Eissenberg et al., 1992). Diese Abhängigkeit des Effekts von der Gendosis unterstützt das "mass action"-Modell (Locke et al., 1988; Tartof et al., 1989). Danach entsteht Heterochromatin durch die Anlagerung von Proteinkomplexen entlang des Chromosoms. Die Proteinkomplexe bestehen aus unterschiedlichen Kombinationen verschiedener Untereinheiten, wobei die Deletion jeder einzelnen Untereinheit die PEV beeinflusst. Wird die verfügbare Anzahl nur einer Untereinheit verändert, hat dies Auswirkungen auf die Ausbreitung des Heterochromatins entlang des Chromosoms. Verschiedene Mutationen von Genen, die einen Einfluß auf die PEV ausüben, können sich somit verstärken, aber auch aufheben. Dies wurde für einige Gene experimentell bewiesen (Übersicht in: Reuter und Spierer, 1992).

Dorer und Henikoff (1994) ist es erstmalig gelungen, im Euchromatin einen Effekt zu erzeugen, der einer klassischen PEV zu entsprechen scheint. Die Autoren transformierten *miniwhite*-Gene als Bestandteile von tandem repetitiven P-Element-Transposons in das Genom von *D. melanogaster*. Die tandem repetitive Anordnung der *miniwhite*-Gene führte zu einer mosaikartigen Expression des *miniwhite*-Gens und damit zu hellrot-gefleckten Augen der transgenen Tiere (s. Abb. 2). Mit wachsender Anzahl der in *D. melanogaster* überführten tandem repetitiven Gene nahm die beobachtete PEV zu. Weitere Experimente zeigten, daß Modifizierer der PEV den Effekt verstärken bzw. erniedrigen (Sass und Henikoff, 1998).

Abb. 2: Tandem repetitive *miniwhite*-Gene führen zu PEV

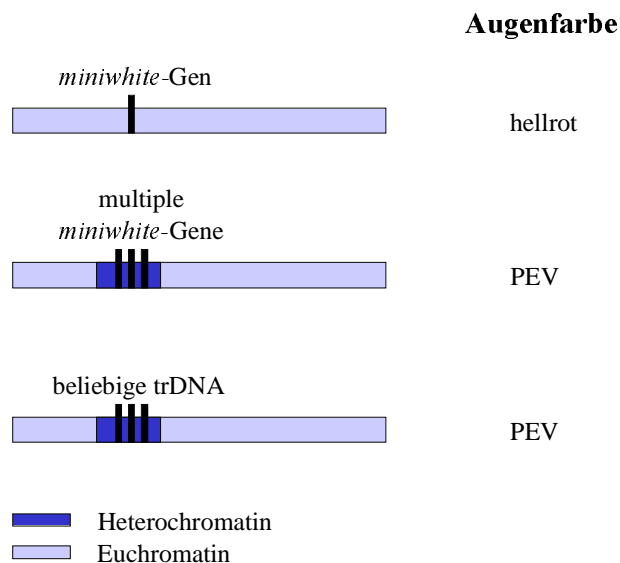


Abb. 2

Ein *D. melanogaster* Stamm mit fehlendem *white*-Gen wurde mit einem P-Element-Transposon und dem *miniwhite*-Gen als Reportergen transformiert (Dorer und Henikoff, 1994). Das *miniwhite*-Gen bewirkt bei transgenen Tieren hellrote Augen. Erfolgt die Transformation nur eines *miniwhite*-Gens, kommt es zu den erwarteten hellroten Augen der transgenen Tiere. Werden hingegen mehrere P-Element-Transposons tandem repetitiv angeordnet und damit tandem repetitive *miniwhite*-Gene erzeugt, kommt es in transgenen Tieren zu einer PEV der Gene. Diese PEV entsteht auch, wenn das Transgen weit entfernt vom centromerischen Heterochromatin lokalisiert ist. Nach dem Modell von Dorer und Henikoff (1994) soll die tandem repetitive Anordnung von beliebigen DNA-Sequenzen die Ausbildung von Heterochromatin bewirken und damit die Fähigkeit besitzen, PEV zu initiieren.

Als Erklärung für den beobachteten Effekt schlugen die Autoren vor, daß die tandem repetitive Anordnung jeder beliebigen DNA unabhängig von der DNA-Sequenz zu der Formierung von Heterochromatin führt und damit PEV auslöst (Dorer und Henikoff, 1994; Übersicht in: Dorer, 1997). Mittels Antikörpern konnten die Autoren nachweisen, daß an die tandem repetitiven Transgene das heterochromatinspezifische HP1 bindet. Mit wachsender Anzahl der tandem repetitiven Transgene steigt auch die Menge an detektierbarem HP1 (Fanti et al., 1998).

Nicht nur in *D. melanogaster*, sondern auch in anderen Organismen zeigt sich, daß tandem repetitiv angeordnete DNA-Sequenzen benachbarte Gene inaktivieren können. So führen Genduplikationen in *Arabidopsis thaliana*, ausgelöst durch einfaches inäquales "crossing over", zu einer Geninaktivierung (Scheid et al., 1991; Assad et al., 1993). Auch bei transgenen Säugern wird das Phänomen der Geninaktivierung durch repetitiv angeordnete Gene beobachtet. Dort kommt es häufig vor, daß transfizierte DNA während des Transformationsprozesses zu großen, tandem repetitiven Einheiten amplifiziert wird, was zu einer Geninaktivierung führt (Palmiter und Brinster, 1986; Barlow et al., 1995). Es ist jedoch nach wie vor unklar, ob der Inaktivierung von Genen in Säugern bzw. Pflanzen und dem beschriebenen Effekt in *D. melanogaster* der gleiche Mechanismus zugrunde liegt. Ebenso ist offen, wieso trDNA in manchen Fällen die Transkription von Genen zu stimulieren scheint, in anderem Kontext trDNA indes reprimierend wirkt.

Zielsetzung der Arbeit:

In dieser Arbeit werden verschiedene Eigenschaften von trDNA analysiert. Im ersten Teil der Arbeit soll die Stabilität von trDNA-Sequenzfamilien im transgenen Modellsystem untersucht werden. Dies erfolgt innerhalb eines Plasmidvektors in *Escherichia coli* und nach der Überführung der trDNA durch die P-Element-vermittelte Keimbahntransformation auch im Genom von *D. melanogaster*. Ziel ist es, Faktoren und Mechanismen zu finden, die die Stabilität von trDNA beeinflussen. Im zweiten Teil der Arbeit soll im *in vivo*-System *D. melanogaster* der Einfluß von repetitiven DNA-Elementen auf die Expression eines benachbarten Gens untersucht werden.

Besonders geeignet für die angestrebten Analysen sind gut charakterisierte trDNA-Sequenzfamilien, um Unterschiede in der Struktur der trDNAs mit möglichen Effekten korrelieren zu können. Die repetitiven DNA-Sequenzen der Zuckmücke *Chironomus* wurden bereits intensiv untersucht. Sie enthalten verschiedene DNA-Sequenzfamilien mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften.

Eigenschaften der verwendeten trDNA-Sequenzfamilien

Die tandem repetitiven **Cla-Elemente** sind nach ihrer charakteristischen Cla I Restriktionsschnittstelle benannt und haben einen hohen AT-Gehalt (> 80%). Eine Monomereinheit ist etwa 117 bp lang und weist eine leichte Krümmung der DNA-Helixachse auf. In der DNA-Sequenz jeder Wiederholungseinheit sind eine perfekte TATA-Box sowie CAAT-Boxen enthalten (Schmidt, 1981, 1984). Nahe verwandte Schwesterarten von *Chironomus* besitzen deutliche Unterschiede in der Kopienzahl dieser trDNA. So besitzt *C. thummi* mit 70.000 Kopien der Cla-Elemente etwa sechs mal mehr Kopien dieser Satelliten-DNA als die Schwesterart *C. piger* (Schaefer und Schmidt, 1981). Auch die Lokalisation der trDNA im jeweiligen Genom unterscheidet sich. In beiden Arten sind die Cla-Elemente bevorzugt im pericentrischen Heterochromatin lokalisiert. Ausschließlich in der Schwesterart *C. thummi* kommen Cla-Elemente in einer Vielzahl weiterer Loci auf den Chromosomenarmen vor, unter anderem auch im NTS der rDNA Gene (Schmidt, 1984; Schmidt und Godwin, 1983). Cla-Elemente sind im Genom von *Chironomus* instabil (Hankeln und Schmidt 1987; Hankeln et al., 1994). In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde ein 21 trDNA-Einheiten enthaltendes Cla-Element-Cluster aus *C. thummi* verwendet.

Die sogenannten **Alu-Elemente** kommen im Genom von *C. thummi* in ca. 10.000 Kopien vor (Hankeln, 1990). Eine Monomereinheit besitzt eine Länge von ca. 168 bp und wird durch eine charakteristische Alu I Restriktionsschnittstelle definiert. Die Alu-Elemente kommen ebenfalls in *C. piger* vor, aber ähnlich wie im Fall der Cla-Elemente ist die Kopienzahl in *C. thummi* um ein Vielfaches höher als in *C. piger*. Das hier verwendete trDNA-Cluster umfaßt acht Repetitionseinheiten mit einem AT-Gehalt von 72% (Mattausch, 1993). Im Gegensatz zu den Cla-Elementen ist das verwendete Alu-Octamer jedoch extrem stark gekrümmt (Mattausch, 1993) und stammt aus *C. piger* (Hankeln, 1990).

Im Vergleich zu den trDNAs aus *Chironomus* soll auch eine Satelliten-DNA aus *D. melanogaster* untersucht werden. Ausgewählt wurde eine mittelrepetitive Satelliten-DNA, die auf Grund ihrer Dichte bei der Cäsiumchlorid-Dichtezentrifugation **1,688-Satellit** genannt wird. Wenige dieser DNA-Elemente kommen vereinzelt in euchromatischen Bereichen des X-Chromosoms vor (DiBartolomeis et al., 1992). Ausgedehnte 1,688-Satelliten trDNA-Cluster scheinen hingegen auf das pericentrische Heterochromatin des X-Chromosoms beschränkt zu sein (Carlson und Brutlag, 1977). Diese Beschränkung der 1,688-Satelliten trDNA auf ein Chromosom unterscheidet sie von den trDNAs aus *Chironomus*. Eine Monomereinheit der 1,688-Satelliten trDNA hat eine Länge von 359 bp und einen AT-Gehalt von 69%. In den durchgeführten Experimenten wurde ein trDNA-Cluster mit 15 Repetitionseinheiten verwendet.

Nach Dorer und Henikoff (1994) reicht unter Umständen allein die tandem repetitive Anordnung beliebiger DNA-Abschnitte aus, um Auswirkungen auf die Genexpression (PEV) zu zeigen. Um dieses Modell zu testen, wurde eine artifizielle trDNA aus fünf bis zehn Kopien des **Hsp70 Promotors** aus *D. melanogaster* hergestellt. Eine Monomereinheit hat eine Länge von 386 bp mit einem AT-Gehalt von 58%. Der Promotor enthält eine TATA-Box, die Hsp Promotor-Konsensussequenz, mehrere "Hitzeschock Antwort Elemente" (HSE), mehrere GAGA-Boxen und den mRNA-Startpunkt des *Hsp70*-Gens (Lee et al., 1992; Shopland et al., 1995; Amin et al., 1994).

Stabilität der verschiedenen trDNA-Sequenzfamilien im transgenen Genom

Cluster dieser vier verschiedenen trDNA-Sequenzfamilien sollen auf ihre Stabilität im bakteriellen Klonierungsvektor in *E. coli* einerseits und als transgene DNA im Genom von *D. melanogaster* andererseits untersucht werden. Es gilt folgende Fragen zu beantworten:

- Sind die ausgewählten trDNA-Familien als Transgene stabil in *E. coli* und im Genom von *D. melanogaster*? Wodurch wird eine mögliche Instabilität beeinflusst?
 - Sind ausschließlich Eigenschaften der DNA-Sequenz wie der AT-Gehalt oder eine sequenzbedingte Krümmung der trDNA für die Stabilität wichtig, oder sind auch die flankierenden DNA-Sequenzen des Clusters von Bedeutung?
 - Ändert sich die Stabilität bei wechselnder Anordnung des trDNA-Clusters?
 - Ist die mögliche Instabilität die Folge einer Rekombination?

- Gibt es eine Korrelation zwischen der Instabilität von trDNA-Clustern in *E. coli* und *D. melanogaster*? Sind die Mechanismen der Instabilität in beiden Organismen vergleichbar?

Der Einfluß von trDNA auf die Expression eines benachbarten Gens

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt in der Untersuchung des Effekts von trDNA auf ein benachbartes Gen. Dazu werden trDNA-Cluster unterschiedlicher DNA-Sequenzfamilien mittels der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation (Spradling und Rubin, 1982; Rubin und Spradling, 1982) an verschiedenen chromosomalen Orten in das Genom von *D. melanogaster* integriert. Direkt benachbart zu dem jeweiligen trDNA-Cluster im Vektor ist das *miniwhite*-Gen unter Kontrolle des Hsp70 Promotors. Dadurch kann unmittelbar der Einfluß der trDNA auf die Transkription des *miniwhite*-Gens analysiert werden (s. Abb. 3).

Abb. 3: Effekt von trDNA auf die Expression eines Reportergens

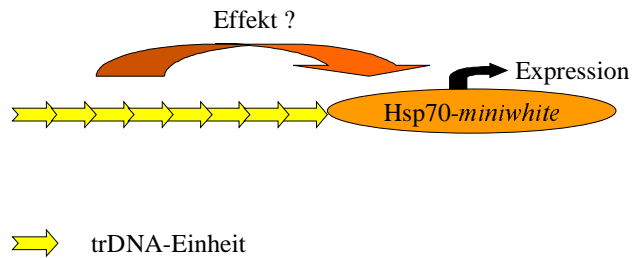


Abb. 3

Verschiedene trDNA-Cluster werden vor ein *miniwhite*-Gen unter Kontrolle eines Hsp70 Promotors kloniert. Es soll der Effekt der trDNA auf die Expression des Reportergens untersucht werden.

- Besonderes Interesse gilt der Frage, ob beliebige trDNA die Expression eines benachbarten Gens beeinflusst. Falls ein Effekt auftritt, wirkt dieser inhibitorisch oder stimulierend auf die Genexpression?
- Die DNA-Sequenz-Familien der Cla- und Alu-Elemente aus *Chironomus* unterscheiden sich sowohl in der DNA-Sequenz als auch in spezifischen Charakteristika, wie etwa in dem unterschiedlichen Grad ihrer Helix-Krümmung. Resultieren daraus verschiedene Effekte auf das benachbarte Gen? Auch Eigenschaften der DNA-Primärsequenz, wie etwa die TATA-Box oder die CAAT-Boxen in der DNA-Sequenz der Cla-Elemente, könnten einen Einfluß auf die Genexpression ausüben.
- Welchen Einfluß hat die Orientierung der trDNA auf die Expression des Reportergens? Hierzu sollen identische trDNA-Cluster in beiden Orientierungen relativ zum Reportergen auf ihren Einfluß auf die Expression untersucht werden.
- Wie wirken trDNA-Elemente mit bekannter Promotoraktivität auf die Expression eines benachbarten Gens? Dies soll mit künstlichen, tandem repetitiven Hsp70 Promotoren untersucht werden. Beeinflusst dabei die Anzahl der repetitiven Hsp70 Promotoren und die Orientierung derselben einen möglichen Effekt?

Es ist bekannt, daß Transgene mit identischer DNA-Sequenz in *D. melanogaster* an verschiedenen chromosomalen Orten unterschiedlich stark exprimiert werden (Spradling und Rubin, 1982; Rubin und Spradling, 1982). Die deutlichsten Effekte treten bei Transgenen auf, deren Integrationsort direkt im centromerischen oder telomerischen Heterochromatin liegt. Dort kann es zu einer völligen Unterdrückung der Expression des jeweiligen Gens kommen. Auch bei verschiedenen Integrationsorten im Euchromatin kann es zu Positionseffekten durch in der Nähe liegende DNA-Sequenzen kommen. Diese Einflüsse sollen ebenfalls untersucht werden, wozu die Erzeugung transgener Stämme mit unterschiedlichen Integrationsorten notwendig ist.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Verschiedene Stämme der Fruchtfliege *D. melanogaster* wurden vom Institut für Genetik, Abteilung Zellbiologie Universität Mainz zur Verfügung gestellt (s. Anhang). Alle Stämme wurden entweder bei 23°C oder bei 18°C in Massenkultur gehalten. Die Larvenanzucht erfolgte auf konventionellem Fliegenfutter (s. Anhang).

2.2 DNA-Isolation aus *D. melanogaster*-Larven und -Fliegen

Die Gewinnung von genomischer DNA aus *D. melanogaster* erfolgte mit einigen Modifikationen nach der Methode von Schmidt et al. (1980). Bis zu 100 Tiere wurden in 700 µl Homogenisierungspuffer und 1% TritonX-100 auf Eis in einem Glas-Teflon-Potter homogenisiert. Die Zellkerne wurden durch zehnmündige Zentrifugation bei 5000 Upm sedimentiert und in 200 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen. Die Lyse der Zellkerne erfolgte mit 0,1 Vol. 10xDialysepuffer und 0,1 Vol. 10% SDS-Lösung für eine Stunde bei 65°C. Nach der Zugabe von 0,1 Vol. gesättigter Tris-Lösung (pH 8,5) und 0,25 Vol. 5 M Natriumperchlorat wurde die DNA mehrfach mit Tris-gesättigtem Phenol (pH 7,6) und mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und mit 2 Vol. Ethanol bei -20°C gefällt.

2.3 Standardmethoden

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte für kleinere Mengen nach der Methode von He et al. (1989). Ansonsten wurde die von Clewell und Helinski (1969) entwickelte, durch Schmidt et al. (1982) modifizierte "cleared lysate"-Methode verwendet. Für die Fluoreszenz-markierte Sequenzierung und die P-Element-vermittelte Keimbahntransformation wurde Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979) präpariert, wobei der "QIAwell Plasmid Kit" (QIAGEN, Hilden) verwendet wurde.

Die Restriktion von genomischer oder Plasmid-DNA durch Endonukleasen sowie die Ligation von DNA-Molekülen erfolgte gemäß den Empfehlungen der Hersteller.

Die Fällung von DNA erfolgte unter Zugabe von 0,1 Vol. 10xDialysepuffer und 2 Vol. absoluten Ethanols für mindestens 15 min bei -20°C. Anschließend wurde die DNA für 20 min abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Fällungen von DNA, die zur Untersuchung des Krümmungsverhaltens bestimmt waren, wurden nicht getrocknet, um eine mögliche Denaturierung der DNA zu vermeiden.

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe von vertikalen, 0,8 bis 1,4% Agarosegelen durchgeführt. Die DNA-Proben wurden zuvor mit 0,2 Vol. DNA-Stop-Puffer versetzt. Als Elektrophoresepuffer dienten entweder 1xTBE- oder 1xE-Puffer. Die Agarosegele wurden anschließend in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und unter UV-Licht mit einer digitalen Kamera aufgenommen. Als Molekulargewichtstandards dienten mit Hind III restringierte Lambda-DNA und mit Eco RI / Hind III restringierte pF-DNA.

Die Wiedergewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte entweder durch Elektroelution (McDonnell et al., 1977) oder mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraktion Kit" (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988) erfolgte in 50 µl Ansätzen mit 50 ng genomischer DNA (bzw. 10 ng Plasmid-DNA), 1xTaq-Puffer, je 500 ng Primer, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U Taq-Polymerase. Vor Zugabe der Primer, dNTPs und der Taq-Polymerase wurde die DNA für 3 min bei 96°C denaturiert und in Eiswasser überführt. Die Amplifikation erfolgte im Standardfall in dem Thermocycler PTC-200 (MJ Research, USA) unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung: 94°C 1 min,
Primer-Anlagerung: 57°C 1:15 min,
Strangverlängerung: 72°C 2 min;
33 Zyklen.

Für die Amplifikationen aus dem Plasmidvektor pUC18 wurden die Primer universal (GTAAAACGACGGCCAGT) und reverse (CAGGAAACAGCTATGAC) verwendet, für den Plasmidvektor pW8 die Primer polyC (ATGCGTCGTTTAGAGCAG) und polyD (CGAATAGAGAATAACGGG). Um Hsp70 Promotor-Einheiten zu amplifizieren, wurden Primer mit Xba I Restriktionsschnittstellen innerhalb der DNA-Sequenz verwendet, auf der 5'-Seite des Hsp70 Promotors Hsp-C (CGAGATCTCCGTTATTCTCTATTTCG) und auf der 3'-Seite des Promotors Hsp-D (GCTCTAGACCTATTCAGAGTTCTC).

Die Amplifikation von größeren Fragmenten aus genomischer DNA wurde mit Hilfe des "Expand™ Long Template PCR"-Systems (Boehringer Mannheim) nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden zwei Primer innerhalb des Vektors pW8 verwendet, auf der 5'-Seite der Primer HspXL1 (TTGTTGAGAGGAAAGGTTGTGTG) und auf der 3'-Seite der Primer HspXL2 (AACTGAAGGCGGACATTGACG) oder der Primer Droso2 (TGGTTAATGCAGCTCTGC).

Zur Überprüfung der Amplifikation wurden 0,1 Vol. des Reaktionsansatzes gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des "QIAquick PCR Purification Kit" (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt und anschließend kloniert oder direkt sequenziert.

2.5 Klonierung von DNA in Plasmidvektoren

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurde der Plasmidvektor pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985) oder der P-Element-Transformationsvektor pW8 (Klemenz et al., 1987) verwendet. Der Plasmidvektor pUC18 kodiert für einen Teil der β -Galaktosidase (*lacZ*'-Gen). Die Klonierung von DNA-Fragmenten in pUC18 zerstört dieses Gen und verhindert im *E. coli*-Stamm RR1ΔM15 (Rüther, 1982) eine α -Komplementation des *lacZ*-Gens (Langley et al., 1975). Dies ermöglicht eine Farbselektion rekombinanter Bakterien auf IPTG / X-Gal-haltigen Nährböden.

Restriktionsfragmente mit nichtkompatiblen Enden sowie die Enden von PCR-Produkten wurden durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt (Sambrook und Gething, 1989).

Die Ligation erfolgte in der Regel mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) über Nacht bei 4°C. Der Ligationsansatz wurde anschließend mit Hilfe des "QIAquick Purification Kit" (QIAGEN, Hilden) gereinigt.

Die Transformation der Bakterien erfolgte entweder durch eine modifizierte CaCl₂-Methode (Mandel und Higa, 1970) oder durch Elektroporation (1500-2000 Volt, 5 msec Impulsdauer). Für die Herstellung von elektrokompenten Bakterien wurden 2 ml einer Übernachtskultur in 500 ml L-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀= 0,6-0,8 bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (4000 x g, 15 min, 4°C) und mehrmals mit 100 ml eiskaltem A. bidest. gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte mit eiskaltem A. bidest. / 10% Glycerin. Das Bakterienpellet wurde schließlich in 1 Vol. eiskaltem A. bidest. / 10% Glycerin resuspendiert, in 50 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die elektrokompenten Bakterien wurden bei -70°C gelagert. Die Selektion positiver Klone erfolgte durch eine Restriktionsanalyse oder eine Koloniefilterhybridisierung (s. 2.7.2). Die ausgewählten Bakterienklone wurden in einem Gemisch aus Glycerin und 2xL-Medium (1:1) bei -20°C als Dauerkultur aufbewahrt.

2.6 DNA-Markierung

2.6.1 Random-primed oligo-labeling

Die Herstellung radioaktiv- oder Digoxigenin-markierter DNA-Sonden erfolgte nach einer von Feinberg und Vogelstein (1983) entwickelten Technik mit Hilfe von Markierungssystemen der Firma Boehringer (Mannheim). Diese Methode beruht auf der enzymatischen Synthese eines DNA-Strangs in Anwesenheit markierter dNTPs. Die Markierungsreaktionen wurden nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Für die radioaktive Markierung wurden 35-50 µCi α³²P-dATP (≥ 3000 Ci/mmol) eingesetzt. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden durch Fällung der DNA entfernt. Die nichtradioaktive Markierung erfolgte mit 0,3 mM Digoxigenin-11-dUTP nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim).

2.6.2 Nick-translation

Bei dieser von Macgregor und Mizuno (1976) beschriebenen Methode werden die durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I entstehenden einzelsträngigen DNA-Bereiche durch Einbau z. T. markierter Nukleotide zum Doppelstrang ergänzt. Die Markierungsreaktion wurde unter Verwendung des BioNick™-Labeling Systems der Firma Gibco BRL Life Technologies GmbH (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Eingesetzt wurden dabei 10 mM Biotin-14-dATP.

2.7 Hybridisierungstechniken

2.7.1 Southern-Hybridisierung

In Anlehnung an die von Southern (1975) entwickelte Methode wurden DNA-Restriktionsfragmente aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter transferiert und anschließend mit radioaktiv-markierter DNA hybridisiert. Um einen besseren Transfer großer DNA-Fragmente zu erreichen, wurden die Agarosegele teilweise 20 min mit 0,25 N HCl behandelt. Die DNA wurde durch eine zweistündige Inkubation bei 80°C auf dem Nitrozellulosefilter fixiert. Nach der Präinkubation in 2xPM / 6xSSC / 1% SDS nach Denhardt (1966) folgte die Hybridisierung der Filter mit einer radioaktiv-markierten Sonde in 1xPM / 3xSSC / 0,5% SDS bei 65°C über Nacht. Anschließend wurden die Filter für 2-3 Stunden in 2xSSC bei 65°C gewaschen. Die Autoradiographie erfolgte unter Verwendung von Verstärkerfolien (Dupont cronex Hi-Plus, Dr. Groos-Suprema) und Kodak AR-Röntgen-filmen bei -70°C.

2.7.2 Koloniefilter-Hybridisierung

Zur Identifizierung von Bakterienklonen, die das gewünschte rekombinante Plasmid tragen, wurde die von Grunstein und Hogness (1975) beschriebene Koloniefilterhybridisierung durchgeführt. Die Bakterienkolonien wurden dazu in identischer Weise auf zwei Nitrozellulosefilter überimpft, die auf ampicillinhaltigen (100 µg/ml) Agarplatten über Nacht bei 37°C angezüchtet wurden. Einer der Filter wurde mit 0,5 M NaOH denaturiert (7 min) und anschließend mit 1,5 M Tris-HCl (pH 7,4) neutralisiert (5 min). Der Nitrozellulosefilter wurde 5 min in 0,5 M Tris / 1,5 M NaCl (pH 7,4) inkubiert und

getrocknet. Es folgte ein Abbau der bakteriellen Proteine durch Proteinase K (1 mg/ml in 1xSSC). Um die Reaktion abzubrechen, wurde der Filter in Ethanol getaucht. Nach weiterer Inkubation in 0,3 M NaCl (5 min) wurden die Bakterienreste durch Pressen zwischen zwei Filterbögen entfernt. Nach dem Fixieren der DNA für 2 Stunden bei 80°C erfolgte die Präinkubation und Hybridisierung wie unter 2.7.1 beschrieben.

2.7.3 *In situ* Hybridisierung

Die Lokalisierung spezifischer DNA-Sequenzen auf den Polytänochrosomen von *D. melanogaster* erfolgte mit Hilfe der FISH-Technik ("fluorescence *in situ* hybridization"). Speicheldrüsenquetschpräparate von *D. melanogaster* (3. Larvenstadium) wurden nach der Vorschrift von Pardue und Gall (1975) angefertigt. Nach der Präparation wurden die Polytänochrosomen hitzestabilisiert (Bonner und Pardue, 1976) und für 50 sec mit 0,1 M NaOH denaturiert (Singh et al., 1977). Die Hybridisierung der Chromosomen mit Biotin- oder Digoxigenin-markierten DNA-Sonden (s. 2.6.1 und 2.6.2) und die nachfolgende immunologische Detektion erfolgten nach der von Langer-Safer et al. (1982) beschriebenen und von Schmidt et al. (1992) optimierten Methode. Die Präparate wurden mit einem Gemisch aus p-Phenyldiamin und Glycerin überschichtet. Abbildungen der Präparate wurden an dem Leitz Aristoplan-Photomikroskop (Film Ilford HP5) bzw. mit der digitalen SenSynTM-Kamera (Photometrics, München) aufgenommen. Um beide Signale gleichzeitig betrachten zu können, wurde ein spezieller Filter verwendet (Omega-Filter, Brattleboro, USA). Die Bildverarbeitung erfolgte mit den Programmen "IPLabTM Spectrum version 3.0.1" (Signal Analytics Corporation, USA) und "Adobe Photoshop 4.0" (Adobe Systems Inc., USA) für Macintosh Power PCs.

2.8 Untersuchung der DNA-Krümmung

Zur indirekten Untersuchung von DNA-Krümmungen eignet sich ein Migrationstest auf nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen (11,5 cm Länge, 1 mm Dicke) nach Diekmann (1989). Gleiche DNA-Mengen bekannter Länge wurden unter Bedingungen in den Gelen aufgetrennt, die die sequenzbedingte Krümmung stabilisieren oder aufheben. Über den Unterschied im Laufverhalten der DNA-Moleküle konnte der Krümmungsgrad abgeschätzt werden. Als Maß des unterschiedlichen Migrationsverhaltens gekrümmter DNA dient der Gelretardierungsfaktor k , gebildet aus dem

Quotienten des apparenten Molekulargewichts zum realen Molekulargewicht (Diekmann, 1986). Die Gelelektrophorese erfolgte auf einem 10% Polyacrylamidgel bei einem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 60 zu 1. Für die Polymerisation wurden 11 µl TEMED und 112 µl 10% APS eingesetzt. Als Laufmittel wurde 1xTBE verwendet, und als Molekulargewichtsstandard dienten multiple DNA-Fragmente eines 123-bp-Fragments (Gibco BRL, Eggenstein). Die DNA-Krümmung wurde durch eine Elektrophorese bei 4°C stabilisiert. Eine Aufhebung der Krümmung wurde durch Zusatz von Ethidiumbromid (1 µg/ml) in den Elektrophoresepuffer, die Gellösung und die Proben sowie durch eine Elektrophorese bei Raumtemperatur erreicht (Diekmann und Wang, 1985). Die angelegte Stromstärke betrug 250 mA bei einer Spannung von 56 V.

2.9 Automatische DNA-Sequenzierung

Die auf der von Sanger et al. (1977) entwickelten Kettenabbruch-Methode beruhende automatische DNA-Sequenzierung wurde mit den Sequenziergeräten 373 *stretch* und PRISM™ 377 der Firma ABI (Weiterstadt) durchgeführt. Als Matrize dienten dabei sowohl superzirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (s. 2.3) als auch gereinigte PCR-Produkte. Für die Sequenzierungsreaktion wurden den Angaben des Herstellers folgend etwa 1-2 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 10 µl auf Eis mit 10 pmol Primer und 9 µl Reaktions-Mix (5xTACS-Puffer, dNTP-Mix, DyeDeoxy™-Terminatoren, AmpliTaq DNA-Polymerase) gemischt. Die Sequenzierung erfolgte als lineare DNA-Amplifikation durch "cycle sequencing". Verwendet wurden dabei der "PRISM™ Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) und der "Thermo Sequenase™ Dye Terminator Cycle Sequencing Pre-Mix Kit" (Amersham Life Science Inc., USA). Um auch bei langer Leseweite noch gute Signalstärken zu erzielen, wurde der "ABI PRISM™ Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte in der Regel nach dem Standardprotokoll (0:15 min 96°C, 4 min 55°C; 25 Zyklen) den Angaben des Herstellers folgend. Als Primer (10 pmol je Ansatz) dienten entweder die Standardprimer universal und reverse oder aber sequenzspezifische Oligonukleotide. Die Aufreinigung der Sequenzierproben sowie die Vorbereitung der Sequenzgele und die Gelelektrophorese erfolgten nach den Empfehlungen der Hersteller.

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der 373A-Software für Apple Macintosh-Computer (ABI, Weiterstadt) sowie mit der "Lasergene Sequence Analysis Software" (DNASTAR Inc., USA). Das Zusammenfügen von Einzelsequenzen erfolgte mit

dem Programm "Sequencher™ 4.0" (Gene Codes Corporation, USA) oder mit dem Programm "Sequed" (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt).

2.10 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation

Die P-Element-vermittelte Keimbahntransformation erlaubt die stabile Integration von nahezu beliebigen DNA-Sequenzen in das Genom von *D. melanogaster* (Spradling und Rubin, 1982; Rubin und Spradling, 1982). Die Methode beruht auf den Eigenschaften der transponierbaren P-Elemente, die unter Anwesenheit der P-Element-Transposase in den Keimzellen von M-Stämmen (besitzen keine P-Element) in das Genom integrieren können (Übersicht in: Engels, 1989). Die Transposase wird von den P-Elementen selbst kodiert und keimzellspezifisch exprimiert (Laski et al., 1986). Der Plasmidvektor pW8, der für die Keimbahntransformation eingesetzt wurde, besteht aus einem unvollständigen P-Element. Dem Plasmidvektor pW8 fehlt die kodierende DNA-Sequenz für die Transposase des P-Elements, er besitzt jedoch die invertierten Wiederholungseinheiten, die der P-Element-Transposase als Zielsequenzen dienen (s. Abb. 4). Ausschließlich die DNA-Sequenzen zwischen den invertierten Wiederholungseinheiten werden in das Genom von *D. melanogaster* integriert. Das ebenfalls injizierte Helfer-P-Element $\rho\pi 25.7wc$ (Karess und Rubin, 1984) produziert in den Keimzellen entsprechender Wirtsstämme die notwendige Transposase, kann aber auf Grund von einer Mutation in den invertierten Wiederholungseinheiten selbst nicht in das Genom integrieren ($wc =$ "wings clipped"). Vor der Keimzellbildung werden pW8-Vektor und Helfer-P-Element zusammen in *Drosophila*-Embryonen injiziert. Gelangen beide Plasmide in die sich bildenden Keimzellen, kommt es zur Produktion der Transposase durch das Helfer-P-Element. Die P-Element-Transposase integriert die DNA-Sequenzen aus dem Vektor pW8, die zwischen den invertierten Wiederholungseinheiten liegen, stabil in das Genom von *D. melanogaster* (Übersicht in: Karess et al., 1985). Als Markergen für transgene Tiere wird das *white*-Gen aus *D. melanogaster* verwendet (O'Hare et al., 1984), das die Augenfarbe von *D. melanogaster* beeinflusst. In den entsprechenden *white*⁻-Rezipientenstamm (weiße Augen) überführt, kommt es (auch in heterozygoten Tieren) zu einer Rekonstitution der hellroten Augenfarbe in transgenen Tieren.

Abb. 4: P-Element-vermittelte Keimbahntransformation

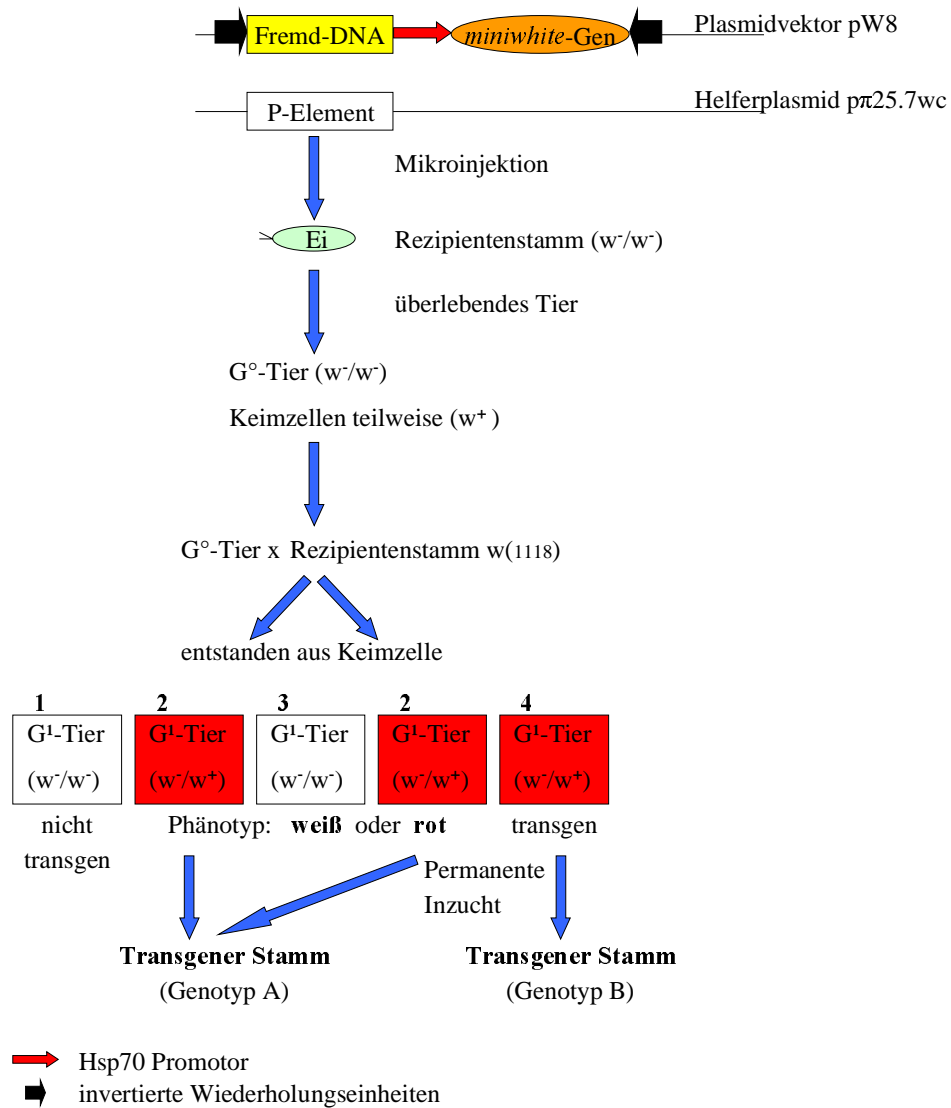


Abb. 4

Im Verlauf der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation wurden zwei Plasmide mikroiinjiziert. Ausschließlich die DNA-Sequenzen zwischen den invertierten Wiederholungseinheiten wurden in das Genom von *D. melanogaster* integriert. Überlebende Tiere der G⁰-Generation mit erfolgreicher Integration der Fremd-DNA sind nur in den Keimzellen heterozygot für das Transgen. Dabei ist es möglich, daß verschiedene Keimzellen innerhalb eines Embryos in unabhängigen Integrationsereignissen transformiert werden. Alle Tiere der G⁰-Generation wurden mit dem Rezipientenstamm (w¹¹¹⁸) rückgekreuzt. In der G¹-Generation waren transgene Tiere an der Expression des *miniwhite*-Reportergens erkennbar, was zu einer hellroten Augenfarbe der transgenen Tiere führte. Aus einem injizierten Embryo ist in der Regel ein transgener Stamm entstanden. In einem Fall jedoch sind aus einem Embryo mehrere genotypisch verschiedene transgene Stämme hervorgegangen, da die transgenen Tiere aus genotypisch verschiedenen Keimzellen entstanden sind. w für *miniwhite*-Reportergen.

2.10.1 Vorbereitung der DNA für die Mikroinjektion

Sowohl die rekombinante Plasmid-DNA als auch das Helfer-P-Element (p π 25.7wc) wurde entsprechend der Methode in 2.3 beschrieben isoliert. Die Injektionslösung enthielt 900 μ g/ml der Plasmid-DNA und 100 μ g/ml des Helfer-P-Elements in einem Injektionspuffer aus 5 mM KCl und 0,1 M Na-Phosphat (pH 6,8).

2.10.2 Vorbereitung der Injektionsnadel

Die Injektionsnadeln wurden auf einem Kapillarenziehgerät der Firma Leitz (Wetzlar) ausgezogen und anschließend mit einer Schleifscheibe poliert. Verwendet wurden Glaskapillaren aus Sodaglas mit einem Außendurchmesser von 1 mm, einer Wanddicke von 0,1 mm und einer Länge von 90 mm.

2.10.3 Vorbereitung der Embryonen

Als Rezipientenstamm diente der Stamm w(1118) (s. Anhang) Die Eiablage erfolgte auf Apfelagarplatten mit einer dünnen Schicht aus Trockenhefe bei 25°C für 20 min im Dunkeln. Die Embryonen wurden gesammelt, mit Wasser gewaschen und das Chorion durch Behandlung mit 3% Natriumhypochlorid (1 min) entfernt. Die Eier wurden erneut mit Wasser gewaschen, auf ein doppelseitiges Klebeband (Scotch) übertragen und für 45 Sekunden bei Raumtemperatur getrocknet. Um ein weiteres Austrocknen der Eier während der Injektion zu verhindern, wurden die Eier mit 10S Voltaleff-Öl der Firma Atochem überschichtet.

2.10.4 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion der Plasmid-DNA in die Keimbahn von *Drosophila* wurde entsprechend der Beschreibung von Karess (1985) durchgeführt. Die Injektion erfolgte bei 160facher Vergrößerung an einem Zeiss-Mikroskop. Injiziert wurden ausschließlich Tiere, die sich im Blastodermstadium befanden. Tiere, die durch die Injektion stark geschädigt erschienen, wurden entfernt, während die übrigen Embryonen in 10S Voltaleff-Öl bei 25°C in einer feuchten Kammer für ein bis zwei Tage inkubiert wurden.

2.10.5 Selektion transgener Tiere und Stammanzucht

Bis zu zehn geschlüpfte Larven (G°) wurden in Futterröhrchen übertragen. Adulte Fliegen wurden einzeln angezüchtet und mit jeweils drei Tieren des Rezipientenstamms (w1118) gekreuzt. Die transgenen Nachkommen (G^1) dieser Kreuzung konnten auf Grund ihrer hellroten Augenfarbe isoliert werden. Jedes transgene Tier wurde erneut mit jeweils drei Tieren des Rezipientenstamms (w1118) gekreuzt. Die transgenen Tiere dieser Kreuzung (G^2) wurden untereinander gekreuzt, um homozygote Stämme zu erhalten. Teilweise wurden für das Transgen heterozygote Stämme hergestellt, die auf dem zum Transgen homologen Chromosom einen "balancer" enthielten.

Der Stamm-Name der verschiedenen transgenen Stämme erklärt sich wie folgt: Die vorderen Zeichen stehen für das Transgen (CT oder 2Cl_a für Cl_a-Elemente, Alu für Alu-Elemente, 5H, 8H oder Hsp für Hsp70 Promotoren), während die erste Ziffer danach eine laufende Nummer ist, die der ersten überlebenden Generation nach der Injektion (G°) gegeben wurde. Falls verschiedene Stämme oder Populationen aus einer überlebenden Fliege entstanden sind (G^2), wurde dem Namen ein Buchstabe hinzugefügt. Die letzte Ziffer im Namen (abgetrennt durch einen Punkt) bezeichnet die Generation nach der Etablierung des Fliegenstamms.

2.10.6 PCR-Test zur Identifikation transgener Tiere

Um transgene Tiere unabhängig von der Expression des *miniwhite*-Reportergens als transgene Tiere nachweisen zu können, wurde eine PCR-Analyse von potentiellen transgenen Tieren durchgeführt. Aus einer Population von bis zu 80 Tieren wurde genomische DNA extrahiert (s. 2.2). Transgene Tiere zeichnen sich durch die Integration von DNA-Sequenzen des pW8 Vektors aus. Zwei vektorspezifische Primer, D1 (AGTTGCACTTTGTCAGCG) und D2 (TGGTTAATGCAGCTCTGC), führen in einer PCR-Analyse an transgenen Tieren zu der Amplifikation eines 684 bp langen DNA-Fragments. Kontrollexperimente zeigten, daß sich in einer DNA-Extraktion aus 80 nicht-transgenen Tieren ein einzelnes transgenes Tier nachweisen läßt. Als positive Kontrolle der PCR diente die Amplifikation eines 423 bp langen DNA-Fragments zwischen den Genen *DmX* und *SpX* (Datenbankeinträge: "Accession"-Nummer für *DmX* "X97196" und für *SpX* "X97197") aus *D. melanogaster*. Dazu wurden die Primer Y23 (GCGTCTCCCAAGTGGTGC) und X27 (AAATACGGTTACTCCAATTAAC) verwendet.

2.11 Kreuzungen zur Transposition von Transgenen

Um unterschiedliche Stämme mit identischen Transgenen in verschiedenen chromosomalen Regionen zu erhalten, wurden in drei Stämmen die jeweiligen Transgene ($P(tr-w^+)$) mobilisiert. Diese Stämme waren für das Transgen homozygot und hatten eine Integration des Transgens entweder auf dem X-Chromosom oder auf dem zweiten Chromosom. Für die Mobilisierung wurde das Gen für die P-Element-Transposase in den jeweiligen Stamm eingekreuzt. Als Quelle für das Transposase-Gen diente der Stamm $P(\Delta 23)$ (s. Anhang). Die Transposase führte ausschließlich zu der Mobilisierung der DNA-Sequenzen, die zwischen den invertierten Wiederholungseinheiten des P-Elements lagen.

Kreuzungsschema für Stämme mit X-chromosomalem Transgen:

1. Kreuzung des Stamms mit dem Stamm $P(\Delta 23)$:

$P(tr-w^+)/P(tr-w^+); +/+; +/+ \quad \times \quad +/Y; sp/CyO; TM6b/Sb, P(\Delta 23)$

2. Rückkreuzung des folgenden Phänotyps mit dem Rezipientenstamm:

$P(tr-w^+)/Y; +/CyO; +/Sb, P(\Delta 23) \quad \times \quad w^-/w^-$

(das Transposase-Gen $P(\Delta 23)$ befindet sich im Genom der Fliegen)

3. Erfolgreiche Mobilisierungen waren am folgenden Phänotyp erkennbar:

w^-/Y , mit roten Augen $P(tr-w^+)$ und keinem "Sb-Phänotyp"

(das Transgen ist nicht mehr auf dem X-Chromosom; das Transposase-Gen befindet sich nicht mehr im Genom der Fliegen, da der "Sb-Phänotyp" fehlt)

4. Etablierung von homozygoten Stämmen mit veränderter Lokalisation des Transgens.

Kreuzungsschema für Stämme mit einem Transgen auf dem zweiten Chromosom:

1. Kreuzung des Stamms mit dem Stamm $P(\Delta 23)$:

$w^-/w^-; P(tr-w^+)/P(tr-w^+); +/+ \quad \times \quad +/Y; sp/CyO; TM6b/Sb, P(\Delta 23)$

(das Transposase-Gen $P(\Delta 23)$ befindet sich im Genom der Fliegen)

2. Rückkreuzung des folgenden Phänotyps mit dem Rezipientenstamm:

$w^-/Y; P(tr-w^+)/CyO; +/Sb, P(\Delta 23) \quad \times \quad w^-/w^-$

3. Erfolgreiche Mobilisierungen waren am folgenden Phänotyp erkennbar:

$w^-/Y; +/CyO$ mit roten Augen $P(tr-w^+)$ und keinem "Sb-Phänotyp"

(das Transgen ist nicht mehr auf dem zweiten Chromosom; das Transposase-Gen befindet sich nicht mehr im Genom der Fliegen, da der "Sb-Phänotyp" fehlt)

4. Etablierung von homozygoten Stämmen mit veränderter Lokalisation des Transgens.

Die Lokalisation der Transgene in einer neuen Chromosomenregion wurde mittels FISH-Analysen durchgeführt (s. 2.7.3). Die chromosomale Organisation der Transgene wurde mit PCR-Analysen (s. 2.4) und anschließender DNA-Sequenzierung (s. 2.9) aufgeklärt.

2.12 Messung des Pigmentgehalts Drosoplerin

Das Pigment Drosoplerin aus den Fliegenaugen wurde nach der Methode von Evans und Howells (1978) extrahiert. Zehn bis zwanzig Fliegen, deren Nachkommen für eine Pigmentmessung bestimmt waren, wurden unter Standardbedingungen bei 23°C angezogen. Wenn nicht anders angegeben wurden für die Messung hemizygot, männliche Tiere im Alter von zwei bis fünf Stunden verwendet. Die Köpfe von vier bis zehn Fliegen wurden in einem Gemisch aus 200 µl Chloroform und 200 µl Ammoniumhydroxid (0,1%) in einem Teflon-Potter homogenisiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 8000 Upm wurden 100 µl des Überstandes abgenommen und die OD bei 485 nm bestimmt. Jede Messung wurde fünf mal wiederholt und der Mittelwert der Messungen ermittelt. Der molare Extinktionskoeffizient für Drosoplerin beträgt bei 485nm, $\epsilon = 25.000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Als Leerwert aller Messungen wurde Ammoniumhydroxid (0,1%) verwendet. Als negative Kontrolle aller Messungen wurde eine Extraktion aus zehn Köpfen des Stamms w(1118) (weiße Augen) verwendet.

2.13 Anhang

2.13.1 *E. coli*-Stämme

RRI: = HB101 [*supE44*, *ara14*, *galK2*, *lacY1*, $\Delta(\text{gpt-proA})62$, *rpsL20*, (Str^R), *xyl-5*, *mtl-1*, *recA13*, $\Delta(\text{mcrC-mrr})$, *HsdS*⁻(*r⁻ m⁻*)] *recA*⁺ (Maniatis et al., 1982).
HB101: = *supE44*, *ara14*, *galK2*, *lacY1*, $\Delta(\text{gpt-proA})62$, *rpsL20*, (Str^R), *xyl-5*, *mtl-1*, *recA13*, $\Delta(\text{mcrC-mrr})$, *HsdS*⁻(*r⁻ m⁻*) (Maniatis et al., 1982).
SURE: = *e14*⁻(*McrA*⁻), $\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})171$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, *recB*, *recJ*, *sbcC*, *umuC::Tn5*, (Kan^R), *uvrC*, [*F'* *proAB lacI^qZM15* Tn10 (Tet^R)] (Greener A., 1990).

2.13.2 *D. melanogaster*-Stämme

W(1118):	= (w^-/w^- ; +/+; +/+)	(Lindsley und Zimm, 1992)
Bal(4):	= (w^-/w^- ; Pm/CyO; CxD/TM6b)	(Vef, 1999)
P(Δ 23):	= (w^-/w^- ; sp/CyO; TM6b/Sb, P(Δ 23))	(Robertson et al., 1988)
Su(UR)ES	= (In(1)scv2)	(Belyaeva et al., 1998)
dackel, 457, 632, 802, 805:	= P(w^+)	(Vef, 1991)
lac1, lac2, lac3, lac22a, lac32:=	P(w^+)	(Weil, 1999)
Neue Stämme dieser Arbeit	= P(tr- w^+)	(s. Tabelle 4)

Die verwendeten Markerchromosomen mit entsprechenden Phänotypen sind bei Lindsley und Zimm (1992) beschrieben.

2.13.3 Nährmedien

Agar-Platten (nach Bedarf)	1,5% (w/v) Agar-Agar (Ampicillin 100 μ g/ml) (X-Gal 0,01% (w/v), IPTG 0,2 mM)
Apfelagarplatten	1 g Agar-Agar in 1 l Apfelsaft
<i>Drosophila</i> -Futter	216 g Agar in 10 l Wasser kochen 480 g Hefeflocken 130 g Sojamehl 2420g Maisgrieß in 5 l Wasser kochen 2160 g Malzextrakt 1080 g Sirup in 10,5 l Wasser kochen 50 g Nipagin 120 ml Propionsäure in 2 l Wasser
L-Medium (= TBY-Medium)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml A. bidest.

2.13.4 Puffer und Lösungen

Denaturierungslösung (Blot)	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Denaturierungslösung (Plaque-Filter)	0,1 N NaOH 1,5 N NaCl
Dialyse-Puffer (10x)	0,025 M Tris 0,3 M NaCl 0,01 M Na ₂ EDTA
DNA-Stop-Puffer	4 M Harnstoff 0,1 M Na ₂ EDTA 0,1% Bromphenolblau 50% Saccharose
dNTP-Mix (Fluoreszenz-markierte Sequenzierung)	750 µM dITP 150 µM dATP 150 µM dTTP 150 µM dCTP
Elektrophoresepuffer (= 1xE-Puffer)	36 M Tris 3 M NaHPO ₄ x 2H ₂ O 1 M Na ₂ EDTA
Ethidiumbromid-Färbelösung	5 µg Ethidiumbromid/ml in 1xE-Puffer
Formamid-Bromphenolblau-Lösung	80% (v/v) Formamid 50 mM Tris-Borat pH 8,3 1 mM Na ₂ EDTA 0,1% (w/v) Xylencyanol FF 0,1% (w/v) Bromphenolblau
Homogenisierungspuffer	50 g Saccharose 1 ml 0,1 M Na ₂ EDTA pH 7,4 2,5 ml 0,1 M Na ₂ EGTA pH 7,4 50 ml Stock A ad 500 ml A. bidest.
Loading Buffer (DNA-Sequenzierung)	500 µl Formamid (deionisiert) 100 µl 10xMOPS-Puffer 150 µl Formaldehyd (filtriert)
Neutralisierungslösung (Blot)	3 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
Neutralisierungslösung (Plaque-Filter)	0,2 M Tris-HCl pH 7,4 in 2xSSC

PBS	2% (w/v) NaCl 0,05% (w/v) KCl 0,05% (w/v) KH ₂ PO ₄ 0,278% (w/v) Na ₂ HPO ₄
Präinkubationsmedium (= 2xPM)	0,02% (w/v) Ficoll 400 0,02% (w/v) Polyvinylpyrrolidon 0,02% (w/v) BSA in 3xSSC
Premix (DNA-Sequenzierung)	4 µl 5xTACS-Puffer 1 µl dNTP-Mix 1 µl 900 µM DyeDeoxy A 1 µl 450 µM DyeDeoxy T 1 µl 15 µM DyeDeoxy G 1 µl 4 µM DyeDeoxy C 0,5 µl (4U) AmpliTaq DNA-Polymerase
SDS-Mix	2,5% (w/v) Natriumlaurylsulphat (= SDS) 0,25 M EDTA 0,5 M Tris-HCl pH 8,0
Standard-Saline-Citratpuffer (= 1xSSC)	0,15 M NaCl 0,015 M Natriumcitrat
Stock A	150 ml 2 M KCl 37,5 ml 2 M NaCl 7,5 ml 0,1 M Spermin 25 ml 0,1 M Spermidin 75 ml Tris 25 ml A. bidest.
Taq-Puffer (10x)	0,4 M KCl 0,1 M Tris-HCl pH 8,3 15 mM MgCl ₂
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM Na ₂ EDTA
Terminator Ammonium Cycle Sequencing (= 5xTACS)	400 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 9,0
Tris-Borat-Elektrophoresepuffer (= 1xTBE)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na ₂ EDTA
Tris-EDTA-Lithiumchlorid-Triton-X-Puffer (= TELT)	50 mM Tris-HCl 62 mM Na ₂ EDTA 2,5 M LiCl 4% (w/v) TritonX-100
TritonX-Mix	50 mM Tris-HCl pH 8,0 62,5 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 0,2% (v/v) TritonX-100

2.13.5 Bezugsquellen

Es wurden Restriktionsenzyme der Firmen Amersham Life Science, Inc. (USA), Boehringer (Mannheim), EuroGentec (Belgien), Gibco BRL (Karlsruhe), Pharmacia (Freiburg) und Stratagene (Heidelberg) eingesetzt. Chemikalien wurden von den Firmen: Difco (USA), Fluka AG (Schweiz), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de-Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (USA) bezogen.

Weitere Bezugsquellen:

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Riedel-de-Haën, Seelze
Agarose No. A-6877	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
APS	International Biotechnologies, USA
Ampicillin	Hoechst AG, Frankfurt
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP	ICN, Meckenheim
Bacto-Hefeextrakt	Difco, USA
Bacto-Trypton	Difco, USA
Dialyseschläuche	Medicell, London
DNase I	Sigma, USA
IPTG	Biomol, Hamburg
Klenow-Enzym	Boehringer, Mannheim
Lysozym	Serva, Heidelberg
Mineralöl	Sigma, USA
3 MM-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Nitrozellulose-Filter	Schleicher & Schüll, Dassel
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, USA
RNase A	Serva, Heidelberg
Röntgenfilm (X-O-MAT AR)	Kodak
Röntgenfilmentwicklerkonzentrat	Adefo, Nürnberg
Röntgenfilmfixiererkonzentrat	Adefo, Nürnberg
Rinderserumalbumin	Sigma, USA
Verstärkerfolie (Cronex Hi-Plus)	Dupon; Goos-Suprema, Heidelberg
X-Gal	Boehringer, Mannheim

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung und Charakterisierung tandem repetitiver DNA

Für die Stabilitätsuntersuchungen in *E. coli* und zur Transformation der trDNA-Cluster in das Genom von *D. melanogaster* wurde der P-Element-Transformationsvektor pW8 verwendet (s. Abb. 5). Die verschiedenen trDNAs aus *C. thummi*, *C. piger* und *D. melanogaster* wurden jeweils in die Stu I Restriktionsschnittstelle im Polylinkers des Vektors einkloniert.

Abb. 5: Der Klonierungsvektor pW8

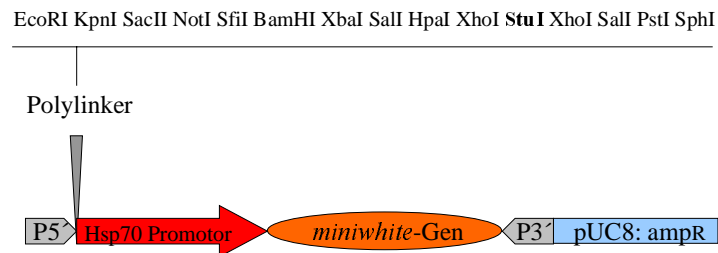


Abb. 5

Der Transformationsvektor pW8 ist 8362 bp lang. Die DNA-Elemente P5' und P3' enthalten invertierte Wiederholungseinheiten und dienen der P-Element-Transposase aus *D. melanogaster* als Erkennungsstellen für die Transposition dieser und der dazwischen liegenden DNA-Sequenzen in das Genom von *D. melanogaster*. Die Transposition der P-Elemente ist in *D. melanogaster* auf die Keimbahn beschränkt. Der Hsp70 Promotor dient als Kontrollelement für das *miniwhite*-Reporter gen. Die Keimbahntransformation erfolgt in einen *D. melanogaster*-Stamm, in dem das *white*-Gen deletiert ist. Anhand der Expression des *miniwhite*-Gens sind transgene Tiere auf Grund des Wechsels der Augenfarbe von weiß nach hellrot zu erkennen. Der pUC8-Anteil des Vektors wird bei der P-Element-vermittelten Keimbahntransposition nicht in das Genom von *D. melanogaster* überführt. Das *Ampicillin*-Resistenzgen (*ampR*) erlaubt eine selektive Klonierung des Vektors in *E. coli* (Klemenz et al., 1987).

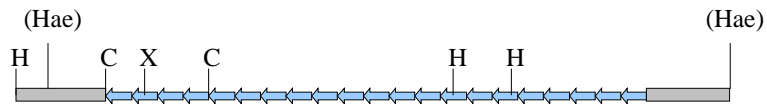
3.1.1 Cla-Elemente aus *C. thummi*


Die verwendeten Cla-Elemente stammen aus dem Genom von *C. thummi* und wurden ursprünglich als Plasmidklon C2i6 mit Hilfe des Plasmidvektors pBR328 kloniert (Rohwedder, 1986). Durch *in situ* Hybridisierung konnten im Klon C2i6 enthaltene DNA-Abschnitte im Euchromatin von Chromosom I Arm R, Region B1e im Genom von *C. thummi* lokalisiert werden (Rohwedder, 1986; Hankeln et al., 1994). Ein Hae III Fragment (s. Abb. 6) des Klons C2i6, das das gesamte Cla-Element-Cluster beinhaltet, wurde in beiden Orientierungen in die Restriktionsschnittstelle Stu I des Vektors pW8 kloniert (s. Abb. 5).

Verschiedene DNA-Fragmente des Cla-Element-Clusters wurden in den Plasmidvektor pUC18 subkloniert und sequenziert. Die vollständige DNA-Sequenz des Cla-Element-Clusters hat eine Länge von 3547 bp (Datenbankeintrag: "Accession"-Nummer, AJ251060). Darin enthalten sind 21 tandem repetitiv angeordnete Cla-Element-Einheiten, die zusammen 2446 bp lang sind. Die trDNA-Einheiten haben eine durchschnittliche Länge von 114 bp (109 bp bis 115 bp) und werden im Klon C2i6 durch Taq I Restriktionsschnittstellen begrenzt. Die Repetitionseinheiten sind bis zu 8% divergent gegenüber der Konsensussequenz. Dadurch ist es möglich, die Reihenfolge der einzelnen Repetitionseinheiten festzulegen. Der AT-Gehalt der trDNA-Einheiten liegt zwischen 80% und 84%. In der DNA-Sequenz der Cla-Elemente kommen ein bis zwei perfekte TATA-Boxen sowie eine CAAT-Box vor. Diese DNA-Sequenz-Motive treten ausschließlich in der Orientierung B des Cla-Element-Clusters auf (s. Abb. 6B). Flankierend zu dem Cla-Element-Cluster befindet sich auf der 5'-Seite ein 781 bp langer und auf der 3'-Seite ein 320 bp langer "single copy"-DNA-Bereich (Orientierung B des trDNA-Clusters). Diese flankierenden DNA-Sequenzen sind nicht eindeutig als Cla-Elemente zu erkennen. Sie weisen aber in kurzen DNA-Motiven eine deutliche Ähnlichkeit mit der DNA-Sequenz der Cla-Elemente auf. So kommen z. B. sowohl TATA-Boxen als auch CAAT-Boxen gehäuft in der flankierenden DNA-Sequenz vor.

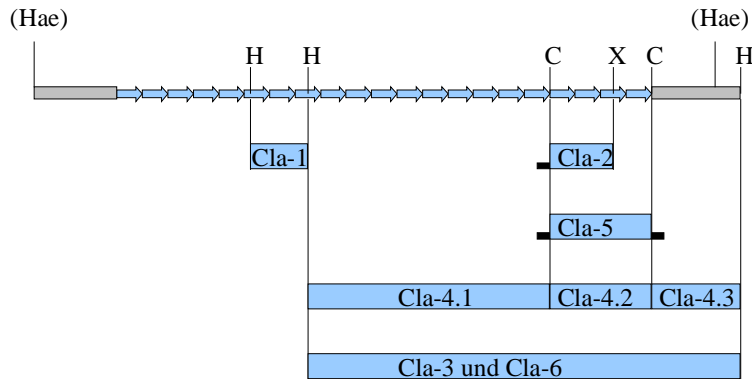
Abb. 6: Das Cla-Element-Cluster des Klons C2i6 aus *C. thummi*


A)



Piktogramm:

 Cla-Element-Cluster
 Orientierung A

B)



Piktogramm:

 Cla-Element-Cluster
 Orientierung B




-  Cla-Element
-  Cla-Cluster flankierende DNA-Sequenz
-  Polylinker

Abb. 6

Die Abbildung 6 zeigt einen Teil des Klons C2i6, der das tandem repetitive Cla-Element-Cluster enthält. In Abbildung **6A**) ist das Cla-Element-Cluster in Bezug auf die DNA-Sequenz des Plasmidvektors in der Orientierung A dargestellt, während Abbildung **6B**) das trDNA-Cluster in invertierter Orientierung zeigt. Die einzelnen Cla-Element-Repetitionseinheiten enthalten Taq I Restriktionsschnittstellen (TCGA). Innerhalb des Cla-Element-Clusters existieren weitere Restriktionsschnittstellen: H für Hind III (AAGCTT), C für Cla I (ATCGAT) und X für Xba I (TCTAGA), Hae für Hae III (GGCC). Restriktionsschnittstellen, die bei der Klonierung zerstört wurden, sind in Klammern angegeben. Das trDNA-Cluster wird auf beiden Seiten von "single copy"-DNA flankiert. Die blauen Boxen unterhalb der Skizze bezeichnen die DNA-Fragmente, mit denen eine Analyse der sequenzbedingten Krümmung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt wurde.

Sequenzbedingte Krümmung des Cla-Element-Clusters C2i6

Eine besondere Eigenschaft von Satelliten-DNA ist die sequenzbedingte Krümmung. Zahlreiche Autoren (Marini et al., 1982; Diekmann, 1986, 1992; Koo et al., 1986) haben nachgewiesen, daß gekrümmte DNA-Moleküle ein verändertes Wanderungsverhalten bei der Gelelektrophorese zeigen. Gekrümmte DNA wandert langsamer als nicht gekrümmte DNA gleicher Länge. Bestimmte Bedingungen wie eine niedrige Temperatur (4°C) und kleine Gelporen verstärken das veränderte Laufverhalten der DNA. Eine erhöhte Temperatur (23°C), große Gelporen und der Zusatz von Ethidiumbromid zu dem Gel, den Proben und dem Laufpuffer heben hingegen die Krümmung der DNA-Helix auf (Israelewski, 1983; Diekmann und Wang, 1985). Der Retardierungsfaktor k dient als Maß für das unterschiedliche Migrationsverhalten gekrümmter DNA. Er wird aus dem Quotienten des apparenten Molekulargewichts zu realem Molekulargewicht gebildet (Diekmann, 1986).

Tabelle 1: Cla-Element-Fragmente zur Bestimmung der DNA-Krümmung

Cla-1	aus Klon 19; 228 bp Hind III Fragment	Cla-Elemente: 2
Cla-2	aus Klon 10; 295 bp Xba I / Cla I Fragment mit 5 bp des pUC18-PL auf der 3'-Seite	Cla-Elemente: 2,5
Cla-3	aus Klon 20; 2043 bp Hind III Fragment mit 463 bp flankierender DNA-Sequenz auf der 3'-Seite	Cla-Elemente: 13,5
Cla-4.1	aus Klon 11; 1,1 Kbp Cla I / Hind III Fragment	Cla-Elemente: 9,5
Cla-4.2	aus Klon 11; 454 bp Cla I Fragment	Cla-Elemente: 4
Cla-4.3	aus Klon 11; 489 bp Hind III / Cla I Fragment mit 463 bp flankierender DNA-Sequenz auf der 5'-Seite	Cla-Elemente: 0
Cla-5	Klon 10; 454 Cla I Fragment mit 18 bp pUC-PL auf der 5'-Seite und 12 bp pUC-PL auf der 3'-Seite	Cla-Elemente: 4
Cla-6	aus Klon 20; 2043 bp großes Hind III Fragment mit 463 bp flankierender DNA auf der 5'-Seite	Cla-Elemente: 13,5

Die Tabelle beschreibt die verschiedenen Restriktionsfragmente des Cla-Element-Klons C2i6, die auf ihr Krümmungsverhalten untersucht wurden (s. Abb 6B). PL für Polylinker.

Um den Grad der Krümmung des trDNA-Clusters zu ermitteln, wurden aus dem Klon C2i6 verschiedene Cla-Element-Fragmente mittels Restriktion erzeugt (s. Abb. 6B). Die Tabelle 1 faßt die Daten der verwendeten DNA-Fragmente zusammen. Die Tabelle 2 stellt das durch die Gelelektrophorese (s. Abb. 7) ermittelte Molekulargewicht dem durch die DNA-Sequenzierung bestimmten Molekulargewicht gegenüber und gibt den Retardierungsfaktor k an. Mit zunehmender Anzahl der Cla-Elemente wächst der Retardierungsfaktor und damit die Krümmung der DNA-Helix. Die DNA-Fragmente mit 13,5 Cla-Elementen (Cla-3 und Cla-6) sind derart stark gekrümmt, daß unter den gewählten Bedingungen der Elektrophorese keine Auftrennung der DNA-Moleküle mehr möglich ist (s. Abb. 7). Die DNA-Fragmente Cla-4.2 und Cla-5 unterscheiden sich nur durch kurze DNA-Sequenzen aus dem Polylinker des Klonierungsvektors. Die DNA-Sequenzen des Polylinkers in Cla-5 führen zu einer stärkeren Retardierung im Krümmungstest. Das DNA-Fragment Cla-4.3 besteht aus Cla-Element flankierenden DNA-Sequenzen (s. Abb. 6B). Auch dieses DNA-Fragment weist eine leichte Krümmung auf. Die Ähnlichkeit der DNA-Sequenz zwischen der flankierenden DNA und dem Cla-Element-Cluster spiegelt sich somit auch im Krümmungsverhalten. Die Ergebnisse zeigen, daß Cla-Elemente, aber auch ihre flankierenden DNA-Sequenzen, gekrümmt sein können. Im Krümmungstest nimmt das Ausmaß der beobachteten Laufverzögerung mit der Größe des tandem-repetitiven Cla-Element-Clusters zu.

Tabelle 2: Gegenüberstellung des tatsächlichen und apparenten Molekulargewichts

	Cla-1	Cla-2	Cla-3	Cla-4.1	Cla-4.2	Cla-4.3	Cla-5	Cla-6
MG (Gel)	306 bp	420 bp	> 9 Kbp	2,1 Kbp	706 bp	583 bp	795 bp	> 9 Kbp
MG (Seq.)	228 bp	300 bp	2,04 Kbp	1,1 Kbp	454 bp	489 bp	484 bp	2,04 Kbp
Anzahl der Cla- Elemente	2	2,5	13,5	9,5	4	0	4	13,5
k	1,34	1,4	> 4,41	1,91	1,56	1,19	1,64	> 4,41

In der Tabelle werden die Molekulargewichte von verschiedenen Cla-Element-Fragmenten verglichen. Die Molekulargewichte wurden entweder durch die Analyse der DNA-Fragmente im Polyacrylamidgel (MG Gel) oder durch DNA-Sequenzierung (MG Seq.) bestimmt. k für Retardierungsfaktor.

Abb. 7: Gel-Migrationstest zur Krümmungsanalyse verschiedener Cla-Fragmente

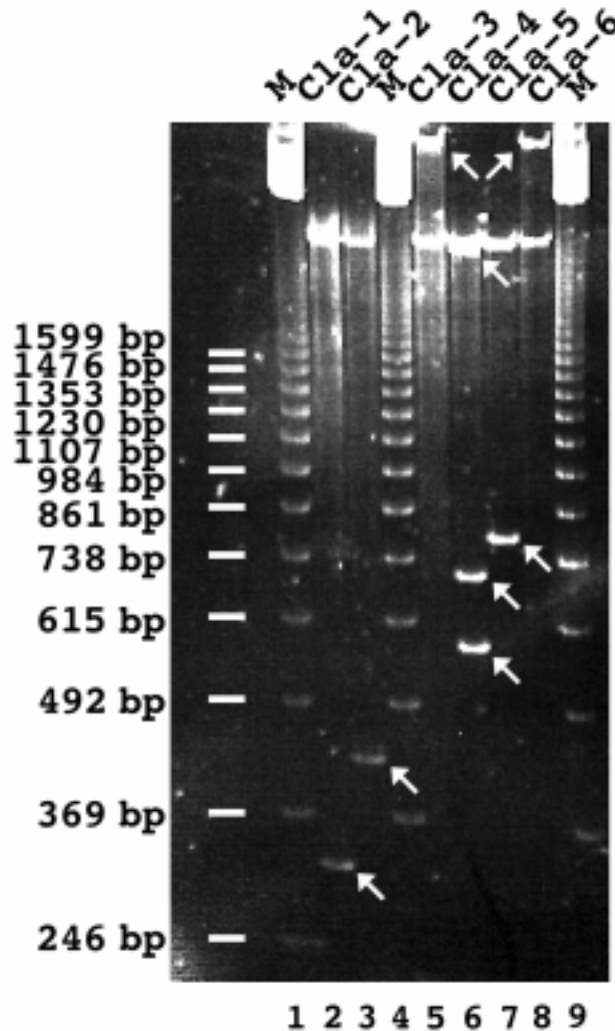


Abb. 7

DNA-Fragmente mit einer unterschiedlichen Anzahl von Cla-Elementen (nummeriert von Cla-1 bis Cla-6, s. Abb. 6B) wurden in einem 30% Acrylamid / 0,5% Bisacrylamidgel bei 4°C für 14h bei 50V aufgetrennt. Diese Bedingungen stabilisieren eine sequenzbedingte Krümmung der DNA-Fragmente. Die DNA-Fragmente Cla-4.1, Cla-4.2 und Cla-4.3 sind im Polyacrylamidgel mit absteigendem Molekulargewicht aufgetrennt und zusammen in der Spur Cla-4 aufgetragen. Alle aufgetrennten Cla-Element-Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der linearisierte Klonierungsvektor pUC18 ergibt in allen Spuren eine weitere Bande von 2,7 Kbp. M für Marker.

3.1.2 Alu-Elemente aus *C. piger*

Alu-Elemente kommen sowohl im Genom von *C. piger* als auch in *C. thummi* vor (Hankeln, 1990). Der verwendete Plasmidklon ppiAlu4-105 enthält acht tandem repetitiv angeordnete Alu-Elemente (Mattausch, 1993). Ein Sac I Fragment (s. Abb. 8) des Plasmidklons wurde in beiden Orientierungen in die Restriktionsschnittstelle Stu I des Vektors pW8 kloniert (s. Abb. 5). Das DNA-Fragment hat eine Länge von 1492 bp, wovon 1332 bp tandem repetitive Alu-Elemente und 31 bp bzw. 129 bp flankierende DNA-Sequenzen sind. Der AT-Gehalt des trDNA-Clusters beträgt 72%. Die Länge einer Repetitionseinheit schwankt zwischen 165 bp und 169 bp, mit Ausnahme des am weitesten im 5'-Bereich liegenden DNA-Elements, das nur 139 bp lang ist. Alle Repetitionseinheiten besitzen die charakteristische Alu I Restriktionsschnittstelle (Mattausch, 1993). Für die Alu-Elemente konnte eine deutliche Krümmung der DNA-Helix nachgewiesen werden. Bei Dimeren wurde ein Retardierungsfaktor zwischen $k=1,5$ und $k=3$ festgestellt. Das verwendete Alu-Octamer (s. Abb. 8) ist stark gekrümmt und weist einen Retardierungsfaktor $k>50$ auf (Mattausch, 1993).

Abb. 8: Das Alu-Element-Cluster des Klons ppiAlu4-105 aus *C. piger*

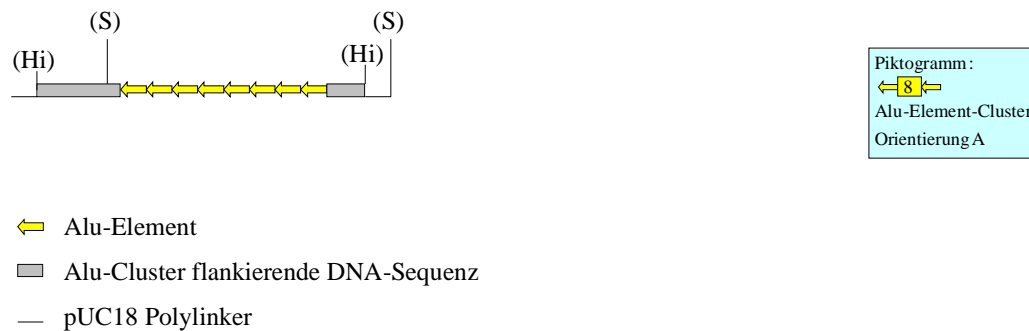


Abb. 8

Die Abbildung zeigt einen Teil des Klons ppiAlu4-105, der das tandem repetitive Alu-Element-Cluster enthält. Das Alu-Element-Cluster ist in bezug auf die DNA-Sequenz des Plasmidvektors in der Orientierung A dargestellt. Die einzelnen Alu-Element-Repetitionseinheiten enthalten Alu I Restriktionsschnittstellen (AGCT). Weitere Restriktionsschnittstellen sind: Hi für Hinc II (GTCGAC), S für Sac I (GAGCTC). Restriktionsschnittstellen, die bei der Klonierung zerstört wurden, sind in Klammern angegeben. Die DNA-Sequenz des mitklonierten pUC18 Polylinkers umfaßt die Basenpaare 25 bis 49 mit den Restriktionsschnittstellen für Xba I, Bam H I, Sma I und Kpn I.

3.1.3 1,688-Satelliten-DNA aus *D. melanogaster*

Das trDNA-Cluster der mittelrepetitiven 1,688-Satelliten-DNA aus *D. melanogaster* stammt vermutlich aus dem pericentrischen Heterochromatin des X-Chromosoms. Es wurde ein ca. 6 Kbp großes Satelliten-DNA-Fragment mittels poly(dA) / poly(dT)-"tailing" mit Hilfe des Vektors pSC101 kloniert (Carlson und Brutlag, 1977). Das DNA-Cluster besteht aus 15 Repetitionseinheiten, die tandem repetitiv angeordnet sind. Eine Wiederholungseinheit ist 359 bp lang und wird von einer Schnittstelle des Restriktionsenzym Hinf I eingerahmt (Hsieh und Brutlag, 1979). In den vorliegenden Versuchen wurde ein ca. 7,4 Kbp großes Hind II Fragment (s. Abb. 9) mit 15 trDNA-Einheiten in die Stu I Restriktionsschnittstelle des Transformationsvektors pW8 kloniert (s. Abb. 5).

Abb. 9: Das 1,688-Satelliten trDNA-Cluster aus *D. melanogaster*

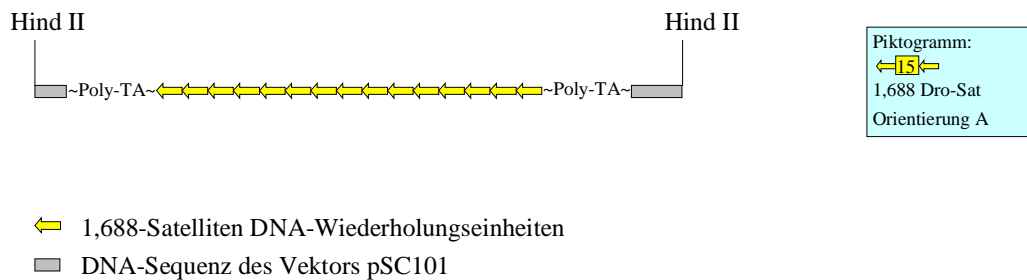


Abb. 9

Die Satelliten-DNA ist durch einen poly(dA) / poly(dT)-Schwanz eingerahmt. Zu beiden Seiten der Satelliten-DNA befinden sich DNA-Sequenzen des Vektors pSC101 (Bernardi und Bernardi, 1984) von 494 bp auf der 5'-Seite und 654 bp auf der 3'-Seite des trDNA-Clusters.

3.1.4 Artificielle trDNA aus Hsp70 Promotoren

Der Hsp70 Promotor ist die Kontrollregion des Gens für das 70 kD Hitzeschock-Protein. In *D. melanogaster* kommen fünf Kopien in zwei Genvarianten vor, die auf dem Chromosom III Arm R, Region 87A7 bzw. 87C1 lokalisiert sind (Karch et al., 1981). In verschiedenen Vektoren für die Transformation von P-Elementen in das Genom von *D. melanogaster* wird der Hsp70 Promotor als Kontrollregion für unterschiedliche Reportergene verwendet. Auch im Vektor pW8 kontrolliert ein 369 bp langes Promotor-Fragment aus der Region 87A7 die Expression des *miniwhite*-Reportergens. Mit spezifischen Primern (Hsp-C und Hsp-D) wurden Hsp70 Promotor-Monomere amplifiziert, die auf beiden Seiten mit einer Xba I Schnittstelle enden (s. Methoden 2.4). Durch Restriktion mit Xba I und anschließender Ligation wurden künstliche tandem repetitive Hsp70 Promotor-Elemente erzeugt. Es konnten nur tandem repetitive Dimere und Trimere kloniert werden, die keine invertierten Wiederholungseinheiten enthalten. Ein Dimer wurde mit einem Trimer ligiert, und das Produkt wurde in den mit Stu I geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pW8 inkloniert (s. Abb. 5). Das Ergebnis sind tandem repetitive Hsp70 Promotor-Pentamere, die gleichsinnig mit dem Promotor des Vektors angeordnet sind (s. Abb. 10A). Als seltene Ausnahme ergaben sich auch Hsp70 Promotor-Dekamere (s. Abb. 10B). Auch diese Promotor-Dekamere bilden ein trDNA-Cluster, welches gleichsinnig mit dem Promotor des Vektors ausgerichtet ist. Mit Hilfe von Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzierung konnte die Cluster-Struktur verschiedener Konstrukte aufgeklärt werden (s. Abb. 10). Um den Grad einer möglichen Krümmung der trDNA aus Hsp70 Promotoren zu ermitteln, sind sowohl ein Dimer als auch ein Trimer der trDNA aus Hsp70 Promotoren mit Hilfe von PAGE auf eine Krümmung der DNA-Helixachse überprüft worden. Beide DNA-Fragmente weisen keine Anzeichen einer Krümmung auf.

In einem weiteren Konstrukt wurden die zusätzlichen Hsp70 Promotor-Einheiten innerhalb des Klonierungsvektors invertiert. Die vorherige Klonierungsarbeit zeigte, daß die Klonierung von invertierten Wiederholungseinheiten in *E. coli* nicht ohne Hilfsmittel möglich ist. Deshalb wurde aus einem pUC18-Klon, der ein Trimer von Hsp70 Promotoren enthielt, zusätzlich zu den tandem repetitiven Promotoren ein 845 bp großes Zwischensegment aus dem Vektor-Bereich mit Eco RI und Dra I herausgeschnitten. Dieses DNA-Fragment konnte gerichtet in den Eco RI / Hpa I geschnittenen und dephosphorylierten Vektor pW8 inkloniert werden. Daraus resultiert ein Hsp70 Promotor-Trimer, das relativ zum Reportergen in umgekehrter Orientierung angeordnet sind (s. Abb. 10C).

Abb. 10: Artifizielle trDNA-Cluster bestehend aus Hsp70 Promotoren

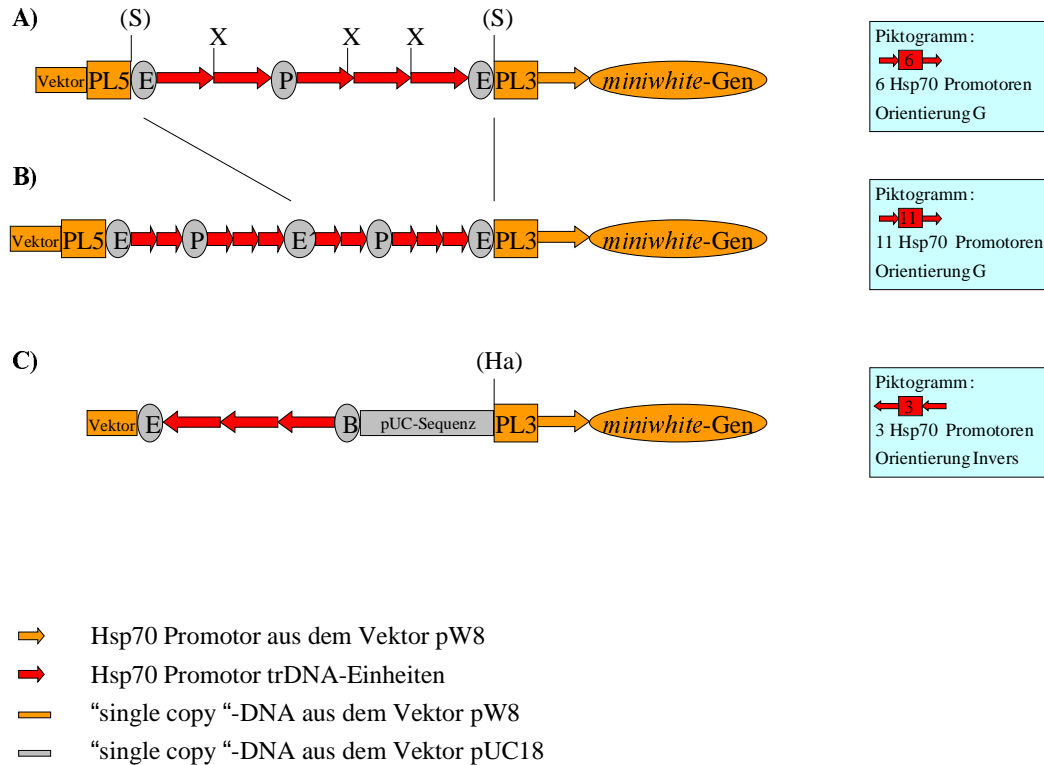


Abb. 10

10A) Die Abbildung zeigt die tandem repetitiven Hsp70 Promotoren kloniert in die Stu I (S) Restriktionsschnittstelle des Vektors pW8. Die zusätzlichen Promotor-Einheiten sind gleichsinnig (Orientierung G) mit dem Promotor des Vektors pW8 orientiert. Restriktionsschnittstellen, die bei der Klonierung zerstört wurden, sind in Klammern angegeben. Die einzelnen Repetitionseinheiten der Hsp70 Promotoren werden durch Xba I (X) Restriktionsschnittstellen eingrahmt. PL5 und PL3 stehen für die 5'-Seite und 3'-Seite des Polylinkers des Vektors pW8 (s. Abb. 5). Der am weitesten im 3'-Bereich liegende Hsp70 Promotor ist Bestandteil des Vektors pW8. Alle DNA-Sequenzen, die Teile des pW8-Vektors sind, wurden orange markiert. E bzw. P stehen für verschiedene Cluster von Restriktionsschnittstellen aus dem Vektor pUC18, E für (Eco RI, Sac I, Kpn I) und P für (Bam HI, Xba I, Sal I, Pst I, Sal I, Xba I, Bam HI).

10B) Das Hsp70 Promotor-Pentamer liegt doppelt vor und bildet so ein tandem repetitives Dekamer bestehend aus Hsp70 Promotoren. E für (Kpn I, Sac I, (Eco RI), Sac I, Kpn I), wobei die Restriktionsschnittstelle Eco RI bei der Klonierung zerstört wurde.

10C) Ein Hsp70 Promotor-Trimer wird vom Hsp70 Promotor des Vektors pW8 durch ein 845 bp langes DNA-Fragment aus dem Vektor pUC18 getrennt. Die zusätzlichen Promotor-Einheiten sind gegenüber dem Promotor des pW8-Vektors invers orientiert (Orientierung Invers). Das DNA-Fragment aus dem Vektor pUC18 besteht aus einer ca. 200 bp langen DNA-Sequenz des *lacZ'*-Gens ohne Promotor und einem Teil des *Ampicillin*-Resistenzgens. Ha für Hpa I. B für (Bam HI, Xba I, Sal I, Pst I, Sph I, Hind III).

3.1.5 Integration von trDNA in das Genom von *D. melanogaster*

Die Übertragung der trDNA in das Genom von *D. melanogaster* erfolgte mittels der Methode der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation (s. Methoden 2.10). Dabei integrieren ausschließlich die DNA-Sequenzen stabil in das Genom von *D. melanogaster*, welche zwischen zwei invertierten P-Element-Wiederholungseinheiten liegen. In den vorliegenden Experimenten wurden verschiedene trDNA-Cluster vor das *miniwhite*-Gen des Vektors pW8 kloniert (s. Abb. 5). Nach erfolgreicher Transformation und Integration der trDNA muß zunächst die Lokalisation und die genomische Organisation der transgenen DNA im Genom von *D. melanogaster* überprüft werden. Für die Keimbahntransformation wurden folgende trDNA-Konstrukte verwendet:

1Cla → Cla-Element-Cluster in der Orientierung A (s. Abb. 6A)

2Cla → Cla-Element-Cluster in der Orientierung B (s. Abb. 6B)

1Alu → Alu-Element-Cluster in der Orientierung A (s. Abb. 8)







Dro-Sat → 1,688-Satelliten-DNA in der Orientierung A (s. Abb. 9)

6xHsp70 → trDNA-Cluster aus sechs Hsp70 Promotoren (s. Abb. 10A)

Hsp70 Invers → trDNA-Cluster aus drei invertierten Hsp70 Promotoren (s. Abb. 10C)

Tabelle 3 zeigt einen Überblick über die Effizienz der Transformationsexperimente in das Genom von *D. melanogaster*. Die Variabilität in der Überlebensrate der Embryonen von dem Zeitpunkt der Injektion über das L1-Larvenstadium bis zu den fertilen Tieren hängt vor allem von den Bedingungen der ersten Tagen nach der Injektion ab. Dazu zählen die Temperatur, der Austrocknungsgrad der Larven sowie die Futterbedingungen und vor allem das Hefewachstum im Futter. Weitere Faktoren, die die Überlebensrate beeinflussen, sind der Rezipientenstamm, der verwendete Transformationsvektor, die Größe des injizierten DNA-Fragments und die unterschiedliche Anzahl von Integrationen, die zu Letalität oder Sterilität führen. Da nicht alle Parameter vollständig konstant gehalten werden können, kommt es zu unterschiedlichen Überlebensraten. Die Transformationsrate errechnet sich aus dem Verhältnis von Transformanten zu überlebenden, fertilen Tieren.

Tabelle 3: Die Effizienz der P-Element vermittelten Keimbahntransformation

trDNA	Injizierte Embryonen	Larven L1 (Gen.:G ⁰)	Fertile Tiere (Gen.:G ⁰)	Transformanten (Transf.-Rate %)	Stämme
1Cla 	637	93	14	3 (21,4 %)	CT9A CT11A CT8B CT8E
2Cla 	1240	218	37	3 (8,1 %)	2Cla7 2Cla18 2Cla59
1Alu 	225	43	11	1 (9,1 %)	Alu9
Dro-Sat 	1620	405	111	0	
6xHsp70 	690	245	46	2 (4,4 %)	5H4 5H72
Hsp70 Invers 	320	74	22	1 (4,6 %)	Hsp27






















Die Tabelle faßt die Ergebnisse der DNA-Mikroinjektionen zusammen. Ausschließlich Embryonen, die nach der Injektion keine äußeren Schäden aufwiesen, wurden als injizierte Tiere in die Statistik aufgenommen. Die Transformationsrate bezieht sich auf die fertilen Tiere der Elterngeneration 0.

Die Transformationsraten liegen im Bereich des in der Literatur beschriebenen Werts von 14% (Spradling, 1986), unter Berücksichtigung der wechselnden Bedingungen der unterschiedlichen Transformationsexperimente. Eine Ausnahme bildet das Transformationsexperiment, bei dem Satelliten-DNA aus *D. melanogaster* verwendet wurde. Trotz einer hohen Anzahl von fertilen Nachkommen nach dem Injektionsexperiment konnten keine transgenen Tiere nachgewiesen werden. Um auszuschließen, daß ein möglicher Effekt der transformierten Satelliten-DNA auf das *miniwhite*-Reporter gen eine Detektion transgener Tiere mittels der roten Augenfarbe verhindert, wurden alle weißäugigen Nachkommen (50-80 Tiere) in der Generation G³ mittels PCR auf ein Transgen im Genom überprüft (s. Methoden 2.10.6). Auch dieser Test bestätigte, daß kein Transgen bestehend aus der 1,688-Satelliten-DNA in das Genom von *D. melanogaster* transformiert worden ist. Es scheint nicht möglich zu sein, ein trDNA-Cluster des 1,688-Satelliten aus *D. melanogaster* außerhalb des X-chromosomalen Heterochromatins in das Genom von *D. melanogaster* zu integrieren.

Die Anzahl transgener Tiere in der ersten Generation lag bei den meisten Stämmen bei über 20 (Stämme: CT8, CT9A, Alu9, 2Cla18, 2Cla59, 5H4, 5H72). Dies deutet auf eine prämeiotische Integration der Fremd-DNA hin. In den Stämmen CT11A, 2Cla7 und Hsp27 sind in der ersten Generation hingegen nur wenige transgene Tiere aus einer Transformante entstanden, was auf eine postmeiotische Integration der Fremd-DNA hindeutet. Die einzelnen transgenen Tiere, entstanden aus der ersten Rückkreuzung eines überlebenden Tieres der Injektionsexperimente, wurden separat vermehrt und auf die Anwesenheit und chromosomale Lokalisation eines Transgens untersucht (s. Methoden 2.10). In den meisten Fällen hatten die Tiere aus einer Injektion die gleiche Integration in identischer chromosomaler Lokalisation. In einem Fall jedoch konnte nachgewiesen werden, daß aus einem G⁰-Tier (CT8) zwei verschiedene Stämme (CT8B und CT8E) mit unterschiedlichem Integrationsort der transgenen DNA hervorgegangen sind. Zwei unterschiedliche Polzellen wurden somit in einem injizierten Embryo unabhängig voneinander mit der Fremd-DNA transformiert (s. Abb. 4). Dies führt zu zwei unabhängigen Stämmen (CT8B und CT8E), mit unterschiedlich arrangierten trDNA-Clustern.

Fast alle transgenen Linien haben ein singuläres Integrationsereignis pro Genom. Der Stamm CT8E weist jedoch zwei Integrationen auf (s. Tabelle 4). Nach einer Berechnung von Spradling (1986) beträgt die Wahrscheinlichkeit für singuläre Integrationsereignisse bei P-Element-vermittelten Keimbahntransformationen über 90%. Somit entsprechen die vorliegenden Ergebnisse den Erwartungen.

Tabelle 4: Übersicht und Lokalisation der Transgene in *D. melanogaster*

Stamm	Konstrukt (der Injektion)	Herstellung	Anzahl der Integrationen	Lokalisation
CT9A 	1Cla 	Injektion	1	Chr. III Arm L Region 75-76
CT8B 		Injektion	1	Chr. II Arm R
CT8E 		Injektion	2 (Doppelbande)	Chr. II Arm R Region 42-43
CT11A 		Injektion	1	Chr. III Arm R Region 93
CT11A-Tc 		Transposition in CT11A	1	Chr. III Arm L Region 65-66
2Cla59 	2Cla 	Injektion	1	Chr. X Region 7-8
2Cla18 		Injektion	1	Chr. III
2Cla7 		Injektion	1	Chr. II Arm L Region 22-24
Alu9 	1Alu 	Injektion	1	Chr. II Arm L Region 28-30
5H72 	6xHsp70 	Injektion	1	Chr. X Region 12-13
5H72Ta 		Transposition in 5H72	1	Chr. III Telomer
5H4 		Injektion	1	Chr. II Arm L Region 23-24
8H4Ta 		Transposition in 5H4	1	Chr. X Region 8-9
8H4Tb 			1	Chr. III Arm R Region 90
8H4Tc 			1	Chr. III Telomer
Hsp27 	Hsp70 Invers 	Injektion	1	Chr. III Arm L Region 67-72

Übersicht der *D. melanogaster*-Stämme, die verschiedene trDNA-Clustern als Transgen tragen. Die erste Spalte gibt den Namen des Stamms an. Die zweite Spalte bezeichnet das trDNA-Konstrukt, das für die Injektion benutzt wurde (s. Ergebnisse 3.1). Die transgenen Stämme sind entweder durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation (Injektion) oder durch das Einkreuzen eines Transposasegens in einen bestehenden transgenen Stamm erzeugt worden (Transposition). Die Piktogramme in Spalte 1 ergeben sich aus der genomischen Organisation der unterschiedlichen trDNA-Cluster (s. Ergebnisse 3.3).

Chromosomale Lokalisation der transgenen trDNA-Cluster in D. melanogaster

Die Lokalisation der Transgene erfolgte durch FISH-Analysen (s. Methoden 2.7.3). Die Tabelle 4 faßt die Ergebnisse für die unterschiedlichen *D. melanogaster*-Stämme zusammen. Um weitere transgene Stämme mit trDNA-Clustern in anderen chromosomalen Loci zu erzeugen, wurden einige der Transgene (in den Stämmen: CT11A, 5H72 und 5H4) durch das Einkreuzen eines Transposasegens mobilisiert (s. Methoden 2.11). Die Transposase mobilisiert ausschließlich DNA-Sequenzen, die innerhalb der invertierten Wiederholungseinheiten des P-Elements liegen (s. Abb. 5). Nach der Mobilisierung des Transgens wird das Gen für die Transposase wieder ausgekreuzt und die Transgene mit veränderter chromosomaler Lokalisation sind in den Stämmen stabil. Insgesamt sind mit dieser Methode fünf Stämme erzeugt worden (Tabelle 4). Auf Grund der verwendeten Methode konnten ausschließlich neue Integrationsorte des Transgens auf dem Chromosom III und dem X-Chromosom erkannt werden. In der Abbildung 11 sind exemplarisch Ergebnisse von FISH-Analysen (s. Methoden 2.7.3) von Transgenen der verschiedenen trDNA-Familien in unterschiedlichen Stämmen von *D. melanogaster* dargestellt. Alle Integrationen mit Ausnahme von zwei erfolgten im Euchromatin verschiedener Chromosomen. Die Stämme 5H72Ta und 8H4Tc haben beide eine singuläre Integration des Transgens im Telomer des Chromosoms III Arm R (s. Abb. 11E-F).

Abb. 11: Transgene in verschiedenen Chromosomenregionen von *D. melanogaster*

Die Abbildungen zeigen Ergebnisse von FISH-Analysen an Polytäanchrosomen verschiedener *D. melanogaster*-Stämme. Die Hybridisierung erfolgte mit Biotin- oder Digoxigenin-markierten DNA-Sonden und anschließender immunologischer Detektion. Als DNA-Sonden wurden trDNA-Fragmente der entsprechenden trDNAs verwendet. Digoxigenin-markierte DNA-Sonden wurden mit Rhodamin (TRITC)-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen, was zu einem roten Fluoreszenzsignal führt. Biotin-markierte DNA-Sonden wurden mit Fluorescein (FITC)-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen, was ein grünes Fluoreszenzsignal ergibt. Die Abbildungen stellen die Phasenkontrastaufnahme der entsprechenden Fluoreszenzaufnahme gegenüber.

Abb. 11A)

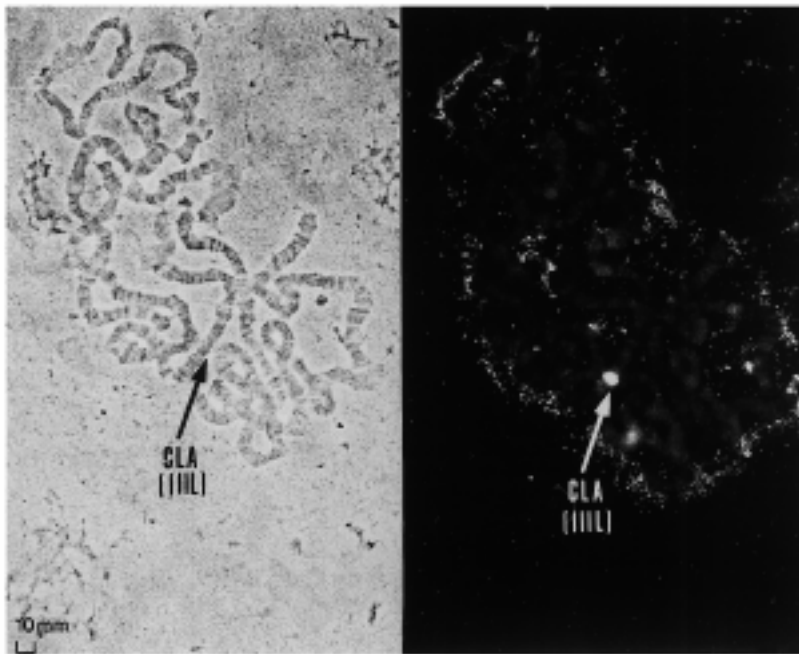
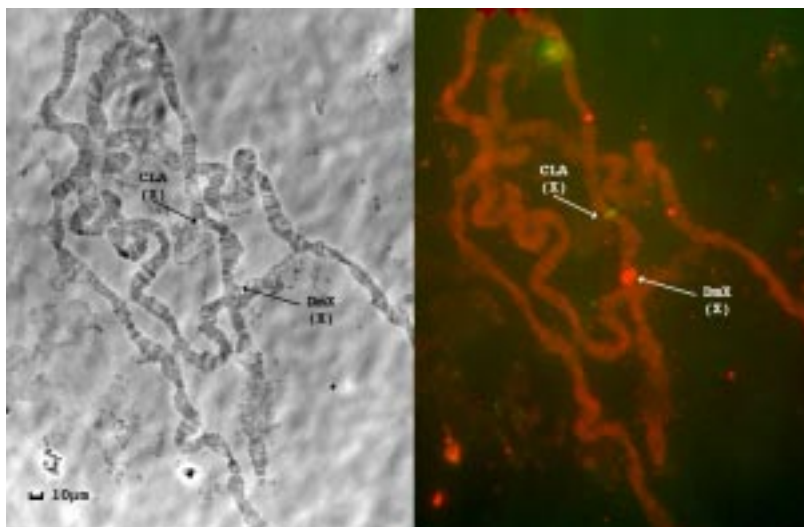


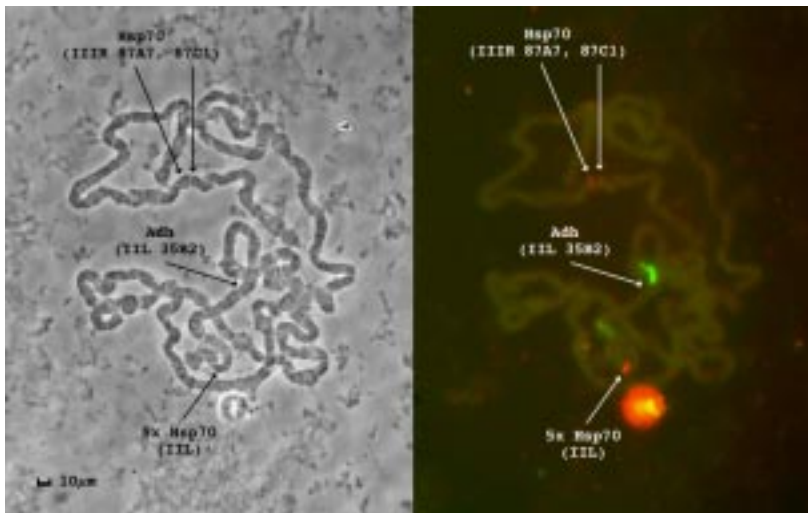
Abb. 11B)



11A) Chromosomen des *D. melanogaster*-Stamms **CT9A** wurden mit Digoxigenin-markierter Cla-Element-Sonde (C2i6-Dig) hybridisiert. Nur das Chromosom III Arm L, Region 75-76 zeigt ein starkes Signal für Cla-Elemente (Cla) im Euchromatin des Chromosoms.

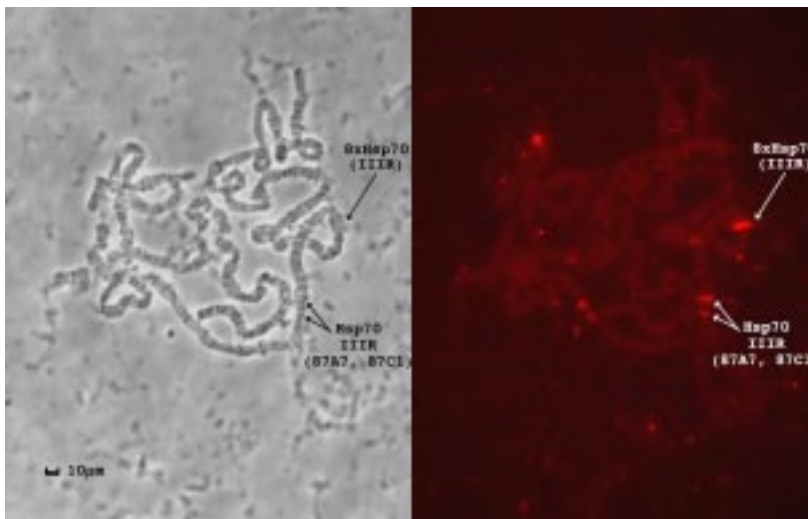
11B) Chromosomen des *D. melanogaster*-Stamms **2C1a59** wurden mit Biotin-markierter Cla-Element-Sonde (C2i6-Bio) hybridisiert. Auf dem X-Chromosom Region 7-8 ist ein starkes, grünes Fluoreszenzsignal der Cla-Elemente (Cla) erkennbar. Als Marker für das X-Chromosom Region 5 dient das *DmX*-Gen. Durch die Hybridisierung mit einem Digoxigenin-markierten DNA-Fragment des Gens ergibt sich ein rotes Fluoreszenzsignal.

Abb. 11C)



Piktogramm:
→ 5 →
5 Hsp70 Promotoren
Orientierung G

Abb. 11D)

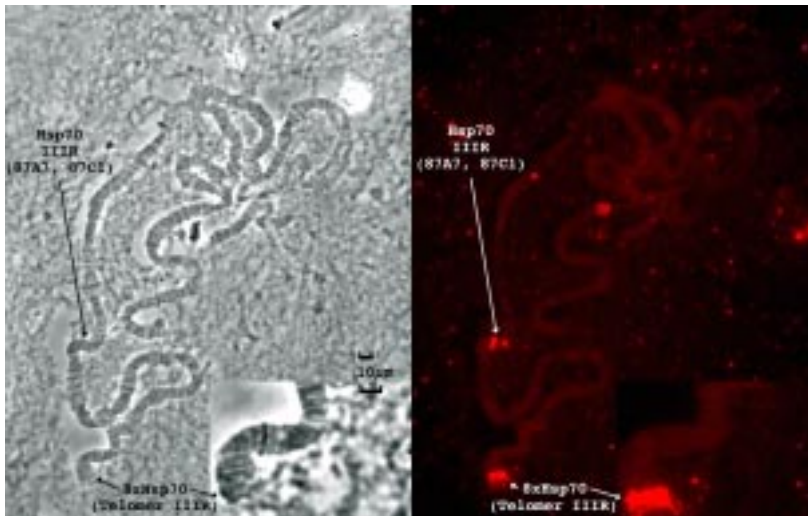


Piktogramm:
→ 8 →
8 Hsp70 Promotoren
Orientierung G

11C) Chromosomen des *D. melanogaster*-Stamms **5H4** wurden mit Digoxigenin-markierter Hsp70 Promotor-Sonde (Hsp70-Trimer) hybridisiert. Auf dem Chromosom II Arm L, Region 23-24 befindet sich ein starkes, rotes Fluoreszenzsignal der Hsp70 Promotor trDNA (5xHsp70). Im weiteren zeigt die Abbildung zwei eng benachbarte, rote Hsp70 Promotor-Signale auf dem Chromosom III Arm R, Region 87A7 und 87C1, die die Lokalisation der natürlichen Hsp70 Promotoren in *D. melanogaster* markieren. Als Marker für das Chromosom II Arm L, Region 35B2 dient das *Adh*-Gen. Durch die Hybridisierung mit einem Biotin-markierten DNA-Fragment des Gens ergibt sich ein grünes Fluoreszenzsignal.

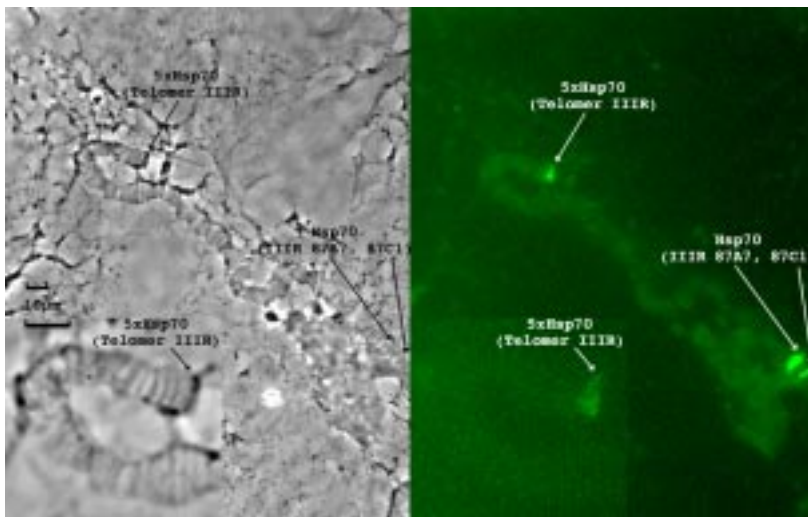
11D) Chromosomen des *D. melanogaster*-Stamms **8H4Tb** wurden mit Digoxigenin-markierter Hsp70 Promotor-Sonde (Hsp70-Trimer) hybridisiert. Auf dem Chromosom III Arm R, Region 90 ist ein starkes, rotes Fluoreszenzsignal der Hsp70 Promotor trDNA (8xHsp70) sichtbar. Im weiteren zeigt die Abbildung zwei eng benachbarte, rote Hsp70 Promotor-Signale auf dem Chromosom III Arm R, Region 87A7 und 87C1, die die Lokalisation der natürlichen Hsp70 Promotoren in *D. melanogaster* markieren.

Abb. 11E)



Piktogramm:
→ 8 →
8 Hsp70 Promotoren
Orientierung G

Abb. 11F)



Piktogramm:
→ 5 →
5 Hsp70 Promotoren
Orientierung G

11E) Chromosomen des *D. melanogaster*-Stamms **8H4Tc** wurden mit Digoxigenin-markierter Hsp70 Promotor-Sonde (Hsp70-Trimer) hybridisiert. Im Telomer des Chromosoms III Arm R ist ein starkes, rotes Fluoreszenzsignal der Hsp70 Promotor trDNA (8xHsp70) zu erkennen. Im weiteren zeigt die Abbildung zwei eng benachbarte, rote Hsp70 Promotor-Signale auf dem Chromosom III Arm R, Region 87A7 und 87C1, die die Lokalisation der natürlichen Hsp70 Promotoren in *D. melanogaster* markieren. Eine Vergrößerung des Telomerbereichs des Chromosoms III Arm R belegt, daß die Integration der artifiziellen trDNA wirklich im äußersten Telomerbereich des Chromosoms III Arm R lokalisiert ist.

11F) Ein Chromosom des *D. melanogaster*-Stamms **5H72a** wurde mit Biotin-markierter Hsp70 Promotor-Sonde (Hsp70-Trimer) hybridisiert. Im Telomer des Chromosoms III Arm R befindet sich ein starkes, grünes Fluoreszenzsignal der Hsp70 Promotor trDNA (5xHsp70). Im weiteren zeigt die Abbildung zwei eng benachbarte, grüne Hsp70 Promotor-Signale auf dem Chromosom III Arm R, Region 87A7 und 87C1, die die Lokalisation der natürlichen Hsp70 Promotoren in *D. melanogaster* markieren. Eine Vergrößerung des Telomerbereichs des Chromosoms III Arm R belegt, daß die Integration der artifiziellen trDNA wirklich im äußersten Telomerbereich des Chromosoms III Arm R lokalisiert ist.

3.2 Stabilität repetitiver DNA-Elemente in *E. coli*

TrDNA ist während der Klonierung in *E. coli* häufig instabil. Dieses Phänomen wurde bei verschiedenen trDNA-Familien aus unterschiedlichsten Organismen beobachtet (z. B. Carlson und Brutlag, 1977; Arnheim und Kuehn, 1979; Case, 1982). Über die Ursachen dieses Phänomens ist jedoch bisher wenig bekannt. Bei der Klonierung der unterschiedlichen trDNA-Sequenzen in dieser Arbeit zeigte sich abhängig vom trDNA-Cluster eine deutliche Instabilität. Deshalb wurde untersucht, welche Parameter die Stabilität klonierter trDNA beeinflussen. Die verschiedenen trDNA-Cluster, inkliniert in den Vektor pW8, wurden zunächst im *E. coli*-Stamm RRI vermehrt. Eine Instabilität der trDNA-Cluster wirkt sich dadurch aus, daß nach kurzer Kulturdauer unterschiedlich große Plasmide aus *E. coli*-Klonen isoliert werden können. Die Untersuchung der Stabilität in *E. coli* erfolgte mittels Southern-Hybridisierung. Die jeweiligen trDNA-Cluster wurden mit flankierenden Enzymen aus dem Polylinker des Vektors herausgeschnitten und mit der entsprechenden, radioaktiv-markierten trDNA als Sonde in einer Southern-Analyse nachgewiesen. Die Instabilität von trDNA führt zu zusätzlichen Banden auf dem Autoradiogramm. Liegen diese Banden unterhalb der Hauptbande des inklinierten DNA-Fragments, handelt es sich um einen Verlust von trDNA-Einheiten. Werden zusätzliche Banden oberhalb der ursprünglichen Größe des trDNA-Clusters detektiert, hat sich das trDNA-Cluster vergrößert. Jede Bande repräsentiert ein trDNA-Cluster innerhalb eines Plasmids, das eine unterschiedliche Anzahl von trDNA-Einheiten verloren oder hinzugewonnen hat.

3.2.1 Einfluß der Orientierung

Die Stabilität eines trDNA-Clusters aus **Alu-Elementen** (s. Abb. 8) wurde an Hand eines trDNA-Cluster der Größe 1,6 Kbp untersucht (s. Abb. 12, Spuren 2 u. 3). Die Southern-Analyse von Plasmid-DNA aus *E. coli* ergibt in beiden Orientierungen des trDNA-Clusters innerhalb des Vektors nur eine Bande bei 1,6 Kbp. Die zusätzlichen hochmolekularen Banden entstehen durch die Hybridisierung der Alu-Element-Sonde mit unrestringierter Plasmid-DNA. Es zeigen sich keine Anzeichen von DNA-Instabilität. DNA-Plasmide mit einem Alu-Element-Cluster erweisen sich somit in beiden Orientierungen des trDNA-Clusters im *E. coli*-Stamm RRI als weitgehend stabil.

Die Spuren 4 und 5 desselben Autoradiogramms (s. Abb. 12) zeigen die gleiche Analyse für ein trDNA-Cluster aus **Cla-Elementen** (s. Abb. 6). Je nach Orientierung der trDNA ist das trDNA-Cluster unterschiedlich stabil. In beiden Spuren ergibt sich eine starke Bande bei der erwarteten Molekulargröße des trDNA-Clusters von 3,7 Kbp. In der Orientierung A des trDNA-Clusters sind keine zusätzlichen Banden auf dem Autoradiogramm zu erkennen (s. Abb. 12, Spur 4). Das Cla-Element-Cluster scheint somit in dieser Orientierung im *E. coli*-Stamm RRI weitgehend stabil zu sein. Liegt das trDNA-Cluster hingegen in umgekehrter Orientierung in dem Vektor vor, so zeigt sich eine deutliche Instabilität. Das trDNA-Cluster "zerfällt" in diskreten Stufen, die in ihrem Abstand exakt dem Molekulargewicht einer Cla-Element-Repetitionseinheit entsprechen (s. Abb. 12, Spur 5). Einzelne Plasmide in der *E. coli*-Population haben offensichtlich sukzessiv Cla-Element-Einheiten verloren, so daß unterschiedliche Clustergrößen entstanden sind. Oberhalb der Hauptbande von 3,7 Kbp ist nur ein undeutlicher Schmier zu sehen, so daß es unklar bleibt, ob auch einzelne Plasmide mit größeren trDNA-Clustern als den ursprünglich 21 Cla-Elementen entstanden sind. Unzweifelhaft bleibt aber ein deutliches Übergewicht in Richtung trDNA-Verlust, sobald eine Veränderung in der Clustergröße der Satelliten-DNA stattfindet. Die zusätzliche Bande bei ca. 8,7 Kbp entsteht durch die Hybridisierung der Cla-Element-Sonde mit unrestringierter Plasmid-DNA.

Die **1,688-Satelliten-DNA** aus *D. melanogaster* ist ebenfalls instabil im *E. coli*-Stamm RRI (s. Abb. 12, Spur 7). Im Autoradiogramm der Abbildung 12 zeigt sich außer der erwarteten Bande des unveränderten trDNA-Clusters bei 7,4 Kbp eine sogenannte DNA-Leiter in Form einer Vielzahl von Banden. Der Abstand aufeinanderfolgender Banden entspricht wiederum der Länge einer Repetitionseinheit der Satelliten-DNA. Die Intensität einiger Banden in der DNA-Leiter ist kaum von der Intensität der erwarteten Bande bei 7,4 Kbp zu unterscheiden. Das bedeutet, daß die Mehrzahl der Plasmide trDNA-Einheiten der Satelliten-DNA verloren haben.

Verschiedene trDNA-Cluster sind unterschiedlich stabil in *E. coli*. Dabei ist die Orientierung des trDNA-Clusters innerhalb des Vektors ein wichtiger Faktor, der die Stabilität des trDNA-Clusters beeinflusst. Allein die Repetitivität eines trDNA-Clusters genügt jedoch nicht als Ursache der Instabilität, da das aus Alu-Elementen bestehende trDNA-Cluster in beiden Orientierungen weitgehend stabil ist.

Abb. 12: Stabilität verschiedener trDNA-Familien in *E. coli*

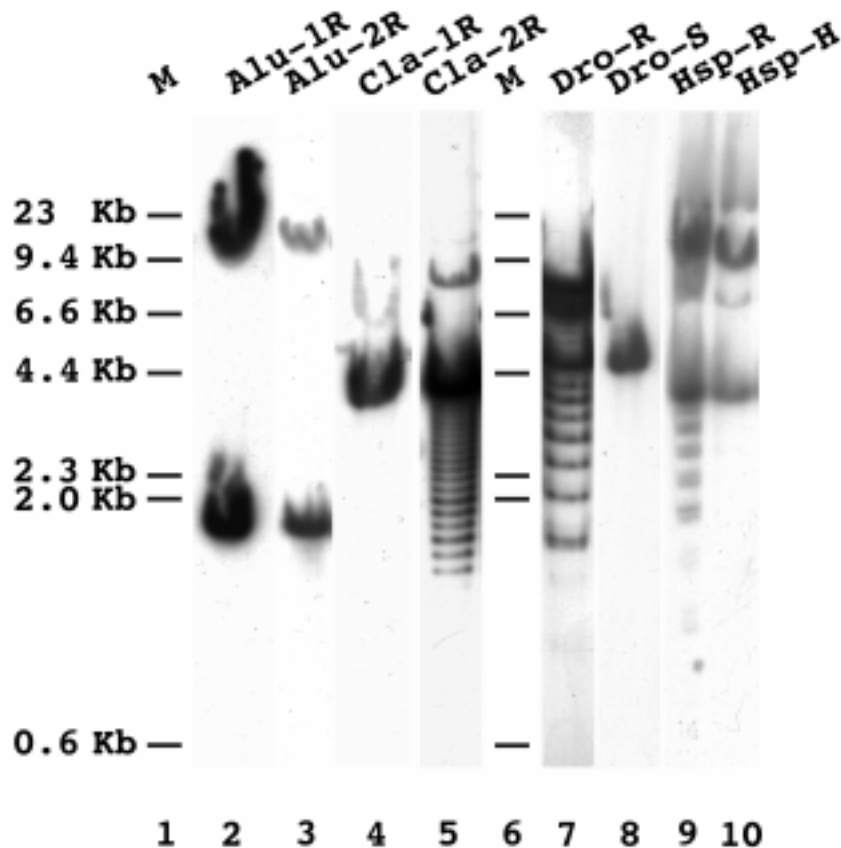


Abb. 12

Southern-Hybridisierung verschiedener trDNA-Cluster kloniert in den Vektor pW8 mit entsprechend klonierter, radioaktiv-markierter trDNA-Sonde. Alu steht für Alu-Element-Cluster (s. Abb. 8), Cla für Cla-Element-Cluster (s. Abb. 6), Dro für das trDNA-Cluster der 1,688-Satelliten-DNA aus *D. melanogaster* (s. Abb. 9) und Hsp für die artifizielle trDNA aus Hsp70 Promotoren (s. Abb. 10B). Die Vermehrung der Plasmide erfolgte im *E. coli*-Stamm RRI (R), dem Stamm Sure (S) oder dem *E. coli*-Stamm HBI01 (H). Die trDNA-Cluster wurden mit den Restriktionsenzymen Eco RI / Pst I oder Xho I aus dem Polylinker des Plasmids herausgeschnitten, mit Ausnahme der aus Hsp70 Promotoren bestehenden trDNA-Cluster, die mit Eco RI herausgeschnitten wurden. Die Zahlen 1 bzw. 2 korrespondieren mit der Orientierung A bzw. B des trDNA-Clusters relativ zu der DNA-Sequenz des Vektors. M für Molekulargewichtsstandard, λ DNA x Hind III. Die Expositionszeit betrug bei -70°C : 18h für Hsp-R und Hsp-H; 2h für Alu-1R, Cla-1R und Dro-R; 3h für Dro-S und Cla-2R; 15 min für Alu-2R.

3.2.2 Einfluß der Rekombinationssysteme von *E. coli*

Um den Einfluß der Rekombinationssystem von *E. coli* auf die Stabilität von trDNA zu untersuchen, wurde das Plasmid mit der 1,688-Satelliten-DNA aus *D. melanogaster* in den *E. coli*-Stamm Sure (*recB*⁻; *recJ*⁻) überführt. Das Autoradiogramm (s. Abb. 12, Spur 8) zeigt, daß eine Instabilität kaum noch nachweisbar ist. Das trDNA-Cluster hat jedoch nur noch eine Größe von 5,3 Kbp gegenüber 7,4 Kbp des trDNA-Clusters im ursprünglich klonierten DNA-Plasmid. Damit enthält das trDNA-Cluster nur noch etwa neun der ursprünglich fünfzehn Satelliten-DNA-Einheiten. Auch im *E. coli*-Stamm RRI ist ein starkes Hybridisierungssignal bei 5,3 Kbp erkennbar (s. Abb. 12, Spur 7). In beiden *E. coli*-Stämmen scheint dieses trDNA-Cluster in seiner Stabilität begünstigt zu sein im Vergleich zu trDNA-Clustern anderer Größe.

In den Spuren 9 und 10 des Autoradiogramms (s. Abb. 12) wird die Stabilität von DNA-Plasmiden in *E. coli* untersucht, in die ein trDNA-Cluster aus zehn tandem repetitiv angeordneten **Hsp70 Promotoren** kloniert wurde (s. Abb. 10B). In der Spur 9 ist deutlich die Instabilität dieser künstlich erzeugten trDNA im *E. coli*-Stamm RRI zu erkennen. Unterhalb der erwarteten Bande mit einem Molekulargewicht von 4,1 Kbp erscheint eine DNA-Leiter. Der Abstand der zusätzlichen Banden entspricht wiederum der Größe einer Repetitionseinheit von ca. 390 bp. Die Banden erscheinen weniger scharf, da es sich teilweise um Doppelbanden handelt. Innerhalb des trDNA-Clusters befinden sich auf Grund der Klonierungsstrategie drei kurze DNA-Abschnitte des Polylinkers (s. Abb. 10B). Die Bandengröße hängt davon ab, ob DNA-Sequenzen zusätzlich zu einer Monomereinheit des trDNA-Clusters deletiert wurden. Der hochmolekulare Schmier in der Abbildung 12 (Spur 9 u. 10) entsteht durch die Hybridisierung der Hsp70 Promotor-Sonde mit unrestringierter Plasmid-DNA. Das Hybridisierungssignal in denselben Spuren bei 8,6 Kbp ist auf eine Hybridisierung der Sonde mit dem vektoreigenen Hsp70 Promotor zurückzuführen.

Erneut wurde der Einfluß der Rekombinationssysteme von *E. coli* auf den Prozeß der trDNA-Instabilität getestet. Die Hsp70 trDNA wurde deshalb in den RecBC-negativen *E. coli*-Stamm HBI01 (*RecA13*⁻) überführt und vermehrt. In Spur 10 (s. Abb. 12) ist das Hsp70 trDNA-Cluster innerhalb des DNA-Plasmids weitgehend stabil.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Rekombinationssysteme in *E. coli* für die Instabilität von trDNA-Clustern in DNA-Plasmiden mit verantwortlich sind. Mutationen in den Rekombinationssystemen erhöhen die Stabilität von trDNA-Clustern in *E. coli*.

3.3 Stabilität repetitiver DNA-Elemente im Genom transgener Fliegen

Um die Stabilität der trDNA-Cluster im Genom von *D. melanogaster* zu untersuchen, wurde die trDNA-Clustergröße über mehrere, aufeinanderfolgende Generationen bestimmt. Dies geschah im allgemeinen durch Southern-Analysen, in Ausnahmefällen auch mit Hilfe von PCR.

Cla-Elemente der Orientierung A

In der zweiten bis sechsten Generation der transgenen Fliegen ergibt die Southern-Analyse in allen untersuchten Stämmen das erwartete Signal des größtmäßig unveränderten trDNA-Clusters von ca. 3,6 Kbp (s. Abb. 13, Spuren 2 bis 6). In den meisten der transgenen Stämme ergibt sich auch im Verlauf folgender Generationen (s. Abb. 13, Spuren 7 bis 11) keine Veränderung in der Größe der transgenen trDNA. Abbildung 13 zeigt in allen Spuren, mit Ausnahme der Spur 8, ein deutliches Hybridisierungssignal der erwarteten Größe von ca. 3,6 Kbp. In der Mehrzahl der Stämme erweist sich die Integration der fremden trDNA aus *Cla*-Elementen bis zu der dreizehnten Generation als stabil. Eine Ausnahme bildet der Stamm CT8B. Hier ergibt die Southern-Analyse eine deutliche Vergrößerung der transgenen trDNA zwischen der zweiten (s. Abb. 12, Spur 3) und zwölften (s. Abb. 13, Spur 8) Generation um etwa 350 bp.

Die Ergebnisse von Restriktionsanalysen an genomischer DNA des Stamms CT8B weisen auf eine Veränderung im zentralen Teil des trDNA-Clusters hin. Durch Sequenzierung des entsprechenden Bereichs wurde die erfolgte Duplikation im Detail analysiert (s. Abb. 14). Die einzelnen Monomereinheiten der Satelliten-DNA innerhalb des Clusters unterscheiden sich in spezifischen Punktmutationen. Dadurch kann die Duplikation im trDNA-Cluster genau lokalisiert werden. Sie umfaßt drei *Cla*-Element-Einheiten, die vom 3'-Bereich der zehnten bis zum 5'-Bereich der dreizehnten Wiederholungseinheit reichen (s. Abb. 14).

Abb. 13: Southern-Analyse zum Nachweis der trDNA-Clustergröße aus Cla-Elementen

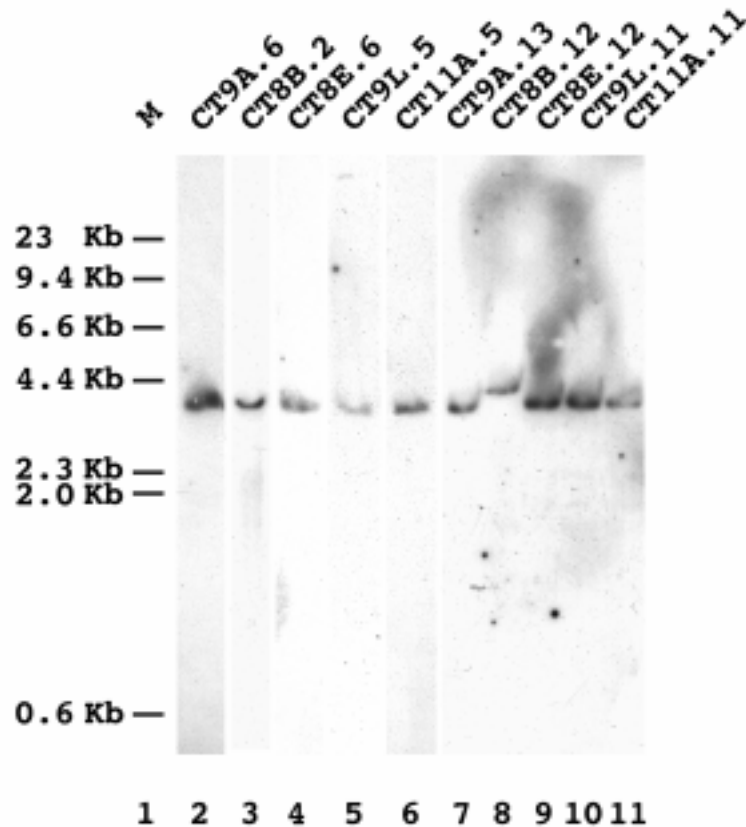


Abb. 13:

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer Southern-Analyse genomischer DNA verschiedener Stämme. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten Cla-Element-Sonde (Klon C2i6-3 x Eco RI, Pst I). Im Stamm CT8B.12 konnte ein vergrößertes trDNA-Clusters aus Cla-Elementen nachgewiesen werden. In den übrigen Stämmen hat das trDNA-Cluster eine unveränderte Größe. Die letzte Ziffer hinter der Stammbezeichnung, abgetrennt mit einem Punkt, gibt jeweils die Generation an, aus der die genomische DNA gewonnen wurde. Bei der Linie CT9L handelt es sich um eine Teilpopulation des Stamms CT9A. Die genomische DNA der verschiedenen Stämme wurde entweder mit Sal I (CT9A.6 [10], CT8E.6 [1], CT11A.5 [8]) oder Xho I (CT8B.2 [2], CT9L.5 [9], CT9A.13 [10], CT8B.12 [10], CT8E.12 [10], CT9L.11 [10], CT11A.11 [10]) restringiert. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die Anzahl der Larven an, aus denen die genomische DNA extrahiert wurde. Im Fall von CT8B.2 waren es anstatt Larven zwei adulte Fliegen. Expositionszeit 24h, mit Ausnahme der Southern-Hybridisierung des Stamms CT8B.2, dort war die Expositionszeit fünf Tage.

Abb. 14: Duplikation von drei Cla-Element-Einheiten im Stamm CT8B

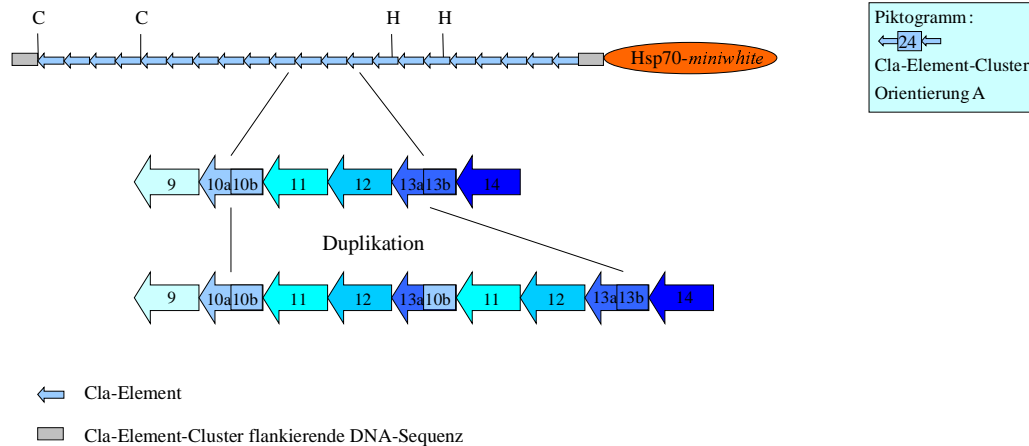


Abb.14

Im oberen Bereich der Abbildung ist die genomische Organisation des Cla-Element-Clusters im *D. melanogaster*-Stamm CT8B vor der Duplikation dargestellt. Im trDNA-Cluster sind die Restriktionsschnittstellen für Cla I (C) und Hind III (H) angegeben. Dem trDNA-Cluster folgt das *miniwhite*-Gen des Vektors unter Kontrolle des Hsp70 Promotors. Die vergrößerte Darstellung im unteren Teil der Abbildung umfaßt die Cla-Elemente neun bis vierzehn des trDNA-Clusters. Die Unterschiede in den trDNA-Einheiten auf Grund verschiedener Punktmutationen sind durch eine unterschiedliche Blauschattierung symbolisiert. Die Duplikation erstreckt sich vom 3'-Bereich der zehnten bis zum 5'-Bereich der dreizehnten Wiederholungseinheit.

Neben dieser Duplikation konnte in verschiedenen Stämmen auch ein Verlust eines Teils des trDNA-Clusters aus Cla-Elementen nachgewiesen werden. In der zehnten Generation des Stamms CT8B zeigt die Southern-Hybridisierung an genomischer DNA aus zehn Tieren einen Schmier, der sich über- und unterhalb des erwarteten Hybridisierungssignals von 3,6 Kbp erstreckt (s. Abb. 15, Spur 2). Die dritte Spur derselben Analyse zeigt in der Linie CT9D.12 zum Vergleich ein deutliches Hybridisierungssignal in der Größe des unveränderten trDNA-Clusters bei ca. 3,6 Kbp. Es gibt demnach in den Genomen der untersuchten zehn Tiere des Stamms CT8B Cla-Element-Cluster unterschiedlicher Größe.

Auch in der Analyse des Stamms CT9D.12 ist neben dem Hybridisierungssignal mit einem DNA-Fragment der Größe von 3,6 Kbp ein weiteres, sehr schwaches Signal mit niedrigerem Molekulargewicht zu erkennen (s. Abb. 15, Spur 3). Dies belegt, daß die Instabilität der trDNA aus Cla-Elementen in verschiedenen Stämmen zu einer Vergrößerung bzw. zu einer Verkleinerung des trDNA-Clusters führen kann.

Abb. 15: Southern-Analyse zum Nachweis der Stabilität von trDNA aus Cla-Elementen

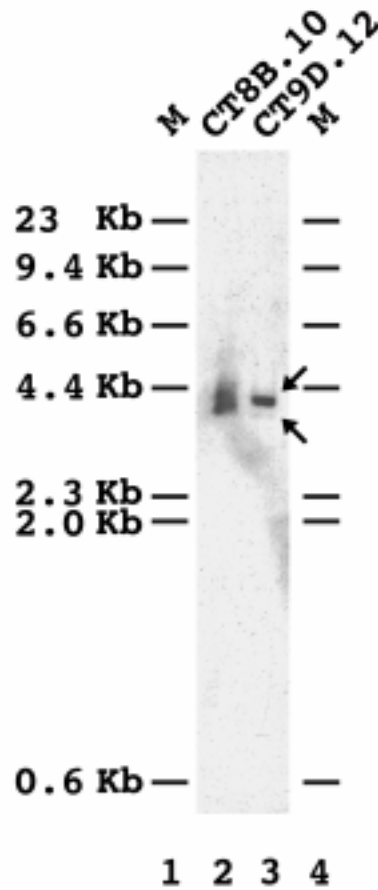


Abb. 15

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer Southern-Analyse genomischer DNA zweier Stämme. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten Cla-Element-Sonde (Klon C2i6-3 x Eco RI, Pst I). Zusätzlich zum Hybridisierungssignal des unveränderten trDNA-Clusters erscheint in beiden Stämmen eine weitere Bande, die auf eine Instabilität des trDNA-Clusters in einzelnen Tieren der Population hinweist. Bei der Linie CT9D handelt es sich um eine über Generationen separat vermehrte Teilpopulation des Stamms CT9A. Die genomische DNA der verschiedenen Stämme wurde mit Xho I (CT8B.10 [10], CT9D.12 [10]) restringiert. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die Anzahl der Larven an, aus denen die genomische DNA extrahiert wurde. Expositionszeit drei Tage.

Cla-Elemente in der Orientierung B

Auch transgene *D. melanogaster*-Stämme mit trDNA-Clustern aus *Cla*-Elementen in der Orientierung B (s. Abb. 6B) wurden auf die tatsächlich integrierte Größe der Fremd-DNA überprüft. In zwei dieser Stämme (2*Cla*18 und 2*Cla*59) ergibt die Southern-Analyse das erwartete Hybridisierungssignal des unveränderten trDNA-Clusters von ca. 3,6 Kbp (s. Abb. 16). Es gibt keine Anzeichen für eine mögliche Instabilität der trDNA in den beiden Stämmen. Eine abschließende Aussage über die Stabilität des trDNA-Clusters im Genom von *D. melanogaster* ist jedoch noch nicht möglich, da die Untersuchungen erst bis zur sechsten Generation nach der Etablierung der Stämme durchgeführt wurden. In der Southern-Analyse des Stamms 2*Cla*7 hybridisiert ein DNA-Fragment mit kleinerem Molekulargewicht gegenüber der ursprünglichen Größe des trDNA-Clusters (s. Abb. 16, Spur 4). Die Sequenzierung des *Cla*-Element-Clusters aus genomischer DNA des Stamms 2*Cla*7 zeigt, daß ein Verlust der zentralen *Cla*-Element-Einheiten stattgefunden hat. Das *Cla*-Element-Cluster in der Größe von 3547 bp ist auf 1267 bp verkürzt worden (⇒2⇒). Die transgene trDNA besteht aus beiden Teilen der flankierenden DNA des *Cla*-Element-Clusters und aus 166 bp des eigentlichen *Cla*-Element-Clusters. Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob im *D. melanogaster*-Stamm 2*Cla*7 das verkürzte *Cla*-Element-Cluster als solches integrierte oder nach der Integration durch Deletion entstanden ist. Die Orientierung B der *Cla*-Elemente wies schon in *E. coli* eine starke Instabilität auf (s. Ergebnisse 3.2.1). Für die Injektion in *D. melanogaster*-Embryonen konnte nur längenheterogene Plasmid-DNA verwendet werden. Möglicherweise hat der Verlust der *Cla*-Elemente innerhalb des trDNA-Clusters schon in *E. coli* stattgefunden, so daß ein schon verkürztes trDNA-Cluster in das Genom von *D. melanogaster* integriert wurde.

Alu-Elemente im Genom von *D. melanogaster*

Wie schon bei den *Cla*-Elementen wurde mit Hilfe der Southern-Analyse die Clustergröße der integrierten Satelliten-DNA bestehend aus *Alu*-Elementen im Stamm AT9.5 überprüft und auf mögliche Instabilitäten untersucht (s. Abb. 16, Spur 6). Die Abbildung 16 zeigt eine Hybridisierung mit einer Bande der erwarteten Größe von 1,5 Kbp des unveränderten *Alu*-Element-Clusters. Ein vollständiges trDNA-Cluster wurde somit in das Genom von *D. melanogaster* integriert und ist in den ersten fünf Generationen stabil vererbt worden.

Abb. 16: Southern-Analyse zum Nachweis der trDNA-Stabilität in *D. melanogaster*

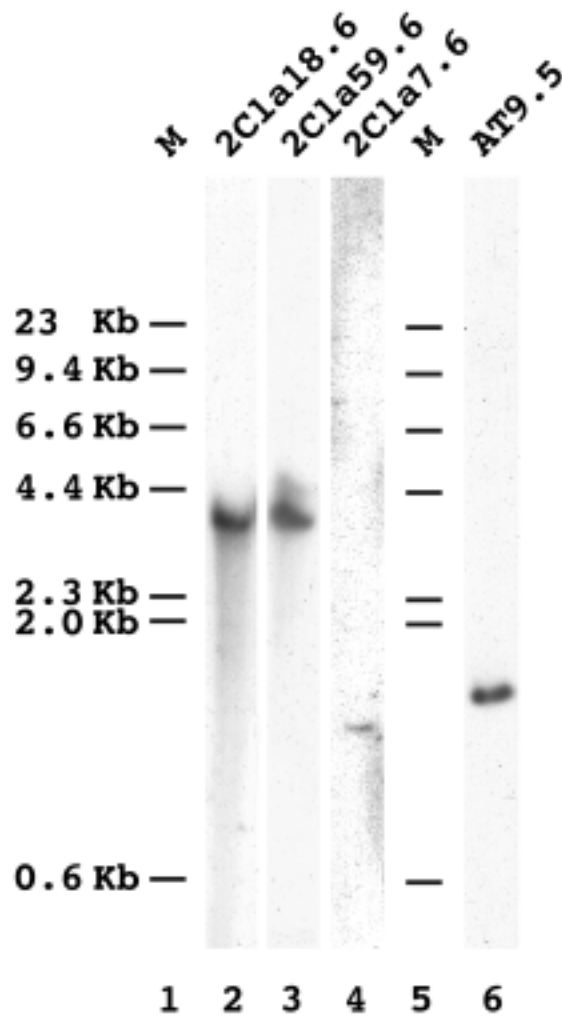


Abb. 16

In den Spuren zwei bis vier der Abbildung 16 ist das Ergebnis einer Southern-Analyse genomischer DNA verschiedener Stämme dargestellt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten Cla-Element-Sonde (C2i6-3 x Eco RI / Pst I). In allen drei Stämmen (2Cla18.6, 2Cla59.6 und 2Cla7.6) liegen die Cla-Elemente in der Orientierung B vor (2Cla). In zwei der Stämme ist die Größe des trDNA-Clusters unverändert, während der Stamm 2Cla7.6 ein verkürztes trDNA-Cluster enthält. Die genomische DNA der verschiedenen Stämme wurde entweder mit Xho I / Pst I (2Cla18.6 [ca. 20], 2Cla59.6 [ca. 20]) oder mit Eco RI / Pst I (2Cla7.6 [ca. 20]) geschnitten. Die Zahlen in eckigen Klammern geben die Anzahl der Larven an, aus denen die genomische DNA extrahiert wurde. Expositionszeit 25 Tage.

Dieselbe Abbildung (Spur 6) zeigt das Ergebnis einer Southern-Analyse genomischer DNA des Stamms AT9.5. Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv-markierten Alu-Elementen als Sonde (Alu-8 x Eco RI / Pst). Die Größe des trDNA-Clusters ist unverändert. Die genomische DNA des Stamms AT9 [10] wurde mit Xho I restringiert. Die Zahl in eckigen Klammern gibt die Anzahl der Larven an, aus denen die genomische DNA extrahiert wurde. Expositionszeit drei Stunden.

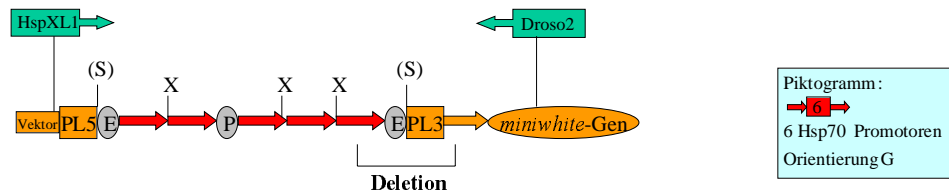
Durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation wurden zwei unabhängige Stämme mit artifizieller trDNA bestehend aus Hsp70 Promotoren hergestellt (5H4 und 5H72). Mittels PCR-Analyse, Restriktionskartierung und anschließender DNA-Sequenzierung wurde die Struktur der integrierten trDNA in beiden Stämmen überprüft. Gegenüber dem ursprünglich klonierten trDNA-Cluster aus Hsp70 Promotoren (s. Abb. 17A) ergibt sich ein Unterschied im 3'-Bereich des trDNA-Clusters. In beiden unabhängigen Stämmen kam es zum Verlust genau einer Hsp70 Promotor-Kopie einschließlich der Polylinker-Sequenz zwischen dem Hsp70 Promotor des Vektors und der ersten Kopie des Hsp70 trDNA-Clusters (s. Abb. 17B). Die artifizielle trDNA aus Hsp70 Promotoren wies bei der Klonierung in *E. coli* eine deutliche Instabilität auf (s. Ergebnisse 3.2.2). Dies deutet darauf hin, daß der Verlust der trDNA-Einheit bereits im Genom von *E. coli* stattfand und damit ein schon rekombiniertes trDNA-Cluster in das Genom von *D. melanogaster* integriert wurde.

Um zusätzliche transgene Stämme zu erhalten, wurde in beide Stämme (5H4 und 5H72) das Gen für eine Transposase eingekreuzt. Es entstanden insgesamt vier Stämme (5H72Ta, 8H4Ta, 8H4Tb, 8H4Tc) mit neuer chromosomaler Lokalisation des Transgens (s. Tabelle 4). Bei Verwendung des Stamms 5H72 als Ausgangsstamm erfolgte eine einfache Mobilisierung des Transgens in eine neue Chromosomenregion. Die anschließende Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung ergab, daß die Größe des trDNA-Clusters im neuen Stamm 5H72Ta identisch ist im Vergleich zum Ausgangsstamm 5H72 (s. Abb. 17B und s. Abb. 18, Spur 4).

Bei der Verwendung des Stamms 5H4 als Ausgangsstamm für die Mobilisierung des transgenen Konstrukts entstanden drei neue transgene Stämme (s. Tabelle 4). Zusätzlich zu der Mobilisierung des Transgens kam es zu einer Umorganisation des trDNA-Clusters. Mit Hilfe von PCR-Analysen konnte in allen drei Stämmen ein 6,3 Kbp großes trDNA-Cluster nachgewiesen werden, somit ca. 1,8 Kbp größer als das erwartete Produkt (s. Abb. 18, Spuren 5-7). Die 5'-Bereiche und 3'-Bereiche der trDNA-Cluster wurden in allen Stämmen durch DNA-Sequenzierung analysiert und es ließ sich kein Unterschied zu der DNA-Sequenz des trDNA-Clusters in den Stämmen 5H4 und 5H72 feststellen. Verschiedene PCR-Experimente, Restriktionskartierungen und anschließende DNA-Sequenzierungen ergeben die in Abb. 17B dargestellte Anordnung der repetitiven DNA-Elemente. In der Mitte des ursprünglichen trDNA-Clusters sind zusätzliche Kopien des Hsp70 Promotors und flankierende Vektorsequenzen integriert.

Abb. 17: Die Organisation von trDNA-Clustern aus Hsp70 Promotoren

A) In *E. coli* kloniertes trDNA-Cluster aus Hsp70 Promotoren in der Orientierung G



B) Organisation der trDNA-Cluster in transgenen Stämmen von *D. melanogaster*

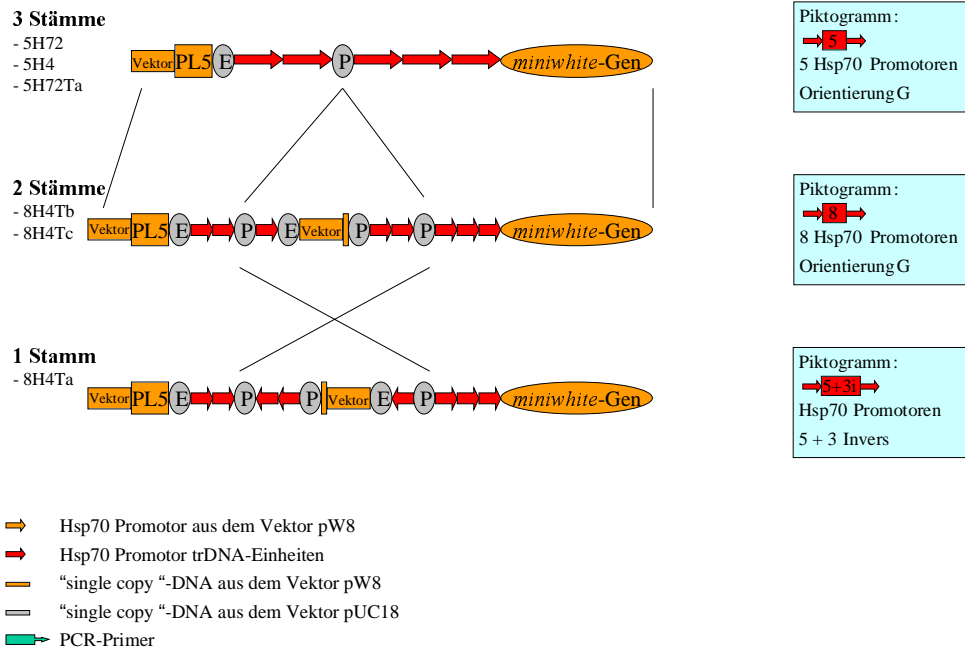


Abb. 17

17A) Die Abbildung zeigt das in *E. coli* klonierte trDNA-Cluster aus fünf Hsp70 Promotoren. Die zusätzlichen Promotor-Einheiten sind gleichsinnig (Orientierung G) mit dem Promotor des Vektors pW8 (orange) orientiert. X für Xba I, S für Stu I. Restriktionsschnittstellen, die bei der Klonierung zerstört wurden, sind in Klammern angegeben. PL5 und PL3 stehen für die 5'-Seite und 3'-Seite des Polylinkers des Vektors pW8 (s. Abb. 5). E bzw. P stehen für verschiedene Cluster von Restriktionsschnittstellen, die aus der Klonierung in den pUC18-Vektor stammen. E für (Eco RI, Sac I, Kpn I); P für (Bam HI, Xba I, Sal I, Pst I, Sal I, Xba I, Bam HI). Die grünen Boxen markieren die PCR-Primer, mit denen das trDNA-Cluster aus der genomischen DNA von transgenen *D. melanogaster*-Stämmen amplifiziert wurde (s. Methoden 2.4).

17B) Die Abbildung zeigt die genomische Organisation der trDNA-Cluster aus Hsp70 Promotoren in unterschiedlichen transgenen *D. melanogaster*-Stämmen. Gegenüber dem ursprünglich klonierten trDNA-Cluster ist das trDNA-Cluster in allen transgenen Stämmen im 5'-Bereich des trDNA-Clusters um eine Promotor-Einheit verkürzt. In drei Stämmen (5H72, 5H4, 5H72Ta) ist das trDNA-Cluster im weiteren unverändert. Drei der Stämme (8H4Ta, 8H4Tb, 8H4Tc), in denen das trDNA-Cluster durch das Einkreuzen eines Transposase-Gens mobilisiert wurde, zeigen ein vergrößertes trDNA-Cluster.

In zwei der durch Transposition erzeugten Stämme (8H4Tb, 8H4Tc) sind die zusätzlichen Kopien der Hsp70 Promotoren tandem repetitiv mit dem ursprünglichen trDNA-Cluster angeordnet. Beim Stamm 8H4Ta hingegen konnte eindeutig gezeigt werden, daß die zusätzlichen trDNA-Kopien als inverse Wiederholungseinheiten innerhalb des ursprünglichen trDNA-Clusters integriert sind. Dies ergibt ein trDNA-Cluster, in dem fünf tandem repetitive Kopien des Hsp70-Promotors in Richtung des *miniwhite*-Gens orientiert und drei Kopien entgegengerichtet angeordnet sind (s. Abb. 17B).

Die Stabilität der trDNA-Cluster im Genom von *D. melanogaster* wurde in der fünften Generation der verschiedenen transgenen Stämme untersucht. Dazu wurde genomische DNA aus jeweils ca. 50 Larven isoliert. Abbildung 18 zeigt die Auftrennung der mittels PCR amplifizierten trDNA-Cluster auf einem Agarosegel.

In allen transgenen *D. melanogaster*-Stämmen mit einer Integration eines trDNA-Clusters aus Hsp70 Promotoren in der Orientierung G läßt sich nur eine diskrete Bande auf dem Gelbild detektieren. Bis zur Generation fünf gibt es in keinem der transgenen Stämme Anzeichen einer Instabilität des trDNA-Clusters (s. Abb. 18, Spuren 2-7). Da die genomische DNA der unterschiedlichen transgenen Stämme nur bis zur Generation fünf analysiert wurde, läßt sich jedoch noch keine endgültige Aussage über die Stabilität der trDNA-Cluster im Genom von *D. melanogaster* machen.

Abb. 18: PCR-Analyse transgener *D. melanogaster*-Stämme

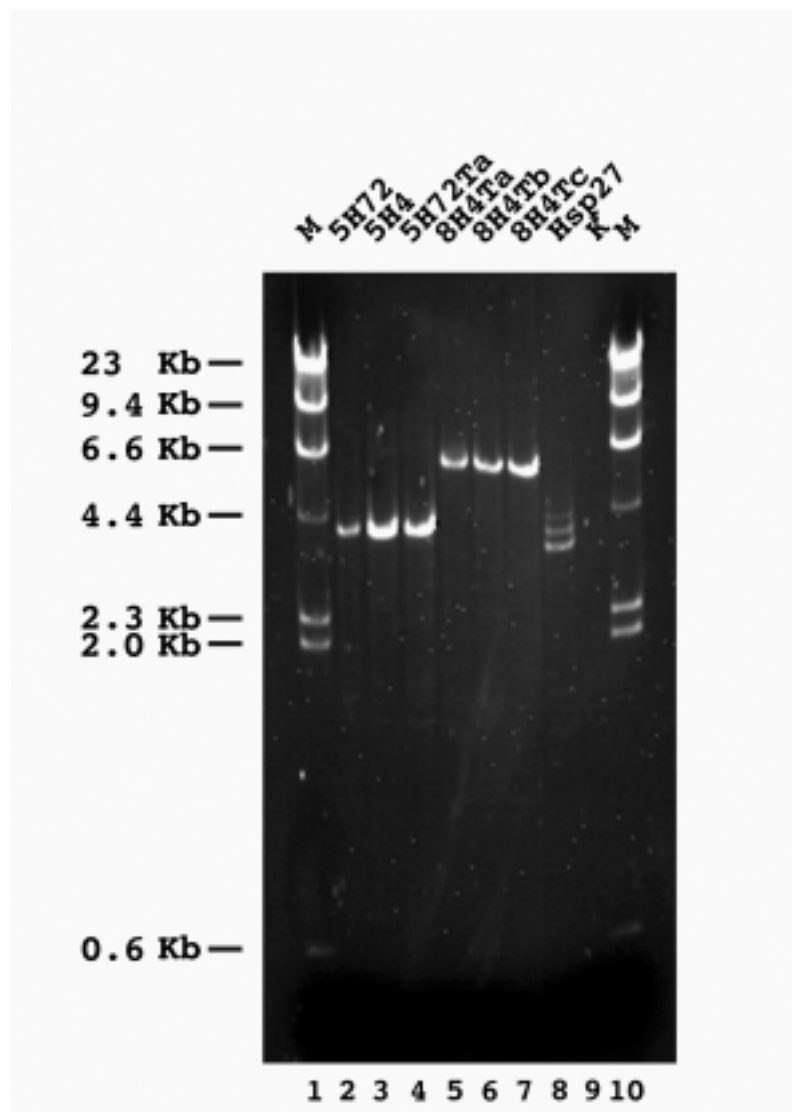


Abb. 18

Aus genomischer DNA von transgenen *D. melanogaster* Stämmen wurde mittels PCR das trDNA-Cluster bestehend aus Hsp70 Promotoren amplifiziert (s. Methoden 2.4). Es gibt keine Anzeichen einer Instabilität der trDNA, wenn das trDNA-Cluster gleichgerichtet mit dem Promotor des Vektors angeordnet ist (Spuren 2 bis 7). Wechselt hingegen die Orientierung des trDNA-Clusters zeigt sich eine deutliche Instabilität des trDNA-Clusters (Stamm Hsp27, Spur 8). Die PCR-Primer liegen innerhalb des P-Element-Vektors in den flankierenden Bereichen des trDNA-Clusters (s. Abb. 17A). Die Abbildung 18 zeigt die amplifizierten PCR-Produkte aufgetrennt auf einem 1%igen Agarosegel. M für Marker. K für Negativkontrolle der PCR.

Die Keimbahntransformation des Konstrukts mit invertierten Hsp70 Promotor-Einheiten (s. Abb. 10C) ergab einen transgene Stamm (Hsp27) mit einer Kopie der zusätzlichen Hsp70 Promotoren im Genom von *D. melanogaster* (s. Tabelle 4). Aus ca. 50 Larven, die für das Transgen heterozygot waren, wurde genomische DNA isoliert. Die Abbildung 18 (Spur 8) zeigt das mittels PCR amplifizierte trDNA-Cluster aufgetrennt in einem Agarosegel. Deutlich sind mehrere PCR-Amplifikate zu sehen. Die am intensivsten gefärbte Bande hat eine Größe von ca. 3,6 Kbp und ist somit um etwa 750 bp kürzer als das ursprünglich klonierte trDNA-Cluster. Oberhalb dieser Hauptbande sind zwei weitere, schwächer gefärbte DNA-Fragmente sichtbar, die jeweils ca. 370 bp größer sind als die Hauptbande. Die DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte ergibt die in Abb. 19 dargestellte Anordnung des trDNA-Clusters. Bezüglich der transgenen trDNA handelt es sich bei dem Stamm Hsp27 um eine heterogene *D. melanogaster*-Population. Verschiedene Tiere besitzen eine unterschiedliche Anzahl von trDNA-Einheiten. Die flankierenden DNA-Sequenzen sind hingegen unverändert. Das artifizielle trDNA-Cluster aus invertierten DNA-Elementen gegenüber dem Hsp70 Promotor des Vektors ist somit deutlich instabil im Genom von *D. melanogaster*.

Abb. 19: Organisation des trDNA-Clusters im Stamm Hsp27

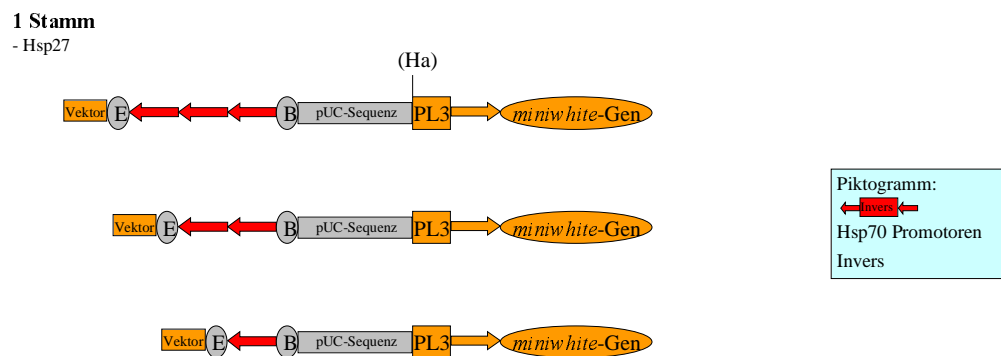


Abb. 19

Ein invertiertes Hsp70 Promotor-Trimer wird vom Hsp70 Promotor des pW8 Vektors von einem 845 bp langen DNA-Fragment aus dem pUC18-Vektor getrennt. Dieses DNA-Fragment besteht aus ca. 200 bp des *lacZ*-Gens ohne Promotor und einem Teil des *Ampicillin*-Resistenzgens. Ha ist Hpa I. B für (Bam HI, Xba I, Sal I, Pst I, Sph I, Hind III).

3.4 Einfluß tandem repetitiver DNA-Elemente auf die Genexpression

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß von trDNA auf die Genexpression zu untersuchen. Dabei sollten verschiedene Fragestellungen beantwortet werden:

- Kann trDNA die Expression eines benachbarten Gens positiv oder negativ beeinflussen?
- Bewirken unterschiedliche trDNAs vergleichbare Veränderungen in der Genexpression?
- Ist allein die Repetitivität ausreichend, um solche Effekte zu erzielen?
- Gibt es chromosomale Positionseffekte, die ihrerseits Einfluß auf benachbarte Gene ausüben?

3.4.1 Bestimmung der basalen Expression des *miniwhite*-Reportergens

Als Testgen für alle Untersuchungen wurde das *miniwhite*-Gen unter Kontrolle eines Hsp70 Promotors verwendet. Das wildtypische *white*-Gen ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und kodiert für ein Transporterprotein, das für die Einlagerung des Pigments Drosopterin in die Pigmentzellen der Augen von *D. melanogaster* verantwortlich ist (Dreesen et al., 1988; Savary et al., 1996; Übersicht in: Phillips und Forrest, 1978). Eine homozygote Deletion des Gens (w^-/w^-) führt zu einer weißen Augenfarbe der Fliegen. Tiere mit der Mutation (w^-/w^-) wurden in dieser Arbeit als Rezipientenstamm für die Keimbahntransformation verwendet (s. Methoden 2.10). Das *miniwhite*-Gen ist ein Allel des *white*-Gens und wird bei der Keimbahntransformation zur Selektion transgener Tiere verwendet. Die Expression des *miniwhite*-Gens führt in transgenen Tieren zu einer hellroten Augenfarbe. Die hellere Augenfarbe gegenüber den roten Augen von wildtypischen Fliegen wird mit der Deletion des ersten Introns bei der Klonierung des *miniwhite*-Gens erklärt (Klemenz et al., 1987).

Das *miniwhite*-Gen wurde in den hier durchgeführten Experimenten jedoch nicht nur als Markergen zur Erkennung transgener Fliegen verwendet sondern auch als Reporter gen, um den Einfluß von unmittelbar benachbarter trDNA auf die Expression dieses Gens zu untersuchen. Um Veränderungen der Expression des *miniwhite*-Gens unter Einfluß von trDNA beurteilen zu können, mußte die Basisexpression des *miniwhite*-Gens unter Standardbedingungen bestimmt werden. Dazu wurden

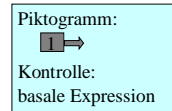
verschiedene transgene Stämme, die alle ein *miniwhite*-Gen als Reportergen enthalten, auf die basale Expression des *miniwhite*-Gens untersucht.

Drei der Kontrollstämme enthalten als Transgen vor dem Hsp70 Promotor anstatt der trDNA ein ähnlich großes DNA-Fragment von ca. 3,6 Kbp eines *lacZ*-Gens ohne Promotor (s. Abb. 20A). Damit sollte überprüft werden, ob allein die Klonierung zusätzlicher DNA-Sequenzen vor den Promotor einen Effekt auf die Genexpression ausübt. Das *lacZ*-Gen wurde als neutraler Puffer gewählt, da es in vielen P-Element-Vektoren als zusätzlicher Marker verwendet wird und bisher in keinem Fall eine Beeinflussung eines in der Nähe liegenden Gens beobachtet werden konnte. In zwei weiteren Stämmen ist vor dem *lacZ*-Gen zusätzlich ein ca. 2,5 Kbp großes DNA-Fragment aus *C. piger* integriert. Die DNA-Sequenz unbekannter Funktion besteht aus der 5'-Region des *CpY*-Gens (Kraemer, 1994). Damit sollte überprüft werden, ob eine beliebige DNA-Sequenz aus *Chironomus* das Reportergen beeinflussen könnte (s. Abb. 20B).

Abb. 20: Konstrukte zur Bestimmung der basalen Expression des *miniwhite*-Gens

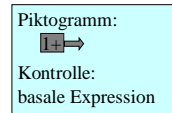
A) Das *lacZ*-Gen anstatt der trDNA

Stämme:
lac1, lac2, lac3



B) Das *lacZ*-Gen und eine DNA-Sequenz aus *C. piger*

Stämme:
lac22a
lac32



C) Der *white*-Promotor anstatt des Hsp70 Promotors

Stämme:
457, dackel,
632, 802, 805

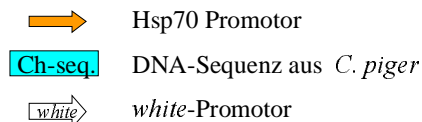
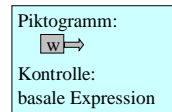


Abb. 20

Dargestellt sind verschiedene Konstrukte in transgenen *D. melanogaster*-Stämmen, die zur Bestimmung der basalen Expression des *miniwhite*-Gens verwendet wurden. PL4 für (Sal I, Pst I, Sph I).

In fünf weiteren Stämmen wurde die Expression des *miniwhite*-Gens unter Kontrolle des natürlichen *white*-Promotors betrachtet (s. Abb. 20C). Damit sollte überprüft werden, ob die Verwendung des Hsp70 Promotors zu einer suboptimalen Expression des *miniwhite*-Reportergens führt. Die verschiedenen transgenen Kontrollstämme lagen schon vor (Vef, 1991; Weil, 1999). Mittels einer PCR-Analyse wurde überprüft, ob die transgenen Kontrollstämme das erwartete Vektorkonstrukt im Genom integriert haben (s. Abb. 21).

Abb. 21: PCR-Analyse der Kontrollstämme

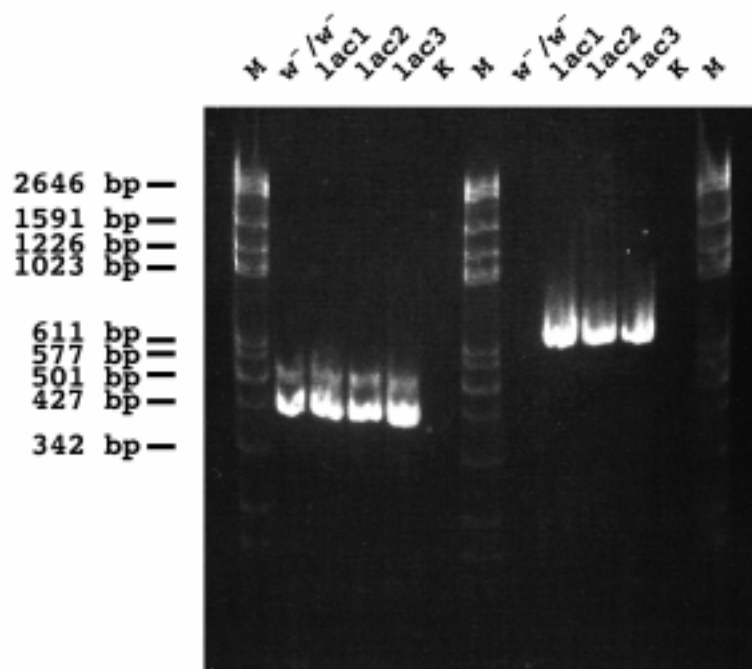


Abb. 21

Aus genomischer DNA der verschiedenen Kontrollstämme wurde mittels PCR eine vektorspezifische DNA-Sequenz aus dem Bereich des *miniwhite*-Gens als "Transgen-Test" amplifiziert (s. Methoden 2.10.6). Die Abbildung 21 zeigt in den Spuren 9 bis 11 die PCR-Produkte exemplarisch für die Stämme lac1, lac2 und lac3. Aus allen transgenen Stämmen ergibt sich ein deutliches Amplifikationsprodukt des *miniwhite*-Gens von ca. 680 bp. Enthält der untersuchte Stamm kein Transgen (w^-/w^-), fehlt ein Amplifikationsprodukt der PCR (Spur 8). Als Kontrolle der PCR dient die Amplifikation eines DNA-Fragments aus dem Intergen-Bereich zwischen den Genen *DmX* (Datenbankeintrag: "Accession"-Nummer "X97196") und *SpX* (Datenbankeintrag: "Accession"-Nummer "X97197") in *D. melanogaster*. Sowohl aus genomischer DNA von transgenen Stämmen (lac1, lac2, lac3) als auch des nicht transgenen Rezipientenstamms (w^-/w^-) lässt sich ein 420 bp langes PCR-Produkt amplifizieren. Die Spuren 2 bis 5 zeigen die Auftrennung der Amplifikationsprodukte auf einem 0,8%igen Agarosegel. M für Marker. K für Negativ-Kontrolle der PCR.

Um die Expression des *miniwhite*-Gens quantitativ zu erfassen, wurde aus den Köpfen transgener Tiere das Pigment Drosopterin extrahiert (Evans und Howells, 1978) und photometrisch bei 485 nm gemessen. Anhand der Extinktion kann der Pigmentgehalt in nmol pro Fliege bestimmt werden (s. Methoden 2.12). Da sowohl das Alter als auch das Geschlecht der Fliegen die Einlagerung des Pigments Drosopterin beeinflussen, wurden für alle Messungen nur Tiere gleichen Alters und Geschlechts verwendet. Der Pigmentgehalt wurde aus hemizygoten, männlichen Tieren im Alter von zwei bis fünf Stunden bestimmt, die unter Standardbedingungen bei 23 °C gezüchtet wurden.

Abb. 22: Basale Expression des *miniwhite*-Gens

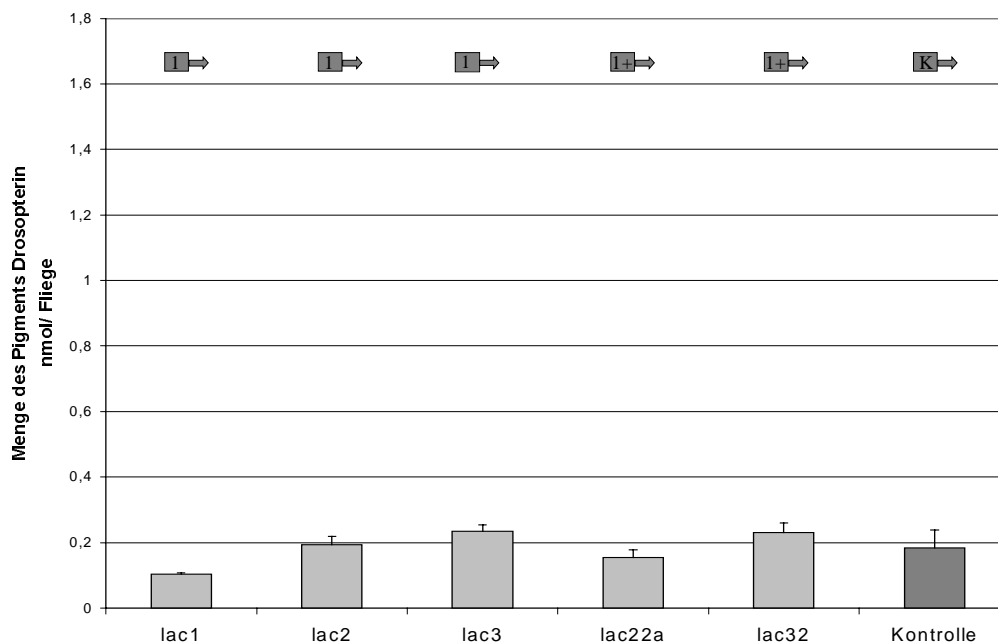


Abb. 22

Aus jeweils fünf bis zehn Tieren der verschiedenen transgenen Kontrollstämmen wurde das Pigment Drosopterin extrahiert und photometrisch die Extinktion bestimmt. Graphisch dargestellt ist die Menge des Pigments Drosopterin in nmol pro Fliege (s. Methoden 2.12). Die Meßwerte für fünf verschiedene Stämme sind als graue Balken dargestellt und mit Piktogrammen für die zwei verschiedenen Konstrukte markiert (s. Abb. 20). Für jeden Stamm wurden mindestens vier unabhängige Extraktionen gemessen. Die Standardabweichung ist dabei ein Maß für die Unterschiede, die sich aus den einzelnen Extraktionen ergeben. Der sechste Balken (dunkelgrau) gibt den Mittelwert des Pigmentgehalts aus den fünf verschiedenen Stämmen an. Die eingezeichnete Standardabweichung ist dabei ein Maß für die unterschiedliche Expression des Transgens auf Grund einer Integration in unterschiedlichen Chromosomenregionen.

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Pigmentmessungen für fünf unterschiedliche transgene Stämme. Das *miniwhite*-Gen wird jeweils von einer Kopie des Hsp70 Promotors reguliert. Die Expression des Reportergens führt in allen Stämmen zu einem Pigmentgehalt von $0,18 \text{ nmol} \pm 0,055$ Drosopterin pro Fliege. Dabei gibt es eine Variabilität im Pigmentgehalt verschiedener Stämme. Diese Variabilität wurde schon bei der Konstruktion des Vektors pW8 und den nachfolgenden Keimbahntransformationen beobachtet (Klemenz et al., 1987). Erklärt wird diese Variabilität mit der Integration des Transgens in verschiedenen Chromosomenregionen. Je nach Integrationsort scheint die Expression des *miniwhite*-Gens begünstigt oder gehemmt zu sein. Entscheidend ist jedoch, daß alle Stämme diese Variabilität nur in einem engen Rahmen um die absolute Drosopterinmenge von $0,2 \text{ nmol}$ Pigment Drosopterin pro Fliege zeigen.

Abb. 23: Expression des *miniwhite*-Gens unter Kontrolle des *white*-Promotors

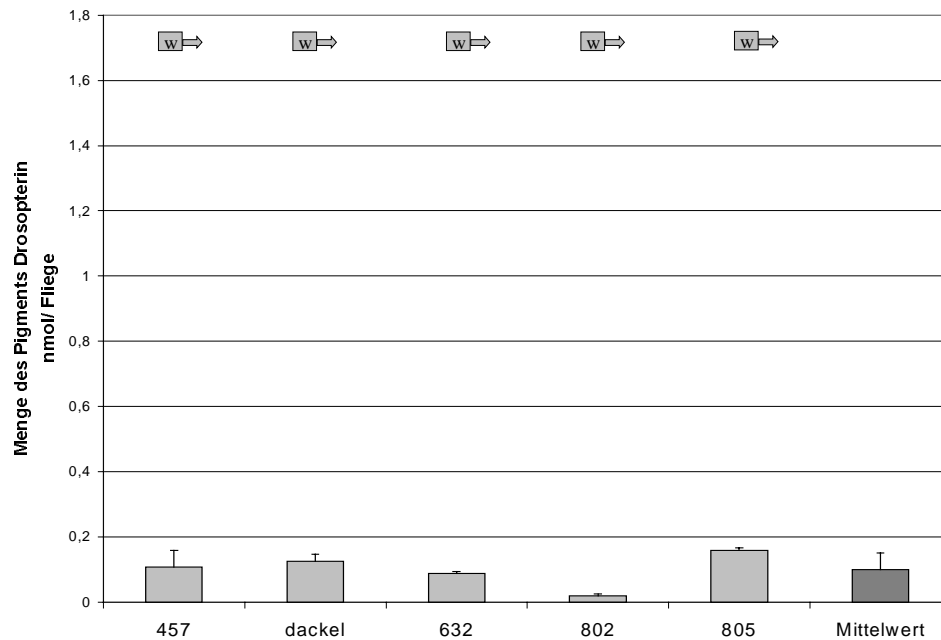


Abb. 23

Aus jeweils fünf bis zehn Tieren der verschiedenen transgenen Kontrollstämmen wurde das Pigment Drosopterin extrahiert und photometrisch die Extinktion bestimmt. Graphisch dargestellt ist die Menge des Pigments Drosopterin in nmol pro Fliege (s. Methoden 2.12). Die Meßwerte für fünf verschiedene Stämme sind als graue Balken dargestellt und mit dem Piktogramm des Konstruktes markiert (s. Abb. 20C). Für jeden Stamm wurden mindestens vier unabhängige Extraktionen gemessen. Die Standardabweichung ist dabei ein Maß für die Unterschiede, die sich aus den einzelnen Extraktionen ergeben. Der sechste Balken (dunkelgrau) gibt den Mittelwert des Pigmentgehalts aus den fünf verschiedenen Stämmen an. Die eingezeichnete Standardabweichung ist dabei ein Maß für die unterschiedliche Expression des Transgens auf Grund einer Integration in unterschiedlichen Chromosomenregionen.

Der Mittelwert aus allen fünf Kontrollstämmen (s. Abb. 22, Kontrolle) wird als Referenz für alle weiteren Abbildungen verwendet. Als weitere Kontrolle wurde die Expression des *miniwhite*-Reportergens unter der Kontrolle des natürlichen *white*-Promotors betrachtet (s. Abb. 20C). Die fünf unterschiedlichen transgenen Stämme zeigen eine Expression des Reporter gens, die zu einem Pigmentgehalt von weniger als 0,2 nmol Drosoplerin pro Fliege führt (s. Abb. 23). Damit scheint die Expression des *miniwhite*-Reporter gens unter Kontrolle des *white*-Promotors im Durchschnitt sogar etwas geringer zu sein als bei den Stämmen, deren *miniwhite*-Gen von einem Hsp70 Promotor kontrolliert wird. Der Hsp70 Promotor führt somit zu einer ähnlich starken Expression des *miniwhite*-Reporter gens wie der natürliche *white*-Promotor.

Damit zeigen insgesamt zehn unterschiedliche transgene Stämme eine Expression des *miniwhite*-Reporter gens von ca. 0,2 nmol des Pigments Drosoplerin pro Fliege.

3.4.2 Artificielle tandem repetitive Hsp70 Promotoren

Um den Einfluß von tandem repetitiven DNA-Elementen mit bekannter Promotor-Aktivität auf die Expression eines benachbarten Reporter gens zu untersuchen, wurden tandem repetitive Hsp70 Promotoren vor das *miniwhite*-Gen kloniert (s. Abb. 10) und in das Genom von *D. melanogaster* integriert. Insgesamt wurden sieben transgene *D. melanogaster* Stämme mit einer singulären Integration eines trDNA-Clusters aus Hsp70 Promotoren hergestellt (s. Tabelle 4).

Einfluß der Orientierung der tandem repetitiven Hsp70 Promotoren

In drei unterschiedlichen Stämmen (5H72, 5H4, 8H4Tb) mit jeweils einer Integration des Transgens im Euchromatin (s. Tabelle 4), sind die Hsp70 Promotoren gleichgerichtet mit dem Promotor des *miniwhite*-Gens angeordnet (s. Abb. 17B). Die Abbildung 24 zeigt im zweiten Balken den Mittelwert der gemessenen Drosoplerinmenge aus zwei Stämmen mit einem trDNA-Cluster aus fünf Hsp70 Promotoren (s. Abb. 17B, Stämme 5H72, 5H4). Gegenüber den Kontrollstämmen ist der Pigmentgehalt um einen Faktor sechs erhöht. Die zusätzlichen tandem repetitiven Promotor-Kopien, die gleichgerichtet mit dem vektoreigenen Promotor sind, rufen eine deutliche Steigerung der Expression des *miniwhite*-Gens hervor.

Abb. 24: Effekt von trDNA aus Hsp70 Promotoren auf die Genexpression

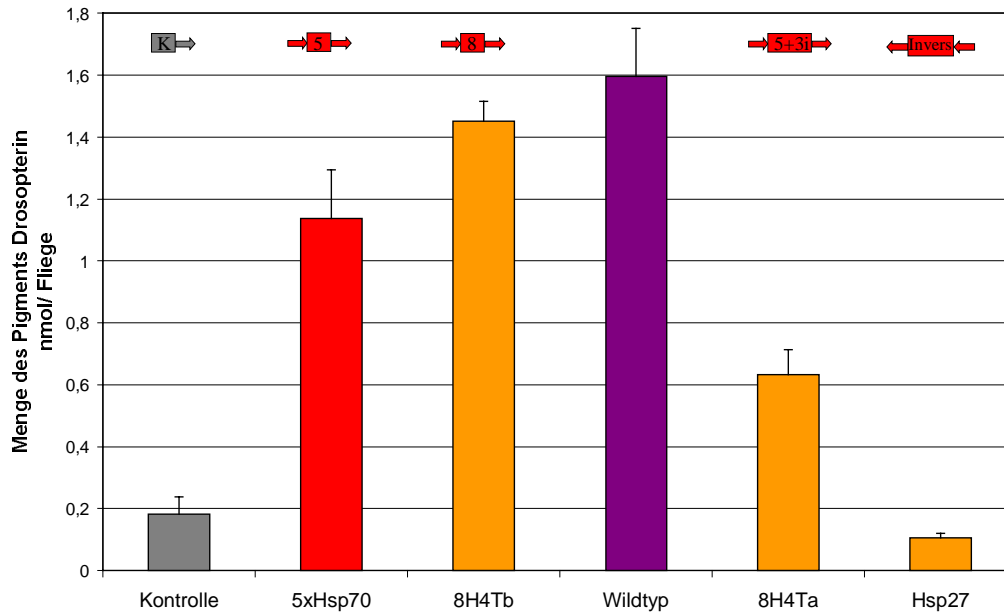


Abb. 24

Aus jeweils fünf bis zehn Tieren der verschiedenen transgenen Stämme wurde das Pigment Drosoprotein extrahiert und photometrisch die Extinktion bestimmt. Graphisch dargestellt ist die Menge des Pigments Drosoprotein in nmol pro Fliege (s. Methoden 2.12). Gemittelte Meßwerte aus verschiedenen Stämmen mit der Integration von identischen Konstrukten sind als roter Balken (5xHsp70 für die Stämme 5H72 und 5H4) und als grauer Balken (Kontrolle) dargestellt. Die eingezeichnete Standardabweichung ist ein Maß für die unterschiedliche Expression des Transgens auf Grund einer Integration in unterschiedlichen Chromosomenregionen. Die Meßwerte für einzelne Stämme sind orange markiert. Die Standardabweichung ist ein Maß für die Unterschiede der Messungen in den einzelnen Extraktionen. Die Piktogramme oberhalb der Balken symbolisieren die unterschiedliche Organisation der verschiedenen trDNA-Cluster (s. Abb. 17B). Für jeden Stamm wurden fünf bis vierzehn unabhängige Extraktionen gemessen.

Im Stamm 8H4Tb wurde ein trDNA-Cluster aus acht Hsp70 Promotoren integriert (s. Abb. 17B). Der Pigmentgehalt dieses Stamms ist gegenüber den Kontrollstämmen um einen Faktor größer sieben erhöht (s. Abb. 24). Der Stamm 8H4Ta hat in seinem Genom ein trDNA-Cluster identischer Größe integriert, bei dem jedoch drei trDNA-Kopien innerhalb des trDNA-Clusters invertiert sind (s. Abb. 17B). Die Abbildung 24 zeigt im fünften Balken die gemessene Drosoproteinmenge der Fliegen dieses Stamms. Gegenüber den Kontrollstämmen ist der Drosoproteinengehalt dreimal so hoch. Im Vergleich zum Stamm 8H4Tb ist der Pigmentgehalt jedoch um die Hälfte erniedrigt. TrDNA-Cluster, die in ihrer DNA-Sequenz identisch sind und sich allein in der Orientierung in Teilen des trDNA-Clusters unterscheiden, zeigen somit deutliche Unterschiede in ihrem

Einfluß auf ein benachbartes Reporter-gen. Im Stamm 8H4Ta sind fünf Kopien des trDNA-Clusters aus Hsp70 Promotoren gleichgerichtet und drei Kopien gegenüber dem Promotor des Vektors invertiert angeordnet (s. Abb. 17B). Trotz der fünf korrekt orientierten Hsp70 Promotoren ist der Pigmentgehalt in den Fliegen um die Hälfte niedriger als bei den Stämmen (s. Abb. 24, 5xHsp70), deren trDNA-Cluster ausschließlich aus fünf richtig orientierten Hsp70 Promotoren besteht (s. Abb. 17B). Die invertierten trDNA-Einheiten im Stamm 8H4Ta blockieren den positiven Effekt zumindest der zwei 5'-liegenden Promotor-Kopien (s. Abb. 17B). Ob die invertierten Kopien zusätzlich auch die 3'-liegenden Hsp70 Promotor-Einheiten in ihrer Wirkung negativ beeinflussen, ist bei diesem Versuch nicht zu erkennen.

Einen Hinweis auf einen negativen Einfluß auf die Genexpression von invertierten Hsp70 Promotoren liefern die Pigmentanalysen des Stamms Hsp27. Der Stamm Hsp27 besitzt ein trDNA-Cluster aus bis zu drei invertierten Hsp70 Promotoren gegenüber dem Hsp70 Promotor des Vektors (s. Abb. 19). Wie in Abbildung 24 zu sehen, liegt der gemessene Pigmentgehalt dieses Stamms bei $0,106 \pm 0,013$ nmol Drosopterin pro Fliege. Ein t-Test belegt den signifikanten Unterschied dieses Werts im Vergleich zu der ermittelten Pigmentmenge in den Kontrollstämmen ($p < 0,0026$). Ein trDNA-Cluster aus invertierten Kopien des Hsp70 Promotors scheint in diesem Stamm negativ auf den Promotor des *miniwhite*-Gens zu wirken. Da nur ein Stamm mit dieser Anordnung der Hsp70 Promotoren vorliegt, ist nicht auszuschließen, daß der beobachtete Effekt auf den Einfluß des Integrationsorts zurückzuführen ist. Zusammen mit den Ergebnissen des Stamms 8H4Ta (s. Abb. 24), der ebenfalls einen verminderten Pigmentgehalt besitzt, ist jedoch ein inhibierender Einfluß invertierter Promotor-Kopien als Ursache für den verminderten Drosopterin-Gehalt zu vermuten.

Einfluß der Anzahl der tandem repetitiven Hsp70 Promotoren

Drei Stämme (5H72, 5H4, 8H4Tb) besitzen eine Integration eines trDNA-Clusters aus Hsp70 Promotoren, wobei alle trDNA-Einheiten gleichorientiert mit dem Hsp70 Promotor des Vektors sind. Beide Stämme (5H72, 5H4) mit einem trDNA-Cluster aus fünf Promotoreinheiten (Abb. 24, 5xHsp70) haben einen niedrigeren Pigmentgehalt als der Stamm mit acht Promotoreinheiten (Abb. 24, 8H4Tb). Mit wachsender Anzahl der trDNA-Einheiten aus Hsp70 Promotoren steigt auch die gemessene Menge des Pigments. Die Expression des *miniwhite*-Gens erreicht im Stamm 8H4Tb annähernd den Wert wildtypischer Fliegen von 1,6 nmol Pigment Drosopterin pro Fliege.

3.4.3 TrDNA aus *Chironomus*

Insgesamt wurden sieben transgene *D. melanogaster*-Stämme mit einer singulären Integration eines trDNA-Clusters aus Cla-Elementen hergestellt (s. Tabelle 4). In allen Stämmen wurde die Menge des Pigments Drosoplerin gemessen und mit den Kontrollstämmen verglichen.

Einfluß der Orientierung der tandem repetitiven Cla-Elemente

In vier unterschiedlichen Stämmen (Tabelle 4, Stämme CT9A, CT11A, CT11A-Tc und CT8B) mit jeweils einer singulären Integration des Transgens ist das Cla-Element-Cluster in der Orientierung A angeordnet (s. Abb. 6A). Die Abbildung 25 zeigt im dritten Balken (1Cla) den Mittelwert der gemessenen Drosoplerinmenge aus allen vier Stämmen. Obwohl die Menge des Pigments Drosoplerin im Vergleich zu den Kontrollstämmen leicht erhöht erscheint, ist der Unterschied nicht signifikant (s. Tabelle 5). In zwei Stämmen (Tabelle 4, Stämme 2Cla18, 2Cla59) sind identische Cla-Element-Cluster in umgekehrter Orientierung angeordnet (s. Abb. 6B). Die Abbildung 25 zeigt im vierten Balken (2Cla) den Mittelwert der gemessenen Drosoplerinmenge aus beiden Stämmen. Der Pigmentgehalt und damit die Expression des *miniwhite*-Gens ist im Vergleich zu den Kontrollstämmen dreimal höher. Ein t-Test (s. Tabelle 5) belegt den signifikanten Unterschied zwischen dem Pigmentgehalt der Kontrollstämmen und allen transgenen Stämmen, die vor dem Reporter gen ein Cla-Element-Cluster in der Orientierung B besitzen. Auch der Unterschied im Pigmentgehalt der Tieren, die mit einem Cla-Element-Cluster unterschiedlicher Orientierung transgen sind, ist reproduzierbar und signifikant (s. Tabelle 5). Ausschließlich in der Orientierung B des Cla-Element-Clusters zeigt sich in transgenen Tieren eine Beeinflussung der Expression des Reporter gens durch das trDNA-Cluster. Die Orientierung A des trDNA-Cluster hat demgegenüber keinen Effekt auf die Expression des Reporter gens.

Abb. 25: Effekt von trDNA aus *Chironomus* auf die Genexpression

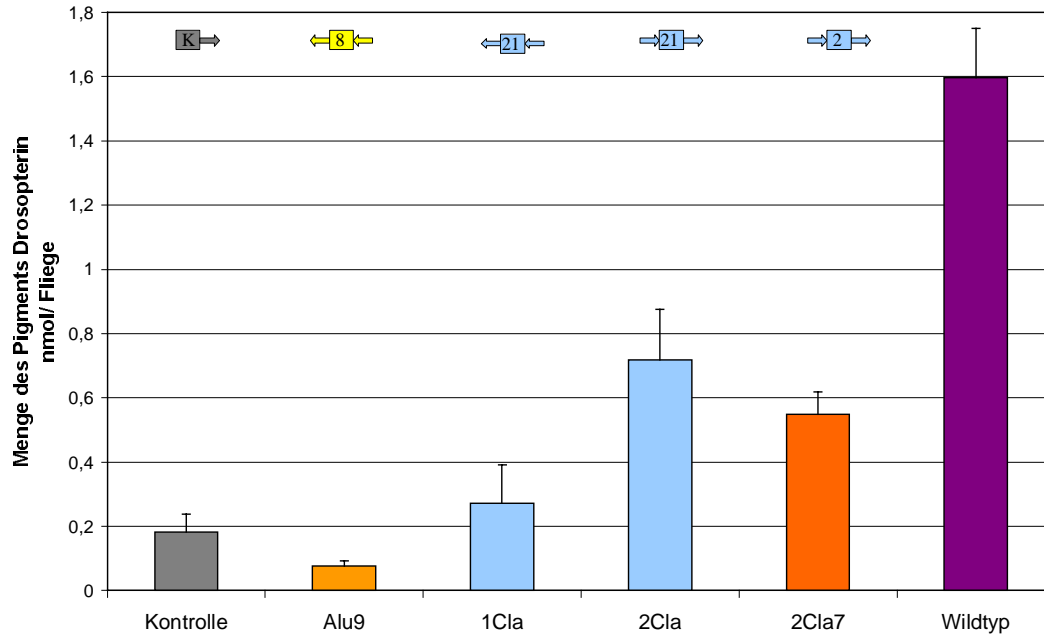


Abb. 25







Aus jeweils fünf bis zehn Tieren der verschiedenen transgenen Stämme wurde das Pigment Drosopterin extrahiert und photometrisch die Extinktion bestimmt. Graphisch dargestellt ist die Menge des Pigments Drosopterin in nmol pro Fliege (s. Methoden 2.12). Gemittelte Meßwerte aus verschiedenen Stämmen mit der Integration von identischen Konstrukten sind als blaue Balken (1Cla für die Stämme CT9A, CT11A, CT11A-Tc, CT8B und 2Cla für die Stämme 2Cla18, 2Cla59) und als grauer Balken (Kontrolle) dargestellt. Die eingezeichnete Standardabweichung ist ein Maß für die unterschiedliche Expression des Transgens auf Grund einer Integration in unterschiedlichen Chromosomenregionen. Die Meßwerte für einzelne Stämme sind orange markiert. Die Standardabweichung ist dabei ein Maß für die Unterschiede der Messungen in den einzelnen Extraktionen. Die Piktogramme oberhalb der Balken symbolisieren die unterschiedliche Organisation der verschiedenen trDNA-Cluster (s. Ergebnisse 3.1 u. 3.3). Für jeden Stamm wurden vier bis sieben unabhängige Extraktionen gemessen.

Einfluß der Anzahl der tandem repetitiven Cla-Elemente

Offensichtlich bestimmt auch die Anzahl der repetitiven Einheiten aus Cla-Elementen das Ausmaß des Effekts auf die Genexpression. Im Stamm 2Cla7 liegt das Cla-Element-Cluster in der zweiten Orientierung stark verkürzt vor (s. Abb. 16, Spur 4). Das trDNA-Cluster ist nur noch ca. 1,3 Kbp groß und besteht aus zwei Cla-Elementen und Cla-Element flankierender DNA, die jedoch noch deutliche Ähnlichkeit zu den Cla-Elementen besitzt (s. Ergebnisse 3.1.1). Auch die Fliegen des Stamms 2Cla7 haben

einen doppelten Drosopteringehalt (s. Abb. 25) gegenüber den Kontrollstämmen und gegenüber den Stämmen mit einer Integration des Cla-Element-Cluster in der Orientierung A (1Cla). In beiden Fällen ist der Unterschied im Pigmentgehalt der Augen signifikant (s. Tabelle 5). Der Stamm 2Cla7 hat jedoch gegenüber den Stämmen, die ein größeres Cla-Element-Cluster in gleicher Orientierung im Genom integriert haben (s. Abb. 25, 2Cla), einen niedrigeren Gehalt an Drosoplerin. Mit weniger Kopien der trDNA sinkt auch der positive Effekt des trDNA-Clusters auf die Expression des *miniwhite*-Reportergens. Alle mit einem *miniwhite*-Gen transgenen Stämme haben einen deutlich geringeren Gehalt an Drosoplerin als Wildtyp-Fliegen (s. Abb. 25).

Tabelle 5: T-Test zum Vergleich der Drosoplerinmenge in verschiedenen Stämmen

	1Cla 4 Stämme: CT9A, CT11A, CT8B, CT11A-Tc 	2Cla (21) 2 Stämme: 2Cla18, 2Cla59 	2Cla-Stämme		
			2Cla (21) 		2Cla7 (2) 
			Stamm: 2Cla18	Stamm: 2Cla59	Stamm: 2Cla7
Kontrolle (5 Stämme) 	p> 0,05 nicht signifikant	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
1Cla (4 Stämme) 		p<0,017	p<0,001	p<0,0021	p<0,0016

Durchgeführt wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test mit gleichen Varianzen (Sachs, 1974). Der Gehalt an Drosoplerin wurde in allen Stämmen durch die Messung von vier bis sieben unabhängigen Pigment-Extraktionen ermittelt. Die Werte von Stämmen mit der Integration von gleichen Konstrukten wurden gemittelt und die Mittelwerte mit dem t-Test auf Unterschiede untersucht (Spalten 2 und 3). Nur die Stämme mit einem trDNA-Cluster in der Orientierung B zeigen im Vergleich zu allen anderen Stämmen einen signifikant erhöhten Gehalt an Drosoplerin. Zusätzlich wurden alle drei Stämme mit einem trDNA-Cluster in der Orientierung B als Einzelstämme (Spalten 4 bis 6) mit dem t-Test auf Unterschiede gegenüber dem Drosopteringehalt in den Kontrollstämmen und Stämmen mit einem trDNA-Cluster in der Orientierung A untersucht. Auch dort zeigt sich jeweils ein signifikanter Unterschied im Drosopteringehalt der Fliegenaugen. In den Spalten drei bis sechs sind in Klammern die Anzahl von trDNA-Einheiten angegeben

Durch die P-Element-vermittelte Keimbahntransformation wurde eine transgene Linie erzeugt, die ein tandem repetitives Alu-Element-Cluster in das Genom von *D. melanogaster* integriert hat (s. Ergebnisse 3.1.5). Die Drosopiermenge im Fliegenauge diesen Stamms ist unterhalb von 0,2 nmol Pigment pro Fliege (s. Abb. 25) und damit sogar noch unterhalb der Werte für die Kontrollstämme. Da nur eine transgene Linie erzeugt wurde und auch nur eine Orientierung der trDNA getestet wurde, ist eine endgültige Aussage über den Einfluß dieser trDNA nicht möglich. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, daß Alu-Elemente keinen Einfluß auf ein in der Nähe liegendes Gen ausüben.

3.4.4 Einfluß der Chromosomenregion auf die Genexpression

Um den Einfluß des Integrationsorts auf die Genexpression zu untersuchen, wurden die verschiedenen transgenen Stämme auf Besonderheiten in ihrer chromosomalen Lokalisation untersucht. Abhängig vom Integrationsort ergeben sich deutliche Unterschiede in der Expression des Reportergens.

Stämme mit telomerischer Integration des Transgens

In zwei Stämmen (5H72Ta und 8H4Tc) erfolgte eine Integration des Transgens im Telomer (s. Abb. 11E, 11F). In beiden Fällen ergibt sich ein deutlicher Effekt auf die Expression des *miniwhite*-Reportergens. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 zusammengefaßt. Sowohl der Stamm 5H72Ta als auch der Stamm 8H4Tc zeigen einen über 20-fach erniedrigten Drosopiergehalt im Vergleich zu den Stämmen mit identischen Konstrukten integriert in euchromatische Bereiche des Chromosoms (s. Abb. 26, 5xHsp70 bzw. 8H4Tb). Die heterochromatische Umgebung des Telomers führt also zu einer Repression des Reportergens in zwei unabhängigen Stämmen. Die positive Wirkung der zusätzlichen Promotoren im Vergleich zu den Kontrollstämmen wird vollständig unterdrückt. Der Pigmentgehalt liegt sogar deutlich unterhalb des Werts für die Kontrollstämme (s. Abb. 26, Balken 7). Ein t-Test belegt den signifikanten Unterschied im Pigmentgehalt beider Stämme mit einer telomerischen Integration des trDNA-Clusters im Vergleich zu den Kontrollstämmen ($p < 0,0061$ für 5H72Ta und $p < 0,0088$ für 8H4Tc).

Die heterochromatische Umgebung führt somit zu einer kaum wahrnehmbaren Expression des *miniwhite*-Reportergens in den betroffenen Stämmen.

Abb. 26: Genexpression von Transgenen in telomerischer Chromosomenregion

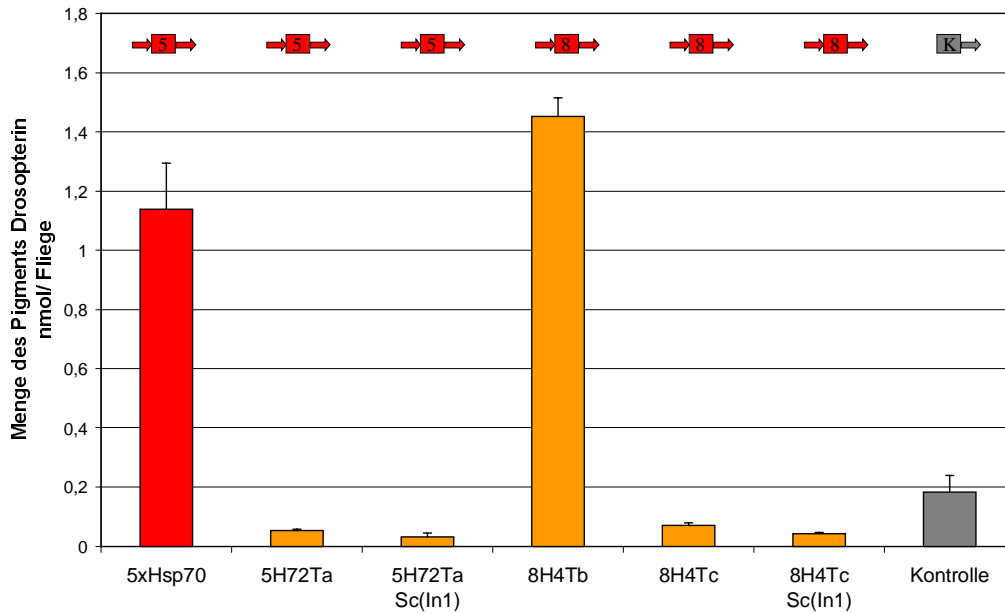


Abb. 26

Aus jeweils zehn bis fünfzehn Tieren der verschiedenen transgenen Stämme wurde das Pigment Drosophyllin extrahiert und photometrisch die Extinktion bestimmt. Graphisch dargestellt ist die Menge des Pigments Drosophyllin in nmol pro Fliege (s. Methoden 2.12). Gemittelte Meßwerte aus verschiedenen Stämmen mit der Integration von identischen Konstrukten sind als roter (5xHsp70 für die Stämme 5H72 und 5H4) und grauer (Kontrolle) Balken dargestellt. Die eingezeichnete Standardabweichung ist dabei ein Maß für die unterschiedliche Expression des Transgens auf Grund einer Integration in unterschiedlichen Chromosomenregionen. Die Meßwerte für einzelne Stämme sind orange markiert. Die Standardabweichung ist dabei ein Maß für die Unterschiede der Messungen in den einzelnen Extraktionen. Die Piktogramme oberhalb der Balken symbolisieren die unterschiedliche Organisation der verschiedenen trDNA-Cluster (s. Abb. 17B). Für jeden Stamm wurden fünf bis vierzehn Extraktionen gemessen.

Einfluß der Mutation Su(UR)ES auf die Genexpression im Telomerbereich

In *D. melanogaster* ist neben der veränderten Packungsdichte auch die Unterreplikation in den Polytänchromosomen ein Merkmal heterochromatischer Bereiche. Eine Mutation des Gens *Su(UR)ES* unterdrückt die Unterreplikation heterochromatischer Bereiche in *D. melanogaster* (Belyaeva und Zhimulev et al., 1998). In den hier

untersuchten Stämmen 5H72Ta und 8H4Tc wirkt die heterochromatische Umgebung reprimierend auf die Expression des Reportergens. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der reprimierenden Wirkung des telomerischen Heterochromatins auf die Genexpression und der Unterreplikation des telomerischen Heterochromatins. Durch Kreuzungen wurden Tiere gezüchtet, die heterozygot für eine Integration eines trDNA-Clusters aus Hsp70 Promotoren im Telomer und für die Mutation des Gens *Su(UR)ES* waren. Es konnten nur heterozygote Tiere mit der Mutation des Gens *Su(UR)ES* hergestellt werden, da sowohl die Integration der telomerischen trDNA als auch das Gen *Su(UR)ES* auf dem Chromosom III lokalisiert sind. Pigmentmessungen der erzeugten Tiere sind in Abbildung 26 (Sc(In 1)) gezeigt. Der Pigmentgehalt dieser Tiere (s. Abb. 26, Sc(In1)) ist im Vergleich zu den Tieren unverändert, denen die Genmutation *Su(UR)ES* fehlt. Auch ein durchgeführter t-Test bestätigt keinen signifikanten Unterschied im Pigmentgehalt der Tiere.

Einfluß des X-Chromosoms auf die Genexpression

Die Expression des *miniwhite*-Reportergens ist in weiblichen Tieren davon abhängig, ob die Integration eines Transgens auf dem X-Chromosom oder auf einem der Autosomen liegt. Die Abbildung 27 zeigt den Pigmentgehalt in transgenen Stämmen mit Integrationen von verschiedenen trDNA-Clustern, wobei männliche und weibliche Tiere getrennt dargestellt sind. Zunächst ist es ein generelles Phänomen, daß männliche Tiere im Vergleich zu weiblichen Tieren einen leicht erhöhten Pigmentgehalt in den Augen zeigen. Dieses Phänomen zeigen alle transgenen Stämme einschließlich der Kontrollstämme. Exemplarisch sind zwei Stämme gezeigt (s. Abb. 27, Stämme 2Cla18 und 5H4), die jeweils eine Integration der jeweiligen trDNA auf einem Autosom haben. Befindet sich die Integration des Transgens aber auf dem X-Chromosom, ist der Unterschied im Pigmentgehalt zwischen männlichen und weiblichen Tieren erheblich verstärkt. Dieser X-chromosomale Effekt findet sich sowohl bei Tieren mit einem aus Cla-Elementen bestehenden Transgen (2Cla 59) als auch bei Tieren, deren transgenes trDNA-Cluster aus Hsp70 Promotoren (5H72) besteht. Ein hemizygoten *miniwhite*-Gen auf dem X-Chromosom scheint in weiblichen Tieren in seiner Expression gehemmt zu sein. Dies zeigt sich an Stämmen mit identischen Konstrukten einerseits integriert auf dem X-Chromosom (Stämme 2Cla59 bzw. 5H72) andererseits auf einem Autosom (Stämme 2Cla18 bzw. 5H4). Je nach Integration des Transgens auf dem X-Chromosom oder auf einem Autosom ergibt sich in den hemizygoten Männchen bezüglich des

Pigmentgehalts kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 27, Balken 2 u. 4 bzw. Balken 7 u. 10). Die weiblichen Tiere hingegen haben nur bei einer autosomalen Integration (Stämme 2Cla18 bzw. 5H4) des Transgens (s. Abb. 27, Balken 3 bzw. Balken 11) eine ähnlich hohe Expression des Reportergens wie die Männchen des gleichen Stamms (s. Abb. 27, Balken 2 bzw. 10). Befindet sich das Transgen auf dem X-Chromosom (Stämme 2Cla59 bzw. 5H72), besteht ein deutlicher Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren des gleichen Stamms (s. Abb. 27, Balken 4 u. 5 bzw. Balken 7 u. 8). Der geschlechtsspezifische Unterschied im Pigmentgehalt wird teilweise aufgehoben, wenn das entsprechende Konstrukt homozygot auf beiden X-Chromosomen vorhanden ist (s. Abb. 27, Balken 6 bzw. Balken 9).

Abb. 27: Genexpression bei X-chromosomaler Lokalisation des Transgens

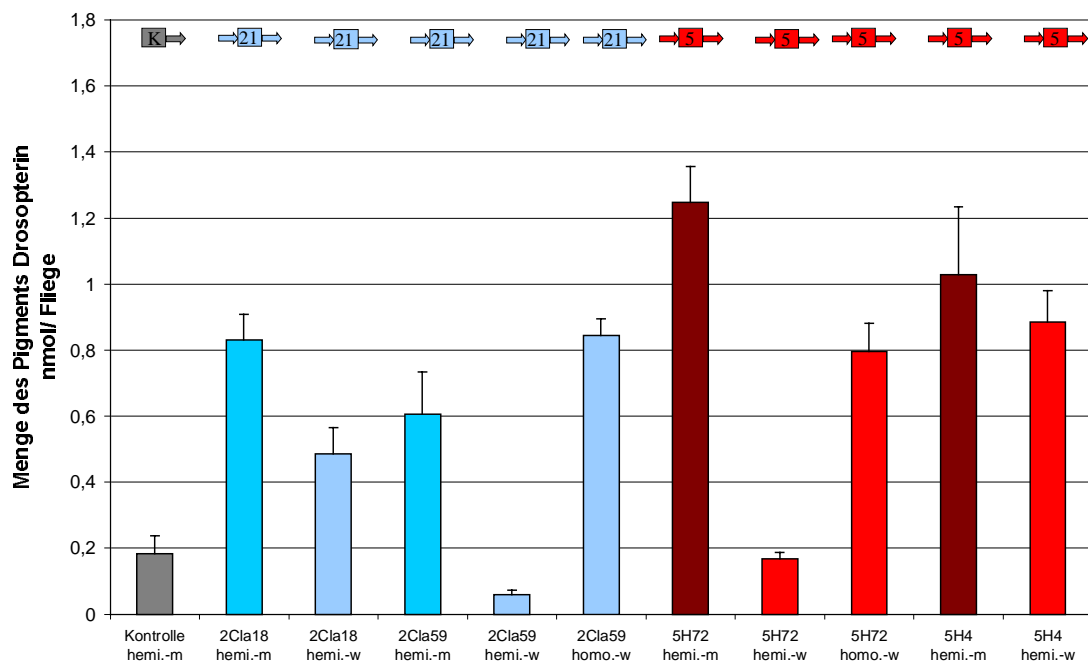


Abb. 27

Aus jeweils zehn bis fünfzehn Tieren der verschiedenen transgenen Stämme wurde das Pigment Drosoprotein extrahiert und photometrisch die Extinktion bestimmt. Graphisch dargestellt ist die Menge des Pigments Drosoprotein in nmol pro Fliege (s. Methoden 2.12). Mit Cla-Elementen transgene Stämme sind als blaue Balken dargestellt, während transgene Stämme mit zusätzlichen Hsp70 Promotoren rot markiert sind. Die Standardabweichung in diesen Stämmen ist ein Maß für die Unterschiede der Messungen in den einzelnen Extraktionen. Meßwerte von männlichen (m) Tieren sind als dunkle Balken markiert, während Meßwerte von weiblichen (w) Tieren als helle Balken dargestellt sind. Die Piktogramme oberhalb der Balken symbolisieren die unterschiedliche Organisation der verschiedenen trDNA-Cluster (s. Ergebnisse 3.3). Für jeden Stamm wurden fünf bis zwölf unabhängige Extraktionen gemessen. hemi für hemizygot; homo für homozygot.

4. Diskussion

Das Genom höherer Organismen setzt sich aus "single copy"-DNA und repetitiven DNA-Abschnitten zusammen. Der Anteil der repetitiven DNA im Genom ist abhängig vom Organismus. So enthält z. B. das Genom der Zuckmücke *C. tentans* nur wenige Prozent repetitiver DNA-Sequenzen, das menschliche Genom etwa 36%, und in einigen Pflanzen kann mehr als 80 % des Genoms repetitiv sein (Cavalier-Smith, 1985; John und Miklos, 1988). Selbst bei nahe verwandten Arten kann die Menge an repetitiven DNA-Sequenzen sehr variieren. Dies wurde z. B. für verschiedene Spezies aus *Chironomus* (Schaefer und Schmidt, 1981; Schmidt, 1984), *Drosophila* (Henning et al., 1970) oder der Maus (Wong et al., 1990a) nachgewiesen. Abhängig von der Anordnung im Genom werden interspergiert vorkommende, repetitive Elemente von trDNA-Sequenzen unterschieden. Bei beiden Organisationsformen gibt es Beispiele sowohl für nicht-kodierende als auch für kodierende DNA-Sequenzen.

Interspergierte Repetitionseinheiten

Bei nicht-kodierenden, verstreut im Genom vorliegenden Repetitionen handelt es sich meist um mobile genetische Elemente, sogenannte Transposons. Klassifiziert werden Transposons nach ihrem Mechanismus, ihre Position im Genom zu verändern (Charlesworth et al., 1994; Kidwell und Lisch, 1997). **Retroelemente** transponieren über RNA-Intermediate, die in Form einer doppelsträngigen cDNA als zusätzliche Kopie in das Genom reintegrieren. Ihre Länge variiert von weniger als 100 bp bis zu mehreren Kbp. Während Retrotransposons (z. B. LINEs), die zur cDNA-Herstellung notwendige Reverse Transkriptase selbst kodieren, fehlt den Retroposons (z. B. SINEs) jegliches Kodierungspotential (Übersicht in: Singer, 1982). Den Retroelementen werden die **DNA-Transposons** gegenübergestellt, deren Transposition im Genom ausschließlich auf DNA-Ebene erfolgt. Durch Exzision und Reintegration kann die Lage des Transposons im Genom verändert werden. Strukturell sind Transposons meist durch invertierte Wiederholungseinheiten an den Enden gekennzeichnet und enthalten offene Leserahmen, die für Transposase-Enzyme kodieren. Aber auch deletierte Transposons ohne eigene Transposase sind mobil, indem sie die Transposase anderer Transposons verwenden. Gut untersuchte Beispiele für Transposons sind die **P-Elemente** und Mariner-Elemente aus *Drosophila* (Spradling und Rubin, 1982; Scavarda und Hartl, 1984) oder die Ac/Dc-Elemente aus Mais (McClintock, 1956).

Tandem repetitive Repetitionseinheiten

Tandem repetitive DNA-Elemente wurden ursprünglich als zusätzliche DNA-Fraktion in der Dichtegradienten-Zentrifugation identifiziert. Diese beruht auf einer erhöhten oder verringerten Schwimmdichte der sogenannten Satelliten-DNA im Vergleich zu anderen DNA-Sequenzen. Die Hauptmasse der klassischen Satelliten-DNA ist im konstitutiven Heterochromatin von Centromeren und Telomeren lokalisiert und wesentlich an dem Aufbau dieser Strukturen beteiligt (Blackburn, 1991; Sun et al., 1997). Gleichzeitig übt das Heterochromatin, etwa in Form eines Positionseffekts, einen inhibierenden Einfluß auf die Expression eines benachbarten Gens aus. Damit stellt sich die Frage, ob die das Heterochromatin-bestimmende trDNA die eigentliche Ursache dieses Effekts ist. Die Untersuchungen von Dorer und Henikoff (1994) zeigen, daß repetitive DNA-Sequenzen möglicherweise generell einen inhibierenden Einfluß auf benachbarte Gene ausüben können (s. Abb. 2). Trifft dies jedoch für jede beliebige repetitive DNA-Sequenz zu, würde das weitreichende Konsequenzen für die Funktionalität vieler Gene haben. TrDNA ist eine instabile Komponente des Genoms (Schmidt, 1984; Hankeln et al., 1994). Jede Positionsveränderung von trDNA würde zu einer Beeinflussung der umliegenden chromosomalen DNA-Region führen. Gene, die benachbart zu neuen oder veränderten trDNA-Clustern liegen, könnten entgegen ihrer normalen Regulation beeinflusst werden. Die Umorganisation von repetitiver DNA gilt jedoch weitgehend als selektiv neutral (Orgel und Crick, 1980; Doolittle und Sapienza, 1980). Nur für einzelne trDNAs gibt es experimentelle Befunde, daß deren Umorganisation einen Einfluß auf einen Organismus ausüben könnte. Haaf et al. (1992) transfizierte α -Satelliten-DNA in eine AGM (Grüne Meerkatze)-Zelllinie. In einigen Chromosomen erfolgte eine Integration auf den Chromosomenarmen. Diese Chromosomen bilden in der Mitose in 43 % der Fälle Anaphase-Brücken. Die Chromatiden sind dabei gleichzeitig mit den gegenüberliegenden Spindelpolen verbunden, und es kann zu einem Chromosomenbruch oder zu einer Fehlsegregation kommen. Die zusätzliche α -Satelliten-DNA scheint ein zweites Centromer zu bilden, was zu einer anormalen Mitose führt. *In vivo* würde dies zu einer erniedrigten Fitneß des Organismus führen. Die Instabilität ausgewählter trDNA-Familien könnte somit Auswirkungen auf die Überlebensfähigkeit eines Organismus haben. Verschiedene Sequenzfamilien von trDNA sind unterschiedlich stabil, wobei die Ursachen dieser Unterschiede weitgehend unklar sind. Die Untersuchung der Stabilität von gut charakterisierten trDNA-Clustern in transgenen Modellsystemen gibt Aufschluß über Mechanismen der trDNA-Stabilität. Charakteristika der trDNA-Familien lassen sich möglicherweise mit der Stabilität dieser trDNAs korrelieren.

4.1 Stabilität von tandem repetitiver DNA in transgenen Organismen

TrDNA ist eine tendenziell instabile Komponente des eukaryotischen Genoms. Sie unterliegt vielfältigen Umbauprozessen (Jeffreys et al., 1985a; Übersicht in: Meyer, 1993; Hankeln et al., 1996). Die tandem repetitiven Minisatelliten des menschlichen Genoms (VNTRs, "variable number of tandem repeats") werden auf Grund ihrer Hypervariabilität als genetische Marker verwendet (Nakamura et al., 1987; Jeffreys et al., 1990). So ermöglicht die Untersuchung von VNTRs individuelle "Fingerprints" (Jeffreys et al., 1985b). In den Genomen verschiedenster Organismen treten Heteromorphismen im Gehalt der trDNA auf. Dies betrifft sowohl menschliche Metaphase-Chromosomen (Yurov et al., 1987) als auch trDNA in den Polytänchromosomen von Insekten (Keyl 1965; Schmidt, 1984; Hankeln, 1990). Besonders die großen trDNA-Cluster in den Centromeren, etwa des menschlichen α -Satelliten (Wevrick und Willard, 1989) oder auch von trDNA in *S. pombe* (Steiner et al., 1993), erweisen sich in bezug auf die Clustergröße als stark polymorph. Heteromorphismen in homologen Chromosomen deuten auf massive Veränderungen der trDNA durch Amplifikation und Deletion hin. Potentielle Mechanismen der Evolution der trDNA werden im folgenden dargestellt.

Die **homologe Rekombination**, sowohl intermolekular als auch intramolekular, ist als ein wichtiger Mechanismus der trDNA-Instabilität lange bekannt (Smith, 1976). Bei der intramolekularen Rekombination kommt es zu einer Rekombination zwischen homologen DNA-Sequenzen auf einer Chromatide. Je nach Orientierung der repetitiven Elemente entsteht eine Deletion oder eine Inversion. Bei der intermolekularen Rekombination kann es zu einer versetzten Paarung von DNA-Sequenzen auf Schwesterchromatiden oder auch Nichtschwesterchromatiden kommen. Ein "crossing over" der homologen Sequenzabschnitte in der Mitose oder Meiose führt in einer Chromatide zu einer Duplikation und in der zweiten Chromatide zu einer Deletion (Übersicht in: Smith, 1989). Jeffreys et al. (1998) identifizierten die meiotische Rekombination als Ursache der Instabilität von menschlichen Minisatelliten.

Im besonderen bei der Evolution von Mikrosatelliten ist die "**replication slippage**" in Organismen von Eubakterien bis hin zum Menschen ein wichtiger Mechanismus (Übersicht in: Djan, 1998; Hancock, 1996). Während der Replikation von Trinukleotiden scheint eine alternative DNA-Struktur begünstigt zu sein, die dann zu der Veränderung in der Clustergröße der trDNA führt (Pearson et al., 1996). Verschiedene humane Krankheiten sind mit der Instabilität von tandem repetitiven Trinukleotiden, die sowohl

im kodierenden Bereich als auch im nicht-kodierenden Bereich zu finden sind, assoziiert (Deka et al., 1996; Monckton et al., 1997; Übersicht in: Sutherland et al., 1995; Lindblad et al., 1996; Warren, 1996).

Durch die **Transposition** von trDNA-Einheiten kann es zu der Ausbreitung von trDNA-Sequenz-Familien im Genom kommen. Da die meisten trDNA-Einheiten keine Kodierungskapazität besitzen, muß die Ursache für die Transposition außerhalb des DNA-Elements liegen. Ein solches Transpositionereignis wurde z. B. für einen menschlichen Minisatelliten nachgewiesen. In manchen Individuen kommt er an zwei chromosomalen Orten vor, während andere Individuen und Menschenaffen nur die ursprüngliche Lokalisation des Minisatelliten zeigen (Wong et al., 1990b). Auch im Genom der Maus (Kominami et al., 1983a) und *C. thummi* (Hankeln und Schmidt, 1987; Hankeln et al., 1994) wurde die Transposition von trDNA-Familien nachgewiesen.

Die DNA-Sequenz der trDNA-Einheiten wird ständig verändert, entweder in Richtung **Diversifikation** durch die Anhäufung von Mutationen oder in Richtung einer **Homogenisierung** der einzelnen Wiederholungseinheiten innerhalb eines Clusters (Übersicht in: Dover et al., 1982, 1993; Jinks-Robertson et al., 1993). Ein Beispiel für die Homogenisierung ist das tandem repetitive *Stellate*-Gen-Cluster, das in *D. melanogaster* im pericentrischen Heterochromatin des X-Chromosoms lokalisiert ist. Die Analyse eines 30 Kbp umfassenden *Stellate*-Gen-Clusters (Tulin et al., 1997) bestätigt das Konzept einer konzertierten Evolution von trDNA (Dover, 1986; Dover et al., 1993). Das diskontinuierliche trDNA-Cluster ist in verschiedene Abschnitte unterteilbar. Mit größerer Distanz der einzelnen Wiederholungseinheiten ist die Homogenisierung weniger effektiv und damit die Divergenz in der DNA-Sequenz erhöht (Tulin et al., 1997). Auch die tandem repetitiven *Histon*-Gene von *Chironomus* evolvieren innerhalb eines Clusters offensichtlich konzertiert (Hankeln und Schmidt, 1990; Hankeln et al., 1993).

Im prokaryotischen Genom sind repetitive DNA-Sequenzen sehr selten. Trotzdem wurden bei der Klonierung eukaryotischer trDNA in *E. coli* ähnliche Veränderungen in der Organisation von trDNA-Clustern beobachtet wie in den Ursprungsgenomen, aus denen die einklonierten trDNA-Cluster stammten. Dies führte zu der These, daß den Mechanismen des trDNA-Umbaus in Eukaryoten und *E. coli* ähnliche Mechanismen zugrunde liegen könnten (Arnheim und Kuehn, 1979; Carroll et al., 1984; Winterpacht, 1991).

4.1.1 Mechanismen der Stabilität von trDNA in *E. coli*

Vier verschiedene trDNA-Familien sind in dieser Arbeit auf ihre Stabilität in *E. coli* untersucht worden. Drei dieser trDNA-Familien zeigen in *E. coli* eine deutliche Instabilität. Die durchgeführten Untersuchungen sollen die Stabilität der trDNAs mit Charakteristika der trDNA-Familien korrelieren und mögliche Mechanismen der trDNA-Instabilität untersuchen.

In vielen Publikationen wird die Instabilität von unterschiedlichen repetitiven DNA-Sequenzen bei der Klonierung in *E. coli* beschrieben. Bereits Hershey et al. (1977) zeigten die spontane Elimination von 380 bp langen trDNA-Einheiten aus einem Cluster mit 32 Kopien der 5S-rDNA-Gene von *D. melanogaster* bei der Vermehrung in *E. coli*. Auch repetitive DNA-Sequenzen von *M. musculus* (Arnheim und Kuehn, 1979) oder *C. thummi* (Schmidt et al., 1982; Schmidt, 1984; Winterpacht, 1991) weisen erhebliche Instabilitäten bei der Klonierung in *E. coli* auf. Die Instabilität in *E. coli* scheint dabei nicht daran gekoppelt zu sein, ob es sich bei der trDNA um Gene oder scheinbar "funktionslose" DNA-Sequenzen handelt. Auch die Länge der einzelnen Wiederholungseinheiten scheint im Hinblick auf die Stabilität in *E. coli* unerheblich zu sein. So ist zum Beispiel auch ein trDNA-Cluster der nur 15 bp langen Wiederholungseinheiten aus der rDNA von *Xenopus laevis* äußerst instabil in *E. coli* (Carroll et al., 1984).

Als mögliche Ursache der Instabilität wird homologe Rekombination diskutiert, die in *E. coli* auf unterschiedlichen Enzymsystemen beruht.

Die RecA-abhängige Rekombination in E. coli

Die homologe Rekombination erfolgt in *E. coli* hauptsächlich mittels dreier verschiedener Rekombinationssysteme. Das wichtigste ist das RecBCD System. Es umfaßt einen multifunktionalen Enzymkomplex mit einer ATP-abhängigen Exonuklease-Endonuklease- und Helikaseaktivität. Alternativ dazu gibt es das RecF (Fishel et al., 1981) und das RecE-Rekombinationssystem, letzteres benannt nach dem wichtigsten Genprodukt der Exonuklease VIII (Übersicht in: Smith, 1989). Die verschiedenen Rekombinationssysteme funktionieren in *E. coli* unabhängig voneinander und werden wahrscheinlich unter verschiedenen Bedingungen aktiviert. So ist das RecF-System z. B. besonders an der Rekombination von DNA-Molekülen beteiligt, die nach der Konjugation verschiedener Spezies in einer Zelle zusammenkommen (Stambuk und

Radman, 1998). Eine Gemeinsamkeit aller drei Rekombinationssysteme in *E. coli* ist die Abhängigkeit vom RecA-Protein (Übersicht in: Smith, 1989). Dieses Protein bewirkt die homologe Paarung von DNA-Molekülen und katalysiert den Strangaustausch, was *in vitro* zu einer Heteroduplex-DNA führt (Übersicht in: West, 1992).

Zwei in dieser Arbeit untersuchten trDNAs zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen der Instabilität der trDNA-Cluster in *E. coli* und dem Funktionieren des RecA-Rekombinationssystems. Im *E. coli*-Stamm RRI sind sowohl die 1,688-Satelliten-DNA aus *D. melanogaster* als auch die artifizielle trDNA aus mehreren Hsp70 Promotoren äußerst instabil. Wie in der Literatur beschrieben (Schmidt et al., 1982; Israelewski, 1983) findet eine präzise Exzision von einzelnen trDNA-Einheiten bzw. Multimeren statt. In den *E. coli*-Stämmen HB101 (RecA13⁻) bzw. SURE (*recB*⁻; *recJ*) sind beide trDNAs jedoch weitgehend stabil. Die jeweiligen Mutationen im RecA-abhängigen Rekombinationssystem führen somit zu einer deutlichen Stabilisierung der trDNA-Cluster in *E. coli*. Das Cluster aus Hsp70 Promotoren ist eine artifiziell erzeugte trDNA. Deren Instabilität unterscheidet sich nicht von der Instabilität der Satelliten-DNA aus *D. melanogaster*. Entscheidend für die Instabilität in *E. coli* ist offensichtlich die tandemartige Anordnung der Hsp70 Promotoren.

Bei den beobachteten Eliminationen ist bei beiden trDNA-Familien das RecA-abhängige Rekombinationssystem von *E. coli* beteiligt. Hershey et al. (1977) zeigten bei der Klonierung von tandem repetitiven 5S-rDNA-Einheiten aus *D. melanogaster* den spontanen Verlust von trDNA-Einheiten in *E. coli*. Wurde jedoch zur Klonierung ein RecA⁻ *E. coli*-Stamm (HB101) verwendet, konnten keine Deletionen im trDNA-Cluster beobachtet werden. Um in Plasmiden eine RecA-abhängige Rekombination beobachten zu können, ist vermutlich eine Mindestlänge der repetitiven Bereiche von 300 bp erforderlich (Bi und Liu, 1994). Die beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten trDNA-Cluster erfüllen diese Bedingung, da sie mehrere Kbp lang sind.

Die RecA-unabhängige Rekombination in E. coli

Die Elimination der artifiziellen trDNA aus Hsp70 Promotoren im *E. coli*-Stamm RRI ist -wie oben gezeigt- vor allem RecA-abhängig. Aber auch im RecA⁻ *E. coli*-Stamm HB101 kommt es zumindest in einem kleinen Anteil der Plasmide zu einer Deletion im trDNA-Cluster. Ein deutlicher Hinweis darauf ergibt sich aus den Experimenten, bei denen die Plasmide für eine P-Element-vermittelte Keimbahntransformation verwendet

wurden. Durch die Integration des trDNA-Clusters in das Genom von *D. melanogaster* kann das in *E. coli* veränderte trDNA-Cluster in einem Genom außerhalb von *E. coli* analysiert werden. Zwei unabhängige, rekombinante *D. melanogaster*-Stämme (5H4 und 5H72) zeigen schon in der ersten Analyse (Generation 2) ein in identischer Weise verändertes trDNA-Cluster. Anstelle von sechs trDNA-Einheiten des Hsp70 Promotors sind nur noch fünf trDNA-Einheiten vorhanden. Zusätzlich fehlt in beiden Stämmen ein identischer "single copy" Bereich aus dem 3'-Bereich des Clusters (s. Abb. 17A). Zwei unabhängige *Drosophila*-Stämme zeigen die gleiche Veränderung im trDNA-Cluster. Daraus ist zu vermuten, daß die Veränderung des trDNA-Clusters schon bei der Vermehrung der Plasmide in *E. coli* stattgefunden hat. Da die Plasmide vor der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation durch Sequenzierung und Restriktionsanalyse auf ihre Organisation überprüft wurden, kann die Anzahl der veränderten Plasmide nur wenige Kopien der Plasmidpopulation nach der Vermehrung im *E. coli*-Stamm HB101 betragen haben.

Die Veränderung in der Plasmid-DNA betrifft den im 3'-Bereich liegenden Rand des trDNA-Clusters (s. Abb. 17A). Dieser Bereich des trDNA-Clusters weist eine Besonderheit gegenüber dem Rest des Clusters auf. Auf Grund der Klonierungsstrategie liegt dort die einzige größere Unterbrechung von 56 bp innerhalb des trDNA-Clusters (s. Abb. 17A). Genau diese 56 bp in Verbindung mit einer trDNA-Einheit im 3'-Bereich des trDNA-Clusters sind deletiert. Eine intramolekulare Rekombination zwischen dem Hsp70 Promotor des Vektors und einer Kopie des Hsp70 Promotor trDNA-Clusters könnte diese Deletion erklären (s. Abb. 28). Die homologe Rekombination muß zwischen den am weitesten im 3'-Bereich liegenden trDNA-Einheiten stattgefunden haben mit einer Länge der gepaarten trDNA-Einheiten von maximal 380 bp. Ein Zusammenhang zwischen der Länge homologer DNA-Sequenzen und dem Grad der RecA-abhängigen Rekombination wurde bereits früher vermutet (Bi und Liu, 1994). In ihrem Modellsystem zeigten die Autoren, daß die Rekombination zwischen Duplikationen, die kleiner als 300 bp sind, kaum RecA-abhängig sind. Mit wachsender Länge des homologen Bereichs wächst graduell auch der Anteil an der RecA-abhängigen Rekombination. Sowohl bei der Rekombination von Plasmiden als auch bei der von Chromosomen wurden effiziente RecA-unabhängige Rekombinationssysteme nachgewiesen (Lovett et al., 1993; Bi und Liu, 1994, 1996a, 1996c).

Abb. 28: Intramolekulare Rekombination

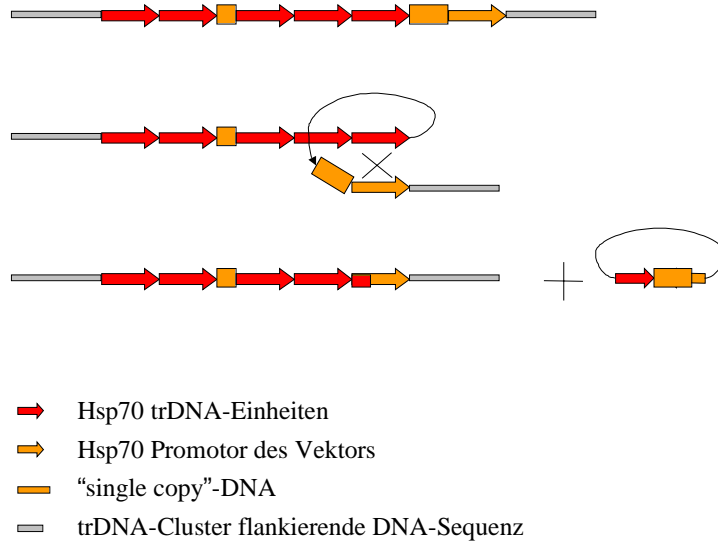


Abb. 28

Die Abbildung zeigt die intramolekulare Rekombination zwischen zwei tandem repetitiv angeordneten Hsp70 Promotoren. Die Hsp70 Promotor-Einheiten des trDNA-Clusters sind rot, während der Promotor des Vektors orange ist. Im trDNA-Cluster führt die Rekombination zu der Deletion einer trDNA-Einheit von 380 bp und eines 56 bp langen "single copy"-Bereichs. Der exzisierte Bereich erscheint als ringförmiges, doppelsträngiges DNA-Molekül.

In *E. coli* wirken bei der Elimination von artifizellen trDNA-Einheiten verschiedene Deletionsmechanismen parallel. Der Hauptteil der beobachteten Eliminationsvorgänge innerhalb des trDNA-Clusters ist offensichtlich RecA-abhängig. Zusätzlich findet in einem kleinen Teil der Plasmide auch eine RecA-unabhängige Rekombination statt. Diese betrifft den Rand des trDNA-Clusters.

Der Einfluß von Replikation und Transkription auf die Stabilität von trDNA in E. coli

Neben der homologen Rekombination als Hauptmechanismus für Deletionen in *E. coli* wird auch eine Beteiligung der Replikation an Deletionsereignissen diskutiert. Auch bei der Instabilität der hier untersuchten Cla-Elemente könnte die Replikation bei den Eliminationsprozessen beteiligt sein. Ein Cla-Element-Cluster in der Orientierung A (s. Abb. 6A) erweist sich in *E. coli* als nahezu stabil. Ist das trDNA-Cluster bestehend aus

Cla-Elementen hingegen in der Orientierung B angeordnet (s. Abb. 6B), zeigt sich eine deutliche Instabilität. Diese äußert sich in der Elimination von vollständigen Cla-Element-Einheiten (s. Abb. 12). Ein und dasselbe trDNA-Cluster zeigt in der einen Orientierung eine starke Instabilität, während die entgegengesetzte Orientierung des trDNA-Clusters nahezu stabil ist. Somit ist in diesem Fall ausschließlich die Orientierung des trDNA-Clusters gegenüber anderen DNA-Sequenzen des Vektors für die Instabilität der trDNA verantwortlich. Ein entscheidender Faktor könnte die Orientierung des trDNA-Clusters relativ zur Wanderungsrichtung der Replikationsgabel sein. Bei der Klonierung von großen Clustern von Trinukleotid (CAG)_n-Wiederholungseinheiten in *Saccharomyces cerevisiae* wurde ebenfalls festgestellt, daß je nach Orientierung des tandem repetitiven Trinukleotid-Clusters innerhalb des Chromosoms das Cluster stabil vererbbar oder instabil ist (Maurer et al., 1996). Die trDNA-Cluster sind instabil, wenn die CTG-Trinukleotide als Matritze für die "lagging"-Strangsynthese dienen (Freudenreich et al., 1997). Dieselbe Trinukleotid-Familie erweist sich auch in *E. coli* nur in einer Orientierung als instabil (Iyer und Wells, 1999). Wird zusätzlich die Transkription eines benachbarten Gens unterbunden, ist die Instabilität zwar vorhanden, aber um den Faktor 25 verringert. Die Autoren schlagen ein Modell vor, nach dem Trinukleotide bevorzugt in der instabilen Orientierung Haarnadelstrukturen bilden und es deshalb zu einem "Überspringen" der Haarnadelstruktur bei der "lagging strand"-Synthese kommt. Der Eliminationsprozeß wird noch verstärkt, wenn zusätzlich eine Transkription stattfindet (Parniewski et al., 1999).

Mit "replication slippage" werden vor allem Deletionen oder Duplikationen von kurzen trDNAs und Deletionen von DNA-Sequenzen zwischen direkten Wiederholungseinheiten erklärt (Levinson und Gutman, 1987; Lovett et al., 1993). Durch die Paarung von Wiederholungseinheiten während der Replikation, entweder im "template"-Strang oder im gerade replizierten Strang, verschiebt sich die Polymerase und es kommt zu einer Deletion oder Duplikation. Intensive Studien mit 10 - 20 bp langen trDNA-Sequenzen unterstützen das Modell, wobei die Bildung von Sekundärstrukturen von Bedeutung zu sein scheint (Trinh und Sinden, 1993). Aber auch bei trDNA mit Wiederholungseinheiten von einer Länge von mehreren 100 bp wird eine Beteiligung der Replikation an Deletionsereignissen vermutet (Lovett et al., 1993). Die Autoren schlagen in ihrem "sister strand exchange"-Modell eine Kombination von homologer Rekombination und "replication slippage" vor.

Der Einfluß von in der Nähe transkribierten Genen auf die Rekombination wird in einem verstärkten "supercoiling" der DNA vermutet (Liu und Wang, 1987; Wu et al., 1988; Stewart und Roeder, 1989). Solche superhelikalen Bereiche sind als bevorzugte Bindungsstellen für Nukleasen bekannt (Thomas und Rothstein, 1989), wodurch es zu einer erhöhten Rekombinationsrate kommen könnte. Hershey et al. (1977) beobachteten einen vermehrten Verlust von klonierten trDNA-Einheiten, nachdem die *E. coli*-Kultur durch die Zugabe von Chloramphenicol zur Transkription eines Resistenzgens angeregt wurde.

Ob die Transkription des benachbarten Ampicillin-Resistenzgens an der Instabilität des Cla-Element-Clusters beteiligt ist, läßt sich mit den vorliegenden Versuchen nicht entscheiden. Ein weiterführender Versuch wäre die Deletion des Ampicillin-Resistenzgens im Vektor, um die Auswirkungen auf die Stabilität des trDNA-Clusters zu untersuchen.

Flankierende DNA-Sequenzen beeinflussen die Stabilität von trDNA in E. coli

Die Stabilität eines Satelliten-DNA-Clusters in *E. coli* hängt nicht ausschließlich von dem eigentlichen trDNA-Cluster ab, sondern offensichtlich auch von der flankierenden DNA. Dies wird vor allem bei den Experimenten mit der 1,688-Satelliten-DNA aus *D. melanogaster* deutlich. Das Satelliten-DNA-Cluster ist in der ursprünglich klonierten Form im Vektor pSC101 stabil. Dies gilt sowohl für *E. coli*-Stämme mit verschiedenen Defizienzen in den Rec-Rekombinationssystemen als auch in einem *E. coli*-Stamm ohne Defizienz in den Rec-Genprodukten (Carlson und Brutlag, 1977). Die Umklonierung des Satelliten-DNA-Clusters in den Vektor pW8 führt zu einer deutlichen Destabilisierung. Auch hier könnte die Lage des Replikationsursprungs eine Rolle spielen, der im Vektor pW8 auf der "anderen" Seite des trDNA-Clusters liegt als im Vektor pSC101. Winterpacht (1991) konnte zeigen, daß ein zuvor stabiles trDNA-Cluster allein durch die Deletion flankierender DNA-Sequenzen destabilisiert werden kann. Ein ähnliches Ergebnis (Maurer et al., 1996) zeigte sich bei einem trDNA-Cluster aus Trinukleotiden in *S. cerevisiae*, das durch die Deletion von flankierenden DNA-Sequenzen instabil wurde. Durch die Deletion wurde ein Replikationsursprung entfernt (ARS-Sequenz). Die Autoren vermuten, daß durch den Wegfall der ARS-Sequenz die Richtung, mit der die Replikationsgabel über das trDNA-Cluster wandert, gewechselt haben könnte.

Abhängigkeit der Stabilität in E. coli von der Nukleotid-Sequenz

Die einzelnen Cla-Element-Einheiten des Cla-Element-Clusters sind durch Punktmutationen unterscheidbar. Dadurch ist es möglich, den Bereich, in dem sich die Mutation ereignet hat, auf wenige bp einzuschränken. Die Cla-Elemente des trDNA-Clusters C2i6 sind in der Orientierung A in *E. coli* stabil, während die Orientierung B in wenigen Generationen zu einem völligen Verlust des trDNA-Clusters führt (s. Abb. 12). Da das trDNA-Cluster in der Orientierung B sehr instabil ist, läßt sich dieses Phänomen schwer in *E. coli* untersuchen. Durch die Transformation des trDNA-Clusters aus Cla-Elementen in das Genom von *D. melanogaster* ergibt sich die Möglichkeit, eine DNA-Instabilität, die in *E. coli* stattgefunden hat, im Genom von *D. melanogaster* zu analysieren. Von den ursprünglich 21 Cla-Elementen sind weniger als zwei Wiederholungseinheiten im Genom von *D. melanogaster* (Stamm 2Cla7) nachweisbar. Da das trDNA-Cluster schon in *E. coli* stark instabil war, hat diese Deletion wahrscheinlich schon in *E. coli* stattgefunden und ist kein Ergebnis der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation. Die Elimination betrifft im Stamm 2Cla7 den gesamten zentralen Teil des trDNA-Clusters und verschont nur die zwei randständigen Wiederholungseinheiten und die flankierende DNA zu beiden Seiten des trDNA-Clusters. Es sind nur vollständige Einheiten der trDNA eliminiert. Der Bereich, in dem die Rekombination in *E. coli* stattgefunden hat, kann auf 24 bp eingeschränkt werden. Darin ist keine Ähnlichkeit z. B. zur DNA-Sequenz des Rekombinationssignals "Chi" aus *E. coli* (Cheng und Smith, 1989) enthalten. "Chi" bezeichnet in *E. coli* die Konsensussequenz, an die Proteine des Rekombinationsapparats binden. Ein Vergleich der 24 bp DNA-Sequenz zu den anderen in *E. coli* instabilen trDNAs zeigt keine Gemeinsamkeiten in der DNA-Sequenz. Die vorliegenden Ergebnissen zeigen keinen Zusammenhang zwischen dem Ort, an dem die eigentliche Rekombination stattfindet, und der DNA-Sequenz.

Einfluß der sequenzbedingten Krümmung der DNA-Moleküle auf die Stabilität

Die sequenzbedingte Krümmung von trDNA-Sequenzen läßt sich *in vitro* durch Gelmigrationstests (Trifonov, 1985; Diekmann, 1987, 1989) nachweisen oder mit Hilfe von Computersimulationen berechnen. Nach dem "wedge"-Modell von Trifonov und Sussman (1980) führt die phasische Anordnung von z. B. (dA/dT)-Tri- oder Tetranukleotiden im Abstand einer helikalen Windung zu der DNA-Krümmung. Eine Vielzahl verschiedener trDNAs wie der "major satellite" der Maus (Radic et al., 1987),

Satelliten-DNA der Ratte und der Grünen Meerkatze (Martinez-Balbas et al., 1990) oder auch der Zuckmücke (Schmidt, 1984; Hankeln, 1990; Mattausch, 1993) weisen eine derartige Krümmung der Helixachse auf.

Die Ergebnisse der hier untersuchten trDNAs weisen darauf hin, daß die Krümmung der DNA-Moleküle auf die Stabilität der trDNA-Cluster in *E. coli* keinen Einfluß hat. Das trDNA-Cluster der Alu-Elemente aus *C. piger* zeigt eine sehr starke DNA-Krümmung (Hankeln, 1990; Mattausch, 1993). In den vorliegenden Versuchen ist diese trDNA im *E. coli*-Stamm RRI in beiden Orientierungen aber stabil. Das DNA-Cluster von Cla-Elementen aus *C. thummi* ist ebenfalls gekrümmt, zeigt jedoch Orientierungs-abhängig eine starke Instabilität in *E. coli*. Auch die artifizielle trDNA zeigt eine starke Instabilität bei der Klonierung in *E. coli*, scheint aber nicht gekrümmt zu sein. DNA-Krümmung läßt sich demnach nicht generell mit der trDNA-Instabilität in *E. coli* korrelieren.

4.1.2 TrDNA-Cluster im transgenen Genom von *D. melanogaster*

Das Genom von *D. melanogaster* ist etwa 165 Mbp lang und besteht zu 30 % aus repetitiver DNA (Spradling und Rubin, 1981). Diese besteht überwiegend aus trDNA und unterliegt einer natürlichen Dynamik. Vergleichende Analysen der unterschiedlichen Satelliten-DNAs nahe verwandter Arten geben Aufschluß über die Evolution dieser trDNAs. Identische trDNAs können im Genom unterschiedlicher Arten einer starken Vermehrung oder aber Verminderung unterliegen. Dabei scheint die trDNA-Evolution diskontinuierlich zu sein. Einige trDNAs sind in entfernt verwandten Arten über lange evolutionäre Zeiträume konserviert, während dieselbe trDNA in nahe verwandten Arten nicht nachweisbar ist (Lohe und Brutlag, 1987).

Die Methode der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation (Spradling und Rubin, 1982) ermöglicht die Integration von definierten trDNA-Clustern in das Genom von *D. melanogaster*. Diese können dann über viele Generationen auf Veränderungen im trDNA-Cluster untersucht werden. Winterpacht (1991) benutzte diese Methode, um Cla-Elemente aus dem NTS von *C. thummi* in das Genom von *D. melanogaster* zu integrieren. Er zeigte, daß in seinen Experimenten eine deutliche Größenabhängigkeit für die Stabilität der trDNA-Cluster im transgenen Genom besteht. Während trDNA-Cluster von einer Größe mit weniger als vier Wiederholungseinheiten über mehr als 20 Generationen in *D. melanogaster* stabil bleiben, zeigen trDNA-Cluster mit mehr als fünf Wiederholungseinheiten von der ersten Generation an eine starke Tendenz zum

Verlust von trDNA-Einheiten. Der Verlust erfolgt immer in vollständigen Cla-Element-Wiederholungseinheiten und tritt verstärkt in transgenen Stämmen auf, die mehrere Integrationsorte der transgenen DNA beinhalten.

Das in dieser Arbeit untersuchte Cla-Element-Cluster (C2i6) kommt als ein isoliertes trDNA-Cluster im Euchromatin von *C. thummi* vor und ist von "single copy"-DNA-Sequenzen eingerahmt. Bereits im Ursprungsgenom ist das trDNA-Cluster in unterschiedlichen Tieren zwischen 17 und 50 Cla-Element-Einheiten groß (Hankeln et al., 1994). Dieses trDNA-Cluster zeigt im Genom von *D. melanogaster* in verschiedenen Stämmen in den ersten Generationen keine Instabilität. Unabhängig von der chromosomalen Lokalisation und unabhängig von der Orientierung der trDNA im Vektor wird das Cla-Element-Cluster im Genom von *D. melanogaster* stabil von einer Generation in die nächste vererbt. Diese überraschende Stabilität eines trDNA-Clusters aus 21 Cla-Elementen widerspricht der These, daß große Cla-Element-Cluster im Genom von *D. melanogaster* generell instabil sind. Ähnlich den Ergebnissen in *E. coli* ist auch in *D. melanogaster* nicht allein die Clustergröße für eine Instabilität ausschlaggebend. Offensichtlich ist die unterschiedliche Herkunft der untersuchten Cla-Element-Cluster mit verschiedenen flankierenden DNA-Sequenzen ein wichtiger Faktor für den unterschiedlichen Grad der Instabilität der trDNA in *D. melanogaster*. Auch die im weiteren untersuchten trDNA-Cluster, bestehend aus Alu-Elementen oder Hsp70 Promotoren, zeigen in der Mehrzahl der Fälle keine Instabilität im Genom von *D. melanogaster*. Somit können im Genom von *D. melanogaster* auch mehrere Kbp große trDNA-Cluster prinzipiell stabil vererbt werden.

In lediglich einem der transgenen *D. melanogaster*-Stämme konnte eine dauerhafte Veränderung des trDNA-Clusters aus Cla-Elementen (C2i6) nachgewiesen werden. Der Stamm CT8B besitzt eine exakte Duplikation von drei Cla-Element-Einheiten (s. Abb. 14). Diese Veränderung hat erst nach der zweiten Generation in den Keimzellen von *D. melanogaster* stattgefunden und ist in der zwölften Generation stabil (s. Abb. 13). Die Duplikation befindet sich in der Mitte des trDNA-Clusters und umfaßt ausschließlich vollständige Wiederholungseinheiten. Die Duplikation ist wahrscheinlich das Ergebnis einer intermolekularen Rekombination (s. Abb. 29). In der zehnten Generation des Stamms CT8B wurden mittels Southern-Hybridisierung verschieden große Cla-Element-Cluster nachgewiesen (s. Abb. 15). Seit langem ist bekannt, daß inäquales "crossing over" in der Mitose oder auch Meiose einen wichtigen Mechanismus der trDNA-Evolution darstellt (Smith, 1976).

Ein "crossing over" findet entweder zwischen Schwesterchromatiden oder Nichtschwesterchromatiden statt. Da der Stamm CT8B homozygot ist, lässt sich nicht entscheiden, welche Chromatiden an der Rekombination beteiligt waren. Nach der zehnten Generation des Stamms CT8B ist ausschließlich das vergrößerte trDNA-Cluster nachweisbar. Die Duplikation muß sich deshalb in der ganzen Population des Stamms gegenüber der ursprünglichen Clustergröße durchgesetzt haben. Da der Stamm über die Generationen in einer unregelmäßigen Größe der Population von nur 20 bis 100 Tieren gehalten wurde, könnte genetische "Drift" die Fixierung des vergrößerten Cla-Element-Clusters erklären.

Abb. 29: Intermolekulare Rekombination im Stamm CT8B

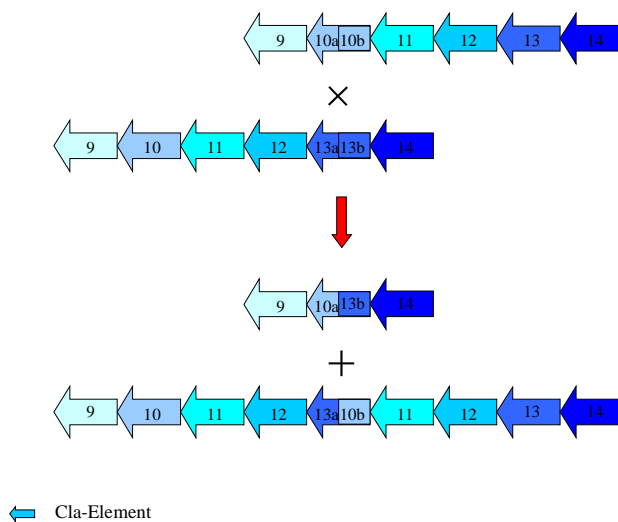


Abb. 29

Eine Intermolekulare Rekombination führt in einer Chromatide zu einem Verlust von trDNA-Einheiten und in der anderen Chromatide zu einem vergrößerten trDNA-Cluster. Die verschiedenen Blauschattierungen symbolisieren die einzelnen trDNA-Einheiten, die sich durch Punktmutationen unterscheiden. Im Stamm CT8B hat eine Verdopplung von drei trDNA-Einheiten stattgefunden.

Der Einfluß invertierter Einheiten auf die trDNA-Stabilität in D. melanogaster

Das trDNA-Cluster aus invertierten Hsp70 Promotoren (s. Abb. 10C) erweist sich von der ersten Generation an im Genom von *D. melanogaster* (Stamm Hsp27) als instabil (s. Abb. 18 u. 19). Das trDNA-Cluster wird erneut nur um vollständige trDNA-Einheiten verkürzt, was auf eine homologe Rekombination hindeutet. Dabei betrifft die trDNA-Instabilität eine große Anzahl der Tiere innerhalb der Population des *D. melanogaster*-Stamms. Da die Instabilität schon in Tieren auftritt, die für das trDNA-Cluster noch nicht homozygot sind, kann eine interchromosomale Rekombination zwischen den homologen Chromosomen nicht die Ursache der Instabilität sein. Entweder ist die Rekombination intramolekular oder es findet eine intermolekulare Rekombination zwischen den Schwesterchromatiden statt. Die invertierten Wiederholungseinheiten sind nicht an der Rekombination beteiligt, da dies zu einer Inversion der dazwischen liegenden DNA-Sequenz führen würde. Die Sequenz-Analyse zeigt jedoch nur einen trDNA-Verlust im 5'-Bereich des trDNA-Clusters ohne eine Inversion. Die invertierten Wiederholungseinheiten scheinen die trDNA-Instabilität in *D. melanogaster* zu stimulieren. Auch in *E. coli* (Sinden et al., 1991; Bi und Liu, 1996b; Lin et al., 1997) und in *S. cerevisiae* (Lobachev et al., 1998) können invertierte Wiederholungseinheiten zu Deletionen und komplexen DNA-Rearrangements führen. Mit wachsender Länge und kürzerer Distanz zwischen den invertierten Wiederholungseinheiten steigt die Frequenz der DNA-Rearrangements. Invertierte DNA-Sequenzen sind in verschiedenen Organismen offensichtlich instabile Komponenten.

Transposon-vermittelte trDNA-Instabilität in D. melanogaster

Das trDNA-Cluster aus fünf gleichsinnig orientierten Kopien des Hsp70 Promotors zeigt in beiden untersuchten *D. melanogaster*-Stämmen (5H72 und 5H4) keine Anzeichen für eine Instabilität. Erst nachdem das trDNA-Cluster im Stamm 5H4 durch Einkreuzen eines Transposase-Gens mobilisiert wird, ergeben sich in drei von vier neu erzeugten Stämmen komplexe Rearrangements (s. Abb. 17B). Nach der Mobilisierung von trDNA-Clustern sind solche Transposon-induzierten Veränderungen keine seltenen Ereignisse. Paques und Wegnez (1993) mobilisierten in transgenen *D. melanogaster*-Stämmen ein trDNA-Cluster aus acht Einheiten der 5S-rDNA aus *D. teissieri*. Sie beobachteten in 30% der Nachkommen eine Veränderung in der trDNA-Clustergröße. Dabei handelt es sich meist um präzise Eliminationen oder Amplifikationen von

mehreren 5S-rDNA-Einheiten. Deletionen scheinen besonders durch direkte Wiederholungseinheiten begünstigt zu werden (Kurkulos et al., 1994).

Der trDNA-Zugewinn in den hier untersuchten Stämmen (8H4Ta, 8H4Tb, 8H4Tc) läßt sich hingegen nicht mit einer einfachen Vermehrung ganzer trDNA-Einheiten erklären, da auch Teile der Vektorsequenz verdoppelt sind (s. Abb. 17B). Paques et al. (1996) beschreiben ebenfalls komplizierte Verdopplungen in trDNA-Clustern innerhalb von P-Elementen nach dem Einkreuzen einer Transposase. Diese Ereignisse scheinen aber im Gegensatz zu den vorherrschenden Deletionen innerhalb der trDNA-Cluster nicht sehr häufig zu sein (Paques et al., 1996). Transposon-induzierte Veränderungen treten nicht nur in trDNA-Clustern auf, die selbst an der Transposition beteiligt sind. Auch P-Elemente, die innerhalb eines trDNA-Clusters liegen, bewirken durch die Transposition aus der Donor-Stelle Deletionen und Amplifikationen in den umliegenden trDNA-Einheiten (Thompson-Stewart et al., 1994). Rearrangements in trDNA-Clustern, induziert durch Transposons, könnten damit ein wichtiger Prozeß der trDNA-Evolution darstellen (Paques und Wegnez 1993). Die erzeugten Deletionen und Amplifikationen wirken dabei auf die Clustergröße der trDNA. Die hier gezeigten komplexen Veränderungen im trDNA-Cluster tragen hingegen zu der Diversifikation einer trDNA-Familie bei.








4.1.3 Vergleich der trDNA-Stabilität in *E. coli* und *D. melanogaster*

TrDNA-Cluster verschiedener Sequenz-Familien sind in *E. coli* und im Genom von *D. melanogaster* unterschiedlich stabil (Tabelle 6). Während in *D. melanogaster* die Mehrzahl der untersuchten trDNA-Cluster stabil sind, erweisen sich verschiedene trDNA-Familien in *E. coli* als sehr instabil. Eine repetitive Anordnung von DNA-Sequenzen alleine führt weder in *E. coli* noch in *D. melanogaster* zwangsläufig zu einer Instabilität des trDNA-Clusters.

Ob die trDNA aus einem Organismus stammt mit einer geringen Toleranz gegenüber trDNA (Alu-Elemente aus *C. piger*, Dro-Sat aus *D. melanogaster*) oder mit einer hohen Toleranz gegenüber trDNA (Cla-Elemente aus *C. thummi*), scheint keine Bedeutung zu haben. Auch der AT-Gehalt und die Krümmung der Helixachse lassen sich nicht mit der Stabilität eines trDNA-Clusters in *E. coli* korrelieren. Andere Parameter wie die Orientierung des trDNA-Clusters innerhalb des Vektors oder unterschiedliche flankierende DNA-Sequenzen sind hingegen für die Stabilität von trDNA-Clustern zumindest in *E. coli* von großer Bedeutung.

Die 1,688-Satelliten-DNA ist im Genom von *D. melanogaster* als ausgedehntes trDNA-Cluster auf das pericentrische Heterochromatin des X-Chromosoms beschränkt. Im Gegensatz zu allen anderen trDNA-Clustern war es nicht möglich, diese trDNA mit der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation auf einem der Chromosomenarme von *D. melanogaster* zu integrieren. Möglicherweise wird eine Verbreitung dieser trDNA im Genom von *D. melanogaster* außerhalb des pericentrischen Heterochromatins durch einen unbekanntem Mechanismus verhindert. In *E. coli* jedoch scheint es keinen Unterschied in der Stabilität der 1,688-Satelliten-DNA im Vergleich zu mobileren trDNAs wie den Cla-Elementen zu geben.

Tabelle 6: Gegenüberstellung der trDNA-Stabilität in *E. coli* und *D. melanogaster*

trDNA-Familie (Orientierung)	Stabilität in <i>E. coli</i>	möglicher Mechanismus	Stabilität in <i>D. melanogaster</i>	möglicher Mechanismus
Alu (A) 	stabil		stabil	
Alu (B) 	stabil		n.u.	
Cla (A) 	stabil		stabil (in CT8B trDNA Gewinn)	Rekombination (intermolekular)
Cla (B) 	instabil	Replikation; Rekombination (RecA-unabhängig); flank. DNA	stabil	
Dro-Sat (A) 	instabil	Rekombination (RecA-abhängig); flank. DNA	n.u.	
Hsp70 (G) 	instabil	Rekombination (RecA-abhängig); Rekombination (RecA-unabhängig)	stabil	
Hsp70 (Invers) 	instabil	n.u.	instabil	Rekombination (intermolekular)

Die Tabelle faßt die Ergebnisse der Stabilität verschiedener trDNA-Cluster bei der Klonierung in *E. coli* und im Genom von *D. melanogaster* zusammen. n.u. für nicht untersucht.

TrDNA-Cluster, die in *E. coli* sehr instabil sind, können in *D. melanogaster* stabil sein. Faktoren, die in *E. coli* zu einer Destabilisierung eines trDNA-Clusters führen, zeigen in *D. melanogaster* keinen Effekt. Die Stabilität des Cla-Element-Cluster C2i6 wird in *E. coli* von der Orientierung des trDNA-Clusters beeinflusst. In *D. melanogaster* hingegen scheint die trDNA in beiden Orientierungen weitgehend stabil zu sein. Auch das trDNA-Cluster aus Hsp70 Promotoren ist im *E. coli*-Stamm RRI sehr instabil, während die trDNA-Cluster in den *D. melanogaster*-Stämmen 5H72 und 5H4 keine Anzeichen einer Instabilität zeigen. Demnach können Ergebnisse aus Stabilitätsuntersuchungen in *E. coli* nicht ohne Überprüfung auf andere Organismen übertragen werden.

D. melanogaster besitzt außerhalb der Centromere wenig trDNA im Vergleich mit anderen Eukaryoten. Auch die Anzahl von Pseudogenen ist in *D. melanogaster* sehr gering. Dies wird mit häufigen Deletionsereignissen in funktionslosen DNA-Sequenzen erklärt (Petrov et al., 1996). Diese generelle Tendenz, die Menge von "junk-DNA" im Genom von *D. melanogaster* zu minimieren (Petrov und Hartl, 1998), verhindert offensichtlich nicht die stabile Weitergabe isolierter trDNA-Cluster über mehrere Generationen im Genom von *D. melanogaster*. Vier der fünf untersuchten trDNA-Cluster sind im Genom von *D. melanogaster* bis zu der dreizehnten Generation stabil.

Bei den Mechanismen, die zu einer trDNA-Instabilität führen, gibt es Parallelen im Genom von *E. coli* und *D. melanogaster*. Eine homologe Rekombination ist in beiden Organismen häufig die Ursache von trDNA-Instabilität. In *E. coli* scheint zusätzlich ein Zusammenhang zwischen Deletionsereignissen und der Replikation zu bestehen. Da in *D. melanogaster* die meisten trDNA-Cluster stabil sind, läßt sich über einen Einfluß der Replikation keine Aussage machen. Bei der Instabilität von CAG-Trinukleotiden zeigt sich eine erstaunliche Übereinstimmung in *E. coli* und *S. cerevisiae* in ihrer Abhängigkeit von der Orientierung des trDNA-Clusters (Maurer et al., 1996; Freudenreich et al., 1997; Iyer et al., 1999; Parniewski et al., 1999). Es lassen sich jedoch nicht alle Mechanismen der Instabilität von einem Organismus auf einen anderen übertragen. So wird für menschliche VNTRs als Mechanismus der trDNA-Evolution eine polare, interallelische Rekombination vorgeschlagen (Jeffreys et al., 1994, 1998), während VNTRs der Maus eher intraallelisch und unpolar evolvieren (Bois et al., 1998a, 1998b).

4.2 Effekte von tandem repetitiver DNA auf die Genexpression

Eine Vielzahl von Veröffentlichungen beschreibt den reprimierenden Charakter von trDNA-Clustern auf die Expression euchromatischer Gene. Für ein transgenes trDNA-Cluster aus DNA-Sequenzen des *Stellate*-Gens wurde im Genom von *D. melanogaster* gezeigt, daß es die Expression des *miniwhite*-Gens unterdrückt. Der Effekt ist abhängig von der Größe des trDNA-Clusters, wobei größere Cluster einen stärkeren Effekt ausüben als kleinere (Übersicht in: Gvozdev et al., 1999). Ein Cluster aus tandem repetitiven *miniwhite*-Genen hat einen negativen Effekt sowohl auf die eigene Expression (Dorer und Henikoff, 1994; Sabl und Henikoff, 1996) als auch auf die Expression eines benachbarten Gens (Dorer und Henikoff, 1997; Martin-Morris et al., 1997). Jedoch nicht in allen Fällen führen tandem repetitive Transgene zu einer verringerten Expression des Transgens. Ein trDNA-Cluster aus *brown*-Genen zeigt im Euchromatin von *D. melanogaster* keinen Effekt in bezug auf die Genexpression, führt aber zu einer Veränderung der Chromatinstruktur (Clark et al., 1998). Bisher ist noch unklar, ob auch natürliche Cluster aus trDNA-Familien eine Wirkung auf benachbarte Gene haben, wie dies mit Hilfe experimentell erzeugter tandem repetitiver Transgen-Cluster gezeigt werden konnte. Neben der beschriebenen reprimierenden Wirkung von trDNA ist auch vorstellbar, daß ein trDNA-Cluster entweder neutral oder positiv auf ein benachbartes Gen wirken kann.

4.2.1 Einfluß der Chromosomenregion

Die chromosomale Lage eines Transgens beeinflusst seine Expression. Große Abschnitte der Chromosomen bestehen aus Heterochromatin. Im Genom höherer Eukaryoten werden zwei Formen von Heterochromatin unterschieden, das dicht gepackte α -Heterochromatin und das stärker aufgelockerte β -Heterochromatin (Heitz, 1928; Übersicht in: Miklos und Cotsell, 1990). Das α -Heterochromatin flankiert die Centromere und wird bei der Polytänsierung, z. B. in den Speicheldrüsenchromosomen von *D. melanogaster*, unterrepliziert. Auch Transgene, die in das α -Heterochromatin integrieren, werden bei der Polytänsierung unterrepliziert (Wallrath et al., 1996). Das β -Heterochromatin ist distal zum centromerischen Heterochromatin lokalisiert und wird bei der Polytänsierung nur teilweise unterrepliziert (Rudkin, 1969; Karpen und Spradling, 1990). In beiden Fällen besteht die DNA-Sequenz der heterochromatischen Bereiche hauptsächlich aus trDNA.

Tandem repetitive DNA im Heterochromatin

Das Heterochromatin zeichnet sich, neben den mikroskopisch erkennbaren von Euchromatin abweichenden morphologischen Eigenschaften, durch die Anwesenheit spezifischer Proteine aus. Einige dieser Proteine binden spezifisch an besondere Bereiche des Heterochromatins und üben dabei definierte zelluläre Funktionen aus. Dazu gehören z. B. die centromerbindenden Proteine (Murphy und Karpen, 1998). Die Abbildung 30 zeigt exemplarisch die Lokalisation von trDNA und der wichtigsten centromerbindenden Proteine im Heterochromatin des menschlichen Centromers.

Abb. 30: Struktur und Organisation des menschlichen Kinetochors am Centromer

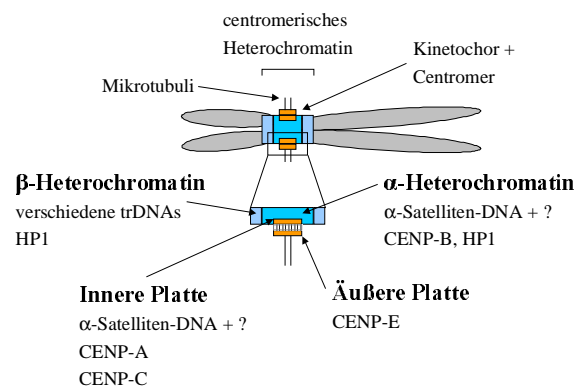


Abb. 30

Das Centromer erfüllt zwei wichtige Aufgaben. Es verbindet die Schwesterchromatiden bis zur Anaphase und ist der Ansatzpunkt zur Bildung des Kinetochors. Das Kinetochor ist eine trilaminare Proteinstruktur, die die Assoziation des Spindelapparates an das Centromer bewirkt. Die centromerische α -Satelliten-DNA ist blau unterlegt. Flankierendes Heterochromatin ist hellblau gekennzeichnet und besteht aus unterschiedlichen trDNA-Familien. Verschiedene Centromer-Proteine (CENP) binden spezifisch an unterschiedliche Bereiche des Centromers (Abb. 30 adaptiert nach Murphy und Karpen, 1998).

Davon zu unterscheiden sind Proteine, die in allen heterochromatischen Bereichen vorkommen, wie etwa das Heterochromatin-Protein 1 (HP1) oder das D1-Protein (Levinger und Varshavsky, 1982; Wreggett et al., 1994). Diese Proteine scheinen am Aufbau des Heterochromatins beteiligt zu sein. Im Detail konnte bislang noch nicht geklärt werden, welche Proteine zum Aufbau von Heterochromatin zwingend notwendig sind. Demgegenüber sind die Effekte von Heterochromatin auf die Expression

benachbarter Gene intensiv untersucht worden. Heterochromatische Gene, die in euchromatische Chromosomenregionen verlagert werden, zeigen dort eine verminderte Expression (Eberl et al., 1993; Howe et al., 1995; Weiler und Wakimoto, 1998). Offensichtlich brauchen heterochromatische Gene für eine unbeeinflusste Expression eine heterochromatische Umgebung. Im Gegensatz dazu beschreibt das Phänomen der "**position effect variegation**" (PEV) den inhibierenden Effekt des Heterochromatins auf die Expression eines benachbarten euchromatischen Gens. Ursprünglich wurde die PEV als Effekt des centromerischen Heterochromatins (s. Abb.1) auf ein benachbartes Gen beschrieben (Muller, 1930; Baker, 1968). Dorer und Henikoff (1994) konnten jedoch mit tandem repetitiven *miniwhite*-Genen einen Effekt erzeugen, der einer klassischen PEV zu entsprechen scheint (s. Abb. 2). Damit wurde der Zusammenhang von trDNA und Heterochromatin untermauert, da trDNA außerhalb des Heterochromatins eine PEV erzeugt haben. Das "cis spreading"-Modell erklärt den reprimierenden Effekt des Heterochromatins mit der Ausbreitung der dicht verpackten Struktur des Heterochromatins über das in der Nähe liegende Gen (s. Abb. 1). Die zur Transkription notwendigen Transkriptionsfaktoren können nicht mehr an die DNA-Sequenzen im Promotor-Bereich der Gene binden, so daß eine Transkription der Gene unterbleibt. "Suppressor of variegation" (Su(var)) kodieren dem Modell nach für Proteine, die am Aufbau des Heterochromatins beteiligt sind. Sowohl bei der klassischen PEV als auch bei den Experimenten von Dorer und Henikoff (1994) bewirkt eine Mutation im *HP1*-Gen (Su(var)205) wie erwartet eine Abschwächung der PEV (Eissenberg et al., 1992; Sass und Henikoff, 1998; Übersicht in: Reuter und Spierer, 1992). Dem Modell zufolge liegen Proteine, die am Aufbau von Heterochromatin beteiligt sind, in der Zelle limitiert vor. Abhängig von der Menge an heterochromatischen Bereichen in der Zelle sollte auch die PEV euchromatischer Gene variieren. In *D. melanogaster* ist das Y-Chromosom vollständig heterochromatisch und in der Tat variiert die Stärke der PEV mit der Menge an Heterochromatin auf dem Y-Chromosom. Mit wachsendem Anteil von heterochromatischen Bereichen auf teildeletierten Y-Chromosomen vermindert sich die PEV von euchromatischen Genen (Dimitri und Pisano, 1989). Proteine, die am Aufbau von Heterochromatin beteiligt sind, scheinen von zusätzlichen heterochromatischen Bereichen gebunden zu werden. Bei der Kombination verschiedener Mutationen, die die PEV modulieren, kommt es in einigen Fällen zu einer weniger ausgeprägten PEV der untersuchten Gene. Dies belegt, daß zumindest einige der Proteine, die das Heterochromatin aufbauen, in der Zelle limitiert vorliegen (Lloyd et al., 1997).

Alle in dieser Arbeit verwendeten trDNA-Cluster zeigen keine Anzeichen für die Bildung von Heterochromatin an den euchromatischen Integrationsorten in *D. melanogaster*. In keinem der erzeugten Stämme zeigt das zum trDNA-Cluster benachbarte *miniwhite*-Reportergen eine PEV. TrDNA-Cluster im Euchromatin führen damit nicht zwangsläufig zu der Entstehung von Heterochromatin, wie im Modell von Dorer und Henikoff (1994) vorgeschlagen (s. Abb. 2). Auch ein trDNA-Cluster aus *brown*-Genen zeigt im Euchromatin von *D. melanogaster* keinen Effekt in Bezug auf die Genexpression (Clark et al., 1998). Je nach Art oder Herkunft der trDNA-Cluster scheint der Einfluß auf ein benachbartes Gen zu variieren.

In *D. melanogaster* ist bei der Mutation *brown*^{Dominant} (*bw^D*) mehr als eine Mb centromerisches Heterochromatin in das euchromatische *brown*-Gen integriert. Dies führt zu einer starken PEV des Gens. In heterozygoten (*bw^D/bw⁺*) Tieren wirkt die Mutation auch in "trans", so daß in den heterozygoten Tieren das Gen nur noch zu 2% exprimiert wird (Henikoff und Dreesen, 1989). Die Paarung der homologen Chromosomen genügt, um den negativen Effekt des Heterochromatins auf das nicht-mutierte *brown*-Gen zu übertragen. Chromosomale Rearrangements, die das *bw^D*-Allel an das centromerische Heterochromatin annähern, verstärken die "trans"-Inaktivierung. Wird das *bw^D*-Allel in eine größere Distanz zum centromerischen Heterochromatin gebracht, führt dies zu einer verminderten "trans"-Inaktivierung (Talbert et al., 1994). Die Autoren schließen daraus, daß die Ausbildung von Heterochromatin an einem genetischen Locus von der Positionierung im Nukleus abhängt. An Interphasechromosomen wurde mit der FISH-Technik nachgewiesen, daß die Mutation *bw^D* im Nukleus näher am centromerischen Heterochromatin lokalisiert als das wildtypische *brown*-Gen. Auch im Nukleus von heterozygoten Tieren (*bw^D/bw⁺*) besteht ein enger Kontakt zwischen dem *bw^D*-Locus und dem centromerischen Heterochromatin (Csink und Henikoff; 1996). Diese Befunde unterstützen das "nuclear compartment"-Modell zur Erklärung von PEV. Dem Modell zufolge liegen die heterochromatischen und euchromatischen Bereiche der Chromosomen in verschiedenen Regionen des Nukleus (Übersicht in: Weiler und Wakimoto, 1995; Wakimoto, 1998). Kommt ein euchromatisches Gen durch Transposition in Verbindung mit einem heterochromatischen Kompartiment im Nukleus, wird es suboptimal transkribiert. Martin-Morris et al. (1997) zeigten, daß auch tandem repetitive *miniwhite*-Gene zu einer Inaktivierung eines Gens in "trans" führen. Zudem verstärkt sich der negative Effekt auf die Expression von tandem repetitiven *miniwhite*-Genen, wenn das trDNA-Cluster näher am centromerischen Heterochromatin lokalisiert ist (Dorer und Henikoff, 1997). Die Autoren schließen daraus, daß tandem repetitive Transgene eine Paarung mit heterochromatischen Bereichen der Centromere und Telomere eingehen.

Diese inaktiven Chromosomenbereiche führen dann zu einer unterdrückten Expression der Transgene. Möglicherweise wird durch die tandem repetitive Anordnung der Transgene *de novo* kein Heterochromatin gebildet, wie im Modell von Dorer und Henikoff (1994) vorgeschlagen wurde, sondern es findet nur eine Kopplung der Gene an heterochromatische Bereiche statt. Brown et al. (1997a) stellten in Maus-Zellkulturen aus B-Lymphozyten fest, daß Transkriptions-inaktive Gene selektiv im Nukleus mit centromerischem Heterochromatin assoziiert sind. Die Autoren schließen daraus, daß je nach Transkriptions-Aktivität ein Gen einerseits mit einer repressiven, centromerischen Umgebung im Nukleus und andererseits mit aktiven Bereichen des Nukleus assoziiert ist. Diese unterschiedliche Assoziation des Gens in verschiedenen Bereichen des Nukleus spiegelt sich dann in der verschiedenen Expression des Gens wider.

Tandem repetitive DNA im telomerischen Heterochromatin

Das eukaryotische Telomer ist meistens heterochromatisch und besteht zum größten Teil aus trDNA. Ähnlich dem centromerischen Heterochromatin wirkt auch das telomerische Heterochromatin negativ auf die Expression eines Gens. Der "**telomeric position effect**" (TPE) unterscheidet sich jedoch von centromerischer PEV, indem Mutationen, die die PEV modifizieren, keinen Einfluß auf den TPE haben (Kurenova et al., 1998). Die Proteine zum Aufbau von Heterochromatin scheinen sich somit im Telomer von denen im Centromer zu unterscheiden. Ähnlich den Su(var)-Mutationen der centromerischen PEV wurden etwa in *S. cerevisiae* DOT-Gene ("disruptor of telomeric silencing") identifiziert, deren Deletion den TPE unterdrücken (Singer et al., 1998). Kurenova et al. (1998) zeigten, daß trDNA ursächlich am TPE beteiligt ist. Die Autoren erzeugten transgene Fliegen, in denen ein Cluster telomerischer trDNA aus *D. melanogaster* in eine euchromatische Region eingebaut ist. Das dem telomerischen trDNA-Cluster benachbarte Reportergen wird hierdurch in seiner Expression negativ beeinflusst. Es kommt jedoch nicht zu einer typischen Variegation wie bei einer klassischen PEV. Das Ausmaß der Repression ist abhängig von der Clustergröße und der Orientierung der telomerischen trDNA (Kurenova et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit zeigen alle transgenen *D. melanogaster*-Stämme mit einer Integration des Reportergens im telomerischen Heterochromatin einen deutlichen TPE. Die Expression des *miniwhite*-Reportergens ist in diesen Tieren deutlich reduziert (s. Abb. 26). Der negative Effekt des telomerischen Heterochromatins auf die Expression bleibt dominant, ist aber leicht abgeschwächt, wenn das trDNA-Cluster aus Hsp70

Promotoren größer ist. TPE scheint somit durch die verstärkte Aktivierung der Transkription eines Gens geschwächt zu werden. Auch in *S. cerevisiae* wurde gezeigt, daß die Transformation des *URA3*-Gens einschließlich der Aktivatoreinheit UAS in die Nähe eines Hefe-Telomers die Transkription von *URA3* unterdrückt. Diese Blockade der Transkription kann jedoch durch einen Aktivator, der an die UAS-DNA-Sequenz bindet, aufgehoben werden (Aparicio und Gottschling, 1994; Übersicht in: Felsenfeld, 1996). Ein starker Aktivator der Transkription vermag somit den TPE zu überwinden.

Tandem repetitive DNA in euchromatischen Chromosomenregionen

Auch in euchromatischen Chromosomenregionen kann der Einfluß von trDNA auf die Expression eines Gens von Positionseffekten der umliegenden DNA-Regionen überlagert werden. Wird ein Transgen unter Einfluß eines schwachen Promotors in die Nähe eines starken Enhancers transformiert, kann es zu einer erhöhten Expression des Transgens kommen. In *D. melanogaster* wird diese erhöhte Expression des Transgens dazu verwendet, gewebsspezifische Enhancer zu identifizieren (Enhancer-Trap-Methode). Umgekehrt identifizierten Sun et al. (1995) mit einem *miniwhite*-Gen als Reporter gen auch "cis"-wirkende Silencer der Expression. Die Autoren vermuten, daß in den untersuchten Fällen die veränderte Expression des *miniwhite*-Gens durch regulatorische DNA-Sequenzen benachbarter Gene verursacht wird. Roseman et al. (1993) wiesen in *D. melanogaster* nach, daß der chromosomale Positionseffekt auf ein Transgen auch aufgehoben werden kann. Sie rahmten ein Transgen mit Bindungsstellen für das Protein suppressor of Hairy-wing (*su(Hw)*) ein und zeigten, daß damit das Reporter gen unbeeinflusst von der chromosomalen Lokalisation exprimiert wird. DNA-Sequenzen, die die Expression eines Gens von Positionseffekten der umliegenden Chromosomenregion abschirmen, werden als "boundary elements" bezeichnet (Roseman et al., 1993; Vazquez und Schedl, 1994). Die Autoren vermuten, daß das *su(Hw)*-Protein die Chromatinstruktur beeinflusst. Enhancer oder Silencer, die in der Nähe des Transgens liegen, haben dadurch ihrerseits keinen Einfluß mehr auf die Chromatinstruktur und damit auf die Expression des untersuchten Gens.

Die hier durchgeführten Experimente zeigen den Einfluß einer X-chromosomalen Integration des Transgens auf die Expression des Reporter gens. Im Vergleich zu weiblichen Tieren ist in männlichen Tieren von *D. melanogaster* die Expression des *miniwhite*-Reporter gens leicht erhöht (Klemenz et al., 1987). Zwei in dieser Arbeit beschriebene Stämme (2Cla59 u. 5H72) haben in hemizygoten, weiblichen Tieren jedoch

eine sechsfach reduzierte Expression des Reportergens im Vergleich zu den männlichen Tieren (s. Abb. 27). Dieser Effekt ist unabhängig von der Art der trDNA und tritt nur auf, wenn die Integration des Transgens auf dem X-Chromosom stattgefunden hat. Es ist zu prüfen, ob dieser Effekt mit dem Phänomen der "Dosiskompensation" zu erklären ist. Der Hauptmechanismus der Dosiskompensation von X-chromosomalen Genen in *D. melanogaster* ist die verstärkte Expression X-chromosomaler Gene in männlichen Tieren (Kelley et al., 1995b; Qian und Pirrotta, 1995; Übersicht in: Stewart und Merriam, 1978; Kelley et al., 1995a). Da jedoch alle hemizygoten, weiblichen Tiere mit einer Integration des Transgens auf einem Autosom eine ähnlich hohe Expression des Transgens wie die männlichen Tiere aufweisen, ist der hier beschriebene Effekt wahrscheinlich keine Folge der klassischen Dosiskompensation in *D. melanogaster*. Die X-chromosomale Integration des Transgens führt in männlichen Tieren nicht zu einer Erhöhung der Transkription, sondern in weiblichen Tieren zu einer erniedrigten Transkription des Transgens. In homozygoten, weiblichen Tieren wird der negative Effekt des X-Chromosoms auf die Expression des Reportergens aufgehoben. Damit zeigen ausschließlich hemizygoten, weibliche Tiere eine verminderte Expression des Transgens. Möglicherweise ist dies ein Beispiel für eine "negative Dosiskompensation" in weiblichen Tieren oder auch für eine Transvektion. Mit Transvektion wird der Einfluß eines Genlocus auf die Aktivität des Alles auf dem homologen Chromosom bezeichnet. Die fehlende Genkopie auf einem der homologen Chromosomen hätte in weiblichen Tieren einen negativen Einfluß auf die Expression des hemizygoten Allels.

4.2.2 Positive Effekte von trDNA auf die Genexpression

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von drei verschiedenen trDNA-Klassen auf ein benachbartes Reportergen untersucht. Zwei der trDNA-Cluster führen zu einer deutlichen Steigerung der Expression des *miniwhite*-Reportergens. Sabbattini et al. (1999) zeigten, daß tandem repetitive Transgene, bestehend aus Immunglobulin-Genen einschließlich Teilen der "locus control region" (LCR), zu einer Kopienzahl-abhängigen Steigerung der Expression des Transgens führen. LCRs in der Nähe von Genen führen zu einer gewebsspezifischen, sehr hohen Expression des Gens. Bei Verwendung der kompletten LCR in Verbindung mit dem $\lambda 5$ -Gen führen diese tandem repetitiven Transgene selbst bei der Integration ins centromerische Heterochromatin zu einer gesteigerten Transkription. Die Steigerung der Transkription wächst dabei mit der Kopienzahl der Transgene und ist "dominant" über den reprimierenden Effekt des

centromerischen Heterochromatins. Die Autoren vermuten, daß die LCRs zu einer offenen Chromatinstruktur führen, so daß die Transgene für Transkriptionsfaktoren zugänglich werden. Auch in rekombinanten CHO-Zelllinien ("chinese hamster ovary") wurde nachgewiesen, daß mit steigender Kopienzahl eines Transgens auch die Expression desselben ansteigt. CHO-Zelllinien sind ein bevorzugtes Modellsystem zur Herstellung rekombinanter Proteine in Säuger-Zellkulturen (Wurm et al., 1986; Übersicht in: Wurm et al., 1996).

4.2.2.1 Einfluß von multimerisierten Promotor-Einheiten

Der Hsp70 Promotor gilt als Modellsystem für die Funktionsweise vieler Promotoren. Er weist eine Vielzahl verschiedener DNA-Sequenzmotive auf, die von unterschiedlichen Proteinen erkannt werden (s. Abb. 31). DNA-Motive wie etwa die TATA-Box sind vielen Promotoren gemeinsam. Diese weit verbreiteten DNA-Sequenzmotive sind häufig am Aufbau des basalen Transkriptionskomplexes beteiligt. Die GAGA-Boxen ((GA)_n), an die der "GAGA transcription factor" (GAF) bindet (Lu et al., 1992), kommen in einer Vielzahl von Promotoren in *D. melanogaster* vor (Kerrigan et al., 1991; Wilkins und Lis, 1997). Im Hsp70 Promotor gibt es vier GAGA-Boxen. Schließlich besitzt der Hsp70 Promotor auch noch spezifische DNA-Sequenzmotive wie die "heat shock elements" (HSE), an die die "heat shock factors" (HSF) binden und die spezifisch die Gene der Hitzeschock-Proteine (HSP) regulieren (Shuey und Parker, 1986a, 1986b; Shopland und Lis, 1996; Mason und Lis, 1997). HSEs bestehen aus invertierten Modulen mit der DNA-Sequenz (AGAAN) (Xiao und Lis, 1988; Amin et al., 1988; Fernandes et al., 1994). In den HSP-Genen von *D. melanogaster* kommen drei bis sechs der HSEs vor.

Abb. 31: Promotor-Elemente des Hsp70 Promotors

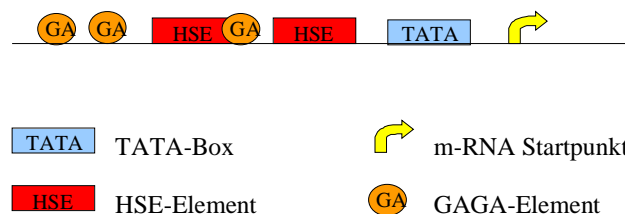


Abb. 31

Die Abbildung zeigt die Anordnung aller Promotor-Elemente in einer Einheit des trDNA-Clusters bestehend aus Hsp70 Promotoren.

Bei der Verwendung des Hsp70 Promotors zur Expression von Transgenen wird meist nur ein Teil des wildtypischen Promotors eingesetzt. Für die Funktionstüchtigkeit des Hsp70 Promotors scheinen nicht alle DNA-Elemente notwendig zu sein. Der in dieser Arbeit verwendete Promotor besteht aus zwei HSE-Elementen, drei GAGA-Boxen, der TATA-Box und der vollständigen RNA-Leader-Sequenz (s. Abb. 31). Experimentell wurde gezeigt, daß diese Anordnung für eine vollständige Expression und Induzierbarkeit beliebiger Gene völlig ausreicht (Lee et al., 1992; Shopland et al., 1995; Amin et al., 1994).

Multimerisierte Hsp70 Promotor-Einheiten führen zu einer Expressionssteigerung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß zusätzliche Hsp70 Promotor-Elemente, wenn sie gleichorientiert mit dem Vektor-eigenen Promotor sind (s. Abb. 10A, Orientierung G), zu einer deutlichen Steigerung der Expression des *miniwhite*-Reportergens im Genom von *D. melanogaster* führen (s. Abb. 24). Wenn es sich um eine euchromatische Integrationsstelle handelt, ist diese Steigerung unabhängig von der chromosomalen Lage des Transgens. Mit wachsender Anzahl der Hsp70 Promotor-Elemente steigt die Expression des Reporter gens. In Stämmen mit sieben zusätzlichen Promotoren wird annähernd das Expressionsniveau des wildtypischen *white*-Gens erreicht.

Die Abhängigkeit des Effekts von der Orientierung der DNA-Elemente zeigt, daß es sich um einen Effekt von zusätzlichen Promotoren handelt. Ausschließlich zusätzliche Promotor-Kopien, die mit dem Promotor des Vektors gleichgerichtet (Orientierung G) sind, tragen zu einer Expressionssteigerung des Reporter gens bei (s. Abb. 24, Stämme 8H4Tb u. 8H4Ta). Die Ergebnisse von zwei transgenen Stämmen (s. Abb. 24, 8H4Ta u. Hsp27) weisen darauf hin, daß invers orientierte Hsp70 Promotoren einen negativen Effekt auf die Expression des untersuchten Reporter gens haben.

Der Hsp70 Promotor setzt sich aus drei verschiedenen Promotor-Elementen zusammen, an die unterschiedliche Proteine binden (s. Abb. 31). Die tandem repetitive Anordnung der Hsp70 Promotoren erhöht die Anzahl der Bindungsstellen für die einzelnen Proteine. Möglicherweise ist dies die Ursache für die erhöhte Expression des *miniwhite*-Reporter gens. Die Eigenschaften dieser drei Promotor-Elemente des Hsp70 Promotors und ihre Bedeutung für die beobachteten Ergebnisse werden im folgenden diskutiert.

Die HSFs liegen konstitutiv in der Zelle als Monomere vor (Zimarino und Wu, 1987), und erst nach entsprechender Induktion werden verstärkt Homotrimere gebildet. Diese Trimere mit aktivierter DNA-Bindeaktivität binden dann an die HSE-Motive der Hitzeschock-Promotoren und führen zu einer extremen Expressionssteigerung (Übersicht in: Lis and Wu, 1993). An nicht induzierten Zellen sind nur wenige HSFs an den Hitzeschock-Genen nachweisbar (Shopland und Lis, 1996). Im weiteren ist die Orientierung von HSEs für die Bindung von HSF nicht wichtig. Wird die Orientierung von HSEs vertauscht, zeigt sich unter Hitzeschock-Bedingungen keine Änderung der Transkriptionsrate eines Reportergens (Amin et al., 1987; Simon und Lis, 1987). Da die hier durchgeführten Versuche nicht unter Hitzeschock-Bedingungen stattgefunden haben und die beobachteten Effekte von der Orientierung der zusätzlichen Hsp70 Promotor-Elemente abhängig sind, ist ein Einfluß von zusätzlichen Bindungsstellen für HSFs eher unwahrscheinlich.

Das Protein GAF ist ein essentielles Protein in *D. melanogaster*, und verschiedene Isoformen werden vom "trithorax like"-Locus (Trl) codiert. Nullmutanten des Gens sind in *D. melanogaster* letal. Das Protein bindet an die DNA-Sequenz (GA)_n, wobei eine Wiederholungseinheit für eine Bindung ausreicht. Wiederholungseinheiten von (GA)_n kommen verstärkt in der Nähe von Promotor-Elementen wie dem Transkriptionsstart oder der TATA-Box vor (Wilkins und Lis, 1998). Das Protein GAF ist in einem solchen Überschuß in der Zelle vorhanden, daß theoretisch alle 2,5 Nukleosomen eine Bindung stattfinden kann (Wilkins und Lis, 1998). Multiple GAF-Bindungsstellen wie in den tandem repetitiven Hsp70 Promotor-Einheiten können deshalb alle mit einem Protein besetzt werden. GAF kann nicht alleine die Transkription einer unverpackten DNA-Sequenz initiieren, vermag aber den inhibitorischen Effekt z. B. von HP1 aufzuheben (Croston et al., 1991). GAF stimuliert demnach nicht direkt die Expression eines Gens, vielmehr schafft es unter ATP-Verbrauch eine offene Chromatinstruktur, indem die Struktur der Nukleosomen aufgelöst wird (Tsukiyama et al., 1994; Wilkins und Lis, 1997). Die Bindung von GAF an DNA-Sequenzen verringert den inhibitorischen Effekt dicht gepackter Histone auf die Transkription, so daß der Promotor-Bereich für Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II zugänglich wird. Daraus läßt sich schließen, daß die Anhäufung von GAGA-Elementen durch die multimerisierten Hsp70 Promotoren vermutlich zu einer vermehrten Bindung von GAF führt und damit zu einer Auflockerung des Chromatins über den ganzen Bereich des trDNA-Clusters. Deletionsversuche an Hsp70 Promotoren zeigten (Weber et al., 1997), daß sich GAF und TFIID unabhängig voneinander an den Hsp70 Promotor anlagern. Obwohl die TATA-Box

deletiert ist, bindet GAF an die GAGA-Elemente (Weber et al., 1997). Die Deletion der GAGA-Elemente im Hsp70 Promotor führt in transgenen *D. melanogaster* zudem zu einer reduzierten Expression des Reportergens (Lu et al., 1992). Für das *gaf*-Gen heterozygote Mutanten (Mutante Trl^{13c}) verstärken in *D. melanogaster* die PEV und gehören somit zu den E(var)s (Farkas et al., 1994). Aber GAF ist nicht nur an der Transkription verschiedener Gene beteiligt, sondern scheint im allgemeinen die Chromatinstruktur zu beeinflussen. So wurde GAF nicht nur im Promotor-Bereich transkribierender Gene sondern auch im Heterochromatin nachgewiesen (Raff et al., 1994). Die Auflockerung des Chromatins durch eine vermehrte Bindung von GAF kann jedoch nicht alle hier vorliegenden Ergebnisse erklären. Wie gezeigt, führen zusätzliche Promotor-Kopien in inverser Anordnung gegenüber dem Promotor des Vektors zu keiner gesteigerten Expression des Reportergens. GAGA-Elemente führen aber in beiden Orientierungen zu der Anlagerung von GAF. Ein Effekt ausschließlich auf Grund vermehrter GAF-Bindungsstellen sollte deshalb unabhängig von der Orientierung der DNA-Elemente sein. Das ist aber in den vorliegenden Ergebnissen eindeutig nicht der Fall.

Ein weiteres Promotor-Element im Hsp70 Promotor ist die **TATA-Box**, an die das "TATA box binding protein" (TBP) bindet. TBP kommt in den unterschiedlichsten Organismen vor und variiert im Molekulargewicht von 22 kD (*Arabidopsis*) bis 38 kD (Mensch und *D. melanogaster*). Während das Carboxy-Ende des Proteins in den verschiedenen Organismen konserviert und für die Bindung an die TATA-Box verantwortlich ist, scheint der N-Terminus des Proteins speziesspezifisch zu sein (Chasman et al., 1993; Übersicht in: Meyers und Sharp, 1993; Orphanides et al., 1996). TBP hat eine sattelförmige Struktur und bindet in die kleine Furche der TATA-Box, wodurch ein scharfer Knick in der DNA-Helix induziert wird (Nikolov et al., 1995, 1996). Gleichzeitig wird die nukleosomale Verpackung der DNA-Sequenz um die TATA-Box verhindert (Übersicht in: Orphanides et al., 1996). Damit dient das TBP als Plattform zur Bindung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren (GTFs), und der Präinitiationskomplex der Transkription wird gebildet (Emanuel und Gilmour, 1993; Tang et al., 1996; Übersicht in: Hahn, 1998).

Durch die Bindung von GAF an die multimerisierten Hsp70 Promotor-Einheiten liegt das trDNA-Cluster möglicherweise als offene Chromatinstruktur vor. Dies ermöglicht die vermehrte Anlagerung von Initiationskomplexen für die Transkription, initiiert durch die primäre Anlagerung von TBP an die tandem repetitiven Hsp70 Promotoren.

Transkriptionskomplexe wären in der unmittelbaren Nähe des zu exprimierenden Gens angeordnet, was zu einer erhöhten Expression des Reportergens führen würde. Das TBP, angelagert an die TATA-Box, orientiert den Präinitiationskomplex gegenüber dem Transkriptionsstartpunkt. Hsp70 Promotor-Einheiten, die entgegen der normalen Orientierung angeordnet wären, sollten zu der Anlagerung eines falsch orientierten Präinitiationskomplexes und damit nicht zu einer Expressionssteigerung führen. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen diese Hypothese.

4.2.2.2 Einfluß von trDNA-Clustern aus *Chironomus*

Cla-Elemente sind eine Klasse von trDNA, die besondere Eigenschaften aufweisen. In den nahe verwandten und kreuzbaren Schwesterarten *C. thummi* und *C. piger* ist die Verteilung und auch die Kopienzahl der Cla-Elemente stark unterschiedlich (Schmidt und Godwin, 1983; Schmidt, 1984; Hankeln et al., 1994). Auffällig sind im besonderen die großen Cla-Element-Cluster im NTS der rDNA-Gene von *C. thummi*, die im orthologen Locus bei *C. piger* fehlen (Schmidt und Godwin, 1983). Möglicherweise hat die Vermehrung der Cla-Elemente in *C. thummi* zufällig stattgefunden. Entsprechend dem Modell einer "selfish"-DNA könnte sich eine funktionslose trDNA im Genom einer Art vermehrt haben. Sowohl der Integrationsort als auch die relative Stabilität der trDNA im NTS von *C. thummi* wären damit zufällig. Im Gegensatz dazu könnten Cla-Element-Cluster zumindest in einigen Chromosomenregionen einer positiven Selektion unterliegen und deshalb in diesen Regionen fixiert worden sein.

Das hier verwendete Cla-Element-Cluster C2i6 bewirkt Orientierungs-abhängig eine Steigerung der Expression des *miniwhite*-Reportergens in *D. melanogaster*. Dieser Effekt ist unabhängig von der Lage des Integrationsorts im Chromosom. Besonders die Abhängigkeit des Effekts von der Orientierung belegt den ursächlichen Einfluß des Cla-Element-Clusters auf die Expression des Reportergens. Vier transgene Stämme (s. Tabelle 4, Stämme CT9A, CT8B, CT11A, CT11A-Tc) mit je einer singulären Integration des Cla-Element-Clusters in der Orientierung A (s. Abb. 6A) zeigen keine gesteigerte Expression des Reportergens im Vergleich zu den Kontrollstämmen (s. Abb. 25). Demgegenüber zeigen drei transgene Stämme (s. Tabelle 4, Stämme 2Cla59, 2Cla18, 2Cla7) mit je einem Cla-Element-Cluster in der Orientierung B (s. Abb. 6B) eine deutlich gesteigerte Expression des Reportergens. Eine Verkleinerung des Cla-Element-Clusters (Stamm 2Cla7) führt zu einer Reduktion des beobachteten Effekts (s. Abb. 25).

Ein trDNA-Cluster aus Cla-Elementen wirkt demnach in Abhängigkeit von der Orientierung expressionssteigernd auf ein benachbartes Gen. Cla-Elemente kommen natürlicherweise nicht im Genom von *D. melanogaster* vor. Die positive Wirkung der Cla-Elemente auf die Expression wurde in einem transgenen System nachgewiesen. Damit ist der Einfluß der trDNA in dem untersuchten Fall nicht auf die Art beschränkt, aus der das trDNA-Cluster stammt. Die Abhängigkeit des Effekts von der Orientierung des trDNA-Clusters spricht mehr für eine Wirkung der Cla-Elemente auf der Ebene des Transkriptionsapparats oder der Chromatinstruktur als für eine Enhancer-ähnliche Wirkungsweise. Das trDNA-Cluster aus Cla-Elementen steigert die Expression des *miniwhite*-Reportergens, das von einer Kopie des Hsp70 Promotors kontrolliert wird. Die Cla-Elemente wirken möglicherweise auf die Genexpression, indem sie den Promotor des Reporter gens beeinflussen. Bei den durchgeführten Experimenten lagen keine Hitzeschock-Bedingungen vor. Am Hsp70 Promotor des Reporter gens bindet aber auch ohne Induktion konstitutiv TBP (Giardina et al., 1992). Zusätzlich bindet GAF an die GAGA-Elemente des Promotors. Die Struktur des Promotors ist deshalb offen und damit zugänglich für die Bindung weiterer Proteine.

Auffällig an der DNA-Sequenz der Cla-Elemente sind Charakteristika, die an Promotoren erinnern. In jeder Wiederholungseinheit kommen sowohl TATA-Boxen als auch CAAT-Boxen vor, und zwar in der Orientierung B (s. Abb. 6B), die im transgenen Genom auch zu der Expressionssteigerung des Reporter gens führt (s. Abb. 25). Im Gegensatz zu den Cla-Elementen bewirkt der transgene *D. melanogaster*-Stamm mit einem Alu-Element-Cluster (s. Tabelle 4) keine Steigerung der Expression des Reporter gens (s. Abb. 25). Den Alu-Elementen fehlen auch die besonderen DNA-Sequenzen der Cla-Elemente.

Die Anhäufung von korrekt orientierten **TATA-Boxen** in Form der trDNA aus Cla-Elementen in der direkten Nachbarschaft des Reporter gens könnte zu einer zusätzlichen Anlagerung von TBP an das trDNA-Cluster führen. Damit könnte an den repetitiven Cla-Elementen, vermittelt durch TBP, der Aufbau von Transkriptionskomplexen erfolgen. Diese an die trDNA angelagerten Transkriptionskomplexe vor dem eigentlichen Promotor des Reporter gens könnten dann zu einer schnelleren Verfügbarkeit der RNA-Polymerase II und damit zu der beobachteten Transkriptionssteigerung führen.

In Promotoren verschiedenster Gene kommen **CAAT-Box** in mehreren Kopien und unterschiedlicher Orientierung vor. An sie binden Transkriptionsfaktoren, die spezifisch in die Regulation dieser Gene eingreifen (Kadonaga et al., 1987; Chodosh et al.,

1988a, 1888b). Die Orientierung der CAAT-Boxen in Promotoren hat jedoch keinen Einfluß auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren. Würden die Cla-Elemente mittels der Anhäufung von CAAT-Boxen eine Expressionssteigerung bewirken, sollte dieser Effekt unabhängig von der Orientierung der trDNA sein. Die durchgeführten Experimente zeigen jedoch eine klare Abhängigkeit des Effekts von der Orientierung. Daher kommt den TATA-Motiven in der Cla-Sequenz vermutlich eine größere Bedeutung als den CAAT-Boxen zu.

Ein experimentell gut abgesichertes Beispiel für die Transkriptions-steigernde Wirkung von DNA-Elementen, die in ihren DNA-Sequenzen ähnlich den Promotoren sind, stellen die "spacer" der rDNA-Gene von *Xenopus laevis* dar (Reeder et al., 1984). Dort ermöglichen zusätzliche Promotoren die Anlagerung des Transkriptionskomplexes einschließlich der RNA-Polymerase I im 5'-Bereich des eigentlichen Promotors des rDNA-Gens. Dadurch ist ein neuer Transkriptionskomplexe direkt verfügbar, sobald eine RNA-Polymerase den Promotor zur Transkription des rDNA-Gens verlassen hat. In ähnlicher Weise könnte auch die trDNA der Cla-Elemente wirken. Fertig assoziierte Transkriptionskomplexe, die sich an die trDNA aus Cla-Elementen angelagert haben, könnten in Richtung des eigentlichen Promotors abfließen und so die Transkription des Reportergens anregen.

Cla-Elemente kommen auch im NTS der rDNA-Gene von *C. thummi* vor. Obwohl die von der RNA-Polymerase I transkribierten Gene keine TATA-Boxen besitzen, ist das TBP ein Bestandteil des Transkriptionskomplexes der RNA-Polymerase I (Übersicht in: McKnight, 1996; Lee und Young, 1998). Möglicherweise bewirken die Cla-Elemente auch im NTS der rDNA-Gene von *C. thummi* eine gesteigerte Expression dieser Gene. Hinweise darauf liefern vorläufige *in vitro*-Transkriptionsversuche an rDNA-Genen von *C. tentans*. Dort führen trDNA-Cluster aus Cla-Elementen vor einem rDNA-Gen ebenfalls zu einer gesteigerten Expression des rDNA-Gens (in Vorbereitung: Koepf, 1999).

Die Wirkung der Cla-Elemente auf die Genexpression könnte auch auf anderen Mechanismen beruhen. Möglicherweise haben die Cla-Elemente einen Einfluß auf die Autoinhibition von TBP. Sowohl in *D. melanogaster* als auch im Menschen verhindern verschiedene TAF_{II} (TBP-assoziierte Faktoren der RNA-Polymerase II) die Bindung von TBP an die TATA-Box (Verrijzer et al., 1995). Die speziellen TAF_{II} imitieren die DNA-Sequenz der TATA-Box und konkurrieren so mit der Promotor-Sequenz um die Bindung von TBP. Dies wird als Autoinhibition bezeichnet (Übersicht in: Burley und Roeder, 1998; Liu et al., 1998). Werden mit Hilfe der Cla-Elemente zusätzliche

Bindungsstellen für TBP zur Verfügung gestellt, so könnte das zu einer vermehrten Anlagerung von TBP an die zu transkribierende DNA führen. Dies könnte die Autoinhibition reduzieren und so die Transkription des Gens stimulieren.

Die Cla-Elemente könnten auf Grund der besonderen DNA-Sequenzen auch einen Bereich mit erhöhter Konzentration von Transkriptionsfaktoren um den Promotor des Reporter gens erzeugen. Das Überangebot von Transkriptionsfaktoren würde dann die Transkription des Reporter gens begünstigen. Käme es aber ausschließlich auf eine lokale Konzentrationserhöhung von TBP, GTFs und TAF_{II} an, sollten die zusätzlichen Promotor-Sequenzen der Cla-Elemente auch in umgekehrter Orientierung eine gesteigerte Expression des Reporter gens bewirken. Die Untersuchungen belegen jedoch eindeutig, daß die Orientierung der Cla-Elemente entscheidend ist.

Der offensichtliche Einfluß, den die Orientierung des trDNA-Clusters ausübt, schließt auch aus, daß die Cla-Elemente allein durch eine Veränderung der Chromatinstruktur wirken. Würde das trDNA-Cluster z. B. zu der Bindung von zusätzlichen Chromatinflockern Acetylasen führen, etwa durch die Anlagerung von TBP und damit TAFs mit Acetylierungsaktivität, sollte auch diese Auflockerung des Chromatins unabhängig von der Orientierung der Cla-Elemente sein.

Insofern ist die Wirkung der Cla-Elemente auf die Expression eines benachbarten Reporter gens vergleichbar mit der von tandem repetitiven Hsp70 Promotor-Einheiten.

4.2.3 Tr-DNA als Stimulator der Genexpression

Eine wichtige Voraussetzung der eukaryotischen Transkription ist die spezifische Anlagerung der Transkriptionsfaktoren an die DNA-Sequenz des Promotors, der in Nukleosomen verpackt im Euchromatin vorliegt. Zur *in vitro*-Transkription von Genen mit Promotoren der Klasse II, die ohne Verpackung in Nukleosomen vorliegen, werden nur die allgemeinen Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II benötigt (Übersicht in: Orphanides et al., 1996). Dieser minimale Transkriptionsapparat vermag hingegen in Chromatin verpackte DNA nicht zu transkribieren. *In vitro* bindet das TBP an die TATA-Box um ein Vielfaches schlechter, wenn die DNA-Sequenz in Nukleosomen verpackt ist (Imbalzano et al., 1994a; 1994b). Die in Nukleosomen verpackte DNA inhibiert die Transkription. Erst zusätzliche Faktoren, die die Struktur der Nukleosomen verändern, ermöglichen die Transkription von verpackter DNA (LeRoy et al., 1998; Imbalzano et al., 1994b; Übersicht in: John und Workman, 1998; Felsenfeld, 1996).

Im Fall der tandem repetitiven Hsp70 Promotor-Einheiten erfolgt die Auflockerung des Chromatins wahrscheinlich durch GAF. Das Protein liegt in der Zelle nicht limitiert vor (Wilkins und Lis, 1998). Die zusätzlichen GAGA-Elemente in den tandem repetitiven Promotoren könnten deshalb zu einer Auflockerung des Chromatins innerhalb der gesamten trDNA führen. TBP ist ebenfalls in der Zelle kein limitierter Transkriptionsfaktor und bindet auch ohne Induktion konstitutiv am Hsp70 Promotor (Giardina et al., 1992). Für *S. cerevisiae* ist die Anzahl der TBP-Moleküle auf 30.000 - 50.000 Moleküle pro Zelle kalkuliert worden (Lee und Young, 1998). Nicht TBP, sondern die vielfältigen Bindungspartner des Moleküls kommen in der Zelle limitiert vor. Auch die RNA-Polymerase II wird ohne Hitzeschock an nahezu jeder Interbande detektiert (Jamrich et al., 1977). Es ist wahrscheinlich, daß die multimeren Bindungsstellen der tandem repetitiven Promotoren von diesen wichtigen Faktoren der Transkription auch wirklich genutzt werden. TBP ist als Initiator beim Aufbau des Präinitiationskomplexes bekannt. Es bleibt die Frage, ob es möglich ist, durch die Initiierung des Aufbaus eines Präinitiationskomplexes auch die fehlenden TAFs an die tandem repetitiven Promotor-Einheiten zu binden.

Mit zunehmender Menge an RNA-Polymerase II-Molekülen am uninduzierten Hsp70 Promotor erhöht sich nach der Induktion auch die Stärke der Genexpression (Lee et al., 1992). Die direkte Verfügbarkeit der RNA-Polymerase II scheint ein kritischer Faktor für die Transkription zu sein. So steigt unter Hitzeschock-Bedingungen sowohl die Anzahl der HSF-Moleküle als auch die Anzahl der RNA-Polymerasen an den Hitzeschock-Genen (Shopland und Lis, 1996). Das bedeutet, es besteht eine Korrelation zwischen der Verfügbarkeit der RNA-Polymerase II am zu transkribierenden Gen und der Stärke der Genexpression. Die Anzahl der RNA-Polymerase II-Moleküle an einem Promotor wird durch eine offene Chromatinstruktur des Promotors begünstigt (Lee et al., 1992). Fehlen die Faktoren, die beispielsweise die Chromatinstruktur auflockern, wird die Expression unterdrückt. So vermag in Zellkultur ein tandem repetitives Polymer (40mer) aus 51 bp des Hsp70 Promotors, bestehend aus zwei HSEs und einem GAGA-Element, spezifisch die Transkription von kotransformierten Hitzeschock-Genen zu inhibieren (Xiao und Lis, 1986). Eine Titration der positiv regulierenden Faktoren der Transkription am Hsp70 Promotor ist damit möglich. Umgekehrt sollte die Bereitstellung von zusätzlichen Bindungsstellen für diese Faktoren im 5'-Bereich des Reportergens die Transkription erleichtern.

Durch die Verbindung von zugänglichem Chromatin mit korrekt orientierten Bindungsstellen für den allgemeinen Transkriptionsapparat könnten vollständige Transkriptionskomplexe an den tandem repetitiven Promotor-Einheiten aufgebaut werden. Einer Perlenschnur ähnlich wären diese Transkriptionskomplexe sofort verfügbar nachdem ein Transkriptionskomplex den Promotor zur Transkription verlassen hat (s. Abb. 32B). Dies könnte dann zu der beobachteten Steigerung der Expression des Reportergens durch ein trDNA-Cluster aus Hsp70 Promotoren führen.

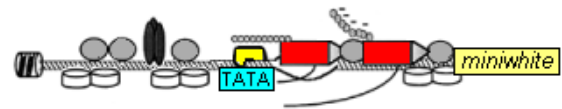
Übertragung dieses Modells auf die tandem repetitiven Cla-Elemente

Sowohl ein trDNA-Cluster aus Cla-Elementen als auch tandem repetitive Hsp70 Promotor-Einheiten führen zu einer gesteigerten Expression eines benachbarten Reportergens. Der Effekt steigt mit wachsender Zahl der tandem repetitiven Einheiten. In beiden Fällen zeigt sich eine Abhängigkeit von der Orientierung der jeweiligen DNA-Elemente. Das für das Modell wichtigste Strukturelement, die TATA-Box, kommt in beiden DNA-Elementen vor und wirkt ausschließlich in einer Orientierung.

Den Cla-Elementen fehlen, verglichen mit den tandem repetitiven Hsp70 Promotor-Einheiten, die GAGA-Elemente. Um den Promotor-Bereich zugänglich zu machen, müsste deshalb eine Auflockerung des Chromatins auf anderem Weg erfolgen. Die Bindung von GAF am Hsp70 Promotor erhöht die Transkription zwar stark, sie scheint jedoch nicht zwingend notwendig zu sein, um einen Transkriptionskomplex aufzubauen (Weber et al., 1997). Selbst nach der Deletion des gesamten 5'-Bereichs vor der TATA-Box kommt es zur Anlagerung eines TFIID-Komplexes. Der Präinitiationskomplex einschließlich der RNA-Polymerase II ist schon am nicht-induzierten Hsp70 Promotor vorhanden (Gilmour und Lis, 1985, 1986). Somit liegt auch der Hsp70 Promotor des Reportergens im 3'-Bereich des trDNA-Clusters aus Cla-Elementen in einer offenen Chromatinstruktur vor, da TBP konstitutiv am Hsp70 Promotor bindet (Giardina et al., 1992). Möglicherweise reicht das erste gebundene TBP aus, um die Anlagerung von TBP an 5'-liegende TATA-Boxen der Cla-Elemente zu ermöglichen. In der Übertragung des Modells bewirken die zusätzlichen TATA-Boxen dann erneut die Anlagerung einer Vielzahl von TBPs als Startpunkt für den Aufbau von Präinitiationskomplexen (s. Abb. 32C). Auch die CAAT-Motive in den Cla-Elementen könnten eine Auflockerung des Chromatins bewirken. Im beschriebenen Modell fließen dann die assoziierten Transkriptionskomplexe in Richtung des Reportergens und bewirken die gesteigerte Expression des Reportergens.

Abb. 32: Modell zur Expressionssteigerung durch tandem repetitive DNA

A) Konstitutiv exprimierter Hsp70 Promotor



B) Multimere Hsp70 Promotoren



C) Tandem repetitive Cla-Elemente vor dem konstitutiv exprimierten Hsp70 Promotor

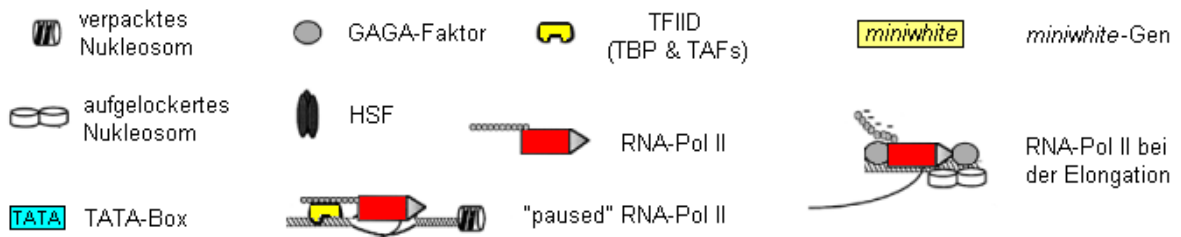
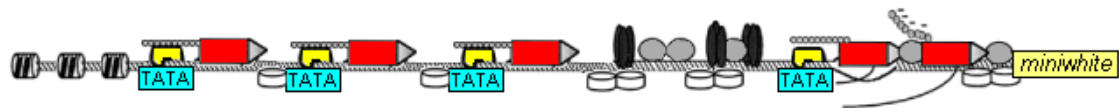


Abb. 32

A) Der Hsp70 Promotor führt zu einer schwachen, konstitutiven Expression des *miniwhite*-Reportergens. TBP und GAF sind an die jeweiligen DNA-Elemente des Promotors angelagert.

B) Multimere Hsp70 Promotoren führen zu einer vermehrten Anlagerung von GAF und TBP. Funktionsfähige Transkriptionskomplexe mit RNA-Polymerase II-Molekülen werden aufgebaut. Die Expression des *miniwhite*-Reportergens ist erhöht.

C) An die TATA-Boxen der trDNA aus Cla-Elementen lagern sich TBP-Moleküle an. Dies führt zum Aufbau von Transkriptionskomplexen, die die Expression des *miniwhite*-Reportergens anregen.

Im Genom von *C. thummi* gibt es eine Vielzahl verschiedener Loci, an denen Cla-Elemente vorkommen. Wenn alle diese Orte Transkriptionsfaktoren binden würden, könnte es zu einer Verknappung derselben kommen oder zu einer generellen Auflockerung des Chromatins. Offensichtlich muß ein Unterschied bestehen zwischen verschiedenen chromosomalen Orten, in denen Cla-Elemente lokalisiert sind. Möglicherweise benötigt die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an die DNA-Sequenz von Cla-Elementen eine offene Chromatinstruktur. Dies wäre vor allem in der Nähe von transkribierenden Genen der Fall. Die offene Chromatinstruktur wäre eine Voraussetzung für einen Effekt der Cla-Elemente auf ein benachbartes Gen. Eine weitere Möglichkeit ist, daß an Cla-Elementen nur eine stabile Bindung von Transkriptionsfaktoren stattfinden kann, wenn die Transkriptionskomplexe in Richtung eines Promotors "abfließen" können. Die Nutzung der assoziierten Transkriptionskomplexe zur Expression eines in der Nähe liegenden Gens wäre eine Voraussetzung für eine stabile Bindung dieser Proteine an die Cla-Elemente. Wenn die Cla-Elemente außerhalb eines Promotor-Bereiches lokalisiert sind, käme es deshalb zu keiner Anlagerung von Transkriptionskomplexen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Eigenschaften von tandem repetitiver DNA (trDNA) analysiert. Drei der untersuchten trDNA-Familien (Cla-Elemente, Alu-Elemente, 1,688-Satelliten-DNA) stammen aus der genomischen DNA von Insekten, während ein trDNA-Cluster artifiziell aus Hsp70 Promotoren hergestellt wurde. Untersucht wurde die Stabilität dieser trDNA-Sequenzfamilien innerhalb eines Plasmidvektors in *E. coli* bzw. nach Integration der trDNA auch im Genom von *D. melanogaster*. Der Schwerpunkt der Arbeit liegt jedoch in der Analyse des Einflusses von trDNA auf die Expression eines benachbarten Reportergens in *D. melanogaster*.

Ziel der Untersuchungen zur Stabilität war es, Eigenschaften von trDNA-Clustern und Mechanismen aufzuzeigen, die die Stabilität derselben in *E. coli* und im Genom von *D. melanogaster* beeinflussen. Mit Ausnahme der Alu-Elemente zeigen alle trDNA-Familien eine deutliche Instabilität in *E. coli*. Am Beispiel der Cla-Elemente wurde gezeigt, daß spezifische Eigenschaften der trDNA-Familie, wie etwa die sequenzbedingte Krümmung der Helixachse, keinen Einfluß auf die Stabilität des trDNA-Clusters haben, sondern die Orientierung des trDNA-Clusters innerhalb des Vektors ausschlaggebend ist. Ein entscheidender Faktor könnte die Orientierung des trDNA-Clusters relativ zur Wanderungsrichtung der Replikationsgabel in *E. coli* sein. Am Beispiel des trDNA-Clusters aus artifiziellen Hsp70 Promotoren konnte gezeigt werden, daß verschiedene Rekombinationssysteme an der Instabilität in *E. coli* beteiligt sind. Die meisten beobachteten Deletionen von trDNA sind RecA-abhängig. Zusätzlich findet jedoch in einem kleinen Teil der Plasmide auch eine RecA-unabhängige Rekombination statt. Sowohl in *E. coli* als auch in *D. melanogaster* wurde als vorherrschender Mechanismus der trDNA-Instabilität die homologe Rekombination identifiziert. TrDNA-Cluster, die in *E. coli* deutlich instabil sind, können jedoch im Genom von *D. melanogaster* weitgehend stabil sein. Auch Faktoren, die in *E. coli* die Stabilität eines trDNA-Clusters beeinflussen, wie etwa die Orientierung, zeigen in *D. melanogaster* keinen Einfluß auf die Stabilität der trDNA-Cluster. Ergebnisse aus Stabilitätsuntersuchungen in *E. coli* können damit nicht ohne Überprüfung auf andere Organismen übertragen werden.

Im Hauptteil der Arbeit sollte geklärt werden, ob trDNA generell die Expression benachbarter Gene beeinflusst und welche Eigenschaften der trDNA für diesen inhibitorischen oder stimulierenden Effekt verantwortlich sind. Keine der untersuchten trDNA-Familien zeigt einen inhibitorischen Effekt auf ein benachbartes Reportergen. Entgegen dem Modell von Dorer und Henikoff (1994) führen trDNA-Cluster nicht per se zu der

Entstehung von Heterochromatin. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß sowohl ein trDNA-Cluster aus Cla-Elementen als auch aus Hsp70 Promotor-Elementen eine deutliche Steigerung der Expression des *miniwhite*-Reportergens bewirken. Diese Steigerung ist für beide trDNA-Familien unabhängig von der chromosomalen Lage des Transgens im Euchromatin. In beiden Fällen ist der Effekt von der Orientierung des trDNA-Clusters abhängig und verstärkt sich mit wachsender Kopienzahl der trDNA-Einheiten. Während eines der trDNA-Cluster aus trDNA-Einheiten besteht, die bekanntermaßen eine Promotoraktivität aufweisen (Hsp70 Promotoren), war für die Cla-Elemente kein Einfluß auf die Expression eines benachbarten Gens bekannt. Damit wurde für eine trDNA-Familie aus *Chironomus* nachgewiesen, daß sie auf ein benachbartes Gen ähnlich wirkt wie zusätzliche Promotoren. Die experimentellen Befunde unterstützen ein Modell, demzufolge die Cla-Elemente in gleicher Weise wie tandem repetitive Promotoren auf ein benachbartes Gen expressionssteigernd wirken. Die TATA-Box ist für das Modell ein wichtiges Strukturelement, da diese in beiden expressionssteigernden DNA-Sequenzen der trDNA-Cluster vorkommt und ausschließlich in einer Orientierung wirkt. Das Modell besagt, daß durch die Verbindung einer offenen Chromatinstruktur mit korrekt orientierten Bindungsstellen für TBP der Aufbau von vollständigen Transkriptionskomplexen an den tandem repetitiven Promotoren initiiert wird. Einer Perlenschnur ähnlich wären die Transkriptionskomplexe direkt verfügbar, nachdem ein Transkriptionskomplex den Promotor zur Transkription verlassen hat (Abb. 32). Dies würde zu der beobachteten Steigerung der Expression des Reporter gens sowohl durch die tandem repetitiven Hsp70 Promotoren als auch durch die Cla-Elemente führen.

6. Literatur

- Amin J., Ananthan J., Voellmy R. (1988) Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol* 8, 3761-9
- Amin J., Fernandez M., Ananthan J., Lis J. T., Voellmy R. (1994) Cooperative binding of heat shock transcription factor to the Hsp70 promoter in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 269, 4804-11
- Amin J., Mestril R., Schiller P., Dreano M., Voellmy R. (1987) Organization of the *Drosophila melanogaster* Hsp70 heat shock regulation unit. *Mol Cell Biol* 7, 1055-62
- Andrew S. E., Goldberg Y. P., Kremer B., Telenius H., Theilmann J., Adam S., Starr E., Squitieri F., Lin B., Kalchman M. A., Graham R. K., Hayden M. R. (1993) The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet* 4, 398-403
- Aparicio O. M., Gottschling D. E. (1994) Overcoming telomeric silencing, a trans-activator competes to establish gene expression in a cell cycle-dependent way. *Genes Dev* 8, 1133-46
- Arnheim N., Kuehn M. (1979) The genetic behaviour of a cloned mouse ribosomal DNA segment mimics mouse ribosomal gene evolution. *J Mol Biol* 134, 743-63
- Ashley C. T. Jr., Warren S. T. (1995) Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu Rev Genet* 29, 703-28
- Ashley C. T., Pendleton C. G., Jennings W. W., Saxena A., Glover C. V. (1989) Isolation and sequencing of cDNA clones encoding *Drosophila* chromosomal protein D1. A repeating motif in proteins which recognize at DNA. *J Biol Chem* 264, 8394-401
- Assad F. F., Tucker K. L., Signer E. R. (1993) Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 22, 1067-85
- Baker W. K. (1968) Position-effect variegation. *Adv Genet* 14, 133-69
- Barlow C., Meister B., Lendahl U., Vennström B. (1995) Altered expression after expansion of a *v-erbA* transgene in transgenic mice. *Transg Res* 4, 378-87
- Belyaeva E. S., Zhimulev I. F., Volkova E. I., Alekseyenko A. A., Moshkin Y. M., Koryakov D. E. (1998) *Su(UR)ES*, a gene suppressing DNA underreplication in intercalary and pericentric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7532-7
- Benfante R., Landsberger N., Maiorano D., Badaracco G. (1990) A binding protein (p82 protein) recognizes specifically the curved heterochromatic DNA in *Artemia franciscana*. *Gene* 94, 217-22
- Bennett S. T., Lucassen A. M., Gough S. C. L., Powell E. E., Undlien D. E., Pritchard L. E., Merriman M. E., Kawaguchi Y., Dronsfield M. J., Pociot F., Nerup J., Bouzekri N., Cambon-Thomsen A., Rönningen K. S., Barnett A. H., Bain S. C., Todd J. A. (1995) Susceptibility to human type 1 diabetes at *IDDM2* is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nature Genet* 9, 284-92

- Beridze T. (1986) *Satellite DNA*, Springer-Verlag, Berlin
- Bernardi A., Bernardi F. (1984) Complete sequence of pSC101. *Nucl Acids Res* 12, 9415-26
- Bi X., Liu L. F. (1994) *recA*-independent and *recA*-dependent intramolecular plasmid recombination. Differential homology. *J Mol Biol* 235, 414-23
- Bi X., Liu L. F. (1996a) A replicational model for DNA recombination between direct repeats. *J Mol Biol* 256, 849-58
- Bi X., Liu L. F. (1996b) DNA rearrangement mediated by inverted repeats. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 819-23
- Bi X., Liu L. F. (1996c) *recA*-independent DNA recombination between repetitive sequences, mechanisms and implications. *Prog Nucl Acids Res Mol Biol* 54, 253-92
- Birnboim H. C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7, 1513-23
- Blackburn E. H. (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-73
- Blackburn E. H. (1994) Telomeres: no end in sight. *Cell* 77, 621-3
- Bois P., Stead J. D., Bakshi S., Williamson J., Neumann R., Moghadaszadeh B., Jeffreys A. J. (1998a) Isolation and characterization of mouse minisatellites. *Genomics* 50, 317-30
- Bois P., Williamson J., Brown J., Dubrova Y. E., Jeffreys A. J. (1998b) A novel unstable mouse VNTR family expanded from SINE B1 elements. *Genomics* 49, 122-8
- Bonner J. J., Pardue M. L. (1976) Ecdysone-stimulated RNA synthesis in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma (Berlin)* 58, 87-99
- Brown K. E., Guest S. S., Smale S. T., Hahm K., Merckenschlager M., Fisher A. G. (1997a) Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* 91, 845-54
- Brown S. A., Kingston R. E. (1997) Disruption of downstream chromatin directed by a transcriptional activator. *Genes Dev* 11, 3116-21
- Brutlag D. L. (1980) Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Ann Rev Genet* 14, 121-44
- Burley S. K., Roeder R. G. (1998) TATA box mimicry by TFIID, autoinhibition of pol II transcription. *Cell* 94, 551-3
- Carlson M., Brutlag D. (1977) Cloning and characterization of a complex satellite DNA from *Drosophila melanogaster*. *Cell* 11, 371-81
- Carroll D., Wright S. H., Ajioka R. S., Hussey C. E. Jr. (1984) Genetic recombination of *Xenopus laevis* 5 S DNA in bacteria. *J Mol Biol* 178, 155-72
- Case S. T. (1982) Selective deletion of large segments of Balbiani ring DNA during molecular cloning. *Gene* 20, 169-76

- Cavalier-Smith T. (1985) Eucaryote gene numbers, non-coding DNA and genome size. In: T. Cavalier-Smith (Ed.) The evolution of genome size. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 69-103
- Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371, 215-20
- Chasman D. I., Flaherty K. M., Sharp P. A., Kornberg R. D. (1993) Crystal structure of yeast TATA-binding protein and model for interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8174-8
- Cheng K. C., Smith G. R. (1989) Distribution of Chi-stimulated recombinational exchanges and heteroduplex endpoints in phage lambda. *Genetics* 123, 5-17
- Chodosh L. A., Baldwin A. S., Carthew R. W., Sharp P. A. (1988a) Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cell* 53, 11-24
- Chodosh L. A., Olesen J., Hahn S., Baldwin A. S., Guarente L., Sharp P. A. (1988b) A yeast and a human CCAAT-binding protein have heterologous subunits that are functionally interchangeable. *Cell* 53, 25-35
- Clark D. V., Sabl J. F., Henikoff S. (1998) Repetitive arrays containing a housekeeping gene have altered polytene chromosome morphology in *Drosophila*. *Chromosoma* 107, 96-104
- Clark R. F., Elgin S. C. (1992) Heterochromatin protein 1, a known suppressor of position-effect variegation, is highly conserved in *Drosophila*. *Nucl Acids Res* 20, 6067-74
- Clarke L., Baum M., Marschall L. G., Ngan V. K., Steiner N. C. (1993) Structure and function of *Schizosaccharomyces pombe* centromeres. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 687-95
- Clewell M. J., Helinski D. R. (1969) Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc Natl Acad Sci* 62, 1159-66
- Croston G. E., Kerrigan L. A., Lira L. M., Marshak D. R., Kadonaga J. T. (1991) Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science* 251, 643-9
- Csink A. K., Henikoff S. (1996) Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature* 381, 529-31
- de la Torre J., Goyanes V., Gosalvez J. (1990) Discontinuous undercondensation of centromeric heterochromatin in mouse chromosomes, evidence in Hoechst 33258-treated cells. *Cytogenet Cell Genet* 54, 55-7
- Deka R., Majumder P. P., Shriver M. D., Stivers D. N., Zhong Y., Yu L. M., Barrantes R., Yin S. J., Miki T., Hundrieser J., Bunker C. H., McGarvey S. T., Sakallah S., Ferrell R. E., Chakraborty R. (1996) Distribution and evolution of CTG repeats at the myotonin protein kinase gene in human populations. *Genome Res* 6, 142-54
- Denhardt D. T. (1966) A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 23, 641-6
- Dernburg A. F., Sedat J. W., Hawley R. S. (1996) Direct evidence of a role for heterochromatin in meiotic chromosome segregation. *Cell* 86, 135-46

- DiBartolomeis S. M., Tartof K. D., Jackson F. R. (1992) A superfamily of *Drosophila* satellite related (SR) DNA repeats restricted to the X chromosome euchromatin. *Nucl Acids Res* 20, 1113-16
- Diekmann S. (1986) Sequence specificity of curved DNA. *FEBS Letters* 195, 53-6
- Diekmann S. (1987) DNA curvature. *Prog Nucl Acids Res Mol Biol* 1, 138-56
- Diekmann S. (1989) The migration anomaly of DNA fragments in polyacrylamide gels allows the detection of small sequence specific DNA structure variations. *Electrophoresis* 10, 354-9
- Diekmann S. (1992) Analyzing DNA curvature in polyacrylamide gels. *Methods Enzymol* 212, 30-46
- Diekmann S., Wang J. C. (1985) On the sequence determinants and flexibility of the kinetoplast DNA fragment with abnormal gel electrophoretic mobilities. *J Mol Biol* 186, 1-11
- Dimitri P., Pisano C. (1989) Position effect variegation in *Drosophila melanogaster*, relationship between suppression effect and the amount of Y chromosome. *Genetics* 122, 793-800
- Djian P. (1998) Evolution of simple repeats in DNA and their relation to human disease. *Cell* 94, 155-60
- Doolittle W. F., Sapienza C. (1980) Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284, 601-3
- Dorer D. R. (1997) Do transgene arrays form heterochromatin in vertebrates? *Transg Res* 6, 3-10
- Dorer D. R., Henikoff S. (1994) Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell* 77, 993-1002
- Dorer D. R., Henikoff S. (1997) Transgene repeat arrays interact with distant heterochromatin and cause silencing in cis and trans. *Genetics* 147, 1181-90
- Dover G. (1982a) A role for the genome in the origin of species? *Prog Clin Biol Res* 96, 435-59
- Dover G. A. (1982b) Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299, 111-7
- Dover G. A. (1986) Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *TIG* 2, 159-65
- Dover G. A. (1989) Victims or perpetrators of DNA turnover? *Nature* 342, 347-8
- Dover G. A. (1992) Observing development through evolutionary eyes, a practical approach. *BioEssays* 14, 281-7
- Dover G. A., Linares A. R., Bowen T., Hancock J. M. (1993) Detection and quantification of concerted evolution and molecular drive. *Methods Enzymol* 224, 525-41
- Dover G. A., Strachan T., Coen E. S., Brown S. D. (1982) Molecular drive [letter] *Science* 218, 1069

- Dreesen T. D., Johnson D. H., Henikoff S. (1988) The brown protein of *Drosophila melanogaster* is similar to the white protein and components of active transport complexes. *Mol Cell Biol* 8, 5206-15
- du Sart D., Cancilla, M. R., Earle E., Mao J. I., Saffery R., Tainton K. M., Kalitsis P., Martyn J., Barry A. E., Choo K. H. (1997) A functional neo-centromer formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA *Nat Genet* 16, 144-153
- Dvorak J., Jue D., Lassner M. (1987) Homogenization of tandemly repeated nucleotide sequences by distance-dependent nucleotide sequence. *Genetics* 116, 487-98
- Earnshaw W. C., Ratrie I. H., Stetten G. (1989) Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma (Berlin)* 98, 1-12
- Earnshaw W. C., Rothfield N. (1985) Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma (Berlin)* 91, 313-21
- Eberl D. F., Duyf B. J., Hilliker A. J. (1993) The role of heterochromatin in the expression of a heterochromatic gene, the rolled locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 134, 277-92
- Eissenberg J. C., Morris G. D., Reuter G., Hartnett T. (1992) The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics* 131, 345-52
- Ekwall K., Javerzat J. P., Lorentz A., Schmidt H., Cranston G., Allshire R. (1995) The chromodomain protein Swi6, a key component at fission yeast centromeres. *Science* 269, 1429-31
- Ekwall K., Olsson T., Turner B. M., Cranston G., Allshire R. C. (1997) Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* 91, 1021-32
- Emanuel P. A., Gilmour D. S. (1993) Transcription factor TFIID recognizes DNA sequences downstream of the TATA element in the Hsp70 heat shock gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8449-53
- Engels W. R. (1989) P-elements in *Drosophila melanogaster*. In: Berg D. E., Howe M. M. (Ed.) *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington D. C., 437-84
- Evans B. A., Howells A. J. (1978) Control of drosopterin synthesis in *Drosophila melanogaster*, mutants showing an altered pattern of GTP cyclohydrolase activity during development. *Biochem Genet* 16, 13-26
- Fanti L., Dorer D. R., Berloco M., Henikoff S., Pimpinelli S. (1998) Heterochromatin protein 1 binds transgene arrays. *Chromosoma* 107, 286-92
- Farkas G., Gausz J., Galloni M., Reuter G., Gyurkovics H., Karch F. (1994) The Trithorax-like gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* 371, 806-8
- Feinberg A. P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13
- Felsenfeld G. (1996) Chromatin unfolds. *Cell* 86, 13-9

- Fernandes M., Xiao H., Lis J. T. (1994) Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucl Acids Res* 22, 167-73
- Fishel R. A., James A. A., Kolodner R. (1981) *recA*-independent general genetic recombination of plasmids. *Nature* 294, 184-6
- Fowler C., Drinkwater R., Skinner J., Burgoyne L. (1988) Humann satellite-III DNA: an example of a "macrosatellite" polymorphism. *Hum Genet* 79, 265-72
- Francastel C., Walters M. C., Groudine M., Martin D. I. K. (1999) A functional enhancer suppresses silencing of a transgene and prevents its localization close to centromeric heterochromatin. *Cell* 99, 259-69
- Freudenreich C. H., Stavenhagen J. B., Zakian V. A. (1997) Stability of a CTG/CAG trinucleotide repeat in yeast is dependent on its orientation in the genome. *Mol Cell Biol* 17, 2090-8
- Giardina C., Perez-Riba M., Lis J. T. (1992) Promoter melting and TFIID complexes on *Drosophila* genes in vivo. *Genes Dev* 6, 2190-200
- Gilmour D. S., Lis J. T. (1985) In vivo interactions of RNA polymerase II with genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 5, 2009-18
- Gilmour D. S., Lis J. T. (1986) RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. *Mol Cell Biol* 6, 3984-9
- Greener A. (1990) *Strategies* 3, 5-6
- Grunstein M. (1998) Yeast heterochromatin, regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* 93, 325-8
- Grunstein M., Hogness D. S. (1975) Colony hybridisation: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci* 72, 3961-5
- Gvozdev V. A., Alatorsev V. E., Aravin A. A., Kalmykova A. I., Kogan G. L., Lavrov S. A., Naumova N. M., Nurminskii D. I., Rasheva V. I., Tolchikov E. V. (1999) Heterochromatin, molecular evolution and effects of gene location in *Drosophila melanogaster* *Mol Biol (Mosk)* 33, 14-25
- Haaf T., Warburton P. E., Willard H. F. (1992) Integration of human α -satellite DNA into simian chromosomes. Centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation. *Cell* 70, 681-96
- Hahn S. (1998) The role of TAFs in RNA polymerase II transcription. *Cell* 95, 579-82
- Hancock J. M. (1996) Simple sequences and the expanding genome. *BioEssays* 18, 421-5
- Hankeln T. (1990) Molekulare Analyse phylogenetisch bedeutsamer repetitiver DNA bei Chironomiden. Diss., Ruhr-Universität, Bochum
- Hankeln T., Amid C., Weich B., Niessing J., Schmidt E. R. (1998) Molecular evolution of the globin gene cluster E in two distantly related midges, *Chironomus pallidivittatus* and *C. thummi thummi*. *J Mol Evol* 46, 589-601
- Hankeln T., Keyl H. G., Ross R., Schmidt E. R. (1993) Evolution of histone gene loci in chironomid midges. *Genome* 36, 852-862

- Hankeln T., Rohwedder A., Weich B., Schmidt E. R. (1994) Transposition of minisatellite-like DNA in *Chironomus* midges. *Genome* 37, 542-9
- Hankeln T., Schmidt E. R. (1987) Cotransposition of a highly repetitive DNA element with flanking sequences in the genome of the midge *Chironomus thummi*. *J Mol Evol* 26, 311-9
- Hankeln T., Schmidt E. R. (1990) New foldback transposable element TFB1 found in histone genes of the midge *Chironomus thummi*. *J Mol Biol* 215, 477-82
- Hankeln T., Winterpacht A., Schmidt E. R. (1996) Instability of tandem repetitive DNA in natural and transgenic organisms. In: Schmidt E. R., Hankeln T. (Ed.) *Transgenic Organisms and Biosafety. Horizontal Gene Transfer, Stability of DNA and Expression of Transgenes*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 181-208
- Harley H. G., Brook J. D., Rundle S. A., Crow S., Reardon W., Buckler A. J., Harper P. S., Housman D. E., Shaw D. J. (1992) Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355, 545-6
- Harrington J. J., Van Bokkelen G., Mays R. W., Gustashaw K., Willard H. F. (1997) Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes. *Nat Genet* 15, 345-55
- Harrington R. E. (1992) DNA curving and bending in protein-DNA recognition. *Mol Biol* 6, 2549-55
- He M., Wilde A., Kaderbhai M. A. (1989) A simple single-step procedure for small scale preparation of *Escherichia coli* plasmids. *Nucl Acids Res* 18, 1660
- Heitz, E. (1928) Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Bot* 69, 381-93
- Heller R., Brown K. E., Burgdorf C., Brown W. R. (1996) Mini-chromosomes derived from the human Y chromosome by telomere directed chromosome breakage *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 7125-30
- Henikoff S., Dreesen T. D. (1989) Trans-inactivation of the *Drosophila* brown gene, evidence for transcriptional repression and somatic pairing dependence. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 6704-8
- Henikoff S., Jackson J. M., Talbert P. B. (1995) Distance and pairing effects on the brown dominant heterochromatic element in *Drosophila*. *Genetics* 140, 1007-17
- Henning W., Henning I., Stein H. (1970) Repeated sequences in the DNA of *Drosophila* and their localization in giant chromosomes. *Chromosoma* 32, 31-63
- Hershey N. D., Conrad S. E., Sodja A., Yen P. H., Cohen M. Jr., Davidson N., Ilgen C., Carbon J. (1977) The sequence arrangement of *Drosophila melanogaster* 5s DNA cloned in recombinant plasmids. *Cell* 11, 585-98
- Hourcade D., Dressler D., Wolfson J. (1973) The amplification of ribosomal RNA genes involves a rolling circle intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 2926-30
- Howe M., Dimitri P., Berloco M., Wakimoto B. T. (1995) Cis-effects of heterochromatin on heterochromatic and euchromatic gene activity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 140, 1033-45
- Hsieh T., Brutlag D. (1979) Sequence and sequence variation within the 1.688 g/cm³ satellite DNA of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* 135, 465-81

- Ikeno M., Grimes B., Okazaki T., Nakano M., Saitoh K., Hoshino H., McGill N. I., Cooke H., Masumoto H. (1998) Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes *Nat Biotechnol* 16, 431-9
- Imbalzano A. N., Kwon H., Green M. R., Kingston R. E. (1994a) Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA *Nature* 370, 481-5
- Imbalzano A. N., Zaret K. S., Kingston R. E. (1994b) Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J Biol Chem* 269, 8280-6
- Israelewski N. (1983) Structure and function of an AT-rich, interspersed repetitive sequence from *Chironomus thummi*, solenoidal DNA, 142 bp palindrome-frame and homologies with the sequence for site-specific recombination of bacterial transposons. *Nucl Acids Res* 11, 6985-96
- Iyer R. R., Wells R. D. (1999) Expansion and deletion of triplet repeat sequences in *Escherichia coli* occur on the leading strand of DNA replication [published erratum appears in *J Biol Chem* 1999, 274, 10668] *J Biol Chem* 274, 3865-77
- James T. C., Elgin S. C. (1986) Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol Cell Biol* 6, 3862-72
- Jamrich M., Greenleaf AL., Bautz E. K. (1977) Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 2079-83
- Jeffreys A. J., MacLeod A., Tamaki K., Neil D. L., Monckton D. G. (1991) Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature* 354, 204-9
- Jeffreys A. J., Neil D. L., Neumann R. (1998) Repeat instability at human minisatellites arising from meiotic recombination. *EMBO J* 17, 4147-57
- Jeffreys A. J., Neumann R., Wilson V. (1990) Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell* 60, 473-85
- Jeffreys A. J., Tamaki K., MacLeod A., Monckton D. G., Neil D. L., Armour J. A. (1994) Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nat Genet* 6, 136-45
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L. (1985a) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73
- Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L. (1985b) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316, 76-9
- Jinks-Robertson S., Michelitch M., Ramcharan S. (1993) Substrate length requirements for efficient mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 13, 3937-50
- Jinks-Robertson S., Petes T. D. (1985) High-frequency meiotic gene conversion between repeated genes on nonhomologous chromosomes in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3350-4
- John B. (1988) The biology of heterochromatin. In: Verma R. S. (Ed.) *Heterochromatin*. Cambridge University Press, New York, 1-147

- John B., Miklos G. L. G. (1988) The eukaryote genome in development and evolution. Allen and Unwin, Boston
- John S., Workman J. L. (1998) Just the facts of chromatin transcription. *Science* 282, 1836-7
- Johnson G. D., Nogueira C., Araujo G. M. (1981) A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J Immun Methods* 43, 349-50
- Kadonaga J. T. (1998) Eukaryotic transcription, an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92, 307-13
- Kadonaga J. T., Carner K. R., Masiarz F. R., Tjian R. (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079-90
- Karch F., Török I., Tissieres A. (1981) Extensive regions of homology in front of the two Hsp70 heat shock variant genes in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* 148, 219-30
- Karess R. E. (1985) P element mediated germ line transformation of *Drosophila*. In: Glover D. M. (Ed.) DNA Cloning Vol. II, a practical approach. IRL Press, Oxford, Washington DC, 121-41
- Karess R. E., Rubin G. M. (1984) Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* 38, 135-46
- Karpen G. H., Spradling A. C. (1990) Reduced DNA polytenization of a mini-chromosom region undergoing position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell* 63, 97-107
- Kelley R. L., Kuroda M. I. (1995a) Equality for X chromosomes. *Science* 270, 1607-10
- Kelley R. L., Solovyeva I., Lyman L. M., Richman R., Solovyev V., Kuroda M. I. (1995b) Expression of msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*. *Cell* 81, 867-77
- Kennedy G. C., German M. S., Rutter W. J. (1995) The minisatellite in the diabetes susceptibility locus *IDDM2* regulates insulin transcription. *Nature Genet* 9, 293-8
- Kerrigan L. A., Croston G. E., Lira L. M., Kadonaga J. T. (1991) Sequence-specific transcriptional antirepression of the *Drosophila* Kruppel gene by the GAGA factor. *J Biol Chem* 266, 574-82
- Keyl H.-G. (1965) Duplikationen von Untereinheiten der chromosomalen DNS während der Evolution von *Chironomus thummi*. *Chromosoma (Berl)* 17, 139-80
- Kidwell M. G., Lisch D. (1997) Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 7704-11
- Klemenz R., Weber U., Gehring W. J. (1987) The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucl Acids Res* 15, 3947-59
- Koepf H. (1999, in Vorbereitung) Die ribosomale RNA in *Chironomus* – Charakterisierung der rRNA-Gene in *C. tentans* und vergleichende strukturelle Analyse der Spacerregionen IGS und ITS. (vorläufiger Titel) Diss., Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Kominami R., Muramatsu M., Moriwaki K. (1983a) A mouse type 2 Alu sequence (M2) is mobile in the genome. *Nature* 301, 87-9

- Kominami R., Urano Y., Mishima Y., Muramatsu M., Moriwaki K., Yoshikura H. (1983b) Novel repetitive sequence families showing size and frequency polymorphism in the genomes of mice. *J Mol Biol* 165, 209-28
- Koo H. S., Wu H. M., Crothers D. M. (1986) DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature* 320, 501-6
- Kraemer, C. (1994) Molekulare Analyse der geschlechtsbestimmenden Region von Chironomiden. Diss., Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Krontiris T. G., Devlin B., Karp D. D., Robert N. J., Risch N. (1993) An association between the risk of cancer and mutations in the *hras* minisatellite locus. *J Med* 329, 517-23
- Kurenova E., Champion L., Biessmann H., Mason J. M. (1998) Directional gene silencing induced by a complex subtelomeric satellite from *Drosophila*. *Chromosoma* 107, 311-20
- Kurkulos M., Weinberg J. M., Roy D., Mount S. M. (1994) P element-mediated in vivo deletion analysis of white-apricot, deletions between direct repeats are strongly favored. *Genetics* 136, 1001-11
- Langer-Safer P. R., Levine M., Ward D. C. (1982) Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc Natl Acad Sci* 79, 4381-5
- Langley K. E., Villarejo M. R., Fowler A. V., Zamenhof P. J., Zabin I. (1975) Molecular basis of β -galactosidase α -complementation. *Proc Natl Acad Sci* 72, 1254-7
- Larin Z., Fricker M. D., Tyler-Smith C. (1994) De novo formation of several features of a centromere following introduction of a Y alphoid YAC into mammalian cells. *Hum Mol Genet* 3, 689-95
- Larson D. D., Spangler E. A., Blackburn E. H. (1987) Dynamics of telomere length variation in *Tetrahymena thermophila*. *Cell* 50, 477-83
- Laski F. A., Rio D. C., Rubin G. M. (1986) Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* 44, 7-19
- Lassner M., Dvorak J. (1986) Preferential homogenization between adjacent and alternate subrepeats in wheat rDNA. *Nucl Acids Res* 14, 5499-512
- Lee D. Y., Hayes J. J., Pruss D., Wolffe A. P. (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73-84
- Lee H., Kraus K. W., Wolfner M. F., Lis J. T. (1992) DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of *hsp70*. *Genes Dev* 6, 284-95
- Lee M. K., Borchelt D. R., Wong P. C., Sisodia S. S., Price D. L. (1996) Transgenic models of neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurobiol* 6, 651-60
- Lee T. I., Young R. A. (1998) Regulation of gene expression by TBP-associated proteins. *Genes Dev* 12, 1398-408
- LeRoy G., Orphanides G., Lane W. S., Reinberg D. (1998) Requirement of RSF and FACT for transcription of chromatin templates *in vitro*. *Science* 282, 1900-4
- Levinger L., Varshavsky A. (1982) Protein D1 preferentially binds A+T-rich DNA in vitro and is a component of *Drosophila melanogaster* nucleosomes containing A+T-rich satellite DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 7152-6

- Levinson G., Gutman G. A. (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 4, 203-21
- Lica L. M., Narayanswami S., Hamkalo B. A. (1986) Mouse satellite DNA, centromere structure, and sister chromatid pairing. *J Cell Biol* 103, 1145-51
- Lin C. T., Lyu Y. L., Liu L. F. (1997) A cruciform-dumbbell model for inverted dimer formation mediated by inverted repeats. *Nucl Acids Res* 25, 3009-16
- Lindblad K., Schalling M. (1996) Clinical implications of unstable DNA repeat sequences. *Acta Paediatr* 85, 265-71
- Lindsley D. L., Zimm G. G. (1992) *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, California
- Lis J., Wu C. (1993) Protein traffic on the heat shock promoter, parking, stalling, and trucking along. *Cell* 74, 1-4
- Liu D., Ishima R., Tong K. I., Bagby S., Kokubo T., Muhandiram D. R., Kay L. E., Nakatani Y., Ikura M. (1998) Solution structure of a TBP-TAF(II)230 complex, protein mimicry of the minor groove surface of the TATA box unwound by TBP *Cell* 94, 573-83
- Liu L. F., Wang J. C. (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7024-7
- Lloyd V. K., Sinclair D. A., Grigliatti T. A. (1997) Competition between different variegating rearrangements for limited heterochromatic factors in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 145, 945-59
- Lobachev K. S., Shor B. M., Tran H. T., Taylor W., Keen J. D., Resnick M. A., Gordenin D. A. (1998) Factors affecting inverted repeat stimulation of recombination and deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 1507-24
- Locke J., Kotarski M. A., Tartof K. D. (1988) Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* 120, 181-98
- Lohe A. R., Brutlag D. L. (1987) Identical satellite DNA sequences in sibling species of *Drosophila*. *J Mol Biol* 194, 161-70
- Lohe A. R., Roberts P. (1988) Evolution of satellite DNA sequences in *Drosophila*. In: R. S. Verma (Ed.) *Heterochromatin*. Cambridge University Press, New York, 148-86
- Lohe A. R., Roberts P. A. (1990) An unusual Y chromosome of *Drosophila simulans* carrying amplified rDNA spacer without rRNA genes. *Genetics* 125, 399-406
- Lovett S. T., Drapkin P. T., Sutera V. A. Jr., Gluckman-Peskind T. J. (1993) A sister-strand exchange mechanism for *recA*-independent deletion of repeated DNA sequences in *Escherichia coli*. *Genetics* 135, 631-42
- Lu Q., Wallrath L. L., Allan B. D., Glaser R. L., Lis J. T., Elgin S. C. (1992) Promoter sequence containing (CT)_n(GA)_n repeats is critical for the formation of the DNase I hypersensitive sites in the *Drosophila* hsp26 gene. *J Mol Biol* 225, 985-98
- Macgregor H. C., Mizuno S. (1976) In situ hybridization of "nick-translated" 3H-ribosomal DNA to chromosomes from salamanders. *Chromosoma* 54,15-25

- Mandel M., Higa A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159-62
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York
- Marini J. C., Levene S. D., Crothers D. M., Englund P. T. (1982) Bent helical structure in kinetoplast DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 7664-8
- Martinez-Balbas A., Rodriguez-Campos A., Garcia-Ramirez M., Sainz J., Carrera P., Aymami J., Azorin F. (1990) Satellite DNAs contain sequences that induce curvature. *Biochemistry* 29, 2342-8
- Martin-Morris L. E., Csink A. K., Dorer D. R., Talbert P. B., Henikoff S. (1997) Heterochromatic trans-inactivation of *Drosophila white*-transgenes. *Genetics* 147, 671-7
- Mason P. B. Jr., Lis J. T. (1997) Cooperative and competitive protein interactions at the Hsp70 promoter. *J Biol Chem* 272, 33227-33
- Masumoto H., Masukata H., Muro Y., Nozaki N., Okazaki T. (1989) A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J Cell Biol* 109, 1963-73
- Matsumura R., Takayanagi T., Fujimoto Y., Murata K., Mano Y., Horikawa H., Chuma T. (1996) The relationship between trinucleotide repeat length and phenotypic variation in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 139, 52-7
- Mattausch S. (1993) Molekulare Analyse gekrümmter, tandem-repetitiver Sequenzen aus dem Genom von *Chironomus thummi piger*. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Maurer D. J., O'Callaghan B. L., Livingston D. M. (1996) Orientation dependence of trinucleotide CAG repeat instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 6617-22
- McClintock B. (1956) Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Yearbook* 21, 197-216
- McDonnell M. W., Simon M. N., Studier F. W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 110, 119-46
- McKnight S. L. (1996) Transcription revisited, a commentary on the 1995 Cold Spring Harbor Laboratory meeting, "Mechanisms of Eukaryotic Transcription". *Genes Dev* 10, 367-81
- Meyer P. (1993) Expression and stability of foreign genes in animals and plants. In: Wöhrmann K., Tomiuk J. (Ed.) *Transgenic Organisms*. Birkhäuser Verlag, Basel, 5-23
- Meyers R. E., Sharp P. A. (1993) TATA-binding protein and associated factors in polymerase II and polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 13, 7953-60
- Michalakis Y., Veuille M. (1996) Length variation of CAG/CAA trinucleotide repeats in natural populations of *Drosophila melanogaster* and its relation to the recombination rate. *Genetics* 143, 1713-25

- Miklos G. L. G., Cotsell H. J. (1990) Chromosome structure at interfaces between major chromatin types: alpha- and beta-heterochromatin. *BioEssays* 12, 1-6
- Moehrle A., Paro R. (1994) Spreading the silence, epigenetic transcriptional regulation during *Drosophila* development. *Dev Genet* 15, 478-84
- Monckton D. G., Coolbaugh M. I., Ashizawa K. T., Siciliano M. J., Caskey C. T. (1997) Hypermutable myotonic dystrophy CTG repeats in transgenic mice. *Nat Genet* 15, 193-6
- Monckton D. G., Neumann R., Guram T., Fretwell N., Tamaki K., MacLeod A., Jeffreys A. J. (1994) Minisatellite mutation rate variation associated with a flanking DNA sequence polymorphism. *Nat Genet* 8, 162-70
- Morin G. B., Cech T. R. (1986) The telomeres of the linear mitochondrial DNA of *Tetrahymena thermophila* consist of 53 bp tandem repeats. *Cell* 46, 873-83
- Morin G. B., Cech T. R. (1988) Mitochondrial telomeres: surprising diversity of repeated telomeric DNA sequences among six species of *Tetrahymena*. *Cell* 52, 367-74
- Muller H. J. (1930) Types of viable variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet* 22, 299-334
- Murphy T. D., Karpen G. H. (1998) Centromeres take flight, alpha satellite and the quest for the human centromere. *Cell* 93, 317-20
- Murphy T.D., Karpen G. H. (1995) Localization of centromere function in a *Drosophila* minichromosome. *Cell* 82, 599-609
- Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., White R. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235, 1616-28
- Nielsen L., Edström J.-E. (1993) Complex telomere-associated repeat units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. *Mol Cell Biol* 13, 1583-9
- Nikolov D. B., Chen H., Halay E. D., Hoffman A., Roeder R. G., Burley S. K. (1996) Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 4862-7
- Nikolov D. B., Chen H., Halay E. D., Usheva A. A., Hisatake K., Lee D. K., Roeder R. G., Burley S. K. (1995) Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* 377, 119-28
- O'Hare K., Murphy C., Levis R., Rubin G. M. (1984) DNA sequence of the white locus of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* 180, 437-55
- Orgel L. E., Crick F. H. (1980) Selfish DNA, the ultimate parasite. *Nature* 284, 604-7
- Orphanides G., Lagrange T., Reinberg D. (1996) The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev* 10, 2657-83
- Owen-Hughes T. A., Pavitt G. D., Santos D. S., Sidebotham J. M., Hulton C. S. J., Hinton J. C. D., Higgins C. F. (1992) The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNA topology and gene expression. *Cell* 71, 255-65

- Pak D. T., Pflumm M., Chesnokov I., Huang D. W., Kellum R., Marr J., Romanowski P., Botchan (1997) Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. *Cell* 91, 311-23
- Palmiter R. D., Brinster R. L. (1986) Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet* 20, 465-99
- Paques F., Bucheton B., Wegnez M. (1996) Rearrangements involving repeated sequences within a P element preferentially occur between units close to the transposon extremities. *Genetics* 142, 459-70
- Paques F., Wegnez M. (1993) Deletions and amplifications of tandemly arranged ribosomal 5S genes internal to a P element occur at a high rate in a dysgenic context. *Genetics* 135, 469-76
- Pardue M. L., Gall J. G. (1975) Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. *Methods Cell Biol* 10, 1-16
- Parniewski P., Bacolla A., Jaworski A., Wells R. D. (1999) Nucleotide excision repair affects the stability of long transcribed (CTGⁿCAG) tracts in an orientation-dependent manner in *Escherichia coli*. *Nucl Acids Res* 27, 616-23
- Pearson C. E., Sinden R. R. (1996) Alternative structures in duplex DNA formed within the trinucleotide repeats of the myotonic dystrophy and fragile X loci. *Biochemistry* 35, 5041-53
- Petrov D. A., Hartl D. L. (1997) Trash DNA is what gets thrown away: high rate of DNA loss in *Drosophila*. *Gene* 205, 279-89
- Petrov D. A., Hartl D. L. (1998) High rate of DNA loss in the *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* species groups. *Mol Biol Evol* 15, 293-302
- Petrov D. A., Lozovskaya E. R., Hartl D. L. (1996) High intrinsic rate of DNA loss in *Drosophila*. *Nature* 384, 346-9
- Phillips J. P., Forrest H. S. (1978) Ommochromes and Pteridines. In Ashburner M., Wright T., R., F. (Ed.) *The genetics and biology of Drosophila*. Vol. 2d Academic Press, London, 541-615
- Pirrotta V., Rastelli L. (1994) White gene expression, repressive chromatin domains and homeotic gene regulation in *Drosophila*. *BioEssays* 16, 549-56
- Qian S., Pirrotta V. (1995) Dosage compensation of the *Drosophila* white gene requires both the X chromosome environment and multiple intragenic elements. *Genetics* 139, 733-44
- Radic M. Z., Lundgren K., Hamkalo B. A. (1987) Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin. *Cell* 50, 1101-8
- Raff J. W., Kellum R., Alberts B. (1994) The *Drosophila* GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle. *EMBO J* 13, 5977-83
- Rattner J. B. (1991) The structure of the mammalian centromere. *BioEssays* 13, 51-6
- Reeder R. H. (1984) Enhancers and ribosomal gene spacers. *Cell* 38, 349-51
- Ren X., Eisenhour L., Hong C., Lee Y., McKee B. D. (1997) Roles of rDNA spacer and transcription unit-sequences in X-Y meiotic chromosome pairing in *Drosophila melanogaster* males. *Chromosoma* 106, 29-36

- Reuter G., Giarre 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, 219-23
- Reuter G., Spierer P. (1992) Position effect variegation and chromatin proteins. *BioEssays* 14, 605-12
- Richard G. F., Dujon B. (1996) Distribution and variability of trinucleotide repeats in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 174, 165-74
- Robertson H. M., Preston C. R., Phillis R. W., Johnson-Schlitz D. M., Benz W. K., Engels W. K. (1988) A stable genomic source of P-element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118, 461-70
- Rohwedder A. (1986) Lokalisation und Aufbau eines Integrationsortes repetitiver DNA-Sequenzen im Genom von *Chironomus thummi*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität, Bochum
- Rose M. R., Doolittle W. F. (1983) Molecular biological mechanisms of speciation. *Science* 220, 157-62
- Roseman R. R., Pirrotta V., Geyer P. K. (1993) The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from chromosomal position-effects. *EMBO J* 12, 435-42
- Rubin G. M., Spradling A. C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-53
- Rudkin G. T. (1969) Non replicating DNA in *Drosophila*. *Genetics* 61, 227-38
- Rüther U. (1982) pUR 250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. *Nucl Acids Res* 10, 5765-72
- Sabbattini P., Georgiou A., Sinclair C., Dillon N. (1999) Analysis of mice with single and multiple copies of transgenes reveals a novel arrangement for the lambda5-VpreB1 locus control region. *Mol Cell Biol* 19, 671-9
- Sabl J. F., Henikoff S. (1996) Copy number and orientation determine the susceptibility of a gene to silencing by nearby heterochromatin in *Drosophila*. *Genetics* 142, 447-58
- Sachs L. (1974) *Angewandte Statistik*. Springer Verlag, 592-8
- Safer B., Grunberg-Manago M., Badman D., Bergman F., Freeman C., Galasso G., Jagus R., Williams B. (1982) International symposium on translational / transcriptional regulation of gene expression. Highlights of the Fogarty International Center Meeting held in Bethesda, Maryland on 7-9 April, 1982. *FEBS Lett* 147, 1-10
- Saiki R. K., Gyllenstein U. B., Erlich H. A. (1988) The polymerase chain reaction. In: K. E. Davies (Ed.) *Genome analysis. A practical approach*. IRL press, Oxford
- Sambrook J., Gething M. J. (1989) Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342, 224-5
- Sanger F., Nicklen S., Coulson R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry* 74, 5463-7

- Sass G. L., Henikoff S. (1998) Comparative analysis of position-effect variegation mutations in *Drosophila melanogaster* delineates the targets of modifiers. *Genetics* 148, 733-41
- Sass G. L., Henikoff S. (1999) Pairing-dependent mislocalization of a *Drosophila brown* gene reporter to a heterochromatic environment. *Genetics* 152, 595-604
- Saunders W. S., Chue C., Goebel M., Craig C., Clark R. F., Powers J. A., Eissenberg J. C., Elgin S. C., Rothfield N. F., Earnshaw W. C. (1993) Molecular cloning of a human homologue of *Drosophila* heterochromatin protein HP1 using anti-centromere autoantibodies with anti-chromatin specificity. *J Cell Sci* 104, 573-82
- Savary S., Denizot F., Luciani M., Mattei M., Chimini G. (1996) Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to *Drosophila white* gene. *Mamm. Genome* 7, 673-6
- Scavarda N. J., Hartl D. L. (1984) Interspecific DNA transformation in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 7515-9
- Schaefer J., Schmidt E. R. (1981) Different repetition frequencies of a 120 base-pair DNA-element and its arrangement in *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. *Chromosoma* 84, 61-6
- Scheid O. M., Paszkowski J., Potrykus J. (1991) Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 228, 104-12
- Schmidt E. R. (1981) The development of a 120 basepair repetitive DNA sequence in *Chironomus thummi* is correlated to the duplication of defined chromosomal segments. *FEBS letters* 129, 21-4
- Schmidt E. R. (1984) Clustered and interspersed repetitive DNA sequence family of *Chironomus*. *J Mol Biol* 178, 1-15
- Schmidt E. R. (1992) Multicolor in-situ-hybridisation - a helpful technique for precise gene localisation. *Scientific and technical information* 10, 80-4
- Schmidt E. R., Godwin E. A. (1983) The nucleotide sequence of an unusual non-transcribed spacer and its ancestor in the rDNA in *Chironomus thummi*. *EMBO J* 2, 1177-83
- Schmidt E. R., Godwin E. A., Keyl H. G., Israelewski N. (1982) Cloning and analysis of ribosomal DNA of *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. *Chromosoma* 87, 389-407
- Schmidt E. R., Keyl H.-G., Hankeln T. (1988) In situ localization of two haemoglobin gene clusters in the chromosomes of 13 species of *Chironomus*. *Chromosoma* 96, 353-59
- Schmidt E. R., Vistorin G., Keyl H. G. (1980) An AT-rich DNA component in the genomes of *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. *Chromosoma (Berlin)* 76, 35-45
- Shopland L. S., Hirayoshi K., Fernandes M., Lis J. T. (1995) HSF access to heat shock elements in vivo depends critically on promoter architecture defined by GAGA factor, TFIID, and RNA polymerase II binding sites. *Genes Dev* 9, 2756-69
- Shopland L. S., Lis J. T. (1996) HSF recruitment and loss at most *Drosophila* heat shock loci is coordinated and depends on proximal promoter sequences. *Chromosoma* 105, 158-71

- Shuey D. J., Parker C. S. (1986a) Bending of promoter DNA on binding of heat shock transcription factor. *Nature* 323, 459-61
- Shuey D. J., Parker C. S. (1986b) Binding of *Drosophila* heat-shock gene transcription factor to the hsp 70 promoter. Evidence for symmetric and dynamic interactions. *J Biol Chem.* 261, 7934-40.
- Simon J. A., Lis J. T. (1987) A germline transformation analysis reveals flexibility in the organization of heat shock consensus elements. *Nucl Acids Res* 15, 2971-88
- Sinden R. R., Zheng G. X., Brankamp R. G., Allen K. N. (1991) On the deletion of inverted repeated DNA in *Escherichia coli*, effects of length, thermal stability, and cruciform formation in vivo. *Genetics* 129, 991-1005
- Singer M. F. (1982) Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int Rev Cytol* 76, 67-112
- Singer M. F. (1982) SINEs and LINEs: Highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* 28, 433-4
- Singer M. S., Kahana A., Wolf A. J., Meisinger L. L., Peterson S. E., Goggin C., Mahowald M., Gottschling D. E. (1998) Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 613-32
- Singh L., Purdom J.F., Jones K.W. (1977) Effect of denaturing agents on the detectability of specific DNA sequences of various base compositions by in situ hybridization. *Chromosoma* 60, 377-89
- Singh P. B., Miller J. R., Pearce J., Kothary R., Burton R. D., Paro R., James T. C., Gaunt S. J. (1991) A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucl Acids Res* 19, 789-94
- Smith G. P. (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science* 191, 528-35
- Smith G. R. (1989) Homologous recombination in *E. coli*, multiple pathways for multiple reasons. *Cell* 58, 807-9
- Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-17
- Spradling A. C. (1986) P-element-mediated transformation. In Roberts D. B. (Ed.) *Drosophila*, a practical approach. IRL Press, Washington, 175-197
- Spradling A. C., Rubin G. M. (1981) *Drosophila* genome organization, conserved and dynamic aspects. *Annu Rev Genet* 15, 219-64
- Spradling A. C., Rubin G. M. (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-7
- Stambuk S., Radman M. (1998) Mechanism and control of interspecies recombination in *Escherichia coli*. I. Mismatch repair, methylation, recombination and replication functions. *Genetics* 150, 533-42
- Steiner N. C., Hahnenberger K. M., Clark L. (1993) Centromeres of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* are highly variable genetic loci. *Mol Cell Biol* 13, 4578-87

- Stewart B., Merriam J. (1978) Dosage compensation. In Ashburner M., Wright T., R., F. (Ed.) The genetics and biology of *Drosophila*. Vol. 2d Academic Press, London, 107-137
- Stewart S. E., Roeder G. S. (1989) Transcription by RNA polymerase I stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 9, 3464-72
- Streisinger G., Okada Y., Emrich J., Newton J., Tsugita A., Terzaghi E., Inouye M. (1966) Frameshift mutations and the genetic code. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 31, 77-84
- Struhl K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. Genes Dev 12, 599-606
- Sullivan K. F., Glass C. A. (1991) CENP-B is a highly conserved mammalian centromere protein with homology to the helix-loop-helix family of proteins. Chromosoma 100, 360-70
- Sun X., Wahlstrom J., Karpen G. (1997) Molecular structure of a functional *Drosophila* centromere. Cell 91, 1007-19
- Sun Y. H., Tsai C. J., Green M. M., Chao J. L., Yu C. T., Jaw T. J., Yeh J. Y., Bolshakov V. N. (1995) White as a reporter gene to detect transcriptional silencers specifying position-specific gene expression during *Drosophila melanogaster* eye development. Genetics 141, 1075-86
- Sutherland G. R., Richards R. I. (1995) Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. Proc Natl Acad Sci USA 92, 3636-41
- Talbert P. B., LeCiel C. D., Henikoff S. (1994) Modification of the *Drosophila* heterochromatic mutation *brown-Dominant* by linkage alterations. Genetics 136, 559-71
- Tang H., Sun X., Reinberg D., Ebright R. H. (1996) Protein-protein interactions in eukaryotic transcription initiation, structure of the preinitiation complex. Proc Natl Acad Sci USA 93, 1119-24
- Tartof K. D., Bishop C., Jones M., Hobbs C. A., Locke J. (1989) Towards an understanding of position effect variegation. Dev Genet 10, 162-76
- Tartof K. D., Hobbs C., Jones M. (1984) A structural basis for variegating position effects. Cell 37, 869-78
- Tautz D., Renz M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucl Acids Res 12, 4127-38
- Thomas B. J., Rothstein R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. Cell 56, 619-30
- Thompson-Stewart D., Karpen G. H., Spradling A. C. (1994) A transposable element can drive the concerted evolution of tandemly repetitious DNA. Proc Natl Acad Sci USA 91, 9042-6
- Trifonov E. N. (1985) Curved DNA. CRC Crit Rev Biochem 19, 89-106
- Trifonov E. N., Sussman J. L. (1980) The pitch of chromatin DNA is reflected in its nucleotide sequence. Proc Natl Acad Sci USA 77, 3816-20
- Trinh T. Q., Sinden R. R. (1991) Preferential DNA secondary structure mutagenesis in the lagging strand of replication in *E. coli*. Nature 352, 544-7

- Trinh T. Q., Sinden R. R. (1993) The influence of primary and secondary DNA structure in deletion and duplication between direct repeats in *Escherichia coli*. *Genetics* 134, 409-22
- Tsukiyama T., Becker P. B., Wu C. (1994) ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* 367, 525-32
- Tulin A. V., Kogan G. L., Filipp D., Balakireva M. D., Gvozdev V. A. (1997) Heterochromatic Stellate gene cluster in *Drosophila melanogaster*, structure and molecular evolution. *Genetics* 146, 253-62
- Tyler-Smith C., Oakey R. J., Larin Z., Fisher R. B., Crocker M., Affara N. A., Ferguson-Smith M. A., Muenke M., Zuffardi O., Jobling M. A. (1993) Localization of DNA sequences required for human centromere function through an analysis of rearranged Y chromosomes. *Nature Genet* 5, 368-75
- Vazquez J., Schedl P. (1994) Sequences required for enhancer blocking activity of scs are located within two nuclease-hypersensitive regions. *EMBO J* 13, 5984-93
- Vef O. (1991) Insertionsmutagenese des Tumor-Suppressor-gens *benign (2) glonial cell neoplasm* von *Drosophila melanogaster* mittels des P-lacZ-W-Vektors. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Vef O. (1999) Charakterisierung von *matzerath (maz)*, einem neuen Gen von *Drosophila melanogaster*, dessen Ausfall zu einem Entwicklungsstopp führt. Diss., Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Verrijzer C. P., Chen J. L., Yokomori K., Tjian R. (1995) Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell* 81, 1115-25
- Vogt P. (1990) Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved "chromatin folding code". *Hum Genet* 84, 301-36
- Wakimoto B. T. (1998) Beyond the nucleosome, epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell* 93, 321-4
- Wakimoto B. T., Hearn M. G. (1990) The effects of chromosome rearrangements on the expression of heterochromatic genes in chromosome 2L of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 125, 141-54
- Wallrath L. L., Guntur V. P., Rosman L. E., Elgin S. C. (1996) DNA representation of variegating heterochromatic P-element inserts in diploid and polytene tissues of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 104, 519-27
- Warburton P. E., Willard H. F. (1995) Interhomologue sequence variation of alpha satellite DNA from human chromosome 17, evidence for concerted evolution along haplotypic lineages. *J Mol Evol* 41, 1006-15
- Warren S. T. (1996) The expanding world of trinucleotide repeats. *Science* 271, 1374-5
- Waye J. S., England S. B., Willard H. F. (1987) Genomic organization of alpha satellite DNA on human chromosome 7: evidence for two distinct alphoid domains on a single chromosome. *Mol Cell Biol* 7, 349-56

- Waye J. S., Willard H. (1989) Concerted evolution of alpha satellite DNA: Evidence for species specificity and a general lack of sequence conservation among aliphoid sequences of higher primates. *Chromosoma* 98, 273-9
- Weber J. A., Taxman D. J., Lu Q., Gilmour D. S. (1997) Molecular architecture of the Hsp70 promoter after deletion of the TATA box or the upstream regulation region. *Mol Cell Biol* 17, 3799-808
- Weil B. (1999, in Vorbereitung) Funktionale Analyse des *CpY*-Gens aus *Chironomus piger* und des *DmX*-Gens aus *Drosophila melanogaster*. Diss., Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Weiler K. S., Wakimoto B. T. (1995) Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 29, 577-605
- Weiler K. S., Wakimoto B. T. (1998) Chromosome rearrangements induce both variegated and reduced, uniform expression of heterochromatic genes in a development-specific manner. *Genetics* 149, 1451-64
- West S. C. (1992) Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Annu Rev Biochem* 61, 603-40
- Wevrick R., Earnshaw W. C., Howard-Peebles P. N., Willard H. F. (1990) Partial deletion of alpha satellite DNA associated with reduced amounts of the centromere protein CENP-B in mitotically stable human chromosome rearrangement. *Mol Cell Biol* 10, 6374-80
- Wevrick R., Willard H. F. (1989) Long-range organization of tandem arrays of α -satellite DNA at the centromeres of human chromosomes: high-frequency array-length polymorphism and meiotic stability. *Proc Natl Acad Sci* 86, 9394-8
- Wevrick R., Willard V. P., Willard H. F. (1992) Structure of DNA near long tandem arrays of alpha satellite DNA at the centromere of human chromosome 7. *Genomics* 14, 912-23
- Wiens G. R., Sorger P. K. (1998) Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell* 93, 313-6
- Wilkins R. C., Lis J. T. (1997) Dynamics of potentiation and activation, GAGA factor and its role in heat shock gene regulation. *Nucl Acids Res* 25, 3963-8
- Wilkins R. C., Lis J. T. (1998) GAGA factor binding to DNA via a single trinucleotide sequence element. *Nucl Acids Res* 26, 2672-8
- Willard H. F., Waye J. S. (1987) Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. *J Mol Evol* 25, 207-14
- Winterpacht A. (1991) Instabilität tandem-repetitiver Elemente aus *Chironomus thummi* nach Transfektion in *Escherichia coli* und in *Drosophila melanogaster*. Diss., Ruhr-Universität, Bochum
- Wong A. K. C., Biddle F. G., Rattner J. B. (1990a) The chromosomal distribution of the major and minor satellite is not conserved in the genus *Mus*. *Chromosoma* 99, 190-5
- Wong A. K. C., Rattner J. B. (1988) Sequence organisation and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucl Acids Res* 16, 11645-61

- Wong Z., Royle N. J., Jeffreys A. J. (1990b) A novel human DNA polymorphism resulting from transfer of DNA from chromosome 6 to chromosome 16. *Genomics* 7, 222-34
- Wreggett K. A., Hill F., James P. S., Hutchings A., Butcher G. W., Singh P. B. (1994) A mammalian homologue of *Drosophila* heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet* 66, 99-103
- Wu H. Y., Shyy S. H., Wang J. C., Liu L. F. (1988) Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* 53, 433-40
- Wurm F. M., Gwinn K. A., Kingston R. E. (1986) Inducible overexpression of the mouse c-myc protein in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 5414-8
- Wurm F. M., Petropoulos C. J., O'Connor J. V. (1996) Manufacture of proteins based on recombinant chinese hamster ovary cells: Assessment of genetic issues and assurance of consistency and quality. In: Schmidt E. R., Hankeln T. (Ed.) *Transgenic Organisms and Biosafety. Horizontal Gene Transfer, Stability of DNA and Expression of Transgenes*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 283-301
- Xiao H., Lis J. T. (1986) A consensus sequence polymer inhibits in vivo expression of heat shock genes. *Mol Cell Biol* 6, 3200-6
- Xiao H., Lis J. T. (1988) Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science* 239, 1139-42
- Yang C. H., Tomkiel J., Saitoh H., Johnson D. H., Earnshaw W. C. (1996) Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Mol Cell Biol* 16, 3576-86
- Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-19
- Yurov Y. B., Mitkevich S. P., Alexandrov I. A. (1987) Application of cloned satellite DNA sequences to molecular-cytogenetic analysis of constitutive heterochromatin heteromorphism in man. *Hum Genet* 76, 157-64
- Zhang P., Spradling C. (1995) The *Drosophila* salivary gland chromocenter contains highly polytenized subdomains of mitotic heterochromatin. *Genetics* 139, 659-70
- Zimarino V., Wu C. (1987) Induction of sequence-specific binding of *Drosophila* heat shock activator protein without protein synthesis. *Nature* 327, 727-30

7. Anhang

Veröffentlichte Abstrakte

Schrank, R., Hankeln, T., Winterpacht, A., Schmidt, E. R. (1997): Instability of insect satellite DNA in transgenic *Drosophila melanogaster*. Abstract of the VIII International Balbiani Ring Workshop. Hereditas 127: 269-270

Hankeln, T., Winterpacht, A., **Schrank, R.**, Weich, B., Schmidt, E. R. (1996): Instability of tandem-repetitive DNA in *Chironomus* and transgenic *Drosophila*. Abstract of the 7th IMP Spring Conference „Chromosomes“, Wien, S.69