

Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

**Funktionale Analyse des *CpY/DmX*  
Gens aus *Chironomus* und  
*Drosophila melanogaster***

Bernd Weil  
geb. in Rüsselsheim

September 2000



---

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Jahr der mündlichen Prüfung: 2000





# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1 Gen, Phän und Funktion . . . . .	13
1.2 Isolierung von <i>DmX/CpY</i> . . . . .	17
1.3 Organisation des <i>DmX/CpY</i> -Gens . . . . .	20
1.4 Evolutionäre Konservierung des <i>DmX/CpY</i> -Gens . . . . .	23
1.5 DMX/CPY ist ein WD-Repeat Protein . . . . .	24
1.6 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit . . . . .	30
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>31</b>
2.1 Versuchstiere . . . . .	31
2.1.1 <i>Chironomus</i> . . . . .	31
2.1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> . . . . .	31
2.2 Standardmethoden . . . . .	31
2.3 DNA-Präparation . . . . .	33
2.3.1 Isolierung von Phagen-DNA . . . . .	33
2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA . . . . .	33
2.3.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>Chironomus</i> und <i>Drosophila</i> . . . . .	33
2.4 RNA-Präparationen . . . . .	34
2.4.1 RNA-Isolierung mit Guanidinthiocyanat . . . . .	34
2.4.2 RNA-Isolierung nach Holmes und Bonner (1985), verändert nach Sass (1990) . . . . .	34
2.5 PCR-Techniken . . . . .	34
2.5.1 Standard-PCR . . . . .	34
2.5.2 X-large PCR . . . . .	35
2.5.3 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) . . . . .	36
2.6 Verwendete Plasmidvektoren . . . . .	36
2.7 Klonierung in Plasmid-Vektoren . . . . .	36
2.8 Transformation von <i>E. coli</i> . . . . .	39
2.9 DNA-Sequenzierung . . . . .	40

2.10	Markierung von DNA . . . . .	40
2.11	Hybridisierungstechniken . . . . .	41
2.11.1	Southern-Hybridisierung . . . . .	41
2.11.2	Koloniefilter-Hybridisierung . . . . .	41
2.11.3	Northern-Hybridisierungen . . . . .	42
2.11.4	„whole mount“ in situ-Hybridisierungen . . . . .	42
2.11.5	In situ-Hybridisierung an Polytänchromosomen . . . . .	43
2.12	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	43
2.13	Keimbahntransformation von <i>D. melanogaster</i> . . . . .	43
2.14	Puffer und Lösungen . . . . .	44
2.15	<i>E. coli</i> -Stämme: . . . . .	48
2.16	Materialien . . . . .	49
2.17	Bezugsquellen . . . . .	49
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1	Chromosomale Lokalisierung von <i>DmX</i> . . . . .	51
3.2	Transkriptionsanalyse von <i>DmX/CpY</i> . . . . .	56
3.2.1	Northern-Analyse der <i>DmX</i> -Transkription . . . . .	56
3.2.2	<i>DmX</i> -Transkription während der Embryonalentwicklung . . . . .	56
3.2.3	<i>DmX/CpY</i> in der Oogenese . . . . .	61
3.2.4	<i>CpY</i> und differentielles Spleißen . . . . .	65
3.2.5	Isolierung regulatorischer Bereiche für die Transkription mit Reporter- genen und RT-PCR . . . . .	68
3.3	Der Phänotyp von <i>DmX</i> -Mutanten . . . . .	74
3.4	Antisense-Strategien zur Unterdrückung der <i>DmX</i> -Expression . . . . .	75
3.4.1	Das Hsp70-Antisense-Konstrukt pKB10.1-d-as . . . . .	78
3.4.2	Das <i>GAL4</i> -UAS Antisense-Konstrukt pUABgl-6 . . . . .	79
3.4.3	Das Ribozym-Konstrukt pKBrz600 . . . . .	80
3.5	Transkriptionsanalyse von <i>DmSPX</i> . . . . .	82
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
4.1	<i>DmX</i> ist ein neuartiges X-chromosomales Gen . . . . .	87
4.2	Bei <i>DmX</i> konnten keine geschlechtsspezifischen Transkriptionsunterschiede festgestellt werden . . . . .	90
4.3	Lokalisation und strukturelle Besonderheiten von <i>CpY</i> . . . . .	91
4.4	Das Transkriptionsprofil von <i>DmX</i> und <i>CpY</i> . . . . .	93
4.4.1	<i>DmX</i> in der Oogenese . . . . .	94
4.4.2	<i>DmX</i> in der Embryogenese . . . . .	95
4.5	Inhibierung der <i>DmX</i> -Expression . . . . .	97
4.5.1	Inhibierung der Genexpression durch Ribozyme . . . . .	97
4.5.2	Inhibierung der Genexpression durch Antisense-RNA . . . . .	98
4.6	Die regulatorischen Bereiche von <i>DmX</i> , <i>CpY</i> und <i>DmSPX</i> . . . . .	100

4.7	DMX/CPY besitzt wahrscheinlich zwei WD-Propeller . . . . .	102
4.8	Rekonstruktion des C-terminalen WD-Propellers von CPY . . . . .	107
4.9	DMX/CPY könnte beim zellulären Transport eine Rolle spielen . . . . .	107
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>115</b>
	<b>Anhang</b>	<b>135</b>
	<b>Veröffentlichungen und Abstracts</b>	<b>143</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Das männchenspezifische Cla-Element Cluster in <i>C. thummi</i> . . . . .	19
1.2	Strukturvergleich <i>DmX</i> , <i>CpY</i> und <i>F54E4.1</i> . . . . .	22
1.3	Alignment von DMX, CPY und F54E4.1 . . . . .	23
1.4	Konsensus-Struktur des WD-Motivs . . . . .	26
1.5	3D-Struktur von $G_{i\alpha 1}\beta_1\gamma_2$ . . . . .	28
1.6	Verteilung von WD-Repeats auf DMX . . . . .	29
2.1	pUC18 . . . . .	36
2.2	pKB256 . . . . .	37
2.3	pUAST . . . . .	37
2.4	pwATG-lac1 . . . . .	38
2.5	CaSpeR-AUG- $\beta$ gal . . . . .	38
2.6	pUC $\pi\Delta 2-3$ . . . . .	39
3.1	Lokalisation von <i>DmX</i> auf dem X-Chromosom . . . . .	52
3.2	Übersicht über die zur Lokalisierung von <i>DmX</i> verwendeten genetischen Aberrationen und Gene . . . . .	52
3.3	<i>DmX</i> und Tp(1;2)rb <sup>+</sup> 71g . . . . .	54
3.4	<i>DmX</i> und Df(1)C149 . . . . .	55
3.5	<i>DmX</i> und Df(1)N73 . . . . .	55
3.6	Northern-Analyse von <i>DmX</i> . . . . .	57
3.7	embryonale <i>DmX</i> -Transkription . . . . .	59
3.8	<i>DmX</i> im embryonalen ZNS . . . . .	61
3.9	<i>DmX</i> -Transkription im embryonalen Kopfbereich . . . . .	62
3.10	<i>DmX</i> -Transkription im Ovar . . . . .	63
3.11	Detailaufnahme von <i>DmX</i> -Transkripten in einer Oozyte . . . . .	64
3.12	<i>CpY</i> -Transkription im Ovar . . . . .	65
3.13	Detailaufnahme von <i>CpY</i> -Transkripten in einer Oozyte . . . . .	66
3.14	Das differentiell gespleißte Exon 8 des <i>CpY</i> -Gens . . . . .	67
3.15	Vergleich der differentiell gespleißten Exons 4 und 8 . . . . .	68
3.16	Transkription von pCosPer $\Delta$ mX-2 . . . . .	70
3.17	Reporter-gen-Vektor pC-GFP . . . . .	71
3.18	Reporter-gen-Konstrukt pC-GFP-y23x42 . . . . .	72
3.19	Phänotyp der <i>DmX</i> -Mutante . . . . .	76

---

3.20	pCosPerDmX-13, pCosPerΔmX-2, und pCosPerΔmX-EGFP, <i>Drosophila</i> -Transformations-Vektoren . . . . .	77
3.21	Der Antisense-Vektor pKB10.1-d-as . . . . .	78
3.22	Der Transformationsvektor pUABgl-6 . . . . .	79
3.23	Prinzip eines <i>DmX</i> -Ribozyms . . . . .	81
3.24	Der Ribozym-Transformationsvektor pKBrz600 . . . . .	82
3.25	Northern Analyse von <i>DmSPX</i> . . . . .	83
3.26	Embryonales Transkriptionsmuster von <i>DmSPX</i> . . . . .	85
4.1	Expressionsmuster der Gene <i>l(1)G0287</i> und <i>l(1)G0063</i> . . . . .	90
4.2	Position des ersten Introns in <i>C. piger</i> , <i>D. melanogaster</i> und <i>C. elegans</i> .	101
4.3	Vergleich der SMART-Ergebnisse . . . . .	103
4.4	Alignment der letzten sechs WD-Einheiten von CPY, DMX und F54E4.1	108
4.5	Dreidimensionale Rekonstruktion der C-terminalen WD-Einheiten von CPY . . . . .	109
4.6	Das Endozytose Netzwerk . . . . .	110
4.7	Häufigkeit des Vorkommens einzelner Aminosäuren an den einzelnen Positionen des WD-Repeats . . . . .	137
4.8	Die Hauptereignisse der <i>D. melanogaster</i> -Embryonalentwicklung nach Campos-Ortega und Hartenstein (1985) . . . . .	139
4.9	Maßstabsgetreue Karte von <i>DmSPX</i> , dem Intergenbereich, sowie dem ersten Exon und Intron von <i>DmX</i> . . . . .	141
4.10	Genetischer Code, sowie Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren .	142

# Tabellenverzeichnis

1.1	Homologe zu <i>DmX</i> und <i>CpY</i> . . . . .	25
2.1	Verwendete <i>D. melanogaster</i> -Stämme . . . . .	32
2.2	Standard PCR Bedingungen . . . . .	35
2.3	Parameter für X-large PCR . . . . .	35
2.4	Parameter für DNA-Sequenzierung . . . . .	40
3.1	Ergebnis der Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i> mit dem Vektor pC-GFP-y23x42 . . . . .	72
3.2	Ergebnis der Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i> mit dem Vektor pCosPerΔmX-EGFP . . . . .	73
3.3	Ergebnis der Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i> mit dem Vektor pCosPerDmX-13 . . . . .	74
3.4	Ergebnis der Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i> mit dem Plasmid pKB10.1-d-as . . . . .	78
3.5	Ergebnis der Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i> mit dem Plasmid pUABgl-6 . . . . .	80
3.6	Ergebnis der Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i> mit dem Ribozym- Konstrukt pKBrz600 . . . . .	81
4.1	bekannte Mutationen in 5D5–5E1 . . . . .	89
4.2	Strukturanalyse mit Computerprogrammen . . . . .	104
4.3	Sequenzen der verwendeten Primer . . . . .	138

# Abkürzungen

3D	dreidimensional
a. bidest	aqua bidestillata
AMPPD	3-(2'-Spiroadamantan)-4-methoxy-4-(3'-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetan
AP	alkalische Phosphatase
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BMERC	„Biomolecular Research Center in Boston“
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
<i>CpY</i>	„ <i>C. thummi</i> Y chromosomales Gene“
d. h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
<i>DmSPX</i>	„ <i>D. melanogaster</i> Splicosome associated Protein gene on the X-chromosome“
<i>DmX</i>	„ <i>D. melanogaster</i> X chromosomal Gene“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E-Puffer	Elektrophoresepuffer
E-Wert	„expected value“
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGFP	„Enhanced Green Fluorescent Protein“
EGTA	Ethylenglykotetraessigsäure
EMBL	„European Molecular Biology Laboratories“
EMS	„ethyl methylsulfonate“
et al.	und andere (et altera)
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAP-DH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
ges.	gesättigt
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert

M	dominanter Determinator für das männliche Geschlecht
MOPS	3(N-morpholin)PropanSulfonsäure
NBT	„nitroblue tetrazolium“
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
P-Element	„Paternally (contributed)“-Element
PBS	„Phosphate-buffered Saline“
PBT	„Phosphate-buffered Saline, Tween 20“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PM	Präinkubationsmedium
PSA	„Protein Sequence Analysis“
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	„RNA interference“
RT-PCR	Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion
SDS	„Sodiumdodecylsulfate“
SM	Suspensionsmedium
SMART	„Simple Modular Architecture Research Tool“
SSC	Standard-Saline-Citrat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TELT	Tris-EDTA-Lithiumchlorid-Triton
TES	Tris-EDTA-SDS
TM	„Trademark“
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
UAS	„upstream activator sequence“
U	„unit“
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
VE	voll entsalzt
Vol.	Volumen
WD-Repeat	Tryptophan-Asparaginsäure Wiederholungseinheit
X-Gal	5-Brom-4-chloro-3-Indolyl- $\beta$ -Galaktosid
X-Phosphat	5-Brom-4-chloro-3-Indolyl- $\beta$ -Phosphat
z. B.	zum Beispiel



# 1 Einleitung

## 1.1 Gen, Phän und Funktion

Über eine lange Zeit erfolgte in der Genetik die Analyse von Genen über die Erzeugung oder Entdeckung einer Mutante mit einem interessanten Phänotyp. Der Eingrenzung und Isolierung des zugrundeliegenden Gens folgte die – oft jahrzehntelange – genetische und biochemische Erforschung der Genstruktur und deren Funktion. Durch die rapide Entwicklung moderner molekulargenetischer Techniken kann dieser Weg heute in einzelnen Abschnitten beschleunigt und sogar in umgekehrter Richtung begangen werden. Dieses im Vergleich zur klassischen Genetik „umgedrehte“ Vorgehen, bei dem man von der Identifizierung und Isolierung von Genen ausgeht und dann Funktion und Phänotyp bestimmt, wird mit dem Begriff „reverse genetics“ bezeichnet (van Ommen und Pearson, 1989; Plasterk, 1992; Kaiser, 1990). Reverse Genetik gewann in letzter Zeit besonders durch die Identifizierung neuer Gene mittels „comparative sequencing“, durch die Entwicklung bioinformatischer Algorithmen und Datenbanken, Transkriptionsanalysen und eukaryotischer Transformationssysteme an Bedeutung.

Mittlerweile konnten in den großen Genomprojekten die eukaryotischen Genome von *Sacharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* komplett sequenziert werden (Mewes et al., 1997; Wilson, 1999; Adams et al., 2000). Mit dem exponentiellen Zuwachs an DNA-Sequenzinformationen durch die Sequenzierprojekte ist nicht nur die Identifizierung neuartiger Gene sondern auch das Auffinden homologer oder ähnlicher Genprodukte, deren Funktion in anderen Organismen unter Umständen schon charakterisiert ist, ermöglicht worden („comparative sequencing“). Darüber hinaus hat auch die Formulierung von Konsensus-Sequenzen für funktionell wichtige Domänen der Genprodukte aufgrund ihrer differentiellen evolutionären Konservierung verschiedener Aminosäuren erhebliche Fortschritte aufzuweisen. So wird die in silico-Analyse unbekannter Sequenzen immer mehr zur Informationsquelle und Richtungsweiser für die experimentelle Planung. Die zunehmend genauere Formulierung von Algorithmen für definierte Domänen erhöht deren Treffergenauigkeit, so daß eine Computer-Analyse immer öfter die Identifikation bestimmter Motive und somit die Einordnung eines unbekanntes Genprodukts in eine bestimmte Familie erlaubt. Die funktionelle Diversität entsteht bei den Proteinen – wie beim LEGO<sup>TM</sup>-Spielzeug (Smith, 1998) – durch die kombinatorische Vielfalt einer kleinen Anzahl von Bausteinen. Dabei sind diese Strukturen weniger von der absoluten Aminosäuresequenz determiniert als von der Aminosäurekomposition. Das heißt: Ein Sequenzmotiv, das eine definierte Domänenstruktur determiniert, kann an vielen Positionen mehr oder weniger variieren, ohne daß die Domänenstruktur davon

beeinflusst wird. Ein gutes Beispiel dafür sind die WD-Repeat Proteine, auf welche in Kapitel 1.5 näher eingegangen wird. Die Bioinformatik verfügt zur Zeit noch nicht über genügend Daten, um bei einer Aminosäuresequenz-Homologie von weniger als 25% zu Proteinen, deren Struktur bereits durch eine Röntgenstrukturanalyse bestimmt wurde, mehr als eine wurstförmige Struktur vorherzusagen. Jedoch ist in denjenigen Fällen, in denen Algorithmen verwendet werden, welche Homologie-Suche, Vergleich der Ähnlichkeit der Aminosäure-Zusammensetzung und einen Vergleich mit bereits bekannten Strukturen berücksichtigen, oft schon eine grundlegende Strukturanalyse möglich.

Daß der Zuwachs an Sequenzinformationen wiederum die Sequenzanalyse verwandter Genomabschnitte beschleunigt, wird am deutlichsten an der Entwicklung der DNA-Chip-Technologie (Schena et al., 1998; Brown und Botstein, 1999), mit der es bald möglich sein wird, durch einen einzigen Hybridisierungsvorgang alle Sequenzunterschiede zwischen einem sequenzierten Genom und einem nichtsequenzierten, nahe verwandten Genom festzustellen (Hacia, 1999). Dies kommt faktisch einer kompletten Sequenzierung des zweiten Genoms gleich.

Ein weiterer zentraler Punkt bei der Funktionsanalyse von Genen ist die Lokalisierung des Genprodukts im Organismus durch Transkriptions- und Expressionsanalysen. Hier können in vielen Fällen bereits Schlüsse auf die Funktion gezogen werden, ob ein Gen z. B. für die Embryonalentwicklung wichtig ist oder ob es z. B. ein maternales Effekten darstellt. Eine ubiquitäre Expression würde auf eine grundlegende zelluläre Funktion hinweisen, eine zeitlich begrenzte Expression in definierten Arealen eher auf eine Funktion in spezifischen Differenzierungsvorgängen. Für die Lokalisation von Genprodukten stehen eine Reihe von Techniken zur Verfügung: Bei der „whole mount“ in situ Hybridisierung (Polak und McGee, 1991) wird die native RNA eines Gens direkt im Gewebe durch Hybridisierung mit einer markierten komplementären RNA oder DNA nachgewiesen. Falls das zu untersuchende Gen als Protein exprimiert wird, können auch spezifische Antikörper verwendet werden, um dieses Protein in situ nachzuweisen.

Die Möglichkeit, transgene Organismen zu erzeugen, ebnete einen weiteren Weg um Genprodukte zu lokalisieren. In einem Vektorkonstrukt kann der regulatorische 5'-Bereich des zu untersuchenden Gens mit einem sogenannten Reporter gen fusioniert und dieses Konstrukt durch Keimbahntransformation in den Organismus eingebracht werden. Das Reporter gen wird in diesem Organismus so reguliert und exprimiert wie das Gen, zu dem die regulatorische Region natürlicherweise gehört. Das Reporter gen jedoch zeichnet sich dadurch aus, daß sein Produkt leicht nachweisbar ist, indem es z. B. für ein Enzym kodiert, das in einer Farbreaktion ein Substrat umsetzt oder als Protein direkt nachweisbar ist (Alam und Cook, 1990). Letzteres ist z. B. beim grün fluoreszierenden Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* der Fall, welches unter UV-Bestrahlung grün fluoresziert und in vivo direkt beobachtet werden kann (Chalfie und Rain, 1998).

Die Möglichkeit, einen Organismus genetisch zu transformieren, ist eines der mächtigsten Werkzeuge um Erkenntnisse über die Funktion eines Gens zu erhalten. Bei *D. melanogaster* wurde die Keimbahntransformation mit P-Elementen durch Rubin und Spradling (1982) etabliert. Dabei wird der zu transformierende DNA-Abschnitt in einen bak-

teriellen Vektor kloniert, der bereits ein funktionstüchtiges, in *Drosophila* exprimierbares Markergen, sowie Bereiche aus der 5'- und 3'-Region eines P-Elementes enthält. Der Abschnitt zwischen 5'- und 3'-Bereich des P-Elements kann in das Genom der Keimzellen integrieren und zu transgenen Tieren in der Nachfolgeneration führen. Das Markergen wird in transgenen Fliegen exprimiert und dient dazu, transformierte von nicht-transformierten Fliegen unterscheiden zu können. Als besonders geeignet hat sich hierfür das *white*-Gen erwiesen, das bei Injektion des Konstrukts in *white*<sup>-</sup>-Embryonen bei erfolgreicher Transformation zu einem rotäugigen Phänotyp in den Nachkommen führt. Die ebenfalls im Vektor enthaltenen P-Element Bereiche enthalten die für die Integration des Konstrukts in das Genom benötigten „inverted repeats“, jedoch nicht die für die Transposase kodierende Region. Diese muß für eine erfolgreiche Transformation durch ein Helferplasmid zusätzlich beigesteuert werden. Dieses Helferplasmid kodiert für die Transposase, ihm fehlen jedoch die für die Integration benötigten „inverted repeats“. Somit ist gewährleistet, daß nur das Konstrukt und nicht das Helferplasmid in das *Drosophila*-Genom integrieren kann. Da das Helferplasmid nicht repliziert, geht es verloren und einmal integrierte Konstrukte können aufgrund des Fehlens der Transposase nicht mehr springen. Eine stabile Transformante ist entstanden. Die Keimbahntransformation eröffnet außer mit Hilfe der bereits erwähnten Reportergene eine Menge weiterer Möglichkeiten, Gene zu identifizieren und zu manipulieren. Mit der von Brand und Perrimon (1993) entwickelten „enhancer trap“-Methode können gezielt Gene aufgrund ihres Expressionsmusters isoliert werden. Dabei wird ein *GAL4*-Gen – ein Transkriptionsfaktor aus Hefe, der an die sogenannte „upstream activator sequence“ (UAS)-Region bindet – durch P-Element-Keimbahntransformation in *Drosophila* gebracht. Durch Einkreuzen eines Stammes, welcher die P-Element Transposase exprimiert, kann dieses Konstrukt zur erneuten Transposition angeregt werden und dadurch an alle möglichen Stellen auf den Chromosomen springen. Dabei gerät das *GAL4*-Gen je nach Integrationsort unter die Kontrolle verschiedener gewebs- oder entwicklungspezifischer Enhancer. Kreuzt man nun einen Stamm ein, der ein UAS-gesteuertes Reportergen enthält, wird dieses Reportergen über die Wechselwirkung von der UAS mit *GAL4* von dem entsprechenden Enhancer gesteuert. Durch Isolierung derjenigen integrierten *GAL4*-Konstrukte aus dem *Drosophila*-Genom, die ein interessantes Expressionsmuster des Reportergens aufweisen, zusammen mit flankierenden genomischen Sequenzen, ist ein molekularer Zugang zur Analyse dieser Gene geschaffen.

Ferner ist es möglich, mit Hilfe der Keimbahntransformation DNA-Abschnitte in das Genom einzubringen, die mit dem zu untersuchenden Gen in ihrer Wirkung interferieren. Ziel solcher Experimente ist es, das Gen soweit wie möglich auszuschalten. In manchen Organismen, wie z. B. der Maus, kann direkt über homologe Rekombination des nativen Gens mit einem Konstrukt, welches eine nicht funktionierende Genkopie enthält, eine transgene Nullmutante erzeugt werden (Robertson, 1991). In anderen Organismen, wie z. B. *Drosophila* ist dies nicht ohne weiteres möglich. Da hier der Austausch von Genen mit episomalen DNA-Abschnitten durch homologe Rekombination nicht so einfach möglich ist, muß die Interferenz mit dem nativen Gen in „trans“ erfolgen. In *Drosophila* kann dies über „antisense-RNA“ (Rosenberg et al., 1985), Ribozyme (Heinrich et al., 1993)

oder doppelsträngige homologe RNA (RNAi, Kennerdell und Carthew (1998)) erfolgen. Die molekularen Ursachen der inhibitorischen Wirkung obengenannter Strategien sind zum Teil ungeklärt. Im Falle der „antisense-RNA“ wird eine Anlagerung an die native RNA zu einem Doppelstrang vermutet, was zu einer Inhibition der Translation führt. Ribozyme sind katalytisch wirksame RNA-Moleküle, die eine katalytische Domäne enthalten, welche von kurzen „antisense“-Abschnitten zu dem zu untersuchenden Gen flankiert sind. Durch diese bindet das Ribozym spezifisch an eine native RNA um sie zu schneiden. Solche Methoden werden dann angewendet, wenn der Phänotyp nicht oder unzureichend bekannt ist, also keine befriedigende Anzahl mutanter Allele bzw. überhaupt keine Mutante zur Verfügung steht.

Eine Keimbahntransformation mit einem sogenannten „Rettungsvektor“ kann der Identifizierung von Mutanten des betreffenden Gens dienen: Gelingt es nämlich, ein Gen, dessen Phänotyp völlig unbekannt ist, vollständig mit seinen regulatorischen Bereichen transgen an einem Ort im Genom zu integrieren, der ungleich seinem Herkunftsort ist, kann diese Kopie das inaktive Gen einer entsprechende Mutante komplementieren, und damit den entsprechenden Phänotyp „retten“. Durch Kreuzung mit verschiedenen Stämmen mit Mutationen im Bereich des zu untersuchenden Gens, kann durch diese Rettung die entsprechende Mutante und der Phänotyp identifiziert werden. In weitergehenden Analysen wird man versuchen, die biochemische Grundlage dieses Phänotyps zu charakterisieren. Dabei geht es vor allem darum, mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, eine Einordnung des Genprodukts in eine bestimmte Klasse bekannter Proteine oder RNAs vorzunehmen und aufgrund der tatsächlich bestimmten oder abgeleiteten Struktur auf funktionelle Eigenschaften zu schließen. Die Identifizierung möglicher Interaktionspartner geschieht üblicherweise *in vitro* über die Kopräzipitation durch Antikörper oder das „yeast-hybrid“-System (Vidal und Legrain, 1999). *In vivo* wird man sich die unter Umständen veränderte Genexpression von anderen Genen in den Mutanten anschauen und eine Modifizierung des Phänotyps in entsprechenden Doppelmutanten oder bei ektopischer Expression erwarten. Oft werden Interaktionspartner dadurch entdeckt, daß diese bei einer Immunpräzipitation eines bestimmten Proteins mit einem spezifischen Antikörper mitgefällt werden (kopräzipitieren), weil sie an das Protein, für das der Antikörper spezifisch ist, binden. Diese interagierenden Proteine können durch Protein-Mikrosequenzierung (Ingliš, 1991) identifiziert werden. Sollte die resultierende Proteinsequenz noch unbekannt sein, kann durch PCR mit degenerierten Primern das Gen des Interaktionspartners identifiziert, isoliert und näher analysiert werden. Das Prinzip des „yeast-2-hybrid“-Systems (Fields und Sternglanz, 1994) beruht auf der Verteilung der funktionalen Domänen eines Transkriptionsfaktors in eine DNA-bindende und eine aktivierende Domäne. Der eine Teil des Transkriptionsfaktors ist mit dem Protein assoziiert, dessen Interaktionspartner man isolieren will, der andere ist Teil einer cDNA-Expressionsbibliothek. Eine Aktivierung des Reportergens findet statt, wenn beide Domänen des Transkriptionsfaktors über die Wechselwirkung ihrer Fusionsanteile zusammenkommen. Von diesem System gibt es zahlreiche Modifikationen, die bei Vidal und Legrain (1999) beschrieben sind.

Weitere Möglichkeiten, Veränderungen der Genexpression in einer Mutante zu charakterisieren, bieten die zweidimensionale Gelelektrophorese (Celis und Gromov, 1999) und der RNA- bzw. cDNA-Chip (Zweiger, 1999; Bowtell, 1999; Duggan et al., 1999). Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese wird die gleiche Gesamtproteinmenge z. B. von Wildtyp und Mutante differentiell markiert, gemischt und in der ersten und zweiten Dimension nach verschiedenen Parametern aufgetrennt. Man erhält ein komplexes Muster von Proteinsignalen, welche bei gleicher Proteinmenge aus jedem Organismus beide Markierungen in gleicher Intensität aufweisen. Ist jedoch das eine organismusspezifische Signal an einer Stelle schwächer als das aus dem Vergleichsorganismus, oder fehlt gänzlich, kann daraus geschlossen werden, das dieses Protein mit der Mutation in einem Zusammenhang steht. Der Nachweis differenzieller Transkription mit einem RNA-Chip funktioniert prinzipiell nach dem gleichen Prinzip. Hier können – durch simultaner Hybridisierung mit den farblich differentiell, jedoch gleichstark markierten Gesamt-cDNAs aus Mutante und Vergleichsorganismus mit auf einem Glasträger fixierten bekannten cDNA-Proben – je nach Farbverschiebung des additiven Signals, Hoch- bzw. Runterregulation einzelner Transkripte detektiert werden.

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Techniken und Möglichkeiten der Funktionsanalyse von Genen wurden in verschiedenen biologischen Systemen etabliert. Aufgrund der unterschiedlichen Erkenntnisse, die für jeden Organismus verfügbar sind und den biologischen Einschränkungen, welche die verschiedenen Systeme in der experimentellen Praxis aufweisen, sind die aufgeführten Strategien zur Funktionsanalyse von Genen nicht universell einsetzbar. So ist z. B. ein „knock out“ eines *Drosophila*-Gens nach dem Vorbild der Maus nur schwer durchführbar (Rong und Golic, 2000), da in *Drosophila*-Männchen keine Rekombination stattfindet (Muller, 1918, 1932). Ein weiteres Hindernis ist die Tatsache, daß nicht für jeden Organismus ein Transformationssystem verfügbar ist.

Hat ein Forscher in der heutigen Zeit das Glück, ein völlig unbekanntes Gen wie z. B. *DmX/CpY* zu entdecken, so wird ihm nicht erspart bleiben, die Grundlagen für den Einstieg in die moderne Funktionsanalyse von Genen zu einem Großteil selbst zu schaffen. Davon handeln die folgenden Kapitel, in denen die von Kraemer und Schmidt (1993) geschaffenen Grundlagen für diese Arbeit erläutert werden.

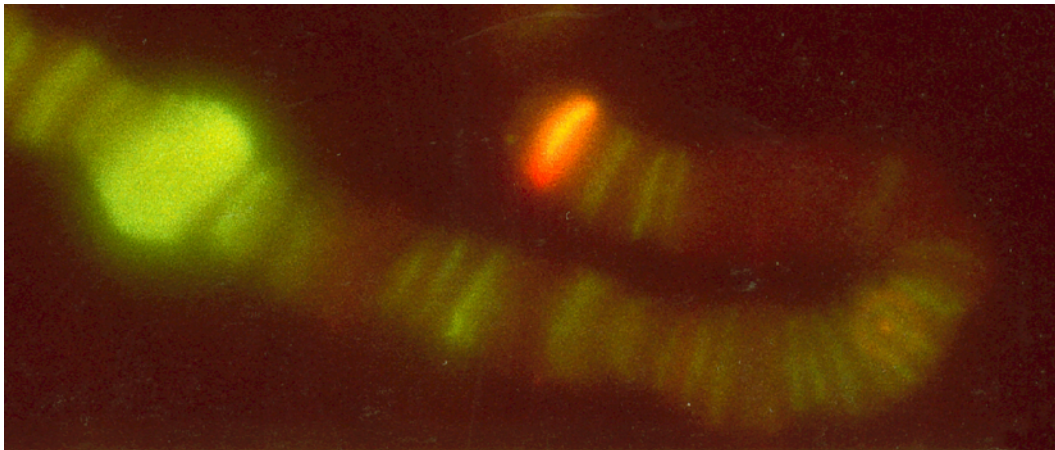
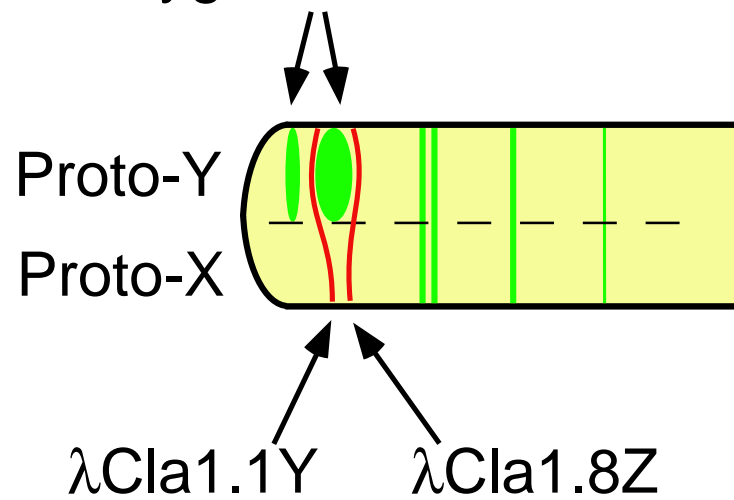
## 1.2 Isolierung von *DmX/CpY*

Die Entdeckung und Isolierung des *DmX/CpY*-Gens ist eng mit der Suche nach dem dominanten männlichen Geschlechtsdeterminator M in Chironomiden verknüpft. Dieser Faktor wurde mit Hilfe von geschlechtsgekoppelten chromosomalen Inversionen, welche diesen Faktor definitionsgemäß enthalten müssen, in einigen *Chironomus*-Spezies lokalisiert (Beermann, 1953, 1955; Acton, 1957; Keyl, 1961, 1962; Rosin und Fischer, 1972; Martin et al., 1980). Dabei konnten in den verschiedenen Spezies auf sechs der sieben Chromosomenarme mögliche Loci für M identifiziert werden. Allein auf Arm E konnte bis jetzt kein möglicher Locus für M gefunden werden. In einigen wenigen Arten ist der

Locus von M mit einer Strukturheterozygotie in Form einer hemizygoten heterochromatischen Bande auf den Polytänchromosomen assoziiert. Dies ist bei *Chironomus australis* (Martin et al., 1980), *Chironomus obtusidens* (Keyl, 1961, 1962) einigen Stämmen von *Chironomus nuditarsis* (Fischer und Tichy, 1980) und *Chironomus thummi* (Hägele und Speier, 1985) der Fall. Da diese Strukturheterozygotien geschlechtsgekoppelt vererbt werden und nur in Männchen vorkommen, müssen die entsprechenden chromosomalen Regionen eng mit M gekoppelt sein oder M enthalten. So war es möglich, die ansonsten homomorphen somatisch gepaarten Chromosomen in Proto-Y und Proto-X zu differenzieren. Bei vergleichenden Untersuchungen an *C. thummi* und *C. piger*, einer Schwesternart von *C. thummi* (Keyl und Strenzke, 1956), konnten Hägele und Speier (1985) sowie Hägele (1986) zeigen, daß diese Strukturheterozygotie per se nicht M darstellt, da diese in *C. piger* fehlt, obwohl die Chromosomen syntän sind und M an homologen Loci liegt. Durch in situ-Hybridisierungen von markierten Cla-Elementen an Speicheldrüsenchromosomen von *C. thummi* (1.1) konnte gezeigt werden, daß die von Hägele und Speier (1985) in *C. thummi* beschriebene männchenspezifische hemizygoten Strukturheterozygotie in der Region D3e1 des Chromosomenarms F Cla-Elemente enthält (Kraemer und Schmidt, 1993). Bei den Cla Elementen handelt es sich um eine Familie hochrepetitiver DNA-Sequenzen, welche in *C. thummi* ca. in  $7 \times 10^5$  Kopien vorhanden sind. Die meisten dieser Elemente finden sich in den Zentromeren der vier Chromosomen, der Rest ist auf über 200 Loci auf alle Chromosomenarme verteilt (Schmidt, 1981, 1984). Die Anzahl der Cla-Elemente ist in der Schwesternart *C. piger* um den Faktor 6 geringer, ihre Lage beschränkt sich im wesentlichen auf die Zentromerregionen. Um Teile der geschlechtsspezifischen Region zu klonieren, wurde eine genomische DNA-Bibliothek von *C. thummi* mit Cla-Elementen als Sonde abgesucht und die hybridisierenden  $\lambda$ -Klone wiederum durch in situ-Hybridisierung an Speicheldrüsenchromosomen auf ihre chromosomale Herkunft überprüft. So konnten zwei Klone,  $\lambda$ Cla1.1Y und  $\lambda$ Cla1.8Z, identifiziert werden, die aus der geschlechtsdeterminierenden Region des Chromosomenarms F stammten (Abbildung 1.1). Ausgehend von diesen Klonen war es möglich, durch einen Chromosomenmarsch 55 kb der geschlechtsdeterminierenden Region aus *C. thummi* zu klonieren. Da sich die Schwesternarten *C. thummi* und *C. piger* in den „single-copy“ Bereichen sehr ähnlich sind, war es darüber hinaus möglich, auch 50 kb aus der geschlechtsdeterminierenden chromosomalen Region von *C. piger* zu klonieren (Kraemer und Schmidt, 1993).

Um Gene in den klonierten chromosomalen Bereichen zu identifizieren, wurde eine embryonale cDNA-Bibliothek von *C. piger* angelegt und mit „single copy“-Sequenzen aus dem klonierten Bereich abgesucht. Damit konnte ein cDNA-Klon mit einem Integrat von 1,4 kb isoliert werden. Das durch diese cDNA repräsentierte Gen wurde *CpY* (*C. piger* Y-chromosomales Gen) genannt. Die vollständige cDNA von *CpY* ist 11,8 kb lang. *CpY* ist auf beiden homologen Chromosomen, dem Proto-Y und dem Proto-X, zu finden. Um zu überprüfen, ob es sich bei *CpY* um den dominanten männlichen Geschlechtsdeterminator M handelt, wurden in situ-Hybridisierungen an Polytänchromosomen verschiedener *Chironomus*-Spezies durchgeführt und der Locus der *CpY*-Homologen mit der Position von M verglichen: Die Position von *CpY* befindet sich in allen untersuchten Arten auf

hemizygote Cla-Elemente



**Abbildung 1.1:** Darstellung des geschlechtsdeterminierenden chromosomalen Bereichs von *C. thummi* durch in situ Hybridisierung von FITC-markierten Cla-Elementen und den flankierenden TRITC-markierten Klonen  $\lambda$ Cla1.1Y und  $\lambda$ Cla1.8Z. Der Klon  $\lambda$ Cla1.1Y enthält Teile des *CpY*-Gens. Durch die in der räumliche Nähe der Hybridisierungssignale auftretenden Interferenzeffekte erscheint das hemizygote Proto-Y spezifische Cla-Element Cluster in gelber Farbe.

Arm F in der Nähe des Telomers. Dies stimmt in allen untersuchten Arten – bis auf *Chironomus plumosus* und *C. nuditaris* – auch mit der Position von M überein, bei letzteren jedoch ist M an anderen Stellen lokalisiert. Die chromosomale Position von *CpY* ist also innerhalb der Chironomiden stärker konserviert als die Position von M. Bis heute ist nichts über die Natur von M bekannt und es kann nicht ausgeschlossen werden, daß in *Chironomus* verschiedene Faktoren die Funktion von M wahrnehmen können, wie z. B. für *Musca domestica* beschrieben (Franco et al., 1982), oder daß M durch Transposition seinen Locus verändern kann (Green, 1980), oder daß sich in der männchenspezifischen Strukturheterozygotie nicht noch andere Faktoren verbergen, bei denen es sich um M handeln könnte. Aus diesen Gründen kann über eine etwaige Beteiligung von *CpY* an der Geschlechtsdeterminierung noch keine Aussage gemacht werden.

Leider sind Chironomiden in vielerlei Hinsicht ungeeignet für die Funktionsanalyse von Genen: Sie paaren sich nur im Schwarm und geben zudem nur ein bis zwei Gelege während ihrer sehr geringen Lebensdauer ab. Kreuzungsgenetik kann deshalb – wenn überhaupt – nur sehr eingeschränkt durchgeführt werden. Außerdem ist für *Chironomus* kein genetisches Transformationssystem etabliert, was auch zur Folge hat, daß die Erzeugung und Analyse von Mutanten z. B. durch Rettung oder Deletionskartierung nur schwer möglich ist. Auch andere Techniken, wie z. B. Reporter-genassays oder antisense-Experimente, sind aus den aufgeführten Gründen nicht leicht durchzuführen. Es war also notwendig, nach einem geeigneten Organismus zu suchen, in dem diese Analysen durchgeführt werden können. Das *CpY* Gen ist evolutionär sehr konserviert (siehe Kapitel 1.4) und das entsprechende homologe Gen *DmX* konnte aus *D. melanogaster*, einem idealen Modellorganismus für genetische Analysen, isoliert werden.

### 1.3 Organisation des *DmX/CpY*-Gens

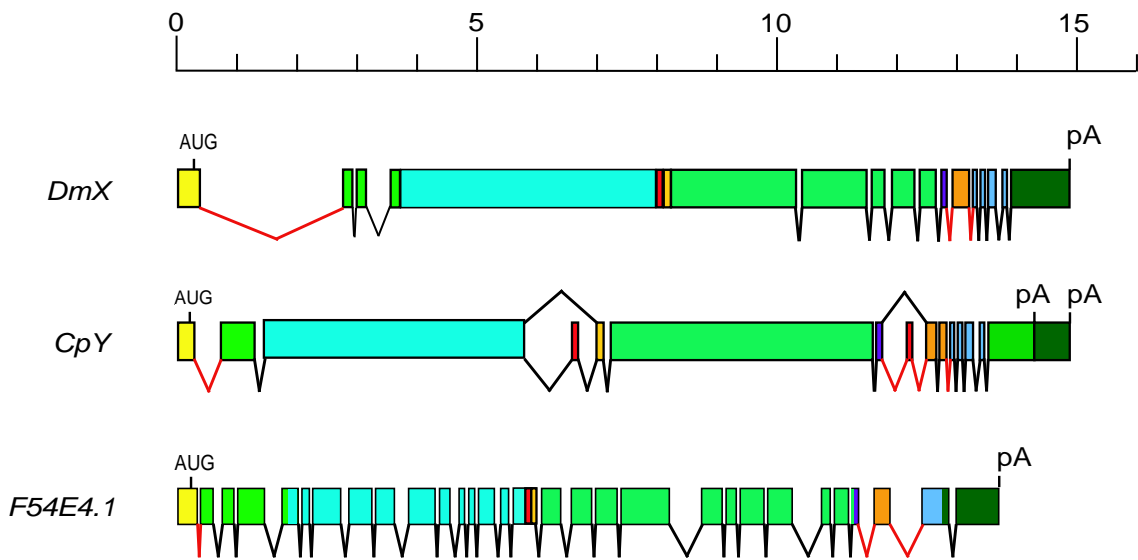
Die Exon/Intron-Struktur von *DmX/CpY* wurde durch den Vergleich der cDNA-Sequenzen verschiedener Klone mit der entsprechenden genomischen Sequenz ermittelt. *CpY* besteht aus 15 Exons und 14 Introns und umfaßt eine Länge von ca. 14,8 kb. Die Exons haben eine Länge zwischen 70 und 4337 bp, die Größe der Introns variiert zwischen 58 und 781 bp. Zwei der kurzen Exons, nämlich Exon 4 mit einer Länge von 90 bp und Exon 8, welches 84 bp lang ist, können differentiell gespleißt werden. Der 5'-untranslatierte Bereich – die Region zwischen dem Transkriptionsstart, der „cap-site“ und dem Start-Kodon – ist 120 bp lang. Der 3'-untranslatierte Bereich, zwischen dem Stop-Kodon und dem Endpunkt der Transkription, ist in verschiedenen cDNA-Klonen unterschiedlich lang. *CpY* kann also an zwei verschiedenen Stellen polyadenyliert werden. Bei Verwendung der proximalen Polyadenylierungsstelle beträgt die Länge des 3'-untranslatierten Bereichs 555 bp, bei Verwendung der distalen Polyadenylierungsstelle ist diese Region 1141 bp lang. Die Bedeutung des differentiellen Spleißens und der differentiellen Polyadenylierung konnte noch nicht geklärt werden. Von den Exons wird insgesamt ein ORF von 10536 bp kodiert, was – unter Berücksichtigung der 5'- und 3'-untranslatierten Be-



reiche – mit der durch Northern-Analysen bestimmten Transkriptgröße von ca. 11,8 kb übereinstimmt. Das abgeleitete Protein hat ein Molekulargewicht von 390 kDa und besteht aus 3512 Aminosäuren. *CpY*-Transkripte wurden in beiden Geschlechtern und in allen untersuchten Entwicklungsstadien gefunden, was auf eine weitgehend ubiquitäre Expression schließen läßt.

Das *DmX*-Gen weist zwar eine große strukturelle Ähnlichkeit mit *CpY* auf, es gibt aber auch einige Unterschiede. Der transkribierte Bereich des *DmX*-Gens ist mit ca. 14,9 kb ungefähr so groß wie *CpY*. *DmX* enthält ebenfalls 15 Exons mit einer Größe von 67 bis 6980 bp und 14 Introns mit einer Größe von 55 bp bis 2,4 kb. Das im *CpY*-Gen differentiell gespleißte kleine Exon 4 ist bei *DmX* Bestandteil des größten Exons 4. Dieser Bereich kann also in *D. melanogaster* nicht differentiell gespleißt werden. Ein homologer Bereich zum zweiten in *CpY* differentiell gespleißten Exon 8 fehlt in *DmX* völlig, kann also auch nicht differentiell gespleißt werden. Alle bisher isolierten cDNA-Fragmente erwiesen sich in der Organisation mit der genomischen Anordnung der Exons übereinstimmend, so daß keinerlei Hinweise auf differentielles Spleißen vorliegen. Ähnliches gilt für cDNA-Klone, die das 3'-Ende des *DmX*-Gens enthalten. Sie sind in ihrer Länge homogen, so daß keine Anzeichen für eine differentielle Polyadenylierung vorliegen. Das erste Intron ist mit einer Ausdehnung von 2,4 kb auffallend groß. Es ist das größte der in *DmX* und seinen Homologen in *Chironomus* und *C. elegans* gefundenen Introns. Die 5'-untranslatierte Region zwischen dem Transkriptionstart und dem Startkodon ist beim *DmX*-Gen 309 bp lang, der 3'-untranslatierte Bereich zwischen Stopkodon und der Polyadenylierungsstelle erstreckt sich über 691 bp. Die Länge der gebildeten mRNA beträgt ca. 11,5 kb und ist damit ungefähr genauso lang wie das *CpY*-Transkript. Der von dieser Struktur gebildete offene Leserahmen kodiert für ein putatives Protein von 380 kDa und einer Länge von 3427 Aminosäuren.

Ein Strukturvergleich des *DmX/CpY*-Gens mit dem homologen Gen *F54E4.1* aus *C. elegans* zeigt, daß das Gen evolutionär stark konserviert ist. *F54E4.1* wurde durch das *C. elegans* Genom-Projekt entdeckt. Es ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und ca. 13,8 kb lang. *F54E4.1* besteht aus 30 Exons und 29 Introns, die in ihrer Größe zwischen ca. 50 und 850 bp liegen. Die Positionen der Introns stimmen in drei Fällen überein (Abbildung 1.2). Dabei handelt es sich um das erste Intron, sowie um zwei weitere Introns im 3'-Bereich. Der zum differentiell gespleißten Exon 4 aus *C. piger* homologe Abschnitt ist wie bei *D. melanogaster* Bestandteil eines größeren Exons 16. Wie bei *D. melanogaster* fehlt auch in *C. elegans* eine Region, die zum differentiell gespleißten Exon 8 aus *C. piger* homolog ist. Jedoch blieben über den evolutionären Zeitraum von ca. 40 Millionen Jahren, der *Chironomus* und *D. melanogaster* trennt, sowie dem noch evolutionären Abstand zu *C. elegans* drei Intronpositionen konserviert: Das erste Intron befindet sich in *DmX*, *CpY* und *F54E4.1* an der gleichen Stelle; Intron 9 aus *DmX*, entspricht Intron 27 in *F54E4.1* und in *C. piger* den Introns 7 und 8, da sich hier das in den anderen Arten nicht vorhandene differentiell gespleißte Exon 8 befindet. Weiterhin ist die Position von Intron 10 von *DmX/CpY*, das dem Intron 28 des *F54E4.1*-Gens entspricht, in seiner Position konserviert.



**Abbildung 1.2:** Vergleich der Struktur der Gene *DmX* aus *D. melanogaster*, *CpY* aus *C. piger* und *F54E4.1* aus *C. elegans*. Im Gegensatz zu den anderen Genen werden bei *CpY* zwei Exons differenziell gespleißt. Exon 4 ist integraler Bestandteil der anderen Gene, Exon 8 ist eine neuartige Sequenz, die in den homologen Genen nicht zu finden ist. *CpY* wird außerdem differenziell polyadenyliert. Das erste Intron des *DmX*-Gens ist größer als alle anderen Introns. Konservierte Intron-Positionen sind rot gekennzeichnet.

Bei *DmX/CpY* handelt es sich also um ein evolutionär konserviertes Gen, das seine Struktur bishin zur Konservierung einzelner Intronpositionen grundsätzlich über einen langen evolutionären Zeitraum gewahrt hat. In kleinen Abschnitten, wie dem differenziell gespleißten *CpY*-Exon 4, das in den anderen Arten Teil einer größeren Einheit ist, und dem *CpY*-Exon 8, welches den Homologen gänzlich fehlt, sowie der differenziellen Polyadenylierung in *C. piger*, hat es jedoch durchaus Veränderungen erfahren.

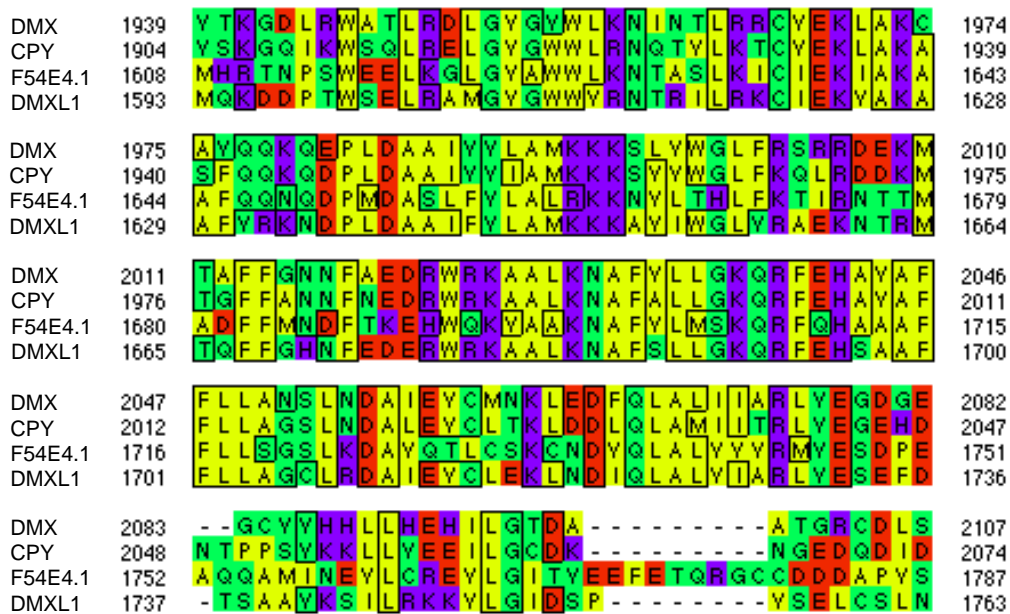
Eine Besonderheit des *DmX*-Gens ist, daß es an seinem 5'-Ende direkt von einem anderen Gen, *DmSPX* (Kraemer et al., 2000b), flankiert wird. Da in der vorliegenden Arbeit auch eine Transkriptionsanalyse von *DmSPX* durchgeführt wurde, soll in diesem Absatz kurz auf das *DmSPX*-Gen eingegangen werden. Der Abstand der beiden Transkriptionsstarts von *DmX* und *DmSPX* beträgt nur 174 bp. *DmSPX* ist ca. 2 kb lang, besitzt 3 Exons und kodiert für ein Transkript von 1,6 kb Länge (siehe 3.2 und 3.20). Das abgeleitete Protein besteht aus 347 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 38 kDa. *DmSPX* ist evolutionär stark konserviert. Homologe wurden in *H. sapiens* (Champion-Arnaud und Reed, 1994), *M. musculus* (Ruiz-Lozano et al., 1997), *C. elegans* (Tanaka et al., 1997), *A. thaliana* (AAD15475), *S. cerevisiae* (Igel et al., 1998) und anderen Taxa beschrieben. *DmSPX* besitzt starke Homologie zum humanen SAP 49. Dieses Protein ist eine Unter-einheit des essentiellen Spleißfaktors SF3B. SF3B ist ein U2snRNP assoziierter Protein-

komplex und besteht aus SAP 49, 130, 145 und 150 (Das et al., 1999). DMSPX besitzt, wie SAP 49, zwei RRM's („RNA Recognition Motifs“), von denen die eine im Menschen und in Hefe wahrscheinlich mit SAP 145 interagiert (Champion-Arnaud und Reed, 1994; Igel et al., 1998), die andere in *C. elegans* für die Bindung von RNA verantwortlich ist (Tanaka et al., 1997).

### 1.4 Evolutionäre Konservierung des *DmX/CpY*-Gens

Gene, welche für den Organismus essentiell sind, weisen in der Regel auch eine hohe evolutionäre Konservierung auf. Ein gutes Beispiel dafür ist die hohe Sequenzhomologie der Histongene oder der ribosomalen Gene, selbst zwischen evolutionär weit entfernten Taxa. Die Existenz *CpY*-verwandter Sequenzen wurde ursprünglich von Kraemer (1994) durch Southern Analysen gezeigt.

Mittlerweile konnten zahlreiche homologe Sequenzen aus vielen Arten, welche zur Zeit intensiv sequenziert werden, identifiziert werden. Ein Vergleich einiger abgeleiteter Proteine zeigt Tabelle 1.1. Obwohl der Anteil der identischen Aminosäuren, außer beim



**Abbildung 1.3:** Ausschnitt aus einem Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *DmX* aus *D. melanogaster*, *CpY* aus *C. piger*, *F54E4.1* aus *C. elegans*, sowie *DMXL1* aus *Homo sapiens* (vergleiche Tabelle 1.1). Nichtpolare Aminosäuren (AILVPFWM) sind gelb unterlegt, ungeladene polare (GSTYCNQ) grün, saure (DE) rot und basische Aminosäuren (HKR) blau. Die besonders stark konservierten Bereiche, in der Zählung von *DmX* zwischen 1966–2000 und 2027–2063 haben starke Ähnlichkeit zu WD-Repeats.

Vergleich von DMX und CPY, bei ca. 36% liegt, wird beim Vergleich der Genstruktur sofort klar, daß es sich hier um homologe Gene handelt. Man vergleiche hierzu die Identität von 32% und Ähnlichkeit von 49% mit dem in Abbildung 1.2 dargestellten Vergleich der Genstrukturen. Die aufgeführten abgeleiteten Proteinsequenzen werden durch ihre E-Werte von  $< 4 \times 10^{-28}$  zu einer Gruppe zusammengefaßt (siehe Tabelle 1.1). Der E-Wert ist ein Maß für die Homologiestärke. Dabei werden sowohl der Prozentsatz der identischen und ähnlichen Aminosäuren berücksichtigt, als auch die Länge der Übereinstimmung. Je kleiner dabei der E-Wert ist, desto höher ist die Ähnlichkeit der Proteine. Der nächstbeste BLAST-Treffer hatte nur einen Wert von  $10^{-13}$  und zeigte außer dem Besitz von WD-Repeats keinerlei Ähnlichkeiten zu der Gruppe mit den niedrigen E-Werten. Von *CpyA* aus *Dictyostelium discoideum* und dem *DmX*-ähnlichen Gen aus *Arabidopsis thaliana* sind die vollständigen Sequenzen und Genstrukturen noch nicht bekannt und das BLAST-Alignment auf einen kurzen Bereich beschränkt, was den „hohen“ E-Wert im Vergleich zu F54E4.1 erklärt. Das Protein YJR033C aus *S. cerevisiae*, das eine Sequenzhomologie von 30% Identität und 49% Ähnlichkeit zu DMX aufweist, ist jedoch um zwei Drittel kürzer als die anderen Proteine der Familie und stellt wohl eher einen entfernten Verwandten dar. Trotzdem ist es aufgrund der Homologie eindeutig der *DmX/CpY*-Familie zuzuordnen. Diese Protein-Familie scheint demnach über das gesamte Reich der Eukaryoten von Hefe bis zum Menschen verbreitet zu sein.

### 1.5 DMX/CPY ist ein WD-Repeat Protein

Die meisten der kurzen Abschnitte, die im Sequenzvergleich der *DmX/CpY*-Homologen besonders gut konserviert sind, können bei genauerem Vergleich (Abbildung 1.3) einem gemeinsamen Sequenz-Motiv, nämlich der proteinbindenden Tryptophan-Asparaginsäure-Wiederholungseinheit (WD-Repeat, Abbildung 1.4) (van der Voorn und Ploegh, 1992), zugeordnet werden.

Das WD-Repeat-Motiv besteht aus 44–60 Aminosäuren und enthält typischerweise ein Glycin-Histidin (GH)-Dipeptid 11–24 Aminosäuren vom N-Terminus des Repeats entfernt und ein WD-Dipeptid am C-Terminus. Beide Dipeptide sind jedoch nicht in allen Fällen konserviert. Vor dem terminalen WD-Dipeptid findet sich im Abstand von 5–7 Aminosäuren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von 84% ein Asparaginsäurerest (D). Die Konsensus-Sequenz der WD-Repeat-Einheit ist in der folgenden Abbildung wiedergegeben. Dabei sind für jede Position diejenigen Aminosäuren genannt, die dort mit der höchsten Wahrscheinlichkeit auftreten. Eine detaillierte Übersicht über die Häufigkeit des Vorkommens einzelner Aminosäuren an den einzelnen Positionen befindet sich im Anhang.

Die Varianz des Vorkommens einzelner Aminosäuren an einer bestimmten Position zeigt, daß die Konsensus-Sequenz der WD-Repeat-Einheit wenig konserviert ist. Dies erschwert die Definition und Identifikation von WD-Repeats erheblich. Eine Röntgenstrukturanalyse zur Bestimmung der Tertiärstruktur eines WD-Proteins ist bis jetzt nur für die

Spezies	„Accession“	Name	Identitäten	Ähnlichkeiten	E-Wert	Referenz
BLASTp-Ergebnisse von DMX						
<i>C. piger</i>	X82317	CPY	57%	69%	0,0	Kraemer (1994)
<i>A. thaliana</i>	AC006418	hypothetisch	36%	54%	$3 \times 10^{-36}$	Lin et al. (1999)
<i>H. sapiens</i>	gi3123572	DMXL1	36%	53%	0,0	Kraemer et al. (2000a)
<i>C. elegans</i>	Z79639	F54E4.1	32%	49%	0,0	Thomas (1996)
<i>D. discoideum</i>	AF076600	CpyA	30%	48%	$7 \times 10^{-38}$	Iranfar und Loomis (1998)
<i>S. cerevisiae</i>	P47104	YJR033C	30%	49%	$4 \times 10^{-28}$	Zagulski et al. (1995) Huang et al. (1995)
BLASTp-Ergebnisse von CPY						
<i>A. thaliana</i>	AC006418	hypothetisch	39%	61%	$7 \times 10^{-34}$	Lin et al. (1999)
<i>H. sapiens</i>	gi3123572	DMXL1	36%	51%	0,0	Kraemer et al. (2000a)
<i>C. elegans</i>	Z79639	F54E4.1	32%	49%	0,0	Thomas (1996)
<i>D. discoideum</i>	AF076600	CpyA	31%	50%	$8 \times 10^{-52}$	Iranfar und Loomis (1998)
<i>S. cerevisiae</i>	P47104	YJR033C	31%	48%	$10^{-28}$	Zagulski et al. (1995) Huang et al. (1995)

**Tabelle 1.1:** Ergebnisse der Suche nach homologen Proteinen mit BLASTp (Altschul et al., 1990). Das Gen von CpyA aus *D. discoideum* ist noch nicht vollständig sequenziert und das als „hypothetical protein“ annotierte Homologe aus *A. thaliana* wurde wahrscheinlich von den Genvorhersageprogrammen nicht vollständig identifiziert. Der ORF von F54E4.1 wurde aus der Nukleotidsequenz nicht korrekt vorhergesagt. Das komplett identifizierte Gen von YJR033C aus Hefe hat nur eine Länge von 1357 Aminosäuren. Ein Auszug aus der originalen BLASTp-Suche findet sich im Anhang.

$\beta$ -4	$\beta$ -1			$\beta$ -2	$\beta$ -3	
xxxxxxxx[ 1-? ]	GHxxx	Vxx	VxFxx	[ 0-? ]	PDG[ 0-3 ]	xLASGSxDTIKVD
	A	I	L W	DND	IVTAG	SVRLFN
			I L	SSN	VL SA	L IY
			C I	TS	FI C	A
			V	P		
			Y			

**Abbildung 1.4:** Konsensus-Struktur des WD-Motivs (Smith et al., 1999)

$\beta$ -Untereinheit des G Protein-Heterotrimeres  $G_{i\alpha_1}\beta_1\gamma_2$  durchgeführt worden (Wall et al., 1995; Sondek et al., 1996). Die  $\beta$ -Untereinheit enthält sieben WD-Repeats und bildet eine propellerartige Tertiärstruktur aus, die aus 7 Propellerblättern besteht. Ein Propellerblatt besteht aus einem in sich verdrehten  $\beta$ -Faltblatt, das wiederum aus vier  $\beta$ -Strängen gebildet wird. Der innerste der vier  $\beta$ -Stränge verläuft nahezu parallel zur Zentralachse (Abbildung 1.5). Es verhält sich jedoch nicht so, daß ein WD-Repeat mit seinen vier  $\beta$ -Strängen je ein Rotorblatt generiert. Vielmehr bilden die letzten drei  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta$ 1–3, vgl. Abbildung 1.5) eines WD-Repeats den inneren Teil des Propellerblattes, der äußerste Teil wird vom ersten  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ 4) der nächsten Wiederholungseinheit gebildet. Durch diese Organisation ist gewährleistet, daß die Propellerstruktur wie mit einer Schnalle ringförmig geschlossen bleibt. Die  $\beta$ -Faltblattbereiche der WD-Repeats bilden ein kompaktes Propellergerüst. Wichtiger als eine hochkonservierte Aminosäure-Sequenz scheint hierbei die resultierende Sekundär- und Tertiärstruktur zu sein. Interessanterweise sind die einzelnen Propellerblätter in ihrer funktionellen Bedeutung nicht unbedingt gleichwertig. So haben gleichartige Austausche des konservierten Asparaginsäurerestes zwischen  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 in verschiedenen Propellerblättern eines Propellers ganz unterschiedliche Auswirkungen auf Geschwindigkeit und Qualität der Faltung (Higuera et al., 1998). Der Schluß, daß alle WD-Proteine eine ähnliche Struktur aufweisen, folgte aus den Beobachtungen, daß kompakte Propellerstrukturen von der Proteinase Trypsin nicht verdaut werden können, und daß WD-Domänen vieler auf diese Weise analysierter Proteine sich in einem Trypsin-Verdau stabil verhalten (Higuera et al., 1996). Zwischen den strukturell konservierten Regionen ( $\beta$  4–1,  $\beta$  1–2,  $\beta$  3–4) einer WD-Einheit finden sich variable Regionen verschiedener Länge. Die höchste Variabilität in der Länge findet man zwischen dem WD-Dipeptid einer Einheit und dem GH-Dipeptid der nächsten Einheit (variable Region I). Dieser Bereich enthält Strang  $\beta$ 4 und kann eine Länge zwischen 11 und 150 Aminosäuren aufweisen, mit einer typischen Länge von ca. 20 Aminosäuren. Dabei ist der variable Bereich vor dem  $\beta$ 4-Strang (variable Region IA) auf der Oberfläche der Propellerunterseite lokalisiert und der Bereich hinter  $\beta$ 4 (variable Region IB) auf der Propelleroberseite.

Die  $\beta$ 4-Stränge aller Repeats bilden die seitliche Außenfläche des Propellers. Eine weitere variable Region (variable Region II) befindet sich zwischen den Strängen  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2. Diese hat eine Länge von 2 bis 30 Aminosäuren und bildet eine Schleife auf der Oberfläche der Propellerunterseite. Es fällt auf, daß die strukturbildend konservierten Aminosäuren in der Propellerstruktur innen liegen, während die variablen Bereiche die Oberfläche bilden.

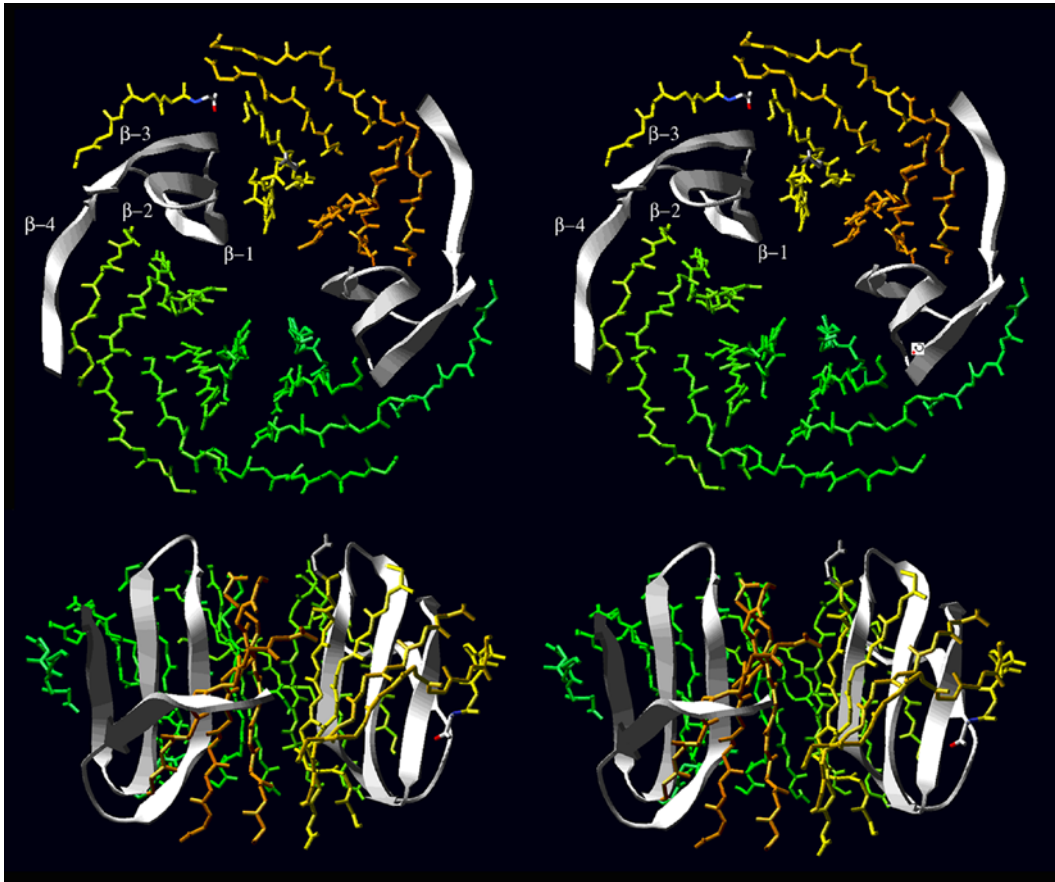
Mit einem WD-Repeat haben wir also eine konservierte räumliche proteinbindende Struktur vorliegen, die sich durch eine große Variabilität ihrer komplexen Oberfläche auszeichnet. Die Organisation dieser Struktur bildet das Grundgerüst für eine große Zahl möglicher verschiedener Proteinbindungen und somit eine Vielzahl möglicher Funktionen. Dabei kann ein einziger WD-Propeller mit mehr als 16 verschiedenen Proteinen reversible Komplexe bilden. Dies wurde für die WD-Proteine  $G_{i\alpha 1}\beta_1\gamma_2$  (van der Voorn und Ploegh, 1992), TUP1 (Williams et al., 1991) und snRNPs (Bjorn et al., 1989) gezeigt. Eine enzymatische Aktivität konnte bis jetzt für keine WD-Repeat-Domäne nachgewiesen werden. Durch die Interaktion mit anderen Proteinen können WD-Proteine bedeutende regulatorische Funktionen wahrnehmen. Das Spektrum der Variabilität des WD-Repeats erlaubt dabei den Einsatz dieser Grundfunktion in vielen regulierten Stoffwechselwegen. In der Tat spielen WD-Proteine in vielen Regulationskaskaden eine wichtige Rolle. So sind die G-Proteine für die Signaltransduktion essentiell (Fong et al., 1986), weitere WD-Proteine werden als Untereinheiten der Phosphatase (Neer et al., 1993) oder als Anker für die Proteinkinase C (Ron et al., 1994) in der Signaltransduktion eingesetzt. Eine andere Gruppe ist mit RNA-Prozessierungskomplexen assoziiert, einige Mitglieder dieser Gruppe sind Teil der snRNPs (Bjorn et al., 1989). Eine weitere Gruppe fungiert als Bestandteil von Transkriptionsregulatoren, wie z. B. die TFIID-Untereinheit des TATA-Bindungskomplexes (Williams et al., 1991; Keleher et al., 1992; Hoey et al., 1993). Andere WD-Proteine sind an der Bildung des Zytoskelettes oder der Bildung der Spindeln in der Mitose (de Hostos et al., 1991; Vaisman et al., 1995) beteiligt. Andere wiederum regulieren die Bildung und den Transport von Vesikeln (Pryer et al., 1993) oder kontrollieren einige Aspekte der Zellteilung (Feldman et al., 1997).

Die evolutionäre Entstehung der WD-Proteine scheint während oder kurz nach der Trennung von Pro- und Eukaryoten stattgefunden zu haben. Während WD-Proteine in allen Eukaryoten vorkommen, konnten sie vereinzelt nur in den vollständig sequenzierten Genomen der Prokaryoten *Synechocystis sp.* Stamm PCC6803 (5 WD-Proteine), in *Thermomonospora curvata* (1 WD-Protein) und in *Anabaena sp.* Stamm PCC7120 (1 WD-Protein) nachgewiesen werden. Keine WD-Repeat Proteine konnten in den vollständig durchsequenzierten Genomen der Bakterien *Escherichia coli*, *Helicobacter pylorii*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, der Archaeobakterien *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Archaeoglobus fulgidus*, sowie der Mycoplasmen *Mycoplasma genitalium* und *M. pneumoniae* nachgewiesen werden. In den Eukaryoten *A. thaliana* wurden bisher 59, in *C. elegans* 88 und in der Hefe 58 WD-Proteine identifiziert (diese Zahlen stammen von Chrysanthe Gaitatzes, BioMolecular Engineering Research Center, Boston University, <http://bmerc-www.bu.edu/wdrepeat/members.html>). Die einzelnen Mitglieder der WD-Familie weisen in der Regel eine

konservierte Aminosäuresequenz auf (Laloti et al., 1996; Verreault et al., 1996; de Vetten et al., 1997; Németh et al., 1998; Rodriguez et al., 1999).

WD-Proteine sind jedoch nicht die einzigen Proteine, die Propellerstrukturen ausbilden. Doch im Gegensatz zu diesen Nicht-WD-Propeller-Proteinen – als Beispiele seien hier Hämopexin (Paoli et al., 1999) Collagenasen (Li et al., 1995) und die Methylamindehydrogenase (Chen et al., 1992a) genannt – konnte in keinem Fall eine enzymatische Aktivität einer WD-Propellerstruktur gezeigt werden.

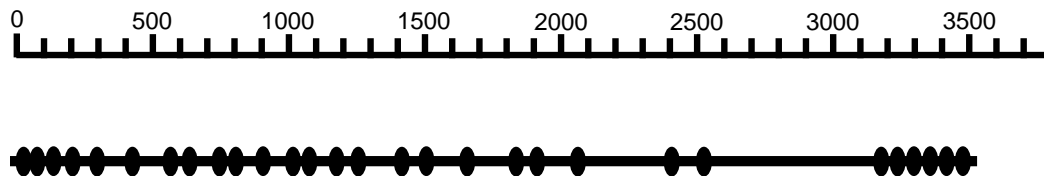
In der abgeleiteten Proteinsequenz von *DmX* wurden durch visuelle Analysen 30 WD-ähnliche Wiederholungseinheiten von Kraemer et al. (1998) identifiziert (vergleiche 1.6).



**Abbildung 1.5:** 3D-Struktur von  $G_{i\alpha 1}\beta_1\gamma_2$ . Die Darstellung wurde mit dem Programm SwissPdb-Viewer35b1 und dem Raytracing Programm POV-Ray 3.1d aus dem entsprechenden pdb-Eintrag aus der Brookhaven-Datenbank (<http://www.rcsb.org/pdb/>), welcher die atomaren Koordinaten enthält, erzeugt. Die dreidimensionale Ansicht erhält man, indem man die Abbildung in normalem Leseabstand vor sich hält und die beiden Teilbilder durch Schielen zur Deckung bringt, oder durch Verwendung einer Stereolupe.



Unter diesen sind besonders die C-terminalen sechs WD-Repeats in der typischen Weise tandemartig angeordnet.



**Abbildung 1.6:** Position von WD-Repeats auf der abgeleiteten Aminosäuresesequenz von DMX nach Kraemer et al. (1998). Die einzelnen Repeat-Einheiten sind als Ovale dargestellt. Die Abstände zwischen den C-terminalen WD-Repeats sind extrem klein und variieren zwischen 11 und 20 Aminosäuren.

## 1.6 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Obwohl aufgrund der Nukleotid- und der abgeleiteten Aminosäuresequenz einige interessante Eigenschaften des DMX/CPY-Proteins vorhergesagt werden können, muß die tatsächliche Funktion experimentell erarbeitet werden. Zunächst sollte der chromosomale Lokus von *DmX* genau bestimmt werden. Dabei war von großem Interesse, ob bereits verfügbare *DmX*-Mutanten aus dem von zahlreichen Arbeitsgruppen durchgeführten Mutagenesen existieren, um Aufschluß über den Phänotyp zu erhalten. Eine der wichtigsten Fragen bei der Funktionsanalyse von Genen ist die nach dem Transkriptionsprofil. Eine Analyse der stadien- und gewebspezifischen Transkription von *DmX* sollte Hinweise auf die Funktion des Gens bzw. des Genprodukts liefern. In diesem Zusammenhang sollte auch untersucht werden, inwieweit sich das *DmX*- und *DmSPX*-Gen, deren Transkriptionsstarts nur 174 bp auseinanderliegen, in ihren Transkriptionsmustern voneinander unterscheiden. Gene, die ein sehr ähnliches Expressionsmuster aufweisen, stehen in vielen Fällen auch in einem funktionellen Zusammenhang. Da für *Drosophila* schon viele Gene durch ihr Transkriptionsmuster charakterisiert wurden, sollten mit Hilfe dieser Ergebnisse Gene mit ähnlichem Transkriptionsmuster identifiziert werden.

Erst durch die vollständige Klonierung des homologen Gens *DmX* in *D. melanogaster* (Kraemer et al., 1998) wurden Untersuchungen mit transgenen Vektorkonstrukten und Mutagenese ermöglicht. Mittels verschiedener „antisense“-Strategien sollte in transgenen Fliegen versucht werden, die endogene Expression von *DmX* zu unterdrücken oder zu stören und einen entsprechenden *DmX*<sup>-</sup>-spezifischen Phänotyp zu erzeugen. Durch die Verbindung potentieller regulatorischer Bereiche von *CpY* und *DmX* mit verschiedenen Reportergenen oder Markerkonstrukten, sollten die für eine normale Expression benötigten Abschnitte identifiziert werden. Mit diesem Wissen ist die Konstruktion eines sogenannten Rettungsvektors möglich, mit dem eine Kopie von *DmX* als Transgen in das Genom von *D. melanogaster* eingeschleust wird. Mit Hilfe dieser Kopie könnte es möglich sein, durch Komplementation (Rettung) entsprechender EMS-Mutationen einen *DmX*<sup>-</sup>-Phänotyp zu identifizieren.

Durch einen Vergleich der experimentellen Ergebnisse von Lokalisation, Transkriptionsanalyse und Phänotyp mit bereits analysierten *Drosophila*-Genen sollte in Zusammenhang mit einer bioinformatischen Charakterisierung des abgeleiteten DMX/CPY-Proteins ein Modell für eine mögliche Funktion erarbeitet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

#### 2.1.1 *Chironomus*

Die verwendeten Tiere der Arten *C. thummi* und *C. piger* stammten entweder aus der permanenten Laborzucht unseres Instituts oder aus Freilandgelegen. Einzelne Gelege wurden bis zum vierten Larvenstadium in belüfteten Schalen bei Raumtemperatur aufgezogen. Als Futter diente insektizidfreies Brennesselpulver und Zellstoff. Das Geschlecht der Larven wurde anhand der Imaginalscheiben bestimmt. Dazu wurden die letzten zwei Segmente abgetrennt, in 50% Essigsäure differenziert und mit den Abbildungen in Wülker und Götz (1968) verglichen.

#### 2.1.2 *Drosophila melanogaster*

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten *Drosophila*-Stämme verwendet. Die Haltung der Stämme erfolgte unter Standardbedingungen bei 25°C bzw. 18°C (Ashburner, 1989). Eiablagen erfolgten auf mit Trockenhefe versetzten Apfelsaftagar-Petriscchalen (25 g/l). Die Determinierung der Entwicklungsstadien wurde gemäß Campos-Ortega und Hartenstein (1985) (siehe Anhang) vorgenommen.

### 2.2 Standardmethoden

Zur Aufreinigung von DNA wurden Phenolextraktionen durchgeführt, entweder mit Phenol, das mit 50 mM Tris pH 7,6 gesättigt, oder zusätzlich mit Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 gemischt war. Es wurde immer eine Chloroformextraktion angeschlossen, um in der wässrigen Phase verbliebenes Phenol zu entfernen. Alternativ wurde die Aufreinigung mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. DNA aus einer Lösung wurde mit 1/10 Vol. 10x Dialysepuffer sowie 2 Vol. Ethanol abs. mindestens 15 min bei -20°C bzw. -80°C gefällt und bei 4°C und 12000 g für mindestens 15 min abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers in 20 µl-Ansätzen (analytisch) bzw. 150 µl-Ansätzen (präparativ). Genomische DNA wurde in 30 µl-Ansätzen über Nacht verdaut. Die Isolierung der DNA aus Gelen erfolgte nach der Methode von McDonnell et al. (1977) durch Elektroelution oder mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

Stamm	Genotyp	Bemerkung
<i>white</i> <sup>-</sup> B-2380	Oregon-R	(Morgan, 1910; Morgan und Bridges, 1916) Wildtyp
Δ2-3:	$\frac{w}{w}; \frac{\pm}{+}; \frac{Dr}{TMS SbP(r\Delta 2-3)99B}$	(Robertson et al., 1989)
2,3 Balancer:	$\frac{w}{w}; \frac{SM6a TM6B CyO Tb}{Pm}; +$	(Vef, pers. Mitteilung)
4-fach Balancer	$\frac{w}{w}; \frac{CyO}{Pm}; \frac{Cx D}{TM6B}$	(Vef, pers. Mitteilung)
B-1665	Df(1)5D	Bruchpunkte: 5D1;5E1-5E8
B-946	Df(1)N73	Bruchpunkte: 5C2;5D5-5D6
B-945	Df(1)C149	Bruchpunkte: 5A8-5A9;5C5
UM-16280	Df(1)JF5	Bruchpunkte: 5E6;5E8
1874	$w^+; Pw^{+mW.hs}=GawB 389 ! GAL4$	
1878	$w^+; Pw^{+mW.hs}=GawB T80/CyO ! GAL4$	
1747	$y^1 w^+; Pw^{+mW.hs}=GawB 71B ! GAL4$	
1822	$y^1 w^+; Pw+mC=GAL4-Hsp70.PB31-1/T(2;3)B3, CyO, Cy^1 dp^{lv1}$	
1747	$y^1 w^+; Pw^{+mW.hs}=GawB 71B ! GAL4$	
813	$w^+; Pw^{+mW.hs}=GawB$	(Urban, pers. Mitteilung)
853	$w^+; Pw^{+mW.hs}=GawB$	(Urban, pers. Mitteilung)
1018	$w^+; Pw^{+mW.hs}=GawB$	(Urban, pers. Mitteilung)
1087	$w^+; Pw^{+mW.hs}=GawB$	(Urban, pers. Mitteilung)

**Tabelle 2.1:** In dieser Arbeit verwendete *D. melanogaster*-Stämme: Der *white*<sup>-</sup>-Stamm diente zur Injektion von Transformationsvektoren mit dem *mini-white*-Reportergen. Oregon-R diente in vielerlei Hinsicht als Negativ/Positivkontrolle. Δ2-3 wurde zur Mobilisierung von P-Elementen verwendet. Die Balancer-Stämme wurden zur Homozygotisierung von Transgenen benötigt. B-1665, B-946, B-945, B-946 und UM-16280 dienten der Lokalisierung von *DmX* und *DmSPX*. Die *GAL4*-Stämme exprimieren GAL4 im Zentralnervensystem.

## 2.3 DNA-Präparation

### 2.3.1 Isolierung von Phagen-DNA

Die Präparation rekombinanter DNA des Phagen EMBL3 (Frischauf et al., 1983) wurde nach Marzluff (unveröffentlicht) durchgeführt. 250 µl einer Wirtsbakteriensuspension (*E. coli* P2392; Stratagene Cloning Systems, Heidelberg) mit einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – resuspendiert in 10 mM MgCl<sub>2</sub> – wurden mit 10–30 µl Phagensuspension gemischt und 15 min bei 37°C präadsorbiert. Der Ansatz wurde in 35 ml L-Medium mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> (oder in NZY-Medium) überführt und bei 37°C bis zur Lyse der Zellen (über Nacht) geschüttelt. Nichtlysierte Bakterien wurden durch Zugabe von einigen Tropfen Chloroform abgetötet und die Bakterienüberreste 15 min bei 9000 g und 4°C sedimentiert. Die Fällung der Phagenpartikel wurde erreicht durch Lösen von 0,06 g/ml NaCl und 0,07 g/ml PEG im Überstand mit anschließender einstündiger Inkubation auf Eis. Die Sedimentation der Phagenpartikel erfolgte durch 30minütige Zentrifugation bei 4°C und 9000 g. Nach Resuspension des Phagenpellets in 1 ml SM-Medium mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> wurden bakterielle DNA und RNA durch Zugabe von 10 µg/ml DNaseI und 50 µg/ml RNase A 30 min bei 37°C (oder 3 h in Eis) verdaut. Die Phagenhüllen wurden durch Zugabe von 1/10 Vol. SDS-Mix sowie 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur aufgebrochen und durch drei Phenol- und eine Chloroform-Isoamylalkohol Extraktionen entfernt. Als Fällungssalz für die DNA diente 1/10 Vol. 2 M NaCl.

### 2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Um zu testen, ob eine Bakterienkolonie das Plasmid mit dem gewünschten Integrat enthält, wurden kleinere Mengen DNA nach der Methode von He et al. (1990) durch Perforierung der Bakterien mit TELT-Puffer gewonnen, bzw. mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen (Hilden). Größere Mengen Plasmid-DNA erhielt man durch partielle Lyse der Bakterien nach der Methode von Clewell und Hellinski (1969), modifiziert nach Schmidt und Godwin (1983), bzw. mit dem „Qiaquick Plasmid Midi kit“ (Qiagen, Hilden).

### 2.3.3 Isolierung genomischer DNA aus *Chironomus* und *Drosophila*

Die Methode wurde nach Kraemer (pers. Mitteilung) durchgeführt: Zwischen 40 und 60 Imagines wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt und in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit 5 ml Homogenisierungspuffer II höchstens dreimal homogenisiert. Für 1–30 Larven bzw. 50 µl Embryonen wurden in einem 1 ml-Glashomogenisator 500 µl Homogenisierungspuffer II eingesetzt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Proteinase K und ein- bis zweistündiger Inkubation bei 60°C folgten zahlreiche Phenol- und Chloroformextraktionen, wobei weitlumige Pipettenspitzen verwendet wurden.

## **2.4 RNA-Präparationen**

Alle RNA-Arbeiten wurden mit Handschuhen und DEPC-behandelten Reagenzien durchgeführt. Homogenisatoren wurden vor der Wiederverwendung gründlich mit Wasser ausgespült, mit Chloroform gewaschen und mindestens 10 min mit UV-Licht bestrahlt.

### **2.4.1 RNA-Isolierung mit Guanidinthiocyanat**

Die Isolierung von RNA wurde nach einer veränderter Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Dabei wurden 100 mg Gewebe in 1 ml Guanidinlösung homogenisiert, mit 0,1 Vol. 2M Natriumacetat pH4 versetzt und vermischt. Nach Zugabe von 1 Vol. wassergesättigtem Phenol, Mischen und Zugabe von 0,2 Vol. Chloroform erfolgte eine viertelstündige Inkubation auf Eis. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 10000 g und 4°C wurde die RNA aus der oberen Phase mit 1 Vol. Isopropanol für 30 Minuten bei -20°C gefällt und anschließend bei 10000g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 0,3 Vol. Guanidinlösung aufgenommen und nochmals mit Isopropanol gefällt. Danach wurde das Pellet in 75% Ethanol resuspendiert, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und abzentrifugiert. Nach fünfminütigem Trocknen in einer Vakuumzentrifuge konnte die RNA in 100–200 µl a. bidest aufgenommen werden.

### **2.4.2 RNA-Isolierung nach Holmes und Bonner (1985), verändert nach Sass (1990)**

Ungefähr 30 Larven oder entsprechend viele Adulte wurden in einem Potter mit 1 ml Holmes-Bonner Lösung homogenisiert. Das Homogenat wurde mindestens dreimal mit Phenol-Chloroform extrahiert und anschließend über Nacht mit 2,5 Vol. Ethanol bei -20°C gefällt. Die Nukleinsäuren wurden durch eine halbstündige Zentrifugation bei 3600 UpM und 4°C pelletiert. Die RNA wurde durch Aufnahme des Pellets in TES und Zugabe von 3 Vol. 4,5 M Natriumacetat für zwei bis drei Stunden auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation und Waschen des Pellets in 3 M Natriumacetat und anschließend in 70% Ethanol erfolgte eine kurze Trocknung und Aufnahme der RNA in a. bidest.

## **2.5 PCR-Techniken**

Die Amplifikations-Reaktionen erfolgten entweder auf einem Autogene-Gerät der Firma GRANT (England), einem DNA-Engine-Gerät (Biozym, Hessisch Oldendorf) oder einem PCR-sprint-Gerät der Firma Hybaid (Heidelberg).

### **2.5.1 Standard-PCR**

Die PCR (Saiki et al., 1988) wurde mit 50 ng genomischer DNA oder 1 ng Plasmid-DNA, je 500 ng Primer, 0,2 mM dNTPs, 2,5 U Taq-Polymerase in 1x Taq-Puffer durchgeführt.

Taq-Polymerase wurde nach Pluthero (1993) isoliert. Im Standardfall wurde die PCR unter den in Tabelle 2.2 Bedingungen durchgeführt:

### 2.5.2 X-large PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, welche größer als 4 kb sind, aus Insekten wurde ein Gemisch der thermostabilen Polymerasen Taq und Pwo verwendet, von denen letztere eine Korrekturlesefunktion besitzt. Dadurch wird die Amplifikation längerer Fragmente überhaupt erst ermöglicht, außerdem wird eine höhere Replikationsgenauigkeit und Ausbeute erzielt. Das „Expand™ Long Template PCR System“ der Firma Roche (Mannheim) erwies sich hierfür als geeignet (Weil et al., 1995). Alle Reaktionen wurden in einem Gerät mit Piezo-Technik durchgeführt (DNA-Engine von Biozym, Hessisch Oldendorf). Typische Parameter für die Amplifikation eines 16 kb-Fragmentes können Tabelle 2.3 entnommen werden.

---

Denaturierung:	10 sec. - 1 min	94°C
„Annealing“:	1,2–3 min	54°C
Elongation:	2,5 min	72°C
		33 Zyklen

**Tabelle 2.2:** Standard PCR Bedingungen

---

Vordenaturierung:	2 min	92°C
Denaturierung:	10 sec.	92°C
„Annealing“:	30 sec.	65°C
Elongation:	15 min	68°C
		10 Zyklen
Denaturierung:	10 sec.	92°C
„Annealing“:	30 sec.	65°C
Elongation:	15 min (+20 sec. / Zyklus)	72°C
		20 Zyklen

**Tabelle 2.3:** X-large PCRs zur Amplifikation des gesamten *CpY* wurden mit den angegebenen Parametern auf einer Biozym DNA-Engine durchgeführt.

### 2.5.3 RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)

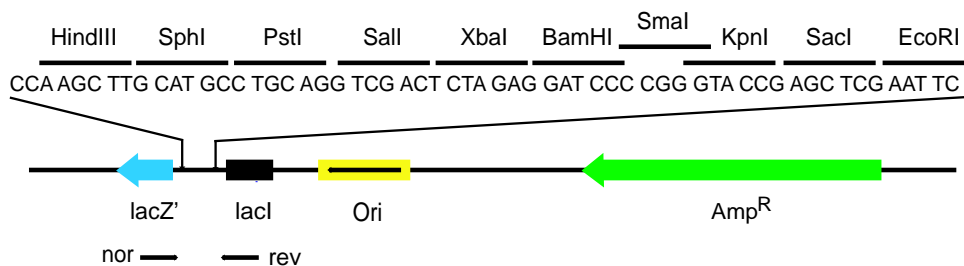
Um die unterschiedliche Expression differentiell gespleißter Exons in verschiedenen Geweben zu untersuchen, wurde zunächst Gesamt-RNA isoliert, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben. 1–10 µg dieser RNA in 10 µl a. bidest wurden zusammen mit 2 µl Primer für 10 min bei 70°C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 4 µl 5x Erststrang-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und 1 µl reverse Transkriptase (Superscript, Life Technologies, Eggenstein) und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur folgten 50 min bei 42°C. Danach wurde die RNA durch Zugabe von 2 µl 6M NaOH und einer halbstündigen Inkubation bei 65°C abgebaut, der Ansatz mit 2 µl 6M Essigsäure neutralisiert und mit a. bidest auf 50 µl aufgefüllt. Nach einer Aufreinigung mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) und Elution in 50 µl 10 mM Tris pH 7,5 wurden 1–5 µl für die Standard-PCR eingesetzt.

## 2.6 Verwendete Plasmidvektoren

In der vorliegenden Arbeit wurden die in den Abbildungen 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 gezeigten Plasmidvektoren zur Klonierung, Subklonierung und zur Konstruktion von Expressionsvektoren verwendet.

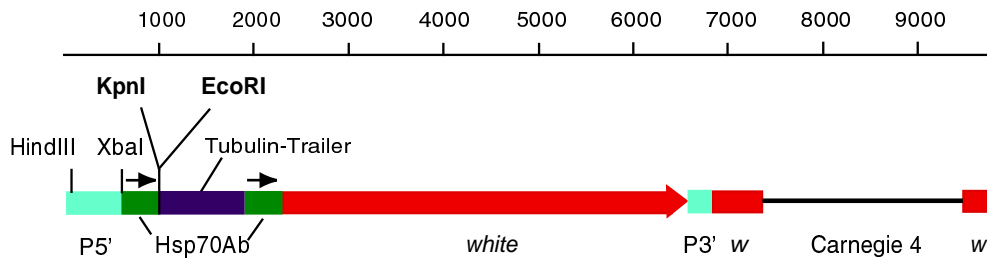
## 2.7 Klonierung in Plasmid-Vektoren

Zur Sequenzierung wurden DNA-Restriktionsfragmente in den doppelsträngigen zirkulären Klonierungsvektor pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985) kloniert, bzw. in pKS (Stratagene, Heidelberg). Diese Vektoren besitzen eine multiple Klonierungsstelle und kodieren für ein lacZ'-Peptid. Dieses Peptid kann mit der vom Wirtsstamm kodierten, teilweise deletierten funktionsuntüchtigen β-Galaktosidase ein funktionstüchtiges Hybridprote-

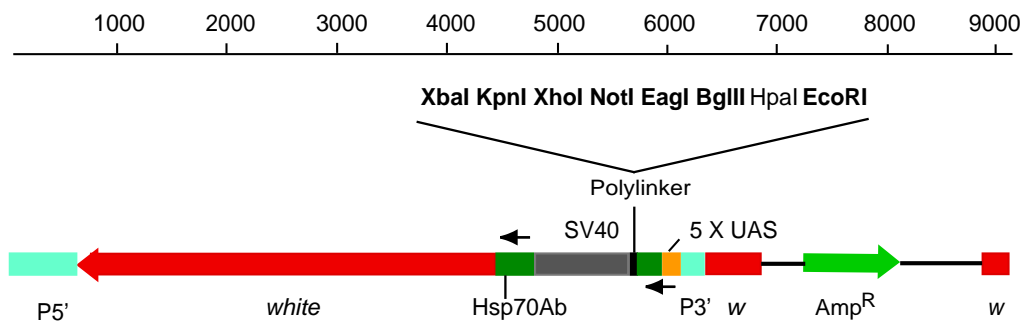


**Abbildung 2.1:** Der Klonierungsvektor pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985) gestattet aufgrund seiner geringen Größe und der Möglichkeit einer blau/weiß-Selektion die einfache Klonierung, Selektion und Sequenzierung von DNA-Fragmenten.

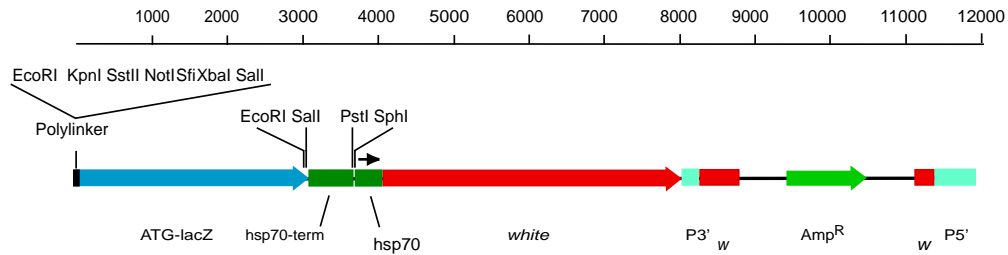




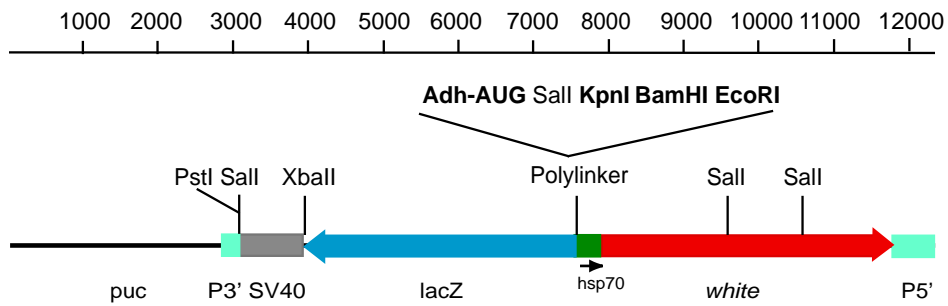
**Abbildung 2.2:** Der *Drosophila* Transformationsvektor pKB256 (Basler, pers. Mitteilung) erlaubt die Expression beliebiger ORFs in *D. melanogaster* unter der Kontrolle des Hitzeschockpromotors Hsp70. Das Integrat sollte neben dem Startkodon noch einen Teil des 5'-untranslatierten Bereichs zwischen der TATA-Box und es Startkodons enthalten. Die korrekte Termination des Transkripts ist durch den 3'-untranslatierten Bereich des Gens *hsp70* gewährleistet. Als Klonierungsschnittstellen kommen dafür im 5'-Bereich KpnI und im 3'-Bereich EcoRI in Frage.



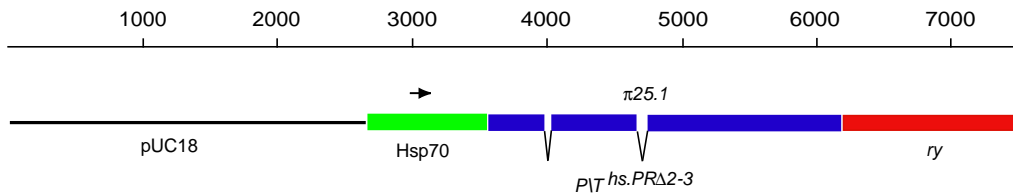
**Abbildung 2.3:** Der *Drosophila* Transformationsvektor pUAST (Brand und Perrimon, 1993) gestattet die stadien- und gewebsspezifische Expression von ORFs unter der Kontrolle der UAS-Sequenzen. Für die korrekte Termination der Transkripte sorgt der SV40-Terminator. Durch Einkreuzen der resultierenden UAS-ORF-Stämme in die entsprechenden GAL4-Stämme kann der ORF unter demjenigen Promotor/Enhancer exprimiert werden, unter dessen Kontrolle das eingekreuzte GAL4 steht.



**Abbildung 2.4:** Der *Drosophila* Reportergenvektor pwATG-lac1 (Kuhn et al., 1988) ist ein *D. melanogaster* -Reportergenvektor, der das *lacZ*- unter die Kontrolle des einklonierten Promotorelements stellt. Das *lacZ*-Gen besitzt ein eigenes Startkodon, das einklonierte Promotorelement sollte eine TATA-Box in entsprechendem Abstand besitzen.



**Abbildung 2.5:** Der Reportergen-Vektor CaSpeR-AUG- $\beta$ gal (Thummel et al., 1988) entspricht in seiner Funktion im Grunde pwATG-lac1. Der Unterschied besteht darin, daß hier der 5'-untranslatierte Bereich des *Adh*-Gens enthalten ist, die Grenzen des einklonierten Promotorelements können hier etwas freier gewählt werden.



**Abbildung 2.6:** Das Helferplasmid pUCs $\pi\Delta 2-3$  (Mullins et al., 1989; Rio, 1996; Fokta, 1997) trägt eine Hsp70-regulierte P-Element-Transposase, allerdings ohne die terminalen „inverted repeats“, die eine Integration in das Genom erlauben würden („wings clipped“). So wird die Transposase nur für einen kurzen Zeitraum nach der Injektion exprimiert und kann die Integration des Transformationsvektors vermitteln.

in bilden (Langley et al., 1975) und erlaubt aufgrund dieser  $\alpha$ -Komplementation eine blau/weiß-Selektion auf IPTG / X-Gal-haltigen Platten. Die Enden von Restriktionsfragmenten, die nicht kompatibel zur Klonierungsstelle waren, wurden durch Klenow-Enzym aufgefüllt und in die HincII-Restriktionsschnittstelle ligiert. Die Ligation erfolgte grundsätzlich mit T4-Ligase. Für Klonierung in *Drosophila*-Transformationsvektoren wurden in der Regel PCR-Fragmente verwendet, welche mit Primern amplifiziert wurden, die an ihren Enden spezifische Schnittstellen tragen.

## 2.8 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Wirtszellen wurde nach einer modifizierten  $\text{CaCl}_2$ -Methode (Mandel und Higa, 1970) durchgeführt. Alternativ dazu erfolgte die Transformation durch Elektroporation. Um *E. coli* kompetent für die Elektroporation zu machen, wurde eine 500 ml Kultur mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5–0,7 bei 2°C pelletiert und dreimal mit eiskaltem a. bidest gewaschen. Der letzte Waschschritt erfolgte mit eiskaltem 10%igem Glycerin, woraufhin die Zellen in 1 Vol. davon resuspendiert und in 50  $\mu\text{l}$  -Aliquots bei -80°C gelagert wurden. Die Transformation erfolgte in 1 mm Küvetten für 5 ms bei 1400 V, in 2 mm Küvetten bei 2000 V in einem Elektroporations-Impulsgenerator EPI 2500 (Fischer, Heidelberg). Sofort nach dem Puls wurde 1 ml L-Medium hinzugefügt und nach 30 min bei 37°C ein Aliquot von 50–100  $\mu\text{l}$  ausplattiert. Positive Klone wurden durch Plasmidisolierung nach He et al. (1990) und anschließendem Restriktionsverdau bzw. durch Koloniefilter-Hybridisierung (Kapitel 2.11.2) identifiziert. 200  $\mu\text{l}$  jeder positiven Kultur wurden in 2x L-Medium / Glycerin im Verhältnis 1:1 bei -20°C als Dauerkultur gelagert.

## 2.9 DNA-Sequenzierung

Die für die Sequenzierung von DNA eingesetzte Methode beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977) unter Verwendung von vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden („Dye-Terminators“). Für die Sequenzierreaktion wurden zwischen 0,2 und 2 µg superzirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA eingesetzt, welche mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert wurde. Für die Sequenzierung hat sich das „2-step-protocol“ mit den in Tabelle 2.4 aufgeführten Parametern bewährt. Der Ansatz wurde dann mit 1/10 Vol. 3M Natriumacetat pH 6,0 und 2 Vol. Ethanol für 15 min auf Eis gefällt, gewaschen und getrocknet. Die in Formamid gelösten Proben wurden auf einem ABI 373 oder ABI 377 (Perkin-Elmer) elektrophoretisiert, eingelesen und mit der mitgelieferten Analysis-Software automatisch ausgewertet. Die weitere Datenverarbeitung erfolgte mit den Programmen Sequencher 3.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor USA), und BLAST (Altschul et al., 1990).

## 2.10 Markierung von DNA

Die Markierung der DNA wurde radioaktiv mit dem „Random Primed DNA Labeling Kit“ oder nichtradioaktiv mit dem „DIG DNA Labeling Kit“ der Firma Roche (Mannheim) nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für radioaktive genomische Southern-Analysen wurden ca. 1 µg Sonden-DNA und 50–80 µCi  $\alpha^{32}\text{PdATP}$  bzw.  $\alpha^{32}\text{PdCTP}$  eingesetzt. Für „whole mount“ in situ-Hybridisierungen in *D. melanogaster* wurden ca. 200 ng eines Gemischs von cDNAs, welche Großteile des *DmX*-Gens abdecken, mit dem „DIG DNA Labeling Kit“ (Roche, Mannheim) markiert. Zum Ansatz wurden 3 µl pd(N)<sub>6</sub>-Primer (20 mg/ml Pharmacia, Freiburg) hinzugegeben, um kleinere markierte Fragmente zu erzeugen, die eine höhere Gewebegängigkeit aufweisen. Für „whole mount“ in situ-Hybridisierungen in *C. thummi* wurde ein mittels X-large-PCR gewonnenes Fragment des *CpY*-Gens (siehe Kapitel 2.5.2) verwendet. Die Markierung von DNA-Fragmenten für die chromosomale in situ Hybridisierung erfolgte mit dem dem „DIG DNA Labeling Kit“ (Roche, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers.

---

Vordenaturierung:	2 min	96°C
Denaturierung:	10 sec.	96°C
„Annealing“ und Elongation:	4 min	55°C
		25 Zyklen

**Tabelle 2.4:** Parameter des „2-step-protocol“ für die standardisierte DNA-Sequenzierung

## 2.11 Hybridisierungstechniken

### 2.11.1 Southern-Hybridisierung

Der Transfer von DNA-Fragmenten auf Nitrozellulose- oder Nylonfilter erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Southern (1975) in der Anordnung von Sambrook et al. (1989, S. 9.34). Nach Transfer, Fixierung der DNA für 2 h bei 80°C und drei- bis vierstündiger Präinkubation in 2x PM in 6x SSC (Denhardt, 1966) mit 1% SDS erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiven Sonde in 1x PM in 3x SSC mit 0,5% SDS über Nacht bei 60–63°C. Durch mehrmaliges Waschen in 2x SSC bei 60–63°C über 4–6 h wurden nichtgebundene Moleküle der Sonde abgewaschen. Anschließend wurde der Filter getrocknet und bei -80°C mit einem Röntgenfilm und Verstärkerfolie über Nacht oder bis zu 14 Tage exponiert. Bei Verwendung von Nylonmembranen wurden diese nach dem DNA-Transfer eine Stunde bei 120°C angebacken und 1 h in Hybridisierungspuffer ohne Formamid (hergestellt nach Anweisung des AMPPD-Herstellers Roche, Mannheim) bei 65°C inkubiert. Die Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden erfolgte bei 65°C über Nacht, der Antikörpernachweis und die Detektion wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) durchgeführt.

### 2.11.2 Koloniefilter-Hybridisierung

Zur Identifizierung von transformierten Bakterienklonen, die das gewünschte rekombinante Plasmid tragen, wurde die von Grunstein und Hogness (1975) beschriebene Koloniefilter-Hybridisierung eingesetzt. Dazu wurden auf zwei gerasterte Nitrozellulosefilter, welche auf ampicilinhaltigen (100 µg/ml) Agarplatten lagen, an identische Positionen die zu untersuchenden Bakterienkolonien überimpft und diese über Nacht bei 37°C bebrütet. Einer der Nitrozellulosefilter wurde zur Denaturierung der Bakterien-DNA für 7 min auf ein mit 0,5 M NaOH getränktes Filterpapier gelegt, getrocknet und für 5 min auf einem mit 1,5 M Tris/HCl pH 7,4 getränktem Filterpapier neutralisiert. Anschließend wurde der Nitrozellulosefilter für 5 min in 0,5 M Tris/1,5 M NaCl pH 7,4 inkubiert und erneut getrocknet. Nach einer 30 minütigen Behandlung mit Proteinase K (1 mg/ml in 1x SSC), bei der bakterielle Proteine abgebaut werden, wurde die Reaktion durch kurzes Eintauchen des Filters in EtOH gestoppt. Der getrocknete Koloniefilter wurde für 5 min in 0,3 M NaCl inkubiert und anschließend kurz zwischen zwei Blättern Filterpapier gepreßt, um Bakterienreste zu entfernen. Nach dem Fixieren der DNA auf dem Filter durch eine zweistündige Inkubation bei 80°C wurde der Filter in 2x PM in 6x SSC (Denhardt, 1966) mit 1% SDS für mindestens 3 h bei 60°C präinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Hybridisierung mit einer in 1x PM in 3x SSC und 0,5% SDS gelösten radioaktiv markierten Sonde erfolgte über Nacht bei 65°C. Freie, nicht gebundene Sondenmoleküle wurden durch dreimaliges Waschen der Filter in 2x SSC bei 65°C entfernt. Zur Detektion der Signale wurden die getrockneten Koloniefilter mit einem Röntgenfilm und Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

### 2.11.3 Northern-Hybridisierungen

Für Northern-Hybridisierungen wurden zwischen 5–20 µg Gesamt-RNA (siehe Kapitel 2.4.1) auf einem formaldehydhaltigen Agarosegel in 1x MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel photographiert, für 10 min in 20x SSC inkubiert, und die RNA anschließend über Nacht in 10x SSC auf einen Nitrozellulosefilter transferiert (Sambrook et al., 1989). Die weitere Behandlung, wie die Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA und die Detektion der Signale, erfolgte wie unter 2.11.1 beschrieben.

### 2.11.4 „whole mount“ in situ-Hybridisierungen

Die „whole mount“ in situ-Hybridisierung an Embryonen und Ovarien der Arten *D. melanogaster* und *C. thummi* wurden nach einer veränderten Methode von Tautz und Pfeifle (1989) durchgeführt. Zur Fixierung wurden die auf Apfelsaft-Agar Schalen abgelegten *Drosophila*-Eier mit VE-Wasser in ein Sieb gespült, für 3–5 min in 50% Chlorbleiche dechorionisiert, gründlich mit 0,1% Triton X-100 in VE-Wasser gespült und für 30 min auf einem Rotationsschüttler in Fixativ inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Embryonen aus der Interphase zur Devitellinisierung in 4 ml -70°C kaltes Heptan / 90% Methanol-50 mM EGTA (1:1) überführt und bei Raumtemperatur heftig geschüttelt. Nach diesem Schritt sinken die devitellinisierten Embryonen zu Boden, Vitellinmembranen und nicht-devitellinisierte Embryonen verbleiben in der Interphase und wurden verworfen. Nach Entfernung des Überstandes wurde mehrmals mit reinem Ethanol gespült, und die Embryonen darin gegebenenfalls bis zu zwei Monate bei -20°C gelagert. Ovarien wurden direkt nach der Fixierung in PBT überführt. Um die Embryonen für die Hybridisierung vorzubereiten, mußten sie über eine Alkoholreihe von 70%, 50% und 30% in PBT überführt werden. Nach einer zweimaligen Spülung in PBT erfolgte eine Nachfixierung in 4% Paraformaldehyd / PBT für 20 min gefolgt von einer fünfmaligen Spülung in PBT. Um das Gewebe permeabel für die Sonde zu machen, wurde es für 4–6 min in 50 µg Proteinase K/ml PBT anverdaut. Dieser Verdau stellt einen kritischen Schritt dar: Zu langer Verdau kann zur Auflösung der Embryonen während der Hybridisierung führen, zu kurzer Verdau führt zu erhöhtem Hintergrund und einer geringeren Nachweisempfindlichkeit. Aus diesem Grund wurde die Zeit für den Verdau bei jeder Charge Proteinase K neu optimiert. Für Ovarien ist ein Proteinase K Verdau von 10–45 min optimal. Zweimaliges Waschen in 2 mg Glycin/ml PBT beendet den Verdau. Nach zwei Waschschrinen in PBT, einer Nachfixierung, wie oben beschrieben, und entsprechendem Spülen in PBT wurden die Embryonen, bzw. Ovarien einmal in 1:1 mit PBT verdünnter Hyb-Lösung gewaschen, bevor sie 1h bei 48°C in Hyb-Lösung prähybridisierten. Zur Hybridisierung wurden die Embryonen (Ovarien) in 100 µl Hyb-Lösung mit 6 µl Sonde in einem Wasserbad über Nacht auf 48°C gehalten. Ungebundene markierte DNA wurde durch je einmaliges Waschen in Hyb-Lösung in 1:1 in PBT verdünnter Hyb-Lösung und fünfmaliges Waschen in PBT aus den Embryonen (Ovarien) entfernt. Alle Waschschrine dauerten ca. 15 min

bei 48°C. Für den Antikörpernachweis der DIG-markierten DNA wurden die Embryonen (Ovarien) zweimal mit AP-Puffer gespült und in 1 ml AP-Puffer mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phosphat („DIG Detection Kit“ Roche, Mannheim) im Dunkeln gefärbt. Die Reaktion wurde anhand eines Aliquots am Stereomikroskop verfolgt und durch Nachfixierung mit 4% Paraformaldehyd / PBT gestoppt. Zur Aufbewahrung und Beobachtung wurden die Embryonen und Ovarien schließlich erst in 30% Glycerin / PBT und dann in 70% Glycerin / PBT überführt.

### 2.11.5 In situ-Hybridisierung an Polytänchromosomen

Die mikroskopische Lokalisation isolierter DNA-Fragmente auf Polytänchromosomen aus Speicheldrüsen erfolgte unter Verwendung Digoxigenin- und Biotin-markierter DNA-Fragmente und anschließendem immunologischen Nachweis (Langer-Safer et al., 1982) mit FITC- bzw. TRITC-gekoppelten Antikörpern. Einzelheiten findet man bei Hankeln und Schmidt (1987) und Schmidt (1992).

## 2.12 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente im Bereich zwischen 150 bp bis 23 kb wurden nach Zugabe von 1/5 Vol. DNA-Stoppuffer auf verschiedenen großen vertikalen Agarosegelen aufgetrennt, deren Konzentration – je nach gewünschtem Trennbereich – zwischen 0,6% und 1,6% (Sambrook et al., 1989, S. 6.5) betrug. Als Größenstandard dienten HindIII geschnittene DNA des Phagen  $\lambda$  (aus *E.coli* Wa312, siehe Abschnitt 2.3.1.) und AluI geschnittener pBR322 (Bolivar et al., 1977). Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung gefärbt, unter UV-Licht betrachtet und gegebenenfalls mit dem EDAS-System (Kodak) dokumentiert.

## 2.13 Keimbahntransformation von *D. melanogaster*

Die Keimbahntransformation von *D. melanogaster* wurde nach dem Protokoll von Rubin und Spradling (1982) mit einigen Veränderungen durchgeführt. *White*<sup>-</sup>-Fliegen wurden für höchstens 45 min bei 25°C auf Apfelagarschalen belassen. Die resultierenden Eier wurden sofort mit einem Skalpell von der Agarschale entnommen und auf einen auf einem Objektträger fixierten Streifen 3M™-Doppelklebeband transferiert. Neben dem Doppelklebeband befand sich ein Apfelagar-Blöckchen von ca. 1,5 cm Länge. Unter dem Stereomikroskop wurden die Embryonen mittels einer Präpariernadel manuell aus dem Chorion gepellt und auf das Apfelagar-Blöckchen transferiert. Der feuchte Agar verhindert ein Austrocknen der Embryonen während des Dechorionisierens. Waren etwa 50 Embryonen dechorionisiert, konnten die Embryonen auf dem Agarblöckchen in zwei Reihen à 25 derart angeordnet werden, daß das posteriore Ende nach außen zeigte. Embryonen, welche sich bereits im zellulären Blastoderm befanden, wurden dabei aussortiert. Zum Trocknen

wurden die Embryonen mit einem Objektträger, welcher mit einem Streifen doppelseitigen Klebebandes versehen war, vom Agar abgenommen und für ca. drei bis fünf Minuten an der Luft getrocknet. Der Trocknungszustand wurde dabei ständig mit einer Präpariernadel kontrolliert: Begannen die Embryonen beim Darüberstreichen kleine Falten zu werfen, war der optimale Trocknungszustand erreicht und die Embryonen konnten mit Voltalef™S10 Holokarbon-Öl überschichtet und injiziert werden. Die Injektions-Anordnung bestand aus einem Leitz-Mikromanipulator sowie einem Leitz-Kursmikroskop mit Binokulareinblick und Schärferegulierung über den Kreuztisch. So konnten, war einmal die Injektionsnadel im Sichtfeld zentriert und mit dem Mikromanipulator scharfgestellt, die Embryonen nur mit der Schärferegulierung des Mikroskops und dem Kreuztisch auf die Höhe der Nadel gebracht und injiziert werden. Die Injektionsnadeln wurden aus 1 mm Kapillarglas auf einem horizontalen Pipettenpuller der Firma Bachofer (Reutlingen) gezogen und anschließend mit einem Kapillarschleifgerät derselben Firma in einem Winkel von 30° geschliffen. Die resultierenden Nadeln hatten einen Durchmesser von höchstens 1/20 Embryo. Für die Injektion wurde DNA mit dem „Maxi-Plasmid-Prep-Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert und zweimal in 0,5x Dialysepuffer mit 2 Vol. Ethanol gefällt. Die Konzentration des P-Element-Plasmids in der Injektionslösung betrug 1 mg/ml, die des Helferplasmids pUCs $\pi\Delta 2-3$  200  $\mu\text{g/ml}$ . Bei pUCs $\pi\Delta 2-3$  (siehe Abbildung 2.6) handelt es sich um ein sogenanntes „wings clipped“ Helferplasmid, das für die P-Element-Transposase kodiert, jedoch keine vollständigen „inverted repeats“ der P-Elemente trägt, und somit die Fähigkeit, selbst ins Genom zu integrieren, verloren hat. Die Helferplasmid-kodierte Transposase sorgt für die Integration des Transposase-defizienten P-Element-Plasmids in das *Drosophila*-Genom. Die Beladung der Injektionsnadel erfolgte unter dem Mikroskop, indem ca. 1  $\mu\text{l}$  Injektionslösung direkt aus einer Pipetten-Spitze gesaugt wurden. Die injizierten Eier wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei 25°C inkubiert und am nächsten Tag die geschlüpften L1-Larven mit einer Präpariernadel aus dem Öl in ein Anzuchttröhrchen überführt. Adulte injizierte Fliegen konnten mit *white*<sup>-</sup>-Fliegen gekreuzt und deren Nachkommen auf die Expression des verwendeten Markergens (*white*) untersucht werden.

### 2.14 Puffer und Lösungen

Agar-Lösung	5% w/v Sucrose 1,5% w/v Agar-Agar
AP-Puffer	1 ml 5M NaCl 2,5 ml 1M MgCl <sub>2</sub> 5 ml 1M Tris-HCl pH 9,5 50 $\mu\text{l}$ Tween 20 a. bidest. ad 50 ml



---

Denaturierungspuffer (Blot)	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
10x Dialyse-Puffer	0,25 M Tris 3 M NaCl 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA
DNA-Stoppuffer	4 M Harnstoff 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA 0,1 % w/v Bromphenolblau 50 % w/v Saccharose
Drosophila-Zuchtmedium	40 g Agar 90 g Trockenhefe 50 g Sojamehl 400 g Maisgrieß 400 g Malzextrakt 200 g Zuckerrübensirup 25 ml Propionsäure Wasser ad 5 l
10x E-Puffer	0,36 M Tris 0,3 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA
Ethidiumbromid Färbelösung	5 µg Ethidiumbromid / ml in 1x E-Puffer
Fixativ	0,5 ml 20x PBS 1,35 ml 37% Formaldehyd 0,5 ml 0,5 M EGTA 2,65 ml a. bidest. 5 ml Heptan
Guanidin-Lösung	4 M Guanidinthiocyanat 25 mM Natriumcitrat 0,5 % N-Laurylsarcosin 0,1 M β-Mercaptoethanol
Holmes-Bonner	7 M Harnstoff 0,35 M NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA

	2% SDS 10 mM Tris-HCl pH 7,4
Homogenisierungspuffer I	11,6% w/v Saccharose 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 7,4 0,5 mM EGTA pH 7,4 0,06 M KCl 15 mM NaCl 1,5 mM Spermin 0,5 mM Spermidin 15 mM Tris-HCl pH 7,4
Homogenisierungspuffer II	1 Vol. Homogenisierungspuffer I 1/10 Vol. 10x Dialyse-Puffer zu dieser Mischung: 1/4 Vol. 5 M NaClO <sub>4</sub> 1/10 Vol. Tris gesättigt pH 8,5 1/3 Vol. 10%iges SDS
Hyb-Lösung:	5 ml Formamid 2,5 ml 20x SSC 100 µl „Carrier“-DNA (10 mg/ml) 20 µl tRNA (50 mg/ml) 10 µl Tween 20 5 µl Heparin 2,3 ml a. bidest.
Kernisolierungspuffer	0,25 M Saccharose 0,01 M Tris-HCl pH 7,5 1 mM MgCl <sub>2</sub> 3 mM CaCl <sub>2</sub>
L-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml a. dest.
L-Puffer	0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA 0,01 M Tris-HCl 0,02 M NaCl
Lysozymlösung	5 mg/ml Lysozym in 0,25 M Tris-HCl pH 7,5

---

Neutralisierungslösung (Blot)	0,5 M Tris-HCl pH 7,5 3 M NaCl
NZY-Medium, pH 7,5	10 g NZ Amin 5 g NaCl 5 g „Yeast Extract“ 2 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O ad 1 l. a. bidest.
10x PBS (FISH)	200 g NaCl 5 g KCl 5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 27,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 l. a. bidest.
10x PBS („whole mount“ Hybridisierung)	76 g NaCl 77 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 23 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l a. bidest.
1x PBT	1x PBS 0,1% Tween 20
p-Phenylendiamin Lösung	100 mg Phenylendiamin in 10 ml E-Puffer 90 ml Glycerin
1x PM nach Denhardt (1966)	0,02% w/v Ficoll 400 0,02% w/v Polyvinylpyrrolidon 0,02% w/v BSA in 3x SSC
SDS-Mix	2,5% w/v SDS 0,25 M Na <sub>2</sub> EDTA 0,5 M Tris-HCl pH 8,0
SM-Medium	0,1 M NaCl 50 mM Tris-HCl pH 7,5 8 mM MgSO <sub>4</sub> 0,01% w/v Gelatine
20x SSC	3 M NaCl

	0,3 M Natriumcitrat
Sucrose-Lösung	30% w/v Sucrose 0,1% w/v NaN <sub>3</sub>
Suspensionsmedium	50 mM Tris-HCl pH 8,0 25% w/v Saccharose
10x Taq-Puffer	400 mM KCl 100 mM Tris-HCl pH 8,3 15 mM MgCl <sub>2</sub>
20x TBE	1,8 M Tris 1,8 mM Borsäure 25 mM Na <sub>2</sub> EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
TELT-Puffer	50 mM Tris-HCl 62 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2,5 M LiCl 4% v/v Triton X-100
TES	10 mM Tris-HCl pH 7,4 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0 0,2% SDS
Triton X-Mix	50 mM Tris-HCl pH 8,0 62,5 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 8,0 0,2% v/v Triton X-100
Xylencyanol-Puffer	0,25% w/v Bromphenolblau 0,40% w/v Xylencyanol

## 2.15 *E. coli*-Stämme:

HB101: *supE44 ara14 galK2 lacY1 Δ(gpt-proA)62 rpsL20 (Str<sup>r</sup>) xyl-5 mtl-1 recA13 Δ(mcrC-mrr) HsdS<sup>-</sup> (r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>)*

SURE:  $e14^-$  ( $McrA^-$ )  $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171$  *endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5* ( $Kan^r$ ) *uvrC* [ $F'$  *proAB lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10* ( $Tet^r$ )]<sup>c</sup>

Dh5 $\alpha$ : *supE44  $\Delta$ lacU169* ( $\phi 80$  *lacZ $\Delta$ M 15*) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*

RR1: HB101 *recA*<sup>+</sup>

WA312: W3110 ( $\lambda$ CI857 Sam7) *su*

## 2.16 Materialien

Agar-Platten: 15 g Agar-Agar ad 1000 ml L-Medium. Hinzugefügt wird je nach Bedarf: Ampicillin 100  $\mu$ g/ml oder Kanamycin 10  $\mu$ g/ml oder X-Gal 0,01%, IPTG 0,2 mM.

Dialyse-Schläuche (Medicell, London): (für Elektroelution; Durchschnitts-Porenradius: 28 Å, Durchmesser: 15,9 mm): Es wurden ca. 20 cm lange Streifen geschnitten, diese mit Siedesteinen im Becherglas in Natriumcarbonat 50 g/l a. bidest. (2x 10 Minuten) aufgekocht, zwischendurch mit a. bidest. gespült und in 3,72 g EDTA pro l. a. bidest. aufbewahrt.

## 2.17 Bezugsquellen

Nicht aufgeführte Chemikalien der Qualitätsstufen „p. A.“ bzw. „reinst“ wurden von den folgenden Firmen bezogen: Roche (Mannheim), Difco (USA), Fluka (Schweiz), Life Technologies (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Riedel-de Hën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (USA).

Agarosen	Seaplaque LMP: FMC (USA)
	MP: Roche (Mannheim)
Ampicillin	Höchst (Frankfurt)
AMPPD	Roche (Mannheim)
Chlorbleiche	Roth (Karlsruhe)
DIG DNA Labeling Kit	Roche (Mannheim)
DIG-dUTP	Roche (Mannheim)
DNase I	Sigma (USA)
Elektroporationsküvetten	Eurogentec
IPTG	Biomol (Hamburg)
Klenow-Enzym	Roche (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Pharmacia (Freiburg), Roche (Mannheim)
Lysozym	Serva, (Heidelberg)
Mineralöl	Sigma (USA)
3 MM-Papier	Schleicher & Schüll (Dassel)
Nitrocellulosefilter	Schleicher & Schüll (Dassel)

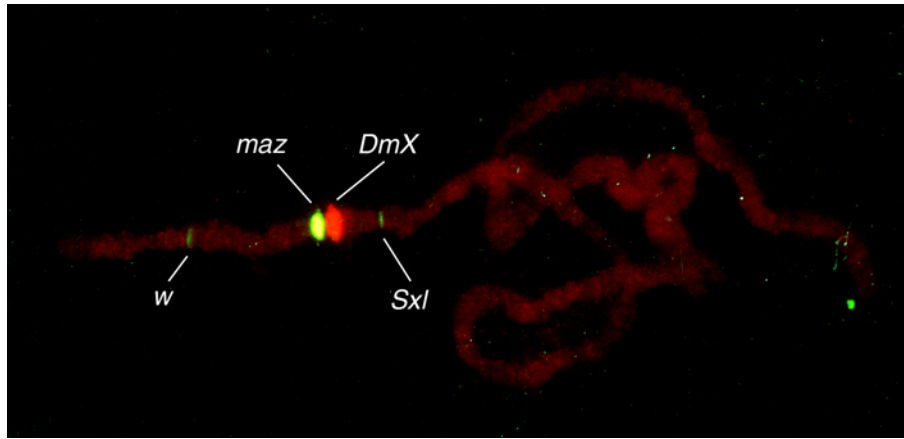
Nylonmembranen	Roche (Mannheim)
$\alpha^{32}\text{PdATP}$ , $\alpha^{32}\text{PdCTP}$	ICN (Meckenheim)
pd(N) <sub>6</sub> -Primer	Pharmacia (Freiburg)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
„QIAprep Spin Miniprep Kit“	Qiagen (Hilden)
„QIAquick PCR Purification Kit“	Qiagen (Hilden)
„QIAquick Gel Extraction Kit“	Qiagen (Hilden)
Random Primed DNA Labeling Kit:	Roche (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen	Roche (Mannheim)
	Pharmacia (Freiburg)
	AGS (Heidelberg)
	Stratagene (Heidelberg)
	USB (USA)
RNase A	Serva (Heidelberg)
Röntgenfilm	X-O-MAT AR: Kodak
Röntgenfilm-Entwicklerkonzentrat	Adefo (Nürnberg)
Röntgenfilmfixierkonzentrat	Adefo (Nürnberg)
Verstärkerfolie (Cronex Hi-Plus)	Dupont; Dr. Goos-Suprema (Heidelberg)
X-Gal	Biomol (Hamburg)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Chromosomale Lokalisierung von *DmX*

Die genaue Lokalisierung des *DmX*-Gens ist in zweierlei Hinsicht von großem Interesse. Zum einen existieren zahlreiche *Drosophila*-Mutanten, bei denen die chromosomale Lage des mutierten Allels bekannt ist, das betreffende Gen jedoch molekular noch nicht charakterisiert werden konnte. Es ist daher wichtig zu überprüfen, ob nicht bereits *DmX*-Mutanten existieren. Zum anderen stellt sich die Frage, ob *DmX* in einer ähnlich interessanten chromosomalen Region liegt wie das Homologe *CpY* aus *C. piger*, welches in einem geschlechtsspezifisch hemizygoten Bereich liegt und eng mit dem dominanten Determinator für das männliche Geschlecht gekoppelt ist (siehe Kapitel 1.2). Um die genaue chromosomale Lokalisation des *DmX*-Gens zu bestimmen, wurden Fluoreszenz-in situ-Hybridisierungen (FISH) an polytären Speicheldrüsenchromosomen von *D. melanogaster* L3-Larven durchgeführt. In einem ersten Versuch wurde gezeigt, daß *DmX* im terminalen Viertel des X-Chromosoms lokalisiert ist (Abbildung 3.1). Um die chromosomale Region näher einzugrenzen, wurden verschiedene Multicolor-FISH-Experimente durchgeführt. Bei der Eingrenzung des chromosomalen Abschnitts, der *DmX* enthält, fanden die X-chromosomalen Gene *white* (*w*), *mazerath* (*maz*) und *Sex-lethal* (*Sxl*) Verwendung. Diese Gene wurden als Sonden ausgewählt, weil ihre chromosomale Position bekannt ist, und diese in der Nähe von *DmX* liegt. Anhand der relativen Abstände der verwendeten Gensonden zum *DmX*-Gen und unter Berücksichtigung des chromosomalen Bandenmusters nach Lindsley und Zimm (1992) wurde die Position von *DmX* auf den Abschnitt 5 des X-Chromosoms festgelegt (Abbildung 3.1).

Um die chromosomale Lage von *DmX* genauer zu bestimmen, wurde untersucht, ob das Gen in verschiedenen Deletionen, Transpositionen oder Duplikationen mit bekannten Bruchpunkten enthalten ist. Durch die Verwendung von Stämmen mit verschiedenen Deletionen, Transpositionen oder Duplikationen mit bekannten Bruchpunkten konnten diejenigen Bruchpunkte, welche am nächsten zum *DmX*-Gen gelegen sind, bestimmt werden. Wenn in Tieren, die für eine bestimmte Aberration heterozygot sind, auf beiden Homologen ein homozygotes *DmX*-Signal nachzuweisen ist, kann daraus geschlossen werden, daß *DmX* außerhalb der Aberration liegt. Ein hemi- oder heterozygotes Signal jedoch zeigt, daß *DmX* zwischen den Bruchpunkten, also innerhalb der Aberration liegen muß. Um die Lokalisation von der Zentromerseite her einzugrenzen, wurden die Deletionen Df(1)JF5 mit den Bruchpunkten 5E8 und 5E6 sowie Tp(1;2)rb<sup>+</sup>71g mit den Bruchpunkten 3F3–5E8 verwendet. Für die Eingrenzung von der Telomerseite fanden die Deletionen Df(1)C149, mit den Bruchpunkten 5A8–A9 und 5C5, sowie Df(1)N73, mit den Bruch-



**Abbildung 3.1:** Lokalisation von *DmX* auf dem X-Chromosom von *D. melanogaster* durch Multicolor FISH. Die grün fluoreszierenden Signale stammen von den Biotin-markierten Fragmenten des *w*<sup>-</sup>, *Sxl*- und *maz*-Gens, die mit FITC-gekoppelten  $\alpha$ -Biotin-Antikörpern detektiert wurden. Um *DmX* von diesen unterscheiden zu können, wurde der *DmX*-Subklon 10.1d (Christman, pers. Mitteilung), welcher das 3'-Ende des Gens enthält, mit DIG markiert und mit TRITC-gekoppeltem  $\alpha$ -DIG-Antikörper nachgewiesen. Die relativen Abstände zu den Genen lassen eine Eingrenzung der *DmX*-Position auf den Bereich 5 des X-Chromosoms zu.

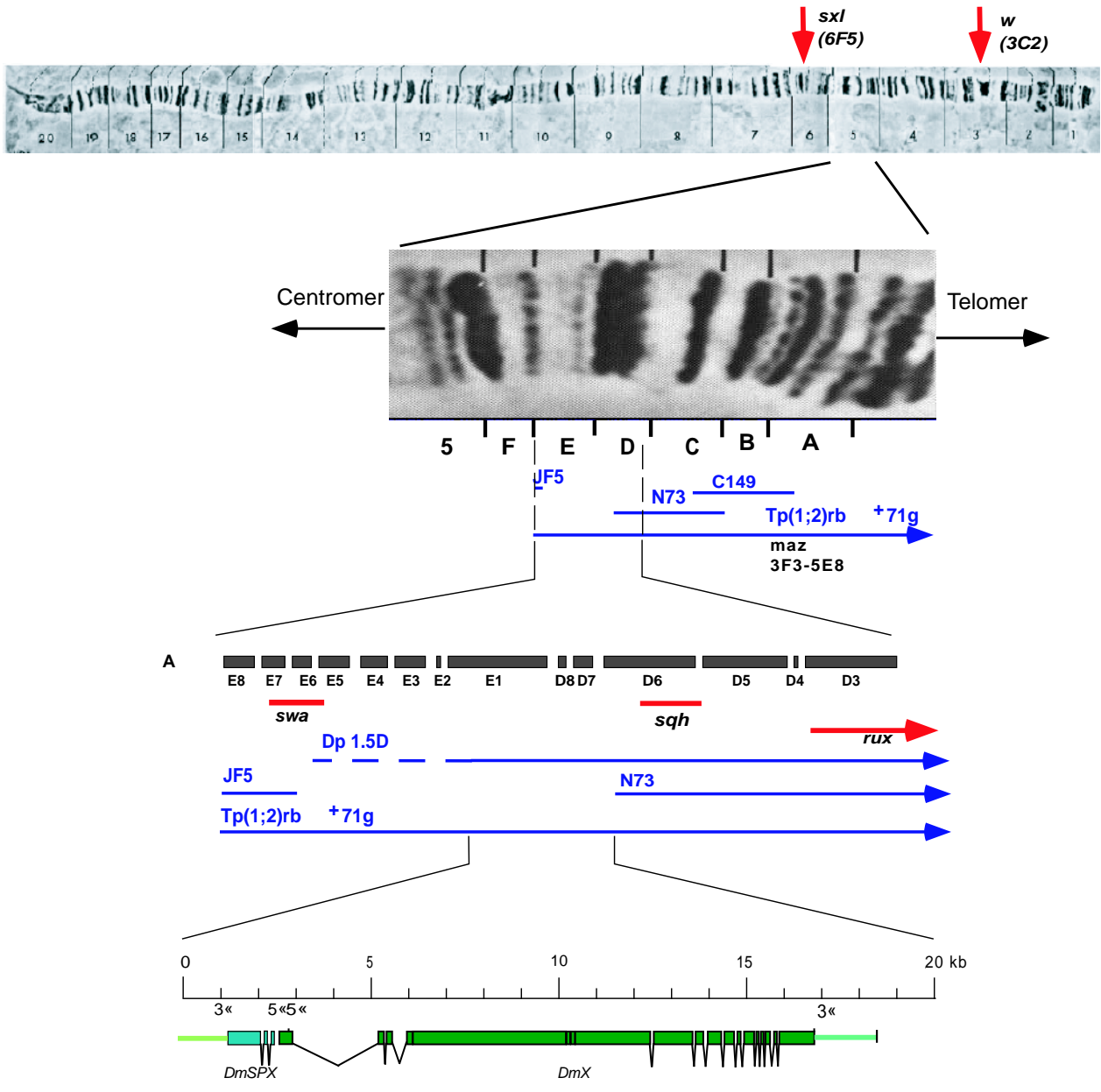
punkten 5C2–5D6, Verwendung (Lefevre, zitiert in Lindsley und Zimm (1992)). Eine Übersichtskarte mit den verwendeten Aberrationen und Genen, sowie deren relative Lage zu *DmX* ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

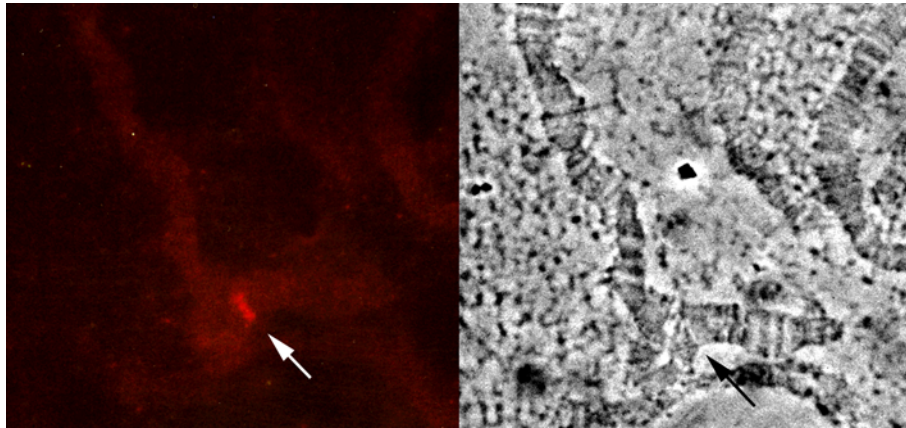
Die Ergebnisse zeigen, daß *DmX* innerhalb der Transposition  $Tp(1;2)rb^+71g$  liegt. Bei dieser Aberration ist der X-chromosomale Bereich von 3F3 bis 5E8 auf das zweite Chromosom transloziert (Lefevre, zitiert in Lindsley und Zimm (1992)). Das *DmX*-Gen liegt in heterozygoten Tieren auf der Schleife (Abbildung 3.3), die bei der Paarung der Homologen durch den inserierten chromosomalen Bereich von 3F3 bis 5E8 des X-Chromosoms in die Region 23A1–23A5 des zweiten Chromosoms gebildet wird. Folglich ist *DmX* telomerwärts von 5E8 lokalisiert.

**Abbildung 3.2 (gegenüberliegende Seite):** Übersicht über die zur Lokalisierung von *DmX* und *DmSPX* verwendeten genetischen Aberrationen und Gene. Die für die Bestimmung des Abschnitts 5 verwendeten Gene *white* (*w*), *roughex* (*rux*) und *Sex-lethal* (*Sxl*) sind mit ihrer Position oben auf der Chromosomenkarte nach Lindsley und Zimm (1992) vermerkt. Im vergrößerten chromosomalen Abschnitt 5 (Mitte) sind die für die Lokalisation von *DmX* in 5D7-E5 verwendeten Deletionen und Transpositionen *Df(1)JF5*, *Df(1)C149*, *Df(1)N73* und  $Tp(1;2)rb^+71g$  dargestellt. Durch die relative Lage von *DmX* zu den Genen *swallow* (*swa*), *spaghetti-squash* (*sqh*) und *roughex* (*rux*) konnte die Position von *DmX* und *DmSPX* schließlich auf 5D6-E1 eingegrenzt werden (Kraemer, pers. Mitteilung).



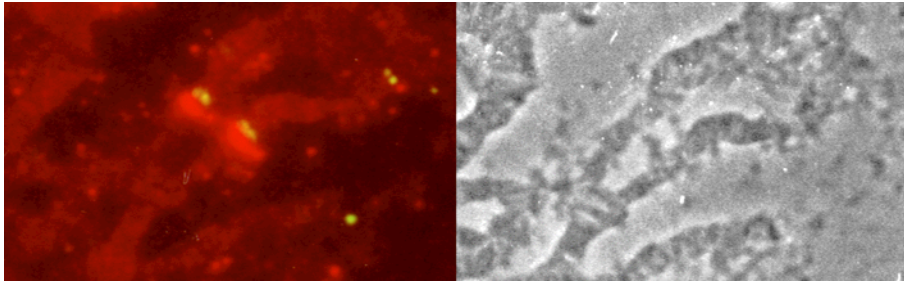
### 3.1 Chromosomale Lokalisierung von DmX



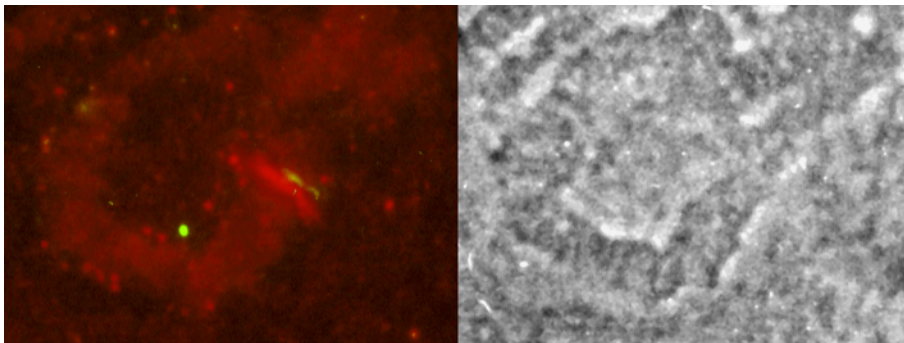


**Abbildung 3.3:** *DmX* liegt innerhalb von  $Tp(1;2)rb^+71g$ . In dem chromosomalen Bereich 23A1–23A5, in den auf dem einen Homologen des zweiten Chromosoms der Bereich 3F3–5E8 inseriert ist, können die Homologen nicht paaren. Das inserierte Chromosomenstück bildet eine Schleife. In dieser Schleife ist *DmX*, dargestellt durch das rote Signal, lokalisiert.

Zur weiteren Eingrenzung wurde eine in situ-Hybridisierung von *DmX* an dem Deletionsstamm  $Df(1)Jf5$  vorgenommen, der eine kleine Deletion im Bereich von 5E8–5E6 trägt (Abbildung 3.2) und sich genau mit dem zentromerwärts gelegenen Ende von  $Tp(1;2)rb^+71g$  deckt. Da in  $Df(1)Jf5$  an beiden Homologen ein *DmX*-spezifisches Signal detektiert werden kann (Kraemer, pers. Mitteilung), muß es telomerwärts von 5E6 liegen. Um eine Eingrenzung der Lokalisation von telomerwärts vorzunehmen, wurde eine Multicolor-FISH von *DmX* zusammen mit dem Gen *roughex* (*rux*), das in 5D1–5D3 liegt, an den Deletionen  $Df(1)C149$  und  $Df(1)N73$  durchgeführt. Es wurde festgestellt, das *DmX* zentromerwärts von *roughex* (D1–5D3) liegt. Beide Gene sind deshalb nicht in der Deletion  $Df(1)C149$  (5A8,A9–5C5) enthalten, sondern weiter zentromerwärts lokalisiert, wie die Hybridisierungsergebnisse zeigen (Abbildung 3.4). Hybridisiert man beide Sonden jedoch an Polytänchromosomen des Deletionsstamms  $Df(1)N73$ , der eine Deletion im Bereich von 5C2–5D6 besitzt, so zeigt das heterozygote Signal von *roughex* in Abbildung 3.5, daß *roughex* innerhalb dieser Deletion liegt, während das homozygote Signal von *DmX* zeigt, daß es im Gegensatz zu *roughex* außerhalb der Deletion, also zentromerwärts von 5D6 liegt.



**Abbildung 3.4:** Hybridisierung von *roughex* (*ru*) und *DmX* an Polytäanchrosomen des Deletionsstamms Df(1)C149. Links sind die Signale von *roughex* (grün) und *DmX* (rot) auf dem X-Chromosom zu sehen. Das Telomer zeigt nach unten. *DmX* liegt demnach zentromerwärts von *ru*. In der Phasenkontrastaufnahme sieht man, daß die Homologen im Bereich der Deletion nicht gepaart sind. Man erkennt, daß beide Signale auf beiden Homologen vorhanden sind, also *ru* und *DmX* nicht in der Deletion Df(1)C149 liegen.



**Abbildung 3.5:** Hybridisierung von *roughex* (*ru*) und *DmX* an Polytäanchrosomen des Deletionsstamms N73. Diese Deletion betrifft den chromosomalen Bereich zwischen 5C2 und 5D6. In diesem heterozygoten Tier sind die Homologen gepaart. Das durchgehende rote Signal zeigt, daß *DmX* auf beiden Homologen vorhanden ist, also nicht in der Deletion Df(1)N73 liegt. Das halb so breite grüne Signal der *roughex*-Sonde zeigt, daß *roughex*, wie aufgrund der publizierten Lokalisation (Thomas et al., 1994) erwartet, in Df(1)N73 liegt.

Weitere Multicolor-FISH, unter der Verwendung der Gene *swallow* (*swa*) und *spaghetti-squash* (*sqh*), welche in der Nähe von 5D6 bzw. 5E6 kartieren, zeigten, daß *DmX* zwischen diesen beiden Genen lokalisiert ist (Kraemer pers. Mitteilung). *DmX* liegt etwas näher zu *sqh*, wodurch die chromosomale Position von *DmX* mit 5D6–5E1 angegeben werden kann (Abbildung 3.2). Die Orientierung von *DmX* relativ zu Zentromer und Telomer wurde durch hochauflösende Multicolor-FISH mit Sonden aus dem 5'- und 3'-Bereich des Gens bestimmt. Dabei hybridisierte die vom 5'-Ende stammende Sonde näher am Zentromer, während die Sonde vom 3'-Ende näher am Telomer hybridisierte. Die Richtung der Transkription von *DmX* verläuft demnach telomerwärts (Kraemer, pers. Mitteilung). Da sich das *DmSPX*-Gen auf molekularer Ebene in unmittelbarer Nähe zu *DmX* befindet, kann die chromosomale Lokalisation von *DmSPX* ebenfalls mit 5D6–5E1 angegeben werden. Die Transkriptionsrichtung von *DmSPX* ist von telomer nach zentromer.

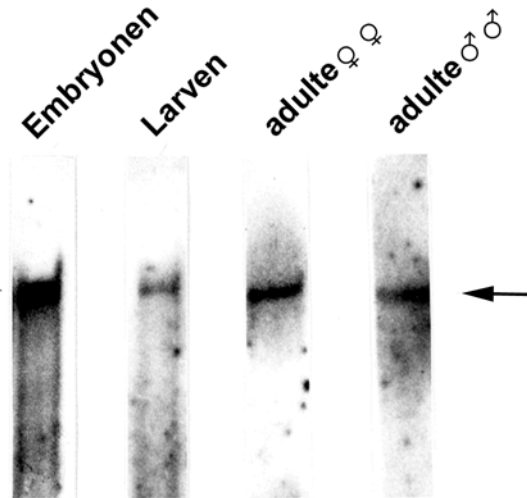
## 3.2 Transkriptionsanalyse von *DmX/CpY*

### 3.2.1 Northern-Analyse der *DmX* -Transkription

Durch Northern-Analysen konnte gezeigt werden, daß *DmX* – ebenso wie das homologe Gen *CpY* aus *Chironomus* – in allen überprüften Entwicklungsstadien (Embryo, Larve, Adulte) transkribiert wird (Kraemer et al., 1998). Dabei konnten *DmX*-Transkripte mit einer Größe von 11,5 kb nachgewiesen werden (Abbildung 3.6). Die durch Northern-Analyse bestimmte Transkriptgröße stimmt gut mit der aus den cDNA-Sequenzen abgeleiteten Größe überein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß *DmX/CpY* vermutlich konstitutiv exprimiert wird. Bei Northern-Blot Analysen konnte erst nach einer Expositionszeit von 14 Tagen eine ausreichende Signalstärke erzielt werden. Die Transkription von *DmX* scheint demnach eher schwach zu sein. Durch „whole mount“ in situ Hybridisierungen und RT-PCR Untersuchungen sollten nun Fragen zur Transkriptmenge und deren Verteilung in verschiedenen Entwicklungsstadien und verschiedenen Geweben näher untersucht werden.

### 3.2.2 *DmX* -Transkription während der Embryonalentwicklung

Der Nachweis von *DmX/CpY*-Transkripten in Geweben erfolgte durch „whole mount“ in situ Hybridisierungen. Dabei hybridisiert eine DIG-markierte einzelsträngige DNA oder antisense-RNA spezifisch an die im Gewebe fixierte nascente RNA. Mit Enzym- oder fluoreszenzgekoppelten anti-DIG-Antikörpern kann die hybridisierte Sonde mittels einer Farbreaktion oder durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Um die vermutlich in niedriger Konzentration vorliegenden *DmX*-Transkripte in den Geweben optimal nachweisen zu können, mußte eine Sonde entwickelt werden, welche einerseits aus kurzen gewebeängigen Polynukleotiden besteht, andererseits dabei einen großen Bereich von *DmX* abdeckt, um eine möglichst hohe Sensitivität des Nachweises zu ermöglichen. Als besonders geeignet hat sich hierfür ein äquimolares Gemisch verschiedener cDNA-



**Abbildung 3.6:** Northern-Analyse der *DmX*-Transkription. 4  $\mu\text{g}$  polyA<sup>+</sup>-mRNA aus *D. melanogaster* Embryonen, L3-Larven sowie aus weiblichen und männlichen Adulten wurden pro Spur eingesetzt. Als Sonde diente ein <sup>32</sup>P-markiertes Gemisch von cDNA-Fragmenten des *DmX*-Gens. Nach 14 Tagen Expositionszeit konnte in allen getesteten mRNA-Präparationen ein Transkript der erwarteten Größe von 11,5 kb detektiert werden (Kraemer, pers. Mitteilung).

Fragmente erwiesen, welche in ihrer Gesamtheit nahezu das vollständige Gen repräsentieren. Für jede Markierung wurden ca. 500 ng dieses Gemisches verwendet.

*DmX*-Transkripte lassen sich in allen Stadien der Embryonalentwicklung nachweisen (Abbildung 3.7). Die schwache, aber immer vorhandene gleichmäßige Hintergrundfärbung deutet auf eine schwache ubiquitäre Transkription hin. Mit heterologer markierter DNA läßt sich diese Hintergrundfärbung nicht erzielen, sie scheint also *DmX*-spezifisch zu sein. Vom ubiquitären Signal hebt sich jedoch ein gewebespezifisches Muster ab: Eine stadienspezifische Konzentration von *DmX*-Transkripten ist in den Mitteldarmvorläufern, einzelnen segmentalen Zellen und Segmentbereichen sowie im Zentralnervensystem (ZNS) und den Anlagen von Sinnesorganen im Kopfbereich zu finden. Die frühesten Anzeichen für eine lokale Konzentration von Transkripten sind im zellulären Blastoderm zu erkennen. Hier ist die Färbung am posterioren Pol eindeutig stärker als im restlichen Embryo (Abbildung 3.7 A). Die nachgewiesene RNA liegt hier aber nicht in den Polzellen selbst, sondern direkt unter der blastodermalen Zellschicht in einem Bereich, aus dem der posteriore Mitteldarm-Vorläufer hervorgeht. Die spezifische Anfärbung des posterioren Mitteldarmvorläufers läßt sich durch die gesamte Embryonalentwicklung hindurch verfolgen. Auch in den zeitlich versetzt entstehenden anterioren Mitteldarmvorläufern ist das Transkript lokalisierbar (Abbildung 3.7 B). Hierbei sind besonders die in den Dotter einwachsenden terminalen Enden der Mitteldarm-Vorläufer markiert. Während die Vorläufer zusammenwachsen, dehnt sich die Färbung auf den gesamten Mitteldarm-Bereich

aus. Ab Stadium 17, in dem die Differenzierung des Verdauungstraktes weitgehend abgeschlossen ist, ist ein Nachlassen der *DmX*-Transkription im Mitteldarmbereich zu beobachten, dagegen nimmt die Färbung im Enddarm gegen Ende der Embryonalentwicklung beträchtlich zu (Abbildung 3.7 F). *DmX*-Transkripte können im Nervensystem zunächst in selektiv gefärbten einzelnen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.7 C). Bei der Durchsicht mehrerer Hundert gefärbter Eier, welche während der ersten 4 Stunden der Embryonalentwicklung gesammelt worden waren, konnten jedoch nur einige wenige Tiere mit diesem Muster beobachtet werden. Diese zellspezifische Expression scheint also auf ein kurzes Zeitfenster der Neurogenese beschränkt zu sein. Die zellspezifische Färbung geht schnell in eine mehr oder weniger gleichmäßige Färbung des ZNS über, deren Intensität zum Ende der Embryogenese hin zunimmt.

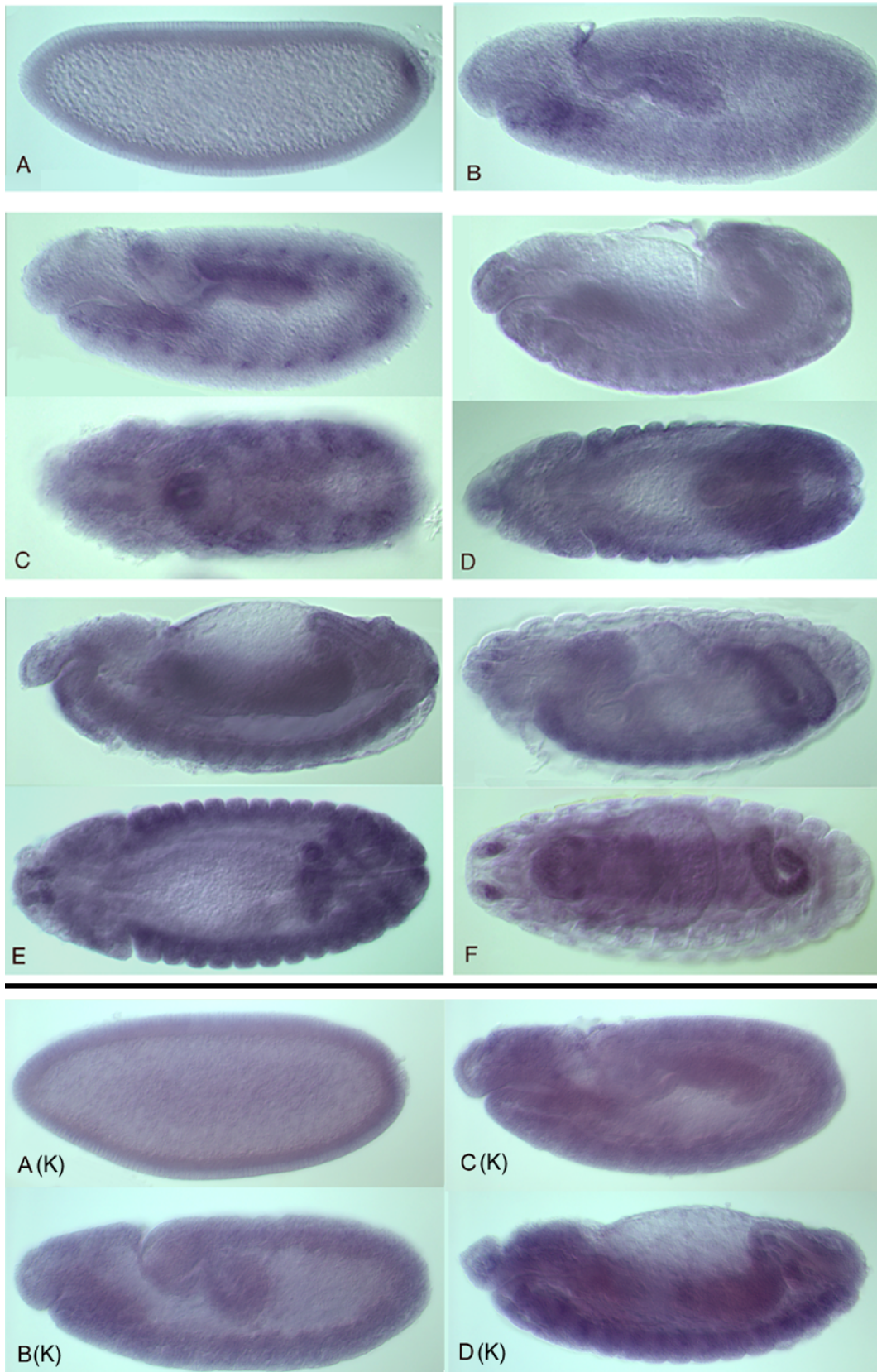
Eine segmentale Verteilung der Transkripte kann, wenn auch schwach, anhand einer Filet-Präparation des ZNS von Embryonen im Stadium 17 auch in den ersten drei Segmenten hinter den Loben nachgewiesen werden (Abbildung 3.8).

Ab Stadium 14 finden sich *DmX*-Transkripte außerdem noch in zwei eng begrenzten Arealen im Kopfbereich. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Gewebeabschnitte, aus denen später periphere Sinnesorgane entstehen, wie z. B. der Antenna-Maxillar-Komplex (Abbildung 3.7 F und 3.9). Zu dem Zeitpunkt, an dem kurzfristig die spezifische Anfärbung einzelner Zellen im ZNS beobachtet werden kann, ist noch ein zweites segmentales Muster erkennbar (Abbildung 3.7 C). Dieses Muster ist jedoch nicht auf einzelne Zellen beschränkt, sondern schwächer und diffuser. Die beiden segmentalen Muster überlagern sich nur im anterioren Teil des Embryos, weiter posterior weichen die Positionen der segmentalen Färbungen voneinander ab. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem diffusen segmentalen Muster um diejenigen Bereiche des Ektoderms, welche die Vorläufer der Tracheenanlagen darstellen, denn mit Entwicklung der Tracheen und der damit verbundenen Invaginierung dieser Bereiche geht eine entsprechende Veränderung des *DmX*-Transkriptionsmusters einher (Abbildung 3.7 C). Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß *DmX* neben einer schwachen Transkription in allen Zellen während der Embryonalentwicklung insbesondere im Vorder-, Mittel- und Enddarm, sowie im ZNS ein intensives gewebespezifisches Muster zeigt, das sich deutlich von dem Muster ubiquitär exprimierter Gene, wie z. B. der *GAPDH* (Abbildung 3.7, A(K)–D(K)) unterscheidet.

**Abbildung 3.7 (gegenüberliegende Seite):** *DmX*-mRNA Lokalisierung in *D. melanogaster* Embryonen durch „whole mount“ in situ Hybridisierung. Als Sonde wurde ein Gemisch von cDNAs verwendet, welche über das gesamte *DmX*-Gen verteilt sind. Der Nachweis der DIG-markierten Sonde erfolgte mit alkalischer Phosphatase-gekoppelten  $\alpha$ -DIG-Antikörpern. Als Färbereagenzien wurden NBT und X-Phosphat verwendet. In Stadium 5 werden *DmX*-Transkripte verstärkt am posterioren Pol detektiert (**A**). Die Polzellen selbst scheinen kein Hybridisierungssignal zu zeigen. (**B**). In Stadium 10 zeigen die anterioren und posterioren Mitteldarm-Vorläufer, sowie der Enddarm-Vorläufer einen erhöhten Gehalt an *DmX*-Transkripten. Während Stadium 11 (**C**) und 12 (**D**) verstärkt sich dieses Signal in den Mitteldarm-Vorläufern. Zusätzlich zeigen für eine kurze Zeit einzelne segmental angeordnete Zellen eine starke Färbung. (**E**) Im Stadium 14 wachsen die anterioren und posterioren Mitteldarmvorläufer zusammen und zeigen eine hohe Konzentration an *DmX*-Transkripten. (**F**) Embryonen, die sich im Stadium 17 befinden, transkribieren *DmX* im Zentralnervensystem, im Enddarm, sowie in definierten Arealen im Kopfbereich. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Anlagen peripherer Sinnesorgane. *DmX*-Transkripte können während aller embryonalen Stadien in Form einer ubiquitären Hintergrundfärbung nachgewiesen werden (**A-F**).

Als Vergleich zur *DmX* -Färbung wurde eine „whole mount“ Hybridisierung mit der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) durchgeführt, welche als ein Enzym der Glycolyse konstitutiv exprimiert wird. Im zellulären Blastoderm (Stadium 5, **A(K)**) ist eine gesteigerte Transkription an der gesamten Peripherie des Embryos zu beobachten. Während der Invagination der Darm-Vorläufer (Stadium 10, **B(K)**) ist das Expressionsmuster ähnlich der *DmX*- und *DmSPX*-Transkription. In den späteren Stadien 12 (**C(K)**) und 14 (**D(K)**) färben alle Gewebe des Embryos in sehr gleichmäßiger Stärke



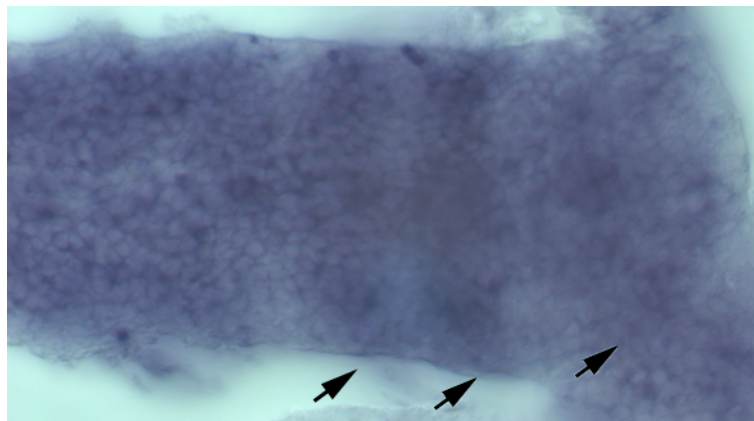




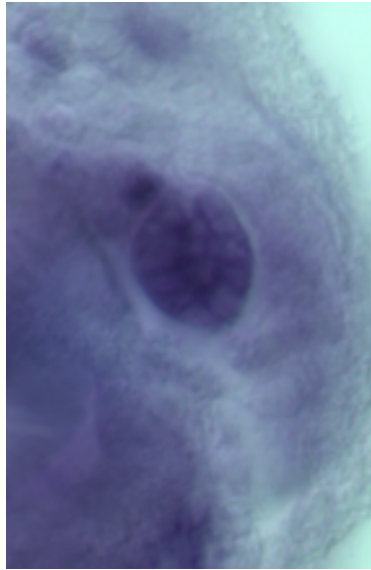
### 3.2.3 *DmX/CpY* in der Oogenese

Die *DmX/CpY*-Transkription während der Oogenese wurde durch „whole mount“ in situ Hybridisierung an Ovarien aus adulten Tieren von *D. melanogaster* und *C. thummi* näher untersucht. Die Anatomie der Eikammern unterscheidet sich bei *D. melanogaster* und *Chironomus*. Bei *D. melanogaster* sind 15 Nährzellen und eine Eizelle durch Zytoplasma-Kanäle (Fusome) miteinander verbunden, über die sie in regem Stoffaustausch stehen. Die 16 Zellen liegen einer Hülle aus kleineren Follikelzellen. Die Zellkerne von Eizelle und Nährzelle sind mehr oder weniger gleichgroß. *D. melanogaster* legt kontinuierlich Eier und die Oogenese erfolgt in den einzelnen Ovariolen nicht synchronisiert, d. h. man kann in einem Ovar alle möglichen Entwicklungsstadien von Oozyten antreffen. Bei *Chironomus* erfolgt die Versorgung der Eizelle lediglich durch eine große Nährzelle, deren Kerngröße die der Eizelle um ein vielfaches übertrifft. Nähr- und Eizelle sind ebenfalls von einer Hülle aus Follikelzellen umgeben. Da *Chironomus* nur ein- bis zweimal im Leben ein Gelege abgibt, die Oogenese also synchronisiert abläuft, sind in einem Ovar nur Eier eines oder zweier Entwicklungsstadien anzutreffen (vgl. Abbildung 3.12).

Es stellte sich heraus, daß *CpY/DmX* -Transkripte nahezu während der gesamten Oogenese von den Nährzellen produziert werden und einem Transport in die Oozyte unterliegen. Bei *Drosophila* sind *DmX* -Transkripte erst im Germarium nachweisbar, nachdem die Ausbildung von Eikammern initiiert worden ist (Abbildung 3.10 links oben). Mit dem Verlaufe der weiteren Entwicklung der Eikammern geht ab Stadium 4 (S4) eine Verstärkung der *DmX* -Transkription in den Nährzellen einher. Zu diesem Zeitpunkt ist die Transkriptmenge in den 15 Nährzellen und der Eizelle gleichmäßig verteilt. Ob dabei die Eizelle selbst *DmX* transkribiert, oder ob die Transkripte der Nährzellen bereits zu die-



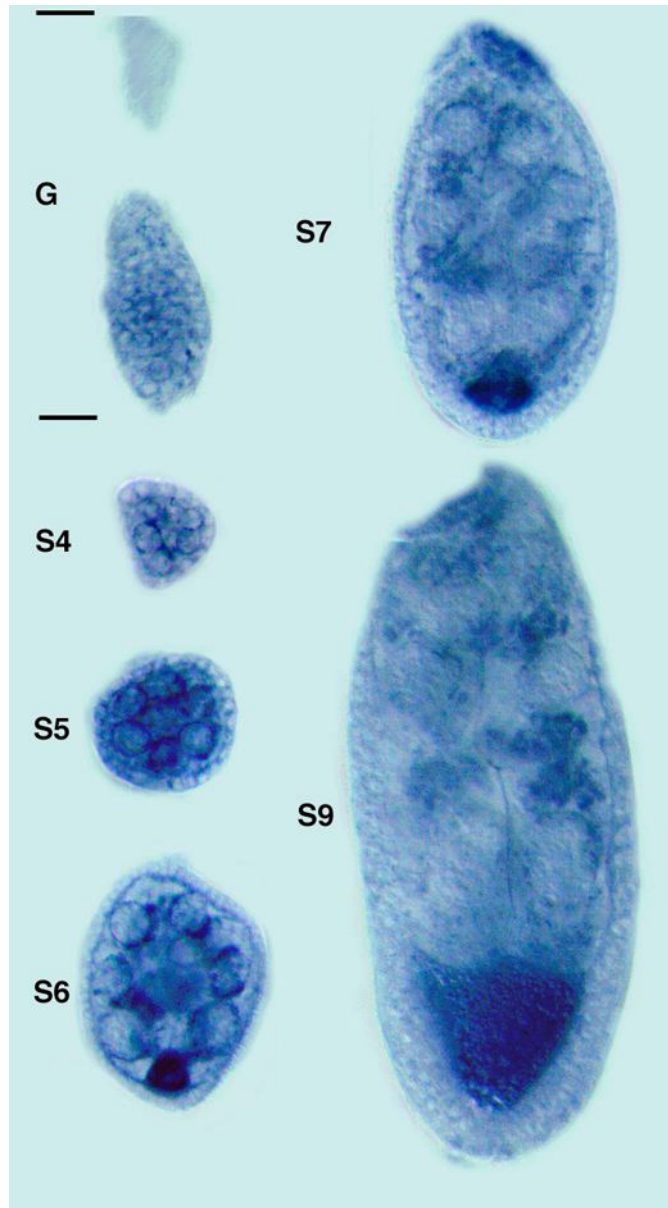
**Abbildung 3.8:** Filet-Präparation des ZNS eines *D. melanogaster* Embryos im Stadium 17 nach „whole mount“ in situ Hybridisierung mit einer DIG-markierten cDNA-Mixtur des *DmX* -Gens. Das ZNS zeigt durchgängig eine Färbung, was auf eine ubiquitäre Verteilung von *DmX* -Transkripten schließen läßt. Im Bereich hinter den Loben sind die Transkripte segmental konzentriert.



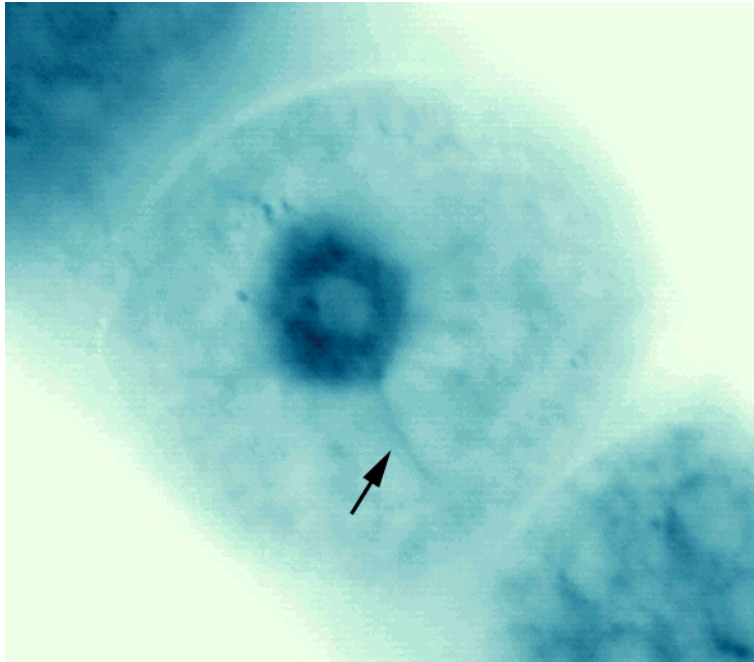
**Abbildung 3.9:** Filet-Präparation des anterioren Teils eines *D. melanogaster* Embryos im Stadium 17 nach „whole mount“ in situ Hybridisierung. Bei den zwei deutlich abgegrenzten Arealen mit verstärkter *DmX* -Transkription handelt es sich wahrscheinlich um die Anlagen des Antenna-Maxillar-Komplexes.

ser Zeit in die Eizelle importiert werden, ist unklar. Eizelle und Nährzellen unterscheiden sich in diesem Stadium nicht durch ihren Gehalt an *DmX* -Transkripten. Ab Stadium 5 (S5) jedoch zeichnet sich die Eizelle durch eine deutlich erhöhte *DmX* -Transkriptmenge aus und kann so unzweifelhaft von den Nährzellen unterschieden werden. Die höchste Konzentration an *DmX* -Transkripten in der Eizelle ist während Stadium 6 und 7 zu beobachten (Abbildung 3.11). In der rapide wachsenden Eizelle, in die nun auch zunehmend Dotter eingelagert wird, ist die Verteilung der Transkripte gleichmäßig, es wird kein Gradient ausgebildet. Mit zunehmender Größe der Eizelle wird die Färbung schwächer und es hat den Anschein, daß eine konstante Anzahl von *DmX* -Transkripten in der wachsenden Eizelle verdünnt wird. Allerdings kann auch ein Zusammenhang zwischen der zunehmenden Bildung der Chorionhülle um das Ei, welche für die Sonde eine impermeable Barriere darstellen könnte, und der schwachen Färbung im reifen Ei nicht ausgeschlossen werden.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch an adulten Ovarien von *C. thummi* durchgeführt. Als Sonde diente hierzu das vollständig in pUC18 klonierte *CpY*-Gen (Weil et al., 1995), welches auf die übliche Weise für die „whole mount“ in situ Hybridisierung markiert wurde. Die Ovarien wurden nach dem gleichen Protokoll wie die *D. melanogaster*-Ovarien für die Hybridisierung vorbereitet. Im Germarium, sowie bei Beginn der synchronisierten Eikammer-Entwicklung, konnten keine *CpY*-Transkripte nachgewiesen werden (Abbildung 3.12). In den folgenden Entwicklungsstadien ergab sich ein ähnliches Bild wie in *D. melanogaster*: In Eikammern, in denen die Differenzierung der Eizelle beginnt,



**Abbildung 3.10:** Lokalisierung von *DmX*-mRNA im adulten Ovar aus *D. melanogaster*. Im Germarium (**G**) beginnt nach Initiierung der Eikammerbildung die *DmX*-Transkription. In Eikammern der Stadien 4 (**S4**) und 5 (**S5**) werden *DmX*-Transkripte im Zytoplasma der Oozyte und der fünfzehn Nährzellen detektiert. Im Laufe der Oogenese bis Stadium 9 (**S9**) sammelt sich *DmX*-mRNA in der Oozyte an, während die Färbung der Nährzellen wieder abnimmt. Im weiteren Verlauf der Oogenese nimmt die Färbung der Oozyte mit deren Expansion ab. Die Transkripte sind in der Eizelle gleichmäßig verteilt.



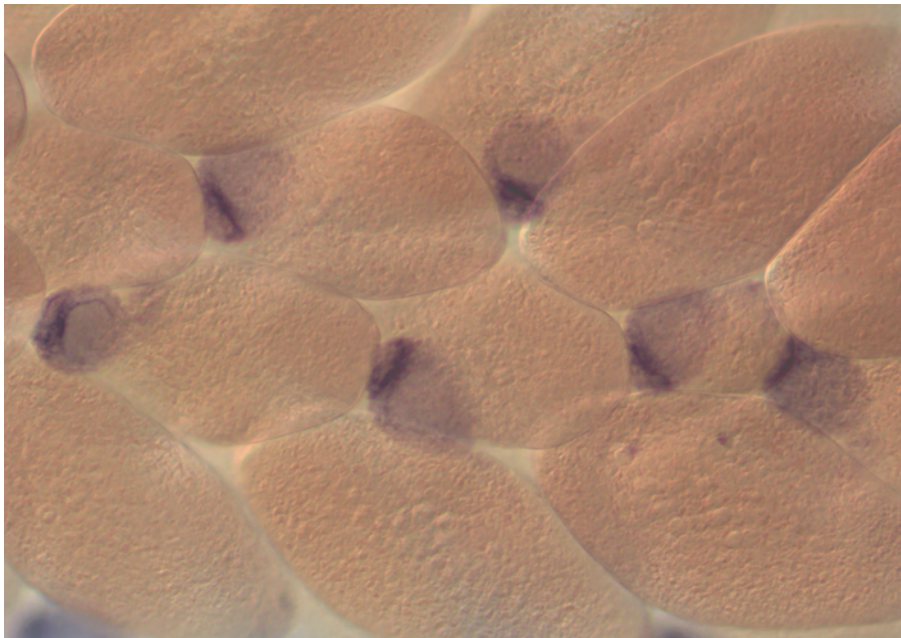
**Abbildung 3.11:** Eikammer im Stadium 6 aus *D. melanogaster* von anterior nach „whole mount“ in situ Hybridisierung. Das Zytoplasma der Eizelle ist sehr intensiv angefärbt. In der Mitte der Zelle ist der heller erscheinende Zellkern deutlich zu erkennen. Weitere *DmX*-Transkripte sind in den zu der Eizelle hinführenden Fusomkanälen zu erkennen (Pfeil). Dies deutet auf einen gerichteten Transport von *DmX*-Transkripten in die Oozyte hin.

bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Eizelle anfängt zu expandieren, ist die höchste Konzentration an *CpY*-Transkripten nachweisbar (Abbildung 3.10 und 3.11). In den expandierenden Eizellen sind keine *CpY*-Transkripte detektierbar. Analog zu *D. melanogaster* könnte die sich bildende Chorionhülle das Eindringen der Sonden in die Zellkammern behindern. Ähnlich wie bei *D. melanogaster* findet in der *Chironomus*-Eikammer ein gerichteter Transport von Transkripten in die Eizelle statt. Bevor die Eizelle zu expandieren beginnt (Abbildung 3.13), befinden sich die meisten Transkripte auf der Seite der Nährzelle, die der Eizelle zugewandt ist. Ebenso befinden sich die Mehrzahl der Transkripte in der Eizelle auf der Seite, welche an die Nährzelle angrenzt. Dieses Bild läßt einen gerichteten Transport der mRNA vom Nukleus der Nährzelle in das Zytoplasma der Eizelle vermuten. Der Kern der Eizelle ist aufgrund seiner geringen Größe in den *Chironomus*-Eikammern nur nach DAPI-Färbung zu erkennen (Ergebnis nicht abgebildet). Insgesamt ergibt sich also im Vergleich der beiden Spezies *D. melanogaster* und *C. thummi* ein ähnliches Bild: *DmX/CpY* wird im Ovar stark transkribiert. Die Abnahme der Transkriptkonzentration in den Nährzellen, die massive Anreicherung der Transkripte in der Oozyte, sowie die Lokalisation der mRNA in *Chironomus* zwischen Nährzellkern und Oozyte sprechen dafür, daß es sich bei *DmX/CpY* um eine maternale „Message“ handelt. Ob *DmX*-Mutanten

auch einen maternalen Effekt aufweisen, bei dem aufgrund des Fehlens maternaler Transkripte die Nachkommen einen Phänotyp aufweisen, ist noch nicht geklärt.

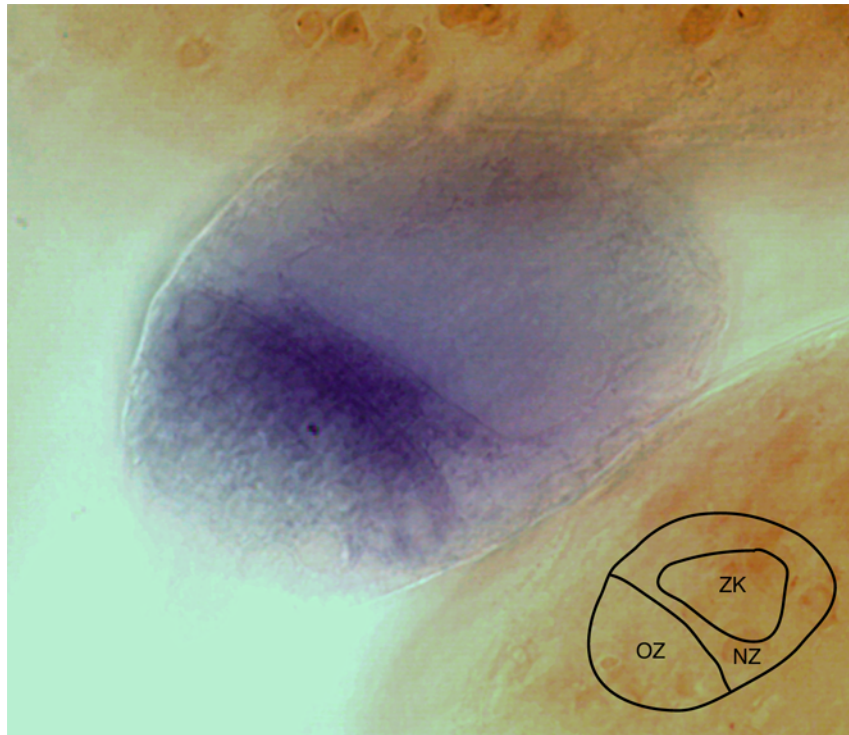
### 3.2.4 *CpY* und differentielles Spleißen

Bei *CpY* konnten zwei differentiell gespleißte Exons identifiziert werden (Kraemer, 1994). Dabei handelt es sich um Exon 4 und Exon 8. *DmX* und *CpY* unterscheiden sich in ihrer Exon/Intron-Struktur. Der zu Exon 4 homologe Bereich des *DmX*-Gens kann nicht differentiell gespleißt werden, weil er integrativer Bestandteil eines größeren Exons ist. Ein homologer Genabschnitt zu Exon 8 des *CpY*-Gens existiert bei *DmX* und *F54E4.1* nicht. Um der Frage nachzugehen, ob die Exons 4 und 8 gewebespezifisch gespleißt werden, wurden exonspezifische RT-PCRs durchgeführt. Dabei können mit einem Primerpaar zwei mögliche Produkte amplifiziert werden, je nachdem, ob ein Exon herausgespleißt wird, oder nicht. Daß die differentiellen Transkripte nicht überall gleichmäßig verteilt sind, wurde bereits von Kraemer (1994) gezeigt. Um Unterschiede in der Transkriptverteilung zu finden, wurden zunächst Kopf, Thorax und Abdomen von Tieren eines Geschlechts (Männchen) untersucht. Die reverse Transkription wurde mit dem Primer SR5 durchgeführt. Für die anschließende Exon 8 spezifische PCR wurden die Primer SR2 und



**Abbildung 3.12:** Ausschnitt aus einem *Chironomus*-Ovar nach „whole mount“ in situ Hybridisierung im einer *CpY*-Sonde. In diesem Ovar befinden sich zwei in ihrer Entwicklung synchronisierte Generationen von Oozyten, von denen nur die jüngere Hybridisierungssignale aufweist. Die Transkripte sind an der Grenze zwischen Nähr- und Eizelle lokalisiert.

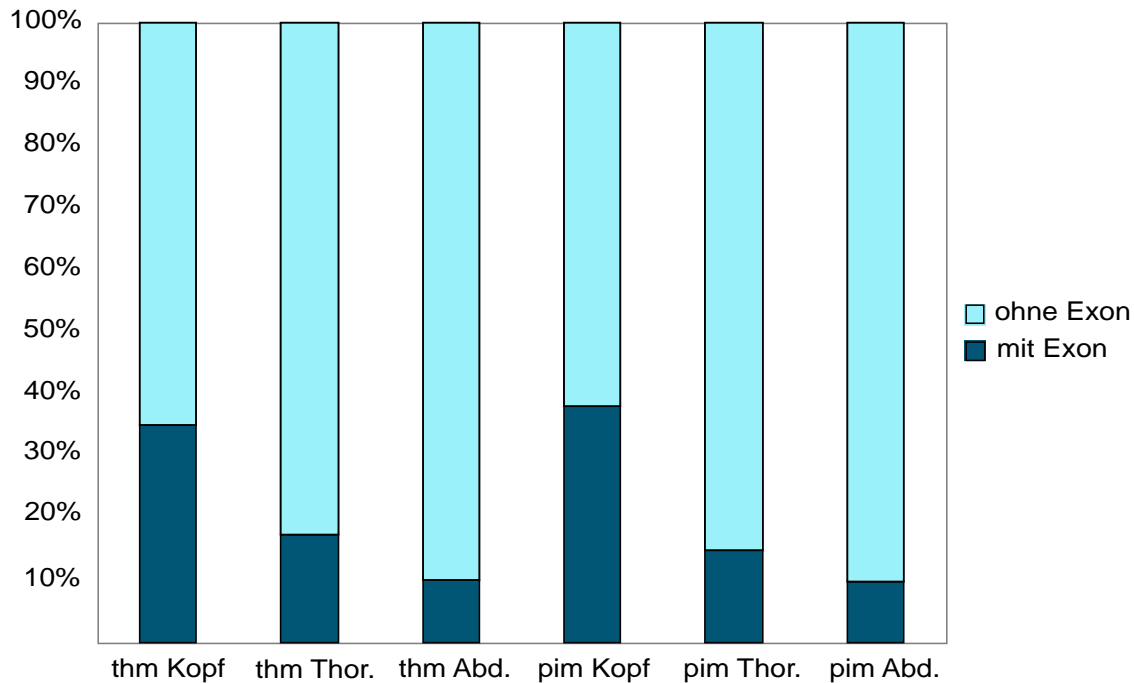




**Abbildung 3.13:** Detailaufnahme einer Eikammer der zweiten Generation aus einem *Chironomus* Ovar. Deutlich ist der große Kern der Nährzelle zu erkennen, auf dessen proximaler Seite eine Konzentration von *CpY*-Transkripten vorliegt. Kontrastreich gefärbt ist auch die Membran, an der Ei- und Nährzelle in Kontakt stehen. In der Eizelle sind die Transkripte diffus verteilt.

SR49 ausgewählt. Im Falle der Amplifikation genomischer DNA würde ein Produkt von 1044 bp, bei Amplifikation von cDNA mit Exon 8 ein Produkt von 360 bp und ohne Exon 8 ein Produkt von 276 bp erwartet werden. Ein Vergleich der relativen Färbintensitäten der PCR-Produkte nach Gelelektrophorese (Abbildung 3.14) zeigt, daß in den adulten Männchen ein Gradient in der Verteilung der differentiell gespleißten Transkripte besteht. Obwohl bei der Mehrzahl der Transkripte Exon 8 herausgespleißt wird, ist der relative Anteil von Transkripten mit Exon 8 im Kopf am höchsten und im Abdomen am niedrigsten.

Der Befund von Kraemer (1994), daß generell die Mehrzahl der Transkripte Exon 8 nicht enthält, konnte ebenso bestätigt werden, wie ein geschlechtsspezifischer Dosisunterschied. In Männchen ist der Prozentsatz der Transkripte, die Exon 8 enthalten, höher als in Weibchen. In Ovarien konnten durch RT-PCR keine Transkripte mit Exon 8 nachgewiesen werden. Wenn doch Transkripte mit Exon 8 vorhanden sind, so muß ihre Zahl unter der Nachweisgrenze des Versuchsansatzes liegen (siehe Abbildung 3.15). Aus cDNA von kultivierten *C. thummi*-Zellen konnten ebenfalls keine Transkripte mit Exon 8 amplifiziert werden. Im Gegensatz zu Exon 8 findet man Transkripte mit und ohne Exon 4 in

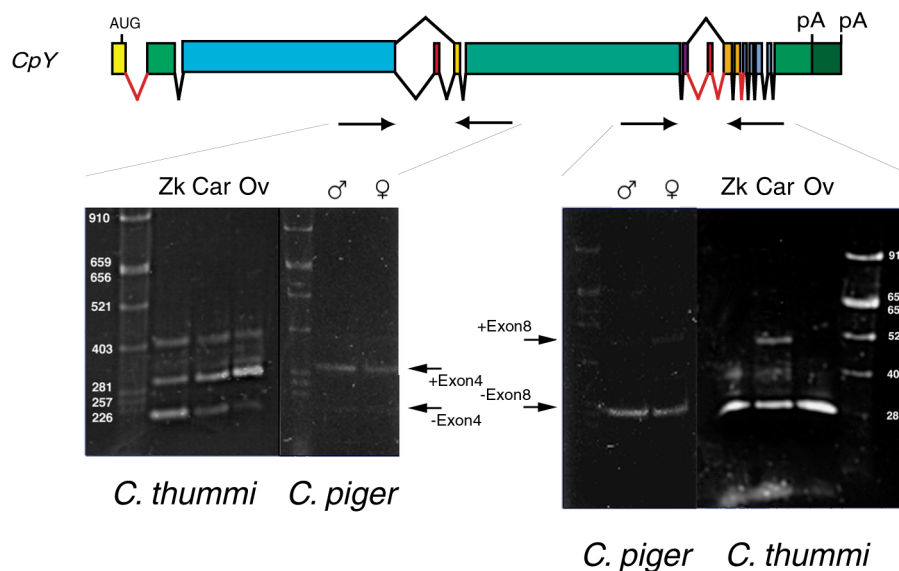


**Abbildung 3.14:** Verteilung des differentiell gespleißten Exon 8 aus *CpY* in Kopf, Thorax (Thor.) und Abdomen (Abd.) von *C. thummi* (thm) und *C. piger* (pim) Männchen. Um die relativen Unterschiede in der RT-PCR der differentiell gespleißten Exons auch bei unterschiedlicher Ausbeute an PCR-Produkten vergleichen zu können, wurden die absoluten Intensitäten der Gelbanden gemessen. Die DNA-Proben wurden dabei nicht mit Bromphenolblau versetzt, sondern mit 60% Saccharose, um die Ethidiumbromid-Floureszenz nicht zu beeinflussen. Die Fluoreszenz-Intensitäten aller Banden einer Spur wurden addiert. Der Prozentsatz der Intensitäten der einzelnen Banden an der Gesamtintensität einer Spur konnte so direkt verglichen werden. Diese Prozentangaben beziehen sich auf die relative Färbeintensitäten und nicht auf die tatsächliche Anzahl von Transkripten. Die Mehrzahl der Transkripte im ganzen Körper enthält kein Exon 8. Die Anzahl der Transkripte jedoch, welche Exon 8 enthalten, ist im Kopf am höchsten und nimmt zum Abdomen hin ab. Die Übereinstimmung der Ergebnisse in *C. thummi* und *C. piger* bestätigt die Anwendbarkeit dieser Methode.

allen bei *Chironomus* untersuchten Geweben und Entwicklungsstadien. Ein geschlechts-spezifischer Dosisunterschied konnte hier, wie auch bei Kraemer (1994), nicht festgestellt werden. Der prozentuale Anteil der Transkripte mit und ohne Exon 4 kann von Gewebe zu Gewebe schwanken. Im Männchen ist die Verteilung im Kopf, Thorax und Abdomen gleichmäßig. In Weibchen jedoch ist der Anteil der Transkripte mit Exon 4 im Ovar deutlich erhöht (Abbildung 3.15). Im Gegensatz zu diesen Befunden überwiegt in Zellkulturzellen die Anzahl der Transkripte ohne Exon 4. Welche Funktion dem differentiellen Spleißen beim *CpY*-Gen zukommt, ist bisher noch nicht geklärt.

### 3.2.5 Isolierung regulatorischer Bereiche für die Transkription mit Reporter genen und RT-PCR

Die Charakterisierung des Promotorbereichs und anderer regulatorischer Elemente eines Gens ist für dessen Funktionsanalyse sehr wichtig. Zum einen ist der Promotor / Enhancer die Voraussetzung für die Konstruktion eines Rettungsvektors, der eine voll funktionfähige Genkopie enthalten muß, damit er für die Identifikation und Rettung von Mutanten eingesetzt werden kann. Zum anderen ist der Promotor / Enhancer für die Durchführung von Experimenten mit Reporter genen notwendig. Um mögliche regulatorische Bereiche des *DmX/CpY*-Gens zu identifizieren, wurden Konstrukte angefertigt, welche verschie-



**Abbildung 3.15:** Nachweis von Transkripten mit den differentiell gespleißten Exons 4 und 8 im Ovar und weiblichen Carcasses, sowie in Zellkulturzellen von *C. thummi*. Die Transkriptverteilung von Exon 4 in weiblichen Carcasses stimmt mit der im Männchen überein. Im Ovar ist der Anteil Exon 4 enthaltender Transkripte deutlich erhöht, in Zellkulturzellen deutlich erniedrigt. Exon 8 enthaltende Transkripte konnten nicht aus Ovarien und Zellkulturzellen amplifiziert werden.



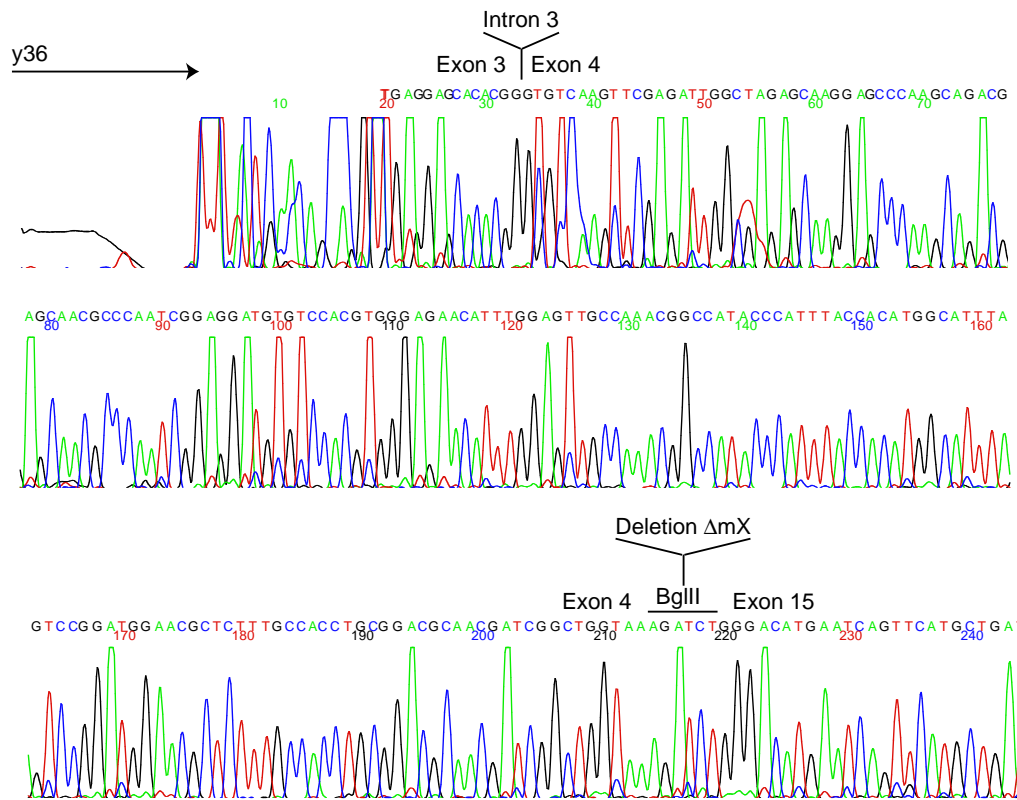
den große Abschnitte potentiell regulatorischer Elemente des *DmX/CpY*-Gens enthalten. Es wurden zwei verschiedene Reporter Gene ausgewählt, die hinter den potentiell regulatorischen Bereich kloniert wurden. Reicht der regulatorische Bereich für die Aktivierung des Reporter Gens aus, kann dessen Produkt durch eine Enzym- oder Fluoreszenzaktivität, beziehungsweise immunhistochemisch nachgewiesen werden. Alternativ zu einem exogenen Reporter Gen wurde ein verändertes *DmX*-Gen verwendet, das eine große Deletion im kodierenden Bereich enthält. Der Nachweis von Transkripten erfolgte in diesem Fall durch RT-PCR und Sequenzierung des Produktes. Die Konstrukte wurden durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation von *D. melanogaster* eingeführt und resultierende transgene Fliegen auf eine Aktivität des Transgens hin untersucht.

### Der Vektor pCosPer $\Delta$ mX-2

Um herauszufinden, ob der Klon pCosPerDmX-13, der die Grundlage für die Konstruktion eines Rettungsvektors bilden sollte, überhaupt die für die Transkription benötigten regulatorischen Elemente enthält, mußte getestet werden, ob das in diesem Klon enthaltene *DmX* als Transgen transkribiert wird. Um das auf pCosPerDmX-13 liegende Gen vom wildtypischen *DmX* unterscheiden zu können, wurde zunächst in das Cosmid pCosPerDmX-13 (Kraemer, pers Mitteilung, siehe Abbildung 3.20 oben) durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym BglIII und anschließender Religation eine ca. 10 kb große Deletion in den kodierenden Bereich des *DmX*-Gens eingeführt. Das resultierende Cosmid pCosPer $\Delta$ mX-2 (Abbildung 3.20 mitte) enthält folglich nur noch ein verstümmeltes, 4,7 kb großes *DmX*-Gen, dem 10148 bp zwischen Exon 4 und Exon 15 fehlen. Durch die Deletion entsteht keine Leserasterverschiebung im ORF der fusionierten Exons 4 und 15. Weiterhin enthält der Klon das vollständige *DmSPX*-Gen, den Intergenbereich zwischen *DmX* und *DmSPX* sowie 2 kb des 3'-untranslatierten Bereiches von *DmSPX*. Durch Keimbahntransformation konnten zwei für pCosPer $\Delta$ mX-2 transgene Linien erzeugt werden. Diese wurden DmpCosPer $\Delta$ mX-15 und -17 genannt. Die Stämme wurden durch PCR auf das richtige Integrat hin untersucht. Durch die Deletion zwischen Exon 4 und Exon 15 konnte die Fusionsstelle zur Überprüfung der Transkriptionsaktivität des Transgens durch RT-PCR herangezogen werden. Dabei wurden die Primer so gewählt, daß der genomische Bereich zwischen den Primern das dritte Intron enthält. Tatsächlich konnte ein Fragment amplifiziert werden, welches einerseits die Fusionsstelle in Exon 4/15 enthält, andererseits Intron 3 nicht enthält. Damit ist gezeigt, daß das Amplifikat von einer gespleißten mRNA des Transgens abstammt (Abbildung 3.16). pCosPer $\Delta$ mX-2 enthält folglich die grundlegenden regulatorischen Bereiche, welche für die Transkription von *DmX* benötigt werden.

### Konstruktion des Reporter Gen-Vektors pC-GFP

Um die *DmX*-Transkription mit Hilfe eines Reporter Gens zu untersuchen, sollte ein entsprechender Transformationsvektor konstruiert werden. Als Reporter Gen wurde das grüne



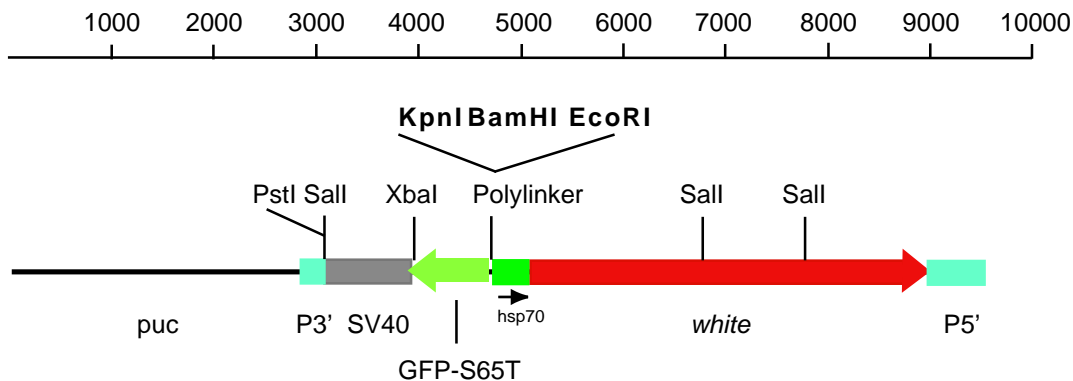
**Abbildung 3.16:** pCosPer $\Delta$ mX-2 enthält die grundlegenden regulatorischen Bereiche für die *DmX*-Transkription. Der Sequenzausschnitt einer RT-PCR des transgenen Fliegenstammes DmpCosPer $\Delta$ mX-17 zeigt durch das Fehlen des Introns 3, daß eine mRNA von dem Konstrukt gebildet wurde. Der direkte Übergang von Exon 4 in Exon 15 beweist darüber hinaus, daß diese mRNA tatsächlich vom Transgen stammt. Unter dem Übergang ist die abgeleitete Aminosäuresequenz notiert. Die Deletion verursacht keine Leserasterverschiebung im ORF von *DmX*.

fluoreszierende Protein (*GFP*) aus *A. victoria* gewählt, weil es gegenüber *lacZ* verschiedene Vorteile aufweist. Mit ca. 730 bp ist es wesentlich kleiner als das ca. 3,5 kb große *lacZ*-Gen und erleichtert dadurch die Klonierungsarbeiten. Außerdem ist für die Detektion kein weiteres experimentelles Vorgehen in Form eines Antikörper-Nachweises oder einer Substratumsetzung mit Farbreaktion notwendig. *GFP* kann mit einem FITC-Filterset unter einem Fluoreszenzmikroskop direkt und sogar in vivo beobachtet werden.

Da zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeiten kein Vektor für die Transformation von *Drosophila* mit einem *GFP*-Reporter gen verfügbar war, wurde ein universeller Vektor für diesen Zweck konstruiert. Als Ausgangsgrundlage diente CaSpeR-AUG- $\beta$ gal (siehe Abbildung 2.5, Thummel et al. (1988)). Das 12 kb große Plasmid ermöglicht die Klonierung von Promotorsequenzen in eine EcoRI, BamHI und/oder KpnI-Schnittstelle. Eine korrekte Termination der Transkripte ist durch eine SV40-Terminator Sequenz ge-

währleistet. Aus diesem Plasmid wurde das *lacZ*-Gen durch Verdau mit KpnI und XbaI deletiert und durch ein *GFP*-Gen ersetzt. Bei dem verwendeten *GFP*-Gen handelt es sich um eine Variante mit der Mutation S65T, bei der das Serin in Position 65 durch ein Threonin ersetzt wurde. Der Austausch hat gegenüber dem Wildtyp eine um den Faktor 7 stärkere Fluoreszenz zur Folge (Heim und Tsien, 1996). Das *GFP-S65T* wurde aus dem bakteriellen Expressionsvektor pRSET-B-GFP-S65T (B. Dickson, pers. Mitteilung) durch „Linker-PCR“ gewonnen. Hierbei tragen die für die Amplifikation verwendeten Primer an den 5'-Enden zusätzliche Basen und Restriktionsschnittstellen, so daß sich PCR-Produkte mit den gewünschten Schnittstellen im richtigen Leserahmen erzeugen lassen. Das *GFP-S65T*-Amplifikat mit einer KpnI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer XbaI-Schnittstelle am 3'-Ende konnte so exakt die Position des *lacZ*-Gens einnehmen (Abbildung 3.17). Der resultierende Vektor pC-GFP ist 2 kb kleiner als CaSpeR-AUG-βgal, hat aber dieselben Klonierungs- und Selektionseigenschaften. Die Integrität des Vektors im Bereich des *GFP*-Gens wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Mit diesem Vektor sollte nun der Einfluß des Intergenbereichs zwischen *DmX* und *DmSPX*, sowie des ersten großen Introns des *DmX*-Gens, welches ebenfalls regulatorische Bereiche enthalten könnte, auf die Transkription des Reporter gens getestet werden.

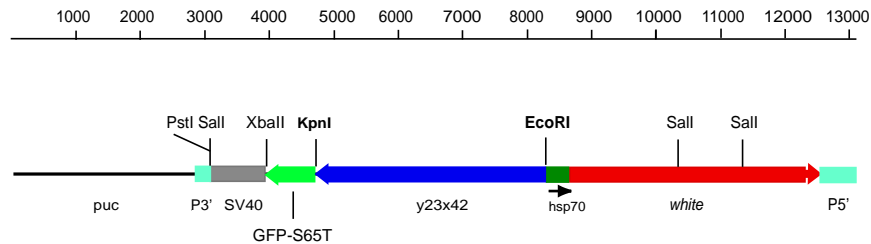


**Abbildung 3.17:** Der *Drosophila*-Reporter-gen-Vektor pC-GFP. Promotorfragmente oder Fusionsgene können über die Restriktionsschnittstellen KpnI, BamHI und EcoRI kloniert werden. Als Reporter für diese Fragmente dient *GFP-S65T*. Das *GFP*-Gen beginnt direkt mit dem Startkodon. Eine TATA-Box sollte deshalb im einzuklonierenden 5'-Bereich enthalten sein. Die Termination der Transkription ist durch den SV40-Terminator sichergestellt. Das *white*-Gen dient der Selektion transgener Individuen.

### Der GFP-Reportergenvektor pC-GFP-y23x42

Um zu untersuchen, ob der Intergenbereich zwischen *DmX* und *DmSPX*, in Verbindung mit dem ersten Intron des *DmX*-Gens für die Aktivierung der Transkription ausreicht, wurde der Vektor pC-GFP-y23x42 (Abbildung 3.18) konstruiert und eine Keimbahntransformation durchgeführt. Eine detaillierte Übersicht über diesen Bereich mit der genauen Lage der Primer y23 und x42, sowie die Position des Intergenbereichs und des Introns befindet sich im Anhang. Die Ergebnis-Statistik der Keimbahntransformation kann Tabelle 3.1 entnommen werden.

Die transgenen Stämme wurden mit DmpCGFP2342-13, -15, -16 und -32 bezeichnet und mittels PCR auf das korrekte Transgen überprüft. Bei der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnte kein Unterschied zum Wildtyp, der als Negativkontrolle diente, festgestellt werden. Da der Nachweis von *GFP*-Transkripten über eine Northern-Analyse und über RT-PCR ebenfalls negative Resultate erbrachte, muß wohl der Schluß



**Abbildung 3.18:** Das Reporter-Konstrukt pC-GFP-y23x42. Als Grundlage für diesen Vektor diente das Konstrukt pC-GFP (Abbildung 3.17). Über „Linker-XI-PCR“ wurde der genomische Bereich zwischen dem Transkriptionsstart von *DmSPX* und dem zweiten Exon des *DmX*-Gens amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *KpnI* in pC-GFP kloniert. Der blaue Pfeil symbolisiert den genomischen Bereich zwischen den Primern y23 und x42. Ein detaillierte Karte mit Lage der Primer, sowie der Genstruktur befindet sich im Anhang.

Injiziert	ca. 500
geschlüpfte Larven	106
Adulte	39
davon fertil	25
davon mit rotäugiger F <sub>1</sub>	5

**Tabelle 3.1:** Statistik der Keimbahntransformation von *D. melanogaster* mit dem Vektor pC-GFP-y23x42.

gezogen werden, daß die im Vektor enthaltenen regulatorischen Bereiche für eine Expression des Reportergens nicht ausreichen.

### Der *EGFP*-Reportergenvektor pCosPer $\Delta$ mX-EGFP

Es wurde gezeigt, daß der Vektor pCosPer $\Delta$ mX-2 die für eine grundlegende Transkription von *DmX* notwendigen flankierenden Bereiche enthält und somit als Basis für einen weiteren Reportgen-Vektor dienen kann (siehe Abbildung 3.20 unten). Durch „Linker-PCR“ wurde das *EGFP* aus dem Vektor pHermesActEGFP (Kristin Michel, pers. Mitteilung) amplifiziert. Michel konnte zeigen, daß *EGFP* trotz der „codon usage“ Anpassung an den Menschen in *Drosophila* sehr stark exprimiert werden kann. Über die in den Primern enthaltenen BamHI-Schnittstellen konnte das isolierte *EGFP* in die kompatible BglII-Schnittstelle von pCosPer $\Delta$ mX-2 kloniert werden. Die Integrität des Transformationsvektors wurde durch Sequenzierung überprüft.

Die aus dem Transformationsexperiment hervorgegangenen Stämme wurden mit den Namen DmpC $\Delta$ mX-EGFP-18-3, -6, -11, -12, -14, -22, -36, -41, -70 und -72 versehen. In den folgenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verschiedener Entwicklungsstadien und Gewebe konnten in diesen Transgenen keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Eine Ursache dafür könnten zum Beispiel sein, daß das *EGFP* sich als Teil des *DmX* -Fusionsproteins nicht so falten kann, daß das fluorophore Zentrum gebildet wird. Eine andere Erklärung wäre, daß die natürliche Expressionsrate von *DmX* nicht ausreicht, um eine durch Fluoreszenz detektierbare Konzentration der transgen exprimierten GFP-Moleküle zu erreichen. Letzteres würde zwar auch das Ergebnis mit dem Reportergenvektor pC-GFP-y23x42 erklären, jedoch nicht den gescheiterten Nachweis des Transgens über RT-PCR und Northern-Analyse. Im Falle von pCosPer $\Delta$ mX-EGFP ist die Ursache also eher im Reportergen zu suchen, im Falle vom pC-GFP-y23x42 wohl eher im Fehlen bestimmter regulatorischer Bereiche.

---

Injiziert	1300
geschlüpfte Larven	225
Adulte	91
davon fertil	56
davon mit rotäugiger F <sub>1</sub>	10

**Tabelle 3.2:** Statistik der Keimbahntransformation von *D. melanogaster* mit dem Vektor pCosPer $\Delta$ mX-EGFP

### 3.3 Der Phänotyp von *DmX* -Mutanten

Da mit dem Konstrukt pCosPerΔ*mX*-2 gezeigt werden konnte, daß der Rettungsvektor pCosPer*DmX*-13 die für eine Transkription von *DmX* grundlegenden regulatorischen Bereiche enthält, konnte dieses Konstrukt herangezogen werden, um durch EMS-Mutagenese hergestellte X-letale Mutationen daraufhin zu untersuchen, ob sie das *DmX* -Gen betreffen. Dabei wurde getestet, welche der Mutanten sich mit dem transgenen *DmX* -Gen komplementieren lassen (Kraemer, pers. Mitteilung). Zunächst mußte also eine Keimbahntransformation von *white*<sup>-</sup>-Fliegen mit dem Cosmid pCosPer*DmX*-13 durchgeführt werden. pCosPer*DmX*-13 enthält neben einem vollständigen *DmSPX* -Gen auch das vollständige *DmX* -Gen mit seinen regulatorischen Bereichen, wie in Kapitel 3.2.5 gezeigt wurde. Trotz der erfahrungsgemäß niedrigen Transformationsrate von sehr großen Plasmiden, konnte von einem injizierten Embryo ein rotäugiger Nachkomme erfolgreich verkreuzt werden.

Aus der Rückkreuzung gingen nur rotäugige Weibchen hervor. Die Insertion des Transgens muß folglich auf dem X-Chromosom stattgefunden haben. Die Nachkommen der Kreuzung wurden mittels PCR auf das richtige Integrat hin untersucht. Weil das transgene Integrat in seiner Sequenz mit dem entsprechendem wildtypischen Fragment übereinstimmt, wurden für diesen Test die Übergänge zwischen Vektor und Transgen als Amplifikations-Ziel ausgewählt. Die Ergebnisse der PCRs zeigten, daß der Stamm tatsächlich transgen für pCosPer*DmX*-13 ist. X-chromosomal letale Mutationen können nur durch ein autosomales Transgen gerettet werden, da die für die Mutation hemizygoten Männchen letal sind. Aus diesem Grund konnte der erzeugte Stamm nicht direkt für eine Komplementationsanalyse verwendet werden. Um die transgene *DmX* -Insertion auf ein Autosom zu transferieren, wurde die P-Element Transposase Δ2-3 (Robertson et al., 1989) eingekreuzt und die resultierenden Stämme auf eine Insertion auf einem Autosom hin untersucht (Kraemer, pers. Mitteilung). Verschiedene autosomale Insertionen des *DmX* -Gens wurden nun für eine Komplementationsanalyse verwendet. Auf diese Weise wurden vier Mutantenstämme identifiziert, die alle den gleichen Phänotyp aufwiesen (Kraemer, pers. Mitteilung).

Injiziert	600
geschlüpfte Larven	67
Adulte	41
davon fertil	23
davon mit rotäugiger F <sub>1</sub>	1

**Tabelle 3.3:** Ergebnis der Keimbahntransformation von *D. melanogaster* mit dem dem Vektor pCosPer*DmX*-13.

Der verwendete Rettungsvektor pCosPerDmX-13 enthält auch eine Kopie des *DmSPX*-Gens. Um auszuschließen, daß die Rettung des Phänotyps auf *DmSPX* zurückzuführen ist, wurden dieselben Experimente mit dem Konstrukt pCosPerΔ*mX*-2 wiederholt. Wie bereits beschrieben, trägt pCosPerΔ*mX*-2 eine ca. 10 kb große Deletion im *DmX*-Gen, das wohl kaum mehr funktionstüchtig sein dürfte. Keine der vorher identifizierten Mutanten konnte mit dem Vektor pCosPerΔ*mX*-2 gerettet werden. Man kann ausschließen, das bei einer der vier identifizierten Mutanten das *DmSPX*-Gen betroffen ist.

Die *DmX*<sup>-</sup>-Tiere führen eine normale Embryogenese durch und sind am Anfang des L1-Stadiums noch nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Dann jedoch beginnt ihre Agilität nachzulassen und das Wachstum wird eingestellt. Die Larven verharren wie paralysiert. Nur durch mechanische Reizung mit einer stumpfen Präpariernadel können die Tiere zum Bewegen veranlasst werden. Werden die Larven in einem Zeitraum von mehr als 20 min ständig auf diese Art gereizt, ist kein Nachlassen der Reaktion auf den mechanischen Reiz zu beobachten. In mikroskopischen Analysen wurde weiterhin eine morphologische Veränderung des Fettkörpers diagnostiziert (Schmidt, pers. Mitteilung). Die Mutanten sterben vor Erreichen des L2-Stadiums. Sie wirken transparent und schlaff. Dieser schwerwiegende Phänotyp kann vollständig durch Einkreuzen einer transgenen Kopie von *DmX* revertiert werden.

Die durch den Rettungsvektor pCosPerDmX-13 komplementierten Tiere gleichen völlig dem wildtypischen Phänotyp. Die transgene Expression des *DmX*-Gens reicht anscheinend aus, um *DmX* in vollem funktionellen Umfang zu exprimieren. Daraus kann wiederum geschlossen werden, daß alle für die wildtypische *DmX*-Expression nötigen Bereiche auf pCosPerDmX-13 enthalten sind. Vergleicht man die beiden verwendeten Vektoren pCosPerDmX-13 und pCosPerΔ*mX*-2, rettet nur pCosPerDmX-13 die betreffenden Mutanten. pCosPerDmX-13 enthält sowohl von *DmX* als auch von *DmSPX* eine intakte Kopie, während pCosPerΔ*mX*-2 nur ein intaktes *DmSPX*-Gen besitzt. Folglich muß die Rettung der EMS-Mutanten dem *DmX*-Gen zu verdanken sein.

### 3.4 Antisense-Strategien zur Unterdrückung der *DmX*-Expression

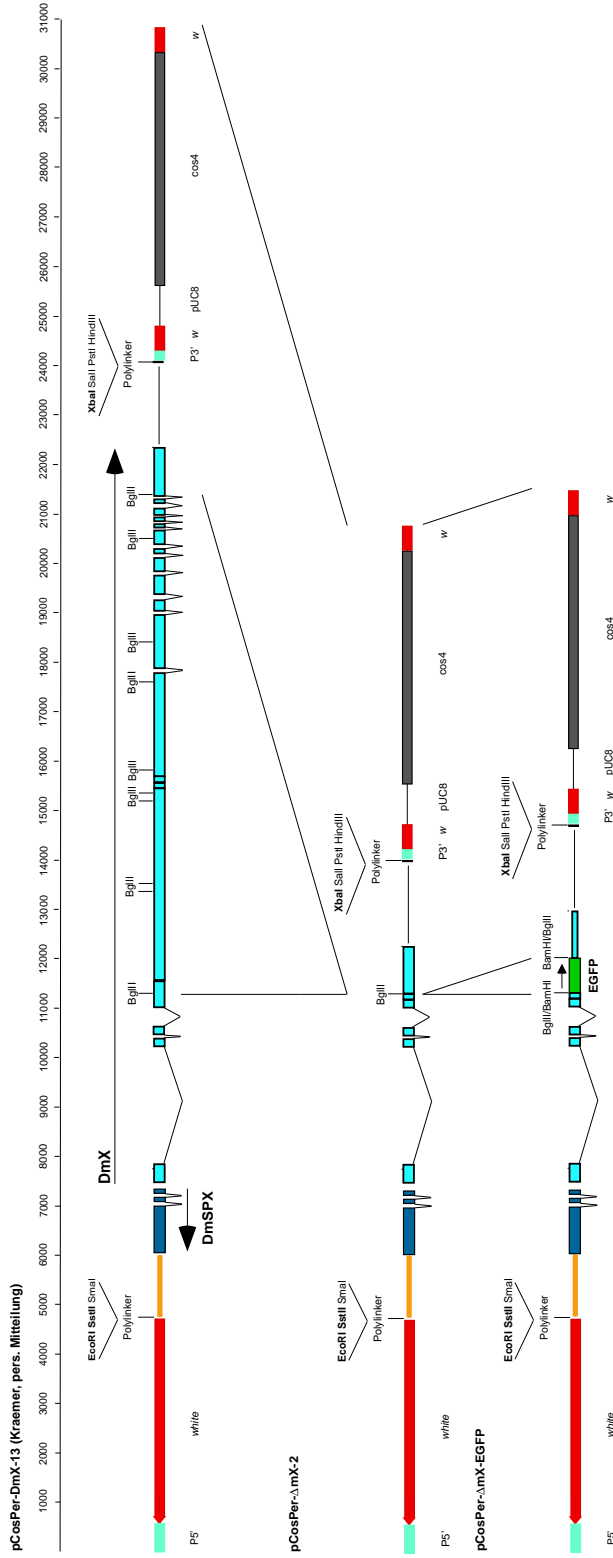
Die Isolierung von *DmX*<sup>-</sup>-Phänotypen erfolgte durch die Rettung X-letaler EMS-Mutanten durch einen Rettungsvektor (siehe Kapitel 3.3, Kraemer pers. Mitteilung). Da hierbei durch die Präselektion auf Letalität keine schwachen Phänotypen identifiziert werden können, welche detailliertere Hinweise auf die Funktion von *DmX* liefern könnten, mußte versucht werden, schwache Phänotypen zu erzeugen. Neben der klassischen Mutagenese durch EMS oder Röntgenstrahlen stehen weitere Mittel zur Verfügung, gezielt Gene auszuschalten. Dazu gehören beispielsweise die Inhibierung der Translation der mRNA durch eine gegenläufige RNA, einer sogenannten Antisense-RNA. In *Drosophila*-Männchen findet keine Rekombination statt, deshalb kann erstere Methode hier nicht angewendet werden. Es bleiben verschiedene Methoden, die alle direkt oder indirekt auf



**Abbildung 3.19:** Phänotyp der *DmX*-Mutante am Beispiel des Stammes 739: Bei diesen ca. 40 h alten Tieren einer 4h Ablage kann man deutlich die im Wachstum stehengebliebenen und inaktiven *DmX*-Mutanten vom Wildtyp unterscheiden. Die Mutanten sterben, wenn die wildtypischen Tiere das L2-Stadium erreicht haben. Mutanten sind durch weiße Pfeile markiert.

der inhibierenden Wirkung einer Antisense-RNA basieren. In dieser Arbeit wurden zwei Bereiche des *DmX*-Gens in reverser Orientierung unter verschiedener Kontrolle in das *Drosophila*-Genom überführt. Ein Bereich, der das 3'-Ende der *DmX*-cDNA enthält, wurde unter Kontrolle des durch Hitzeschock induzierbaren Promotors Hsp70 gebracht und in Form des Vektors pKB10.1-d-as (Abbildung 3.21) transfiziert. Ein weiterer Bereich aus der Mitte des *DmX*-Gens wurde in reverser Orientierung hinter UAS-Sequenzen (siehe Kapitel 1.1) kloniert. Das GAL4-UAS System stammt ursprünglich aus der Hefe und konnte in *Drosophila* etabliert werden (Fischer et al., 1988). GAL4 ist ein Transkriptionsfaktor, der an die „upstream activator sequence“ (UAS) eines Gens bindet und damit dessen Transkription initiiert. Mittlerweile stehen zahlreiche transgene *Drosophila*-Stämme zur Verfügung, die GAL4 stadien- und gewebespezifisch exprimieren. Die Kreuzung eines UAS-Transgen-Stammes mit einem entsprechenden GAL4-Stamm erlaubt die gezielte Expression des Transgens. Als weitere Möglichkeit, *DmX* auszuschalten, wurde ein Vektor mit einem Ribozym (Cech und Uhlenbeck, 1994) konstruiert, das spezifisch die native *DmX*-RNA an einer definierten Stelle schneiden sollte (Kapitel 3.4.3).



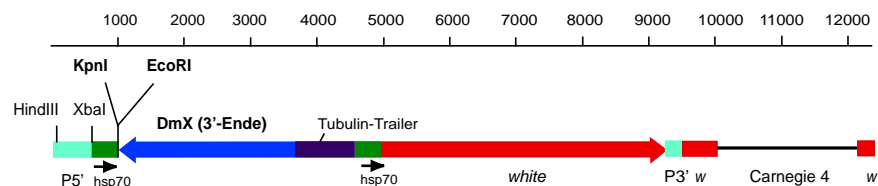


**Abbildung 3.20:** Übersichtskarte über die *Drosophila*-Transformations-Vektoren pCosPerDmX-13, pCosPerΔmX-2, und pCosPerΔmX-EGFP. pCosPerDmX-13 enthält ein genomisches Fragment, das sowohl das komplette *DmX* -Gen (hellblau) als auch das Gen *DmSPX* (dunkelblau) beinhaltet. Darüber hinaus sind noch ca. 2 kb 3'-flankierende Sequenz des *DmX* -Gens und 1.5 kb 3'-flankierende Sequenz des *DmSPX*-Gens enthalten (orange). *DmX* und *DmSPX* liegen Kopf an Kopf. Zwischen den Transkriptionsstarts liegen nur 148 bp. Die Transkription der beiden Gene erfolgt in gegenläufiger Orientierung. Das Plasmid pCosPerΔmX-2, wurde aus pCosPerDmX-13 durch Verdau mit BglII und anschließender Religation erzeugt. Dabei wurden ca. 10 kb des *DmX* -Gens deletiert. Die so entstandene einzige BglII-Schnittstelle wurde benutzt, um das Reportergen *EGFP* (hellgrün) als BamHI-Fragment in die kompatible BglII-Schnittstelle im Leseraster einzuklonieren. Durch das am Ende des *EGFP*-Gens gelegene Stop-Kodon wird der 3'-gelegene Bereich von *DmX* nicht mehr translatiert. Es entsteht ein *DmX* -*EGFP*-Fusionsprotein. Die Selektion transgener Fliegen erfolgte über das *white*-Gen. Der Maßstab ist in bp angegeben.

In keinem der im folgenden aufgeführten Ansätze konnte ein eindeutiger Phänotyp identifiziert werden. Der Grund, weshalb diese Versuche dennoch beschrieben werden, ist folgender: Wie in Kapitel 4.5 gezeigt wird, ist der Nachweis von Phänotypen in *Drosophila*, die durch Antisense-Strategien erzeugt wurden, oft schwierig und fast immer nur durch ein spezielles, für das betreffende Genprodukt etabliertes Nachweissystem möglich. Ein solches Nachweissystem war jedoch derzeit nicht verfügbar. Aus diesem Grund könnten in den Transgenen durchaus schwächere *DmX*<sup>-</sup>-Phänotypen identifiziert werden, wenn erst ein geeignetes Nachweissystem (z. B. in Form von DMX-spezifischen Antikörpern) zur Verfügung steht.

### 3.4.1 Das Hsp70-Antisense-Konstrukt pKB10.1-d-as

Der erste erzeugte Antisense-Vektor pKB10.1-d-as (Abbildung 3.21) enthält das Integrat des ersten isolierten cDNA-Klons von *DmX* pMC10.1-d (Markus Christmann, pers. Mitteilung). Als Target-Vektor für dieses Integrat diente pKB256 (Abbildung 2.2).



**Abbildung 3.21:** Karte des Antisense-Vektors pKB10.1-d-as. Als Ausgangspunkt für die Klonierung dienten die Plasmide pKB256 und pMC10.1d, der das 3'-Ende des *DmX*-Gens enthält. Dieser Abschnitt ist invers orientiert hinter einen Hsp70-Promotor kloniert, durch den die Transkription der Antisense-RNA initiiert werden kann. Für eine korrekte Termination des Transkripts sorgt der Trailer des Tubulin-Gens. Die Selektion der transgenen Fliegen erfolgt über die Expression des *white*-Gens.

Injiziert	450
geschlüpfte Larven	99
Adulte	17
davon fertil	14
davon mit rotäugiger F <sub>1</sub>	5

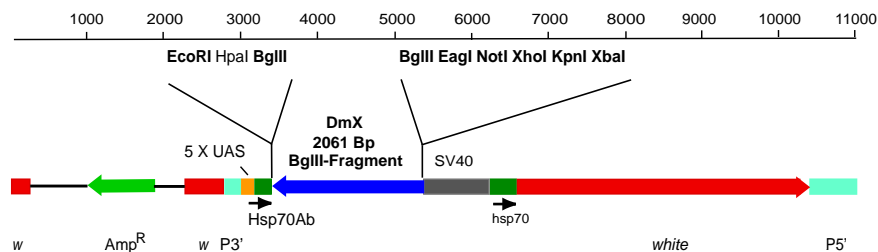
**Tabelle 3.4:** Ergebnis der Keimbahntransformation von *D. melanogaster* mit dem Plasmid pKB10.1-d-as

Die erzeugten transgenen Stämme wurden DmpKB10.1-d-1, -8, -14 und -17 benannt. Eine der fünf rotäugigen Fliegen konnte nicht erfolgreich verkreuzt werden. Mit den transgenen Tieren wurden Hitzeschock-Experimente durchgeführt. Dabei wurden Embryonen, L1- und L3-Larven, sowie adulte Tiere dreimal täglich für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert und ansonsten bei 25°C gehalten. Als Negativ-Kontrolle dienen *white*<sup>-</sup>-Tiere. Da eine Hitzeschock-Behandlung auch im Wildtyp zu einem bestimmten Prozentsatz an Fehlentwicklungen führt, muß bei den hitzegeschockten transgenen Tieren neben diesen unter Hitzeschockumständen üblichen Aberrationen ein zahlenmäßig überlegener Phänotyp beobachtet werden, um auf eine Antisense-Wirkung schließen zu können. Bei der Versuchsreihe mit pKB10.1-d-as konnte im Vergleich zur Negativkontrolle unter den fehlentwickelten Tieren kein eindeutiger Phänotyp erkannt werden. Bei den transgenen Tieren ließ sich unter Hitzeschock-Bedingungen keine erhöhte Letalität feststellen.

### 3.4.2 Das *GAL4*-UAS Antisense-Konstrukt pUABgl-6

Um die Transkription des Antisense-Transgens schonender und gleichmäßiger zu initiieren, als dies durch die Hitzeschockbehandlung möglich ist, wurde das 2061 bp große *Bgl*II-Restriktionsfragment aus Exon 4 des *DmX*-Gens in reverser Orientierung hinter die UAS-Sequenzen des *Drosophila*-Transformationsvektors pUAST (Abbildung 2.3) kloniert (Abbildung 3.22). Durch Einkreuzen von Fliegenstämmen, welche *GAL4* ubiquitär oder besonders im Nervensystem exprimieren, sollte dort auch das Antisense-Konstrukt zur Wirkung kommen.

Die resultierenden transgenen Stämme wurden DmpUABgl-6 -2, -22, -26, -30, -52, -57 und -58 genannt. Nur ein rotäugiges Tier konnte nicht erfolgreich verkreuzt werden. In der nachfolgenden Kreuzung mit *GAL4*-exprimierenden Stämmen wurde je ein



**Abbildung 3.22:** Karte des Antisense Transformationsvektors pUABgl-6. Ein 2061 bp großes Fragment aus Exon 4 des *DmX*-Gens wurde in reverser Orientierung in pUAST, hinter die fünf UAS-Sequenzen, die von einem Hsp70 Basalpromoter gefolgt werden, kloniert. Die ordnungsgemäße Termination der Transkription wird durch den *SV40* Trailer gewährleistet. Die Selektion der transgenen Fliegen erfolgte über die Expression des *white*-Gens.

Injiziert	1100
geschlüpfte Larven	141
Adulte	64
davon fertil	32
davon mit rotäugiger F <sub>1</sub>	8

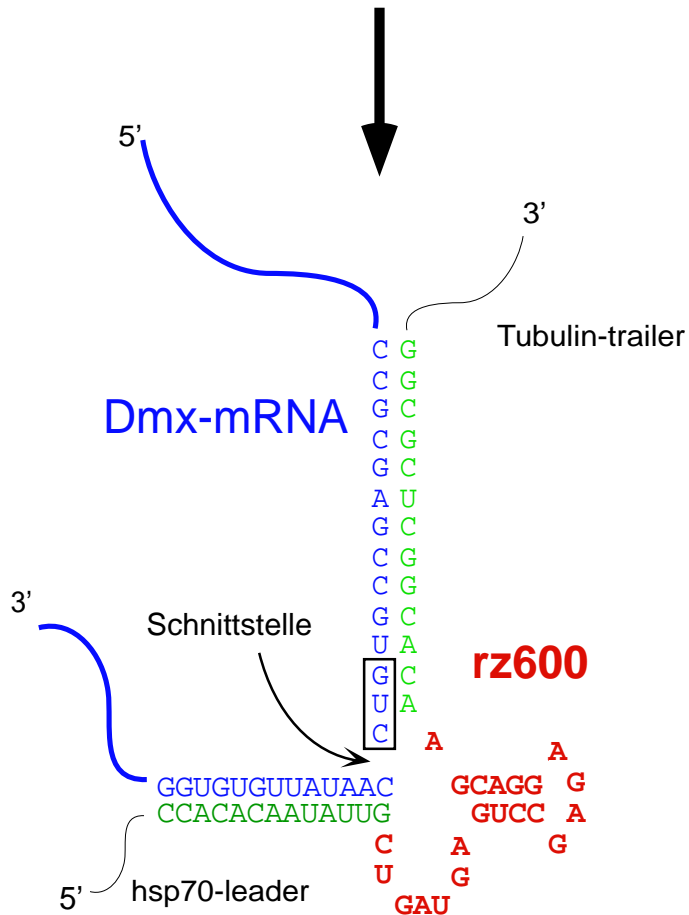
**Tabelle 3.5:** Bilanz der Keimbahntransformation von *D. melanogaster* mit dem Plasmid pUABgl-6

pUABgl-6-Männchen mit fünf *GAL4*-Weibchen verpaart. Bei den Nachkommen der Kreuzung mit den *GAL4*-Stämmen 813, 853, 1018, 1087, 1747 und 1822, welche *GAL4* im ZNS exprimieren (Kapitel 2.1.2), konnte kein Effekt beobachtet werden. In den Kreuzungen mit den *GAL4*-Stämmen 1874 und 1878 wurden zahlreiche nicht geschlüpfte Eier beobachtet. Dies ließ sich aber in Kreuzungen mit anderen Männchen dieser Stämme nicht reproduzieren.

### 3.4.3 Das Ribozym-Konstrukt pKBrz600

Ribozyme sind katalytisch wirksame RNAs. Die Hammerkopf-Ribozyme, die wegen ihrer Sekundärstruktur so genannt werden, können spezifisch an eine komplementäre RNA binden um diese hinter dem Triribonukleotid GUC zu schneiden (Cech und Uhlenbeck, 1994). Das in der Natur vorkommende Hammerkopf-Ribozym ist Teil eines Viroids, einer freien pflanzenpathogenen RNA. Nach dem Vorbild von Haseloff und Gerlach (1988) und Zhao und Pick (1993) wurde die DNA für ein *DmX*-spezifisches Ribozym synthetisiert und in den *Drosophila*-Transformationsvektor pKB256 einkloniert. Die *DmX*-Spezifität wurde dadurch erzielt, daß an die katalytische Ribozym-Domäne auf beiden Seiten jeweils dreizehn Basen synthetisiert wurden, die komplementär zu den flankierenden Bereichen eines GUC-Triplets der *DmX*-RNA sind (Abbildung 3.23). Die Klonierung wurde dadurch vereinfacht, daß beide Stränge getrennt synthetisiert wurden, wobei an den einen Strang die vier überhängenden Basen einer *EcoRI*-Schnittstelle addiert wurden, an den komplementären Strang die vier überhängenden Basen einer *KpnI*-Schnittstelle. Beide Produkte wurden in äquimolarem Verhältnis gemischt, so daß sich die komplementären Stränge paaren konnten. Dieses Gemisch konnte dann direkt für die Ligation mit dem *EcoRI*/*KpnI*-geschnittenen Vektor verwendet werden.

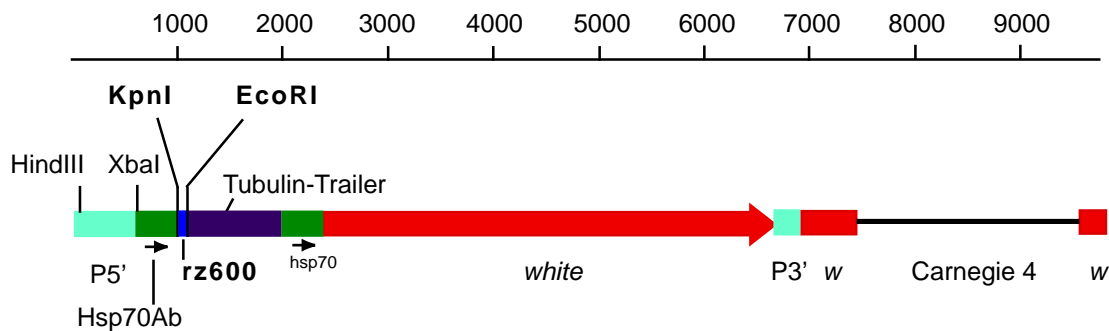
Die aus diesem Experiment resultierenden rotäugigen Stämme wurden Dmrz600-3, -4, -9, -11 und -13 genannt. Die Stämme wurden durch PCR auf das korrekte Transgen überprüft. Die Induktion durch Hitzeschocks erfolgte nach folgendem Schema: Je 10 rz600-Fliegen wurden mit normalen *white*<sup>-</sup>-Fliegen zusammen in einem Breiglas dreimal für eine halbe Stunde einem Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt. Zwischen den Hitzeschocks wurden die Fliegen für 45 min bei Raumtemperatur belassen und nach dem letzten Hitze-



**Abbildung 3.23:** Prinzip der Konstruktion und Wirkung eines spezifischen Ribozyms. Die katalytische Domäne (rot) faltet sich so, daß die flankierenden Bereiche, die komplementär zu einer GUC-Zielstelle (grün) sind, dort spezifisch mit der *DmX* -RNA (blau) paaren und die RNA hinter dem GUC geschnitten wird. Die Transkription des Ribozyms wird über den Hitzeschock-Promotor Hsp70 gesteuert.

Injiziert	480
geschlüpfte Larven	86
Adulte	30
davon fertil	17
davon mit rotäugiger F <sub>1</sub>	5

**Tabelle 3.6:** Bilanz der Keimbahntransformation von *D. melanogaster* mit dem Ribozym-Konstrukt pKBrz600

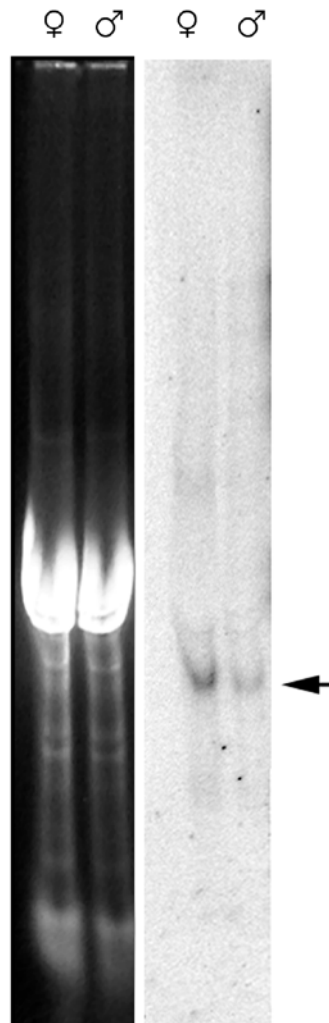


**Abbildung 3.24:** Karte des Ribozym-Transformationsvektors pKBrz600. Der Abstand der GUC-Schnittstelle zum Transkriptionsstart des *DmX*-Gens beträgt 4012 bp. Das synthetisierte Ribozym wurde über KpnI und EcoRI überhängende Enden in den Vektor pKB256 kloniert. Als Selektionsmarker für transgene Fliegen diente das *white*-Gen.

schock bei 29°C inkubiert. Eine Kontrollgruppe wurde für die nächsten 10 Tage bei 29°C belassen, während der Rest jeden Tag für eine halbe Stunde auf 37°C gebracht wurde. Es wurde kein Unterschied in der Vitalität oder dem Phänotyp der verschiedenen Stämme im Vergleich zu den als Negativkontrolle dienenden *white*<sup>-</sup>-Fliegen beobachtet. Aus den während der Hitzeschockphase abgelegten Eiern entwickelten sich, wie bei der Negativkontrolle, auch normale Larven.

### 3.5 Transkriptionsanalyse von *DmSPX*

Im 5'-Bereich von *DmX* liegt eng benachbart auf dem Gegenstrang in Kopf an Kopf Orientierung das Gen *DmSPX*, so daß zwischen den beiden Transkriptionsstarts nur 174 bp liegen (Abbildung 3.20). Dieser Abschnitt enthält die Promotorbereiche für beide Gene. Da für einen durchschnittlichen Promotor mit einer Länge von ca. 100 bp gerechnet werden muß, müssten die beiden Promotoren eigentlich deutlich überlappen, wenn auch in umgekehrter Orientierung. Es stellt sich die Frage, ob sich *DmX* und *DmSPX* in ihrem Transkriptionsmuster gleichen. In Northern-Analysen (Abbildung 3.25) kann ein 1,6 kb großes *DmSPX* Transkript in beiden Geschlechtern nachgewiesen werden. Für die Northern-Analyse wurde Gesamt-RNA verwendet, im Gegensatz zur Northern-Analyse von *DmX*, für die polyA<sup>+</sup>-mRNA eingesetzt werden mußte, um eine ausreichende Signalstärke zu erreichen. Daraus läßt sich schließen, daß *DmSPX*-Transkripte recht häufig in der Zelle vorhanden sein müssen, jedenfalls sehr viel häufiger, als *DmX*-Transkripte.

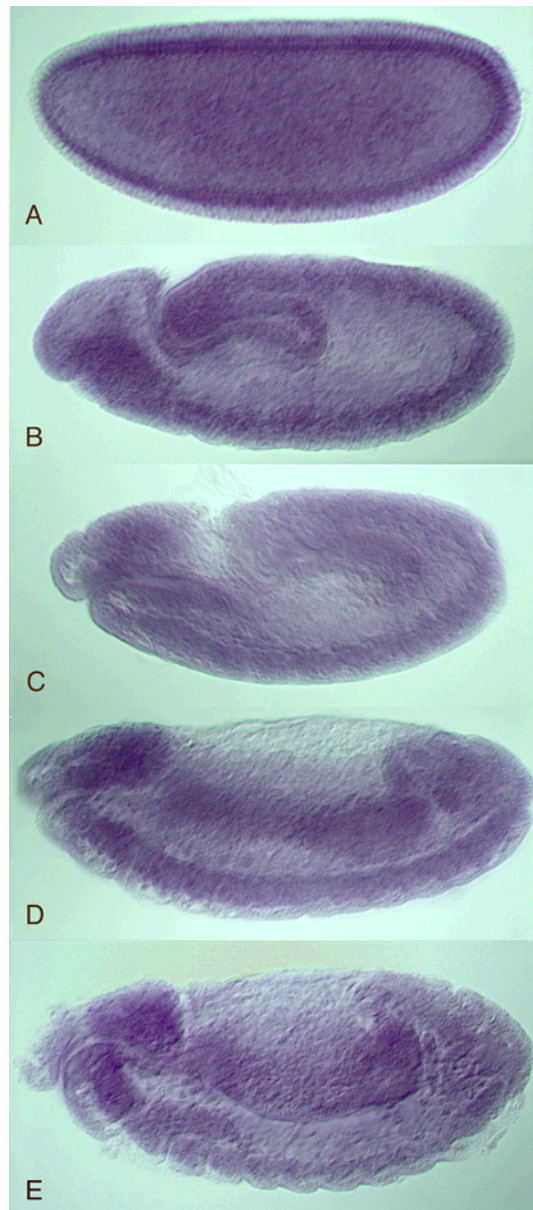


**Abbildung 3.25:** Northern Analyse von *DmSPX* in adulten Männchen und Weibchen. Pro Spur wurden ca. 4  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt. Als Sonde diente das PCR-Fragment y27x26, das fast den gesamten genomischen Bereich des *DmSPX*-Gens abdeckt (siehe Anhang). Die Markierung erfolgte mit  $\alpha^{32}\text{PdATP}$ , die Expositionszeit betrug 14 Tage. Es wird ein in Männchen und Weibchen etwa in gleicher Menge vorhandenes Transkript von ca. 1,6 kb detektiert.

Um der Frage nachzugehen, ob neben diesen quantitativen Unterschieden zwischen *DmX* und *DmSPX* auch gewebespezifische Unterschiede in der Expression bestehen, wurde mit einer *DmSPX*-spezifischen Sonde eine „whole mount“ in situ Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen durchgeführt. Das Transkriptionsmuster (Abbildung 3.26) unterscheidet sich deutlich sowohl von dem des *DmX*-Gens als auch von dem des *GAPDH*-Gens, obwohl auch einige Gemeinsamkeiten bestehen.

In Stadium 5 (Abbildung 3.26 A) sind *DmSPX*-Transkripte im Gegensatz zu *DmX*, das am posterioren Pol konzentriert ist, über das gesamte zelluläre Blastoderm verteilt. Während der Keimstreifverlängerung und der Invagination des Stomodaeums (B, Stadium 10) sind die Transkripte mehr oder weniger diffus verteilt. *DmSPX*-RNA ist dabei in den Mitteldarmvorläufern und dem zentralen Nervensystem nachweisbar. Dieses Muster ist ähnlich dem des *DmX*, jedoch fehlt hier die segmentale Komponente. Ab Stadium 14 beginnen sich *DmSPX*-Transkripte in den Mitteldarmvorläufern und im Zentralnervensystem zu konzentrieren, was auch bei *DmX* zu beobachten ist. Das Transkriptionsmuster in den Mitteldarmvorläufern ist bei beiden Genen vergleichbar. Im Stadium 15 ist neben einer Färbung des Mitteldarms die stärkste *DmSPX*-Transkription im Gehirn nachweisbar. Im Gegensatz dazu ist die Transkription von *DmX* in den beiden Geweben ungefähr gleichstark (Abbildung 3.7). Gegen Ende des Embryonalstadiums ist bei *DmX* eine zusätzliche Transkription im Kopf im Bereich des Antenna-Maxillar-Komplexes, sowie im Hinterdarm zu detektieren. Dies ist im Falle von *DmSPX* nicht zu beobachten. Die Unterschiede zwischen *DmX* und *DmSPX* sowohl im Transkriptionsmuster als auch in dessen Stärke zeigen, daß die beiden Gene trotz wahrscheinlich überlappender Promotoren unterschiedlich reguliert werden.





**Abbildung 3.26:** Embryonales Transkriptionsmuster des *DmSPX*-Gens. Die „whole mount“ in situ Hybridisierung wurde mit der DIG markierten Sonde y27x26 (siehe Anhang) durchgeführt. Die sonstigen Versuchsbedingungen entsprachen der entsprechenden Hybridisierung mit *DmX*. A: Stadium 5, B: Stadium 10, C: Stadium 11, D: Stadium 14, E: Stadium 15



## 4 Diskussion

### 4.1 *DmX* ist ein neuartiges X-chromosomales Gen

In der vorliegenden Arbeit wurde die chromosomale Lokalisation von *DmX* durch Multicolor FISH an Polytänchromsomen von *Drosophila* auf 5D6–5E1 des X-Chromosoms festgelegt (Abschnitt 3.1). Da in *D. melanogaster* aufgrund seiner langen experimentellen Geschichte eine große Anzahl von Genen durch Mutageneseexperimente identifiziert und lokalisiert, jedoch viele dieser Gene bis heute nicht molekular charakterisiert worden sind, stellt sich die Frage, ob *DmX* mit einem dieser Gene identisch sein könnte. Mit Hilfe des „cytosearch tools“ der Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) wurden alle noch nicht molekular charakterisierten Gene aus diesem chromosomalen Bereich und deren Phänotypen zusammengestellt (Tabelle 4.1).

Lokalisation	Name	Phänotypklasse	Phänotyp
3C1–6F6	<i>Bt</i>	sichtbar dominant, genetisch rezessiv, letal	(Bateman, 1950): 100% der heterozygoten Weibchen haben eine nach hinten verlängerte Verzweigung der posterioren Flügelader. Zusätzliche Verzweigungen können im selben Bereich des Flügels auftreten. Die abdominalen Segmente sind oft unterchitinisiert.
3E8–6C11	<i>l(1)1PP22</i>	rezessiv letal	(Perrimon et al., 1989): Maternaler Effekt Phänotyp. Es fehlt das ventrale Hypoderm.
3E8–6C11	<i>l(1)9PP1</i>	rezessiv letal	(Perrimon et al., 1989): Maternaler Effekt Phänotyp. Einige Segmente sind fusioniert.
3E8–6C11	<i>l(1)9PP12</i>	rezessiv letal	(Perrimon et al., 1989): Maternaler Effekt Phänotyp. Verdrehte Embryonen mit Fehlentwicklungen im Kopfbereich.

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von vorhergehender Seite			
Lokalisation	Name	Phänotypklasse	Phänotyp
3E8–6C11	<i>l(1)PB7</i>	rezessiv letal	(Perrimon et al., 1989): Maternaler Effekt Phänotyp. Abnormale Oogenese, kollabierte Eier und verschmolzene Filamente.
3F1–7B3	<i>l(1)291-95</i>	rezessiv letal	(Slizynski, 1938)
3F3–5E8	<i>l(1)TK128</i>	rezessiv,letal larval	(Thaker und Kankel, 1992): abnormale Zellklone im Auge und der Lamina führen zu rauhen Bereichen im Auge.
5A1–5E8	<i>l(1)air4</i>	rezessiv larval letal	(Watson et al., 1991): Melanisierete Tumoren. Kleines abnormal geformtes Gehirn.
5A7–5E8	<i>l(1)5AEa</i>	rezessiv letal	(Schalet, 1986)
5A7–5E8	<i>l(1)5Aa</i>	rezessiv letal	(Schalet, 1986)
5A8–7B3	<i>fs(1)de1</i>	weibliche Sterilität	(Galanopoulos et al., 1989) abnormale Eier
5A8–7B3	<i>Su(tor)1-1</i>	weibliche Sterilität	(Doyle und Bishop, 1993): Eier sind ungefärbt und kollabieren. Schwache Suppression des <i>EgfrE1</i> -Phänotyps (rauhe Augen).
5C5–5D6	<i>fs(1)M3</i>	embryonal letal	(Mohler und Carroll, 1984): Maternaler Effekt Phänotyp. Löcher am posterioren Ende des Embryos. Einige Eier kollabieren bei der Ablage.
5C7–5D6	<i>fs(1)M13</i>	letal	(Mohler und Carroll, 1984): Maternaler Effekt Phänotyp. Eier entwickeln sich, sind aber löchrig, einige kollabieren.
5D	<i>fs(1)5Da</i>	weiblich semi-steril	(Grossniklaus et al., 1989): Ovarien sind desorganisiert, die Ovariole nicht normal geformt, die Germarien sind zusammengeklumpt.
5D1–5E8	<i>fs(1)K741</i>	rezessive weibliche Sterilität	(Perrimon und Gans, 1983): Temperatursensitiv: Weibchen produzieren bei 29°C keine oder wenig Eier.
5D1–5E8	<i>l(1)5DEa</i>	rezessiv letal	(Schalet, 1986)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung von vorhergehender Seite			
Lokalisation	Name	Phänotypklasse	Phänotyp
5D1–6	<i>l(1)5CDa</i>	rezessive Sterilität	(Voelker und Wisely, 1982): Temperatursensitiv. Entwicklung verzögert und Adulte steril bei 22°C. Adulte fertil bei 17°C.
5D5–5E1	<i>fs(1)K254</i>	weibliche Sterilität	(Perrimon et al., 1986): Späte Oogenese ist unterbrochen. Amplifikation der Chorion-Gene ist normal.
5D5–5E1	<i>fs(1)K1214</i>	weibliche Sterilität	(Perrimon et al., 1986): Späte Oogenese ist unterbrochen. Chorion-Gene unteramplifiziert.
5E-5F	<i>l(1)G0287</i>	rezessiv letal	(Schaefer et al., 1999) Fly-View: P1854a, Embryo, Stadium 15 ubiquitäre Färbung, vgl. Abb. 4.1
5E1–2	<i>l(1)G0063</i>	rezessiv letal	(Schaefer et al., 1999): Fly View: P1680, Gehirn stark gefärbt, ähnlich <i>DmSPX</i> , vgl. Abb. 4.1

Tabelle 4.1: Übersicht über bekannte Mutationen, die den Bereich 5D5–5E1 betreffen könnten.

*DmX* -Mutanten weisen einen L1-larvalen rezessiv letalen Phänotyp auf (siehe Kapitel 3.3 und 3.19). Die Eier erscheinen normal. Die Embryogenese verläuft ohne Komplikationen und es schlüpfen Larven, die zunächst keine Morphologie- oder Verhaltensauffälligkeiten zeigen. Im Verlauf des ersten Larvenstadiums leiden die Mutanten unter zunehmender Inaktivität, nehmen keine Nahrung mehr auf und sterben. In heterozygoten Adulten kann weder ein sichtbarer Phänotyp noch eine erhöhte Sterilität beobachtet werden. Ein Vergleich von *DmX*<sup>-</sup> mit den in Tabelle 4.1 aufgeführten Mutanten zeigt, daß es sich bei *DmX* mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um ein neuartiges Gen handelt. *Bt* zeigt in genetisch heterozygotem Zustand einen dominant sichtbaren Phänotyp. *Su(tor)1-1*, *fs(1)5Da*, *fs(1)K741*, *fs(1)5CDa*, *fs(1)K254* und *fs(1)I214* haben einen mit Sterilität gekoppelten Phänotyp. Der Phänotyp der Gene *l(1)1PP22*, *l(1)9PP1*, *l(1)9PP12*, *l(1)PB7*, *l(1)TK128* und *l(1)air4* ist mit auffälligen Defekten in der Organogenese verbunden. Die Mutationen der Gene *fs(1)de1*, *fs(1)M3* und *fs(1)M13* führen zu abnormalen Eiern und Letalität schon während der Embryogenese.

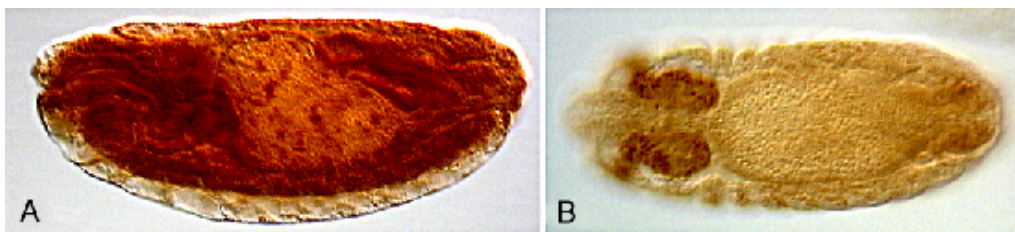
Die bekannten *DmX*<sup>-</sup>-Allele wurden aufgrund des Kriteriums „Letalität“ selektiert. Deshalb ist der Phänotyp „schwacher“ Allele nicht bekannt. Da von keinem der hier aufgeführten mutierten Gene Allele bekannt sind, die einen ähnlichen Phänotyp wie *DmX*<sup>-</sup> aufweisen, kann man davon ausgehen, daß es sich bei *DmX* um ein neuartiges Gen handelt.

Die Gene *l(1)G0287* und *l(1)G0063* sind durch die Insertion eines P-Elements entdeckt worden. Für sie wurde noch kein Phänotyp beschrieben, jedoch steht durch die Expression des *lacZ* Reportergens (siehe Abbildung 4.1) ein Transkriptionsmuster als Vergleichsgrundlage zur Verfügung.

Das *DmX*-Transkriptionsmuster in Stadium 15 (Abbildung 3.7) unterscheidet sich von der ubiquitären *l(1)G0287*-Expression insofern, daß die *DmX*-Transkription in einigen Geweben, wie dem Gehirn und dem Antenna-Maxillar-Komplex, erhöht ist. *l(1)G0063* zeigt eine stärkere Anfärbung des Gehirns, das Muster deckt sich jedoch nicht mit dem von *DmX*. Vielmehr gleicht dieses Transkriptionsmuster sehr stark dem von *DmSPX* (Abbildung 3.26), so daß es sich bei *l(1)G0063* um eine P-Element Insertion in *DmSPX* handeln könnte. Für die Gene *l(1)5AEa*, *l(1)5Aa* und *l(1)DEa* (Schalet, 1986) und *l(1)291-95* (Slizynski, 1938) wurde kein Phänotyp beschrieben. Außerdem sind die entsprechenden Mutantenstämme nicht verfügbar. Eine Komplementationsanalyse mit *DmX* ist deshalb nicht möglich.

## 4.2 Bei *DmX* konnten keine geschlechtsspezifischen Transkriptionsunterschiede festgestellt werden

*DmX* ist das orthologe Gen zu *CpY*, einem Gen, das in der geschlechtsdeterminierenden chromosomalen Region von *C. piger* gelegen ist (siehe Kapitel 1.2). *CpY* wird bei Chironomiden geschlechtsspezifisch reguliert (siehe Kapitel 4.3) und steht in Verdacht, in die Geschlechtsdeterminierung involviert zu sein. Bei *D. melanogaster* wird das Geschlecht durch das Mengenverhältnis der X-Chromosomen und Autosomen determiniert (Bridges, 1925). An der „Messung“ dieses Verhältnisses sind die Numerator-Elemente auf dem X-Chromosom und die Denominator-Elemente auf den Autosomen beteiligt. *DmX*-Mutanten können durch die freie Duplikation Dp(1;f)q2 gerettet werden. (Stephenson (1994) und Kraemer, pers. Mitteilung). Auf Dp(1;f)q2 liegen zwei Kopien von *DmX*, von denen allerdings nicht bekannt ist, ob es sich bei beiden um aktive Gene handelt. Für den Fall, daß beide Kopien aktiv sein sollten, wäre bei geretteten Tieren kein Phänotyp in Abhängigkeit von der Anzahl der *DmX*-Kopien zu beobachten. Eine Rolle von *DmX* als



**Abbildung 4.1:** Expressionsmuster der Gene (A) *l(1)G0287* von lateral (Flyview P1854), und *l(1)G0063* von dorsal (Flyview P1680)

Numerator-Element ist daher unwahrscheinlich. Weiterhin konnten bei *DmX* keine Eigenschaften festgestellt werden, die eine geschlechtsspezifische Regulation ermöglichen würden, wie differentielles Spleißen, differentielle Polyadenylierung oder geschlechtsspezifische Unterschiede in der Transkriptionsstärke. Die Ergebnisse lassen also vermuten, daß *DmX* in beiden Geschlechtern – abgesehen von Transport maternaler Transkripte in die Oozyte – wahrscheinlich in gleicher Weise reguliert wird.

### 4.3 Lokalisation und strukturelle Besonderheiten von *CpY*

In *C. thummi* sind die Geschlechtschromosomen bis auf einen kleinen Bereich in D3e1 (Hägele, 1985) homomorph. In diesem Chromosomenabschnitt ist ein männchenspezifisches Cluster von Cla-Elementen vorhanden, das mit dem dominanten männchenbestimmenden Faktor M eng gekoppelt ist (Schmidt et al., 1982; Kraemer und Schmidt, 1993). Die Situation in *C. thummi* kann als der Beginn der Evolution von heteromorphen Geschlechtschromosomen, wie man sie z. B. auch in *Drosophila* findet, betrachtet werden. Ganz generell scheinen Bereiche, in denen geschlechtsdeterminierende Faktoren liegen, von der Rekombination ausgeschlossen zu sein. Solche Bereiche werden als Transposonfalle diskutiert (Charlesworth et al., 1986). Dort kann eine progressive Anreicherung von Heterochromatin stattfinden (Muller, 1932), welche wiederum eine Anhäufung schädlicher Mutationen begünstigt (Rice, 1994). Die Kombination beider Mechanismen stellt die Grundlage der Degeneration eines Chromosoms und der Entwicklung heteromorpher Geschlechtschromosomen dar. Bei den beiden Schwesternarten *C. thummi* und *C. piger* (Keyl und Strenzke, 1956) liegt im Hinblick auf die Frage einer Heterochromatinanreicherung eine interessante Situation vor: Während *C. thummi* einen relativ hohen Anteil an Heterochromatin und an repetitiver DNA (Schaefer und Schmidt, 1981) besitzt, kann in der Schwesternart *C. piger* kaum Heterochromatin nachgewiesen werden (Hägele, 1977). Dieser Unterschied korreliert mit der Genomgröße. Diese ist bei *C. thummi* ca. 30% größer als in *C. piger* (Keyl, 1957, 1965). Der Unterschied in der Menge an Heterochromatin korreliert auch mit der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Heterochromatin am geschlechtsbestimmenden Locus von *C. thummi* und *C. piger*. Die chromosomale Lokalisation des Geschlechtsdeterminators ist allerdings in *C. thummi* und *C. piger* identisch (Hägele, 1985, 1986). Das Gen *CpY* liegt sowohl in *C. thummi* als auch in *C. piger* in genau diesem chromosomalen Abschnitt. Dieser Abschnitt ist offensichtlich von der Rekombination ausgeschlossen. Dies wurde durch die Anwesenheit von geschlechtsspezifischen RFLPs in den Proto X- und Y-chromosomalen Kopien in *C. thummi* und *C. piger* gezeigt (Kraemer, 1994). Zwischen X- und Y-chromosomaler Kopie konnten generell keine quantitativen Unterschiede in der Transkription festgestellt werden (Kraemer, 1994). Mit der spezifischen Lokalisation von *CpY* in der evolutionären „Keimzelle“ eines differenzierenden Geschlechtschromosoms sind auch Eigenschaften von *CpY* korreliert, die es von *DmX* und *F54E4.1* unterscheidet: Im Gegensatz zu den homologen Genen *DmX* und *F54E4.1* weist *CpY* zum einen differentiell gespleißte Exons auf und zum anderen

eine differentielle Polyadenylierung (Kraemer, 1994). Da *CpY* in Männchen und Weibchen gleichstark transkribiert wird und es offensichtlich einer differenzierten Regulation unterliegt, ist es unwahrscheinlich, daß es sich bei *CpY* um M handelt. Dennoch sind leichte geschlechtsspezifische Unterschiede festzustellen: Bei der Transkriptionsanalyse der differentiell gespleißten Exons fällt auf, daß im Falle von Exon 4, dessen Sequenz integraler Bestandteil von *DmX* und *F54E4.1* ist, differentiell gespleißte Transkripte in ihrer Verteilung mehr oder weniger gleichmäßig sind, d. h. es finden sich in den untersuchten Geweben ungefähr gleichviel Transkripte mit und ohne Exon 4. Das gilt für männliche Gewebe im allgemeinen und für die meisten Gewebe im Weibchen. Im Ovar allerdings ist die Anzahl der Transkripte mit Exon 4 deutlich überrepräsentiert. In Zellkulturzellen ist die Anzahl der Exon 4 enthaltenden Transkripte deutlich unterrepräsentiert. Ob der Bereich von Exon 4 etwas mit dem Transport von RNA in die Oozyte zu tun hat, ist nicht bekannt. Exon 8 enthaltende Transkripte sind im Männchen häufiger als im Weibchen, wo sie z. B. im Ovar überhaupt nicht nachzuweisen sind. Im Männchen sind die Transkripte in allen Tagmata vorhanden, wobei ein Gradient zwischen Kopf und Abdomen besteht (Abbildung 3.14).

Vergleicht man die relative Häufigkeit von Transkripten ohne Exon 4 mit der relativen Häufigkeit derer, welche Exon 8 enthalten, fällt auf, daß erstere häufiger sind und weitläufig vorhanden, während die Expression von Exon 8 sehr spezifisch begrenzt ist. Das Fehlen von Exon 8-Transkripten in Zellkulturzellen, sowie das gänzliche Fehlen des Exon 8-homologen Genabschnittes in *DmX* und *F54E4.1* könnte auf eine spezifische regionale, für die einzelne Zelle nicht lebenswichtige Funktion hindeuten. Weiterhin kann man aufgrund der unterschiedlichen relativen Häufigkeiten die Vorhersage treffen, daß das differentielle Spleißen von Exon 8 nicht zwangsläufig an das differentielle Spleißen von Exon 4 gekoppelt ist. Um zu testen, welche von den theoretisch möglichen Spleißvarianten (Kraemer, 1994) tatsächlich in vivo vorkommen, müßte man aus einer *CpY*-spezifischen cDNA Bank einzelne Klone durch PCR auf den Gehalt von Exon 4 und Exon 8 untersuchen. Ein direkter Nachweis beider Exons in einem Schritt durch RT-PCR ist wegen der geringen Exongrößen und deren weitem Abstand voneinander nicht möglich, denn die Größenunterschiede der resultierenden Moleküle wären zu klein, um sie durch Gelelektrophorese auftrennen zu können.

Ob das differentielle Spleißen von *CpY* auch mit verschiedenen Funktionen korreliert, ist nicht bekannt. Die Tatsache, daß die verschiedenen differentiell gespleißten Transkripte von *CpY* nicht gleichartig verteilt sind, deutet jedoch darauf hin. Ein sehr bekanntes Beispiel eines Gens, das durch differentielles Spleißen in einen Funktionszusammenhang, mit dem es ursprünglich nichts zu tun hat, gerät, ist das Gen *Sxl* aus *Drosophila*. In anderen Dipteren ist *Sxl* nicht geschlechtsspezifisch reguliert (Meise et al., 1998; Saccone et al., 1998). Wahrscheinlich ist *Sxl* in diesen Arten an der Neurogenese beteiligt (Erickson und Cline, 1991; Parkhurst und Meneely, 1994). In *D. melanogaster* jedoch fungiert es als Hauptschalter an der Spitze der Geschlechtsbestimmungskaskade (Cline und Meyer, 1996). Wenn *Sxl* aktiv ist, werden durch seine Produkte somatische Zellen auf die weibliche Geschlechtsdifferenzierung geschaltet (Lucchesi, 1996), im inaktiven Zustand



wird der männliche Entwicklungsgang eingeschlagen. Der Angriffspunkt dieser An/Aus Regulation ist der dosisabhängige Promotor  $P_e$ , der nur in Zellen mit einem X:A-Verhältnis von 1:1 im zellulären Blastoderm Stadium aktiv ist (Keyes et al., 1992; Estes et al., 1995). Später wird *Sxl* von einem anderen Promotor ( $P_m$ ) in beiden Geschlechtern transkribiert. In Abwesenheit von aktivem SXL, wie in Männchen der Fall, enthalten die *Sxl*-Transkripte ein Stop-Kodon in Exon 3, das zu einem verkürzten Protein führt und nicht funktionell ist. In Anwesenheit von SXL – in Weibchen der Fall – wird Exon 3 aus der *Sxl*-RNA herausgespleißt, so daß das funktionale Protein translatiert werden kann. Dieser autoregulative Mechanismus gewährleistet die kontinuierliche Produktion von aktivem SXL in Weibchen (Bell et al., 1988, 1991). In *Drosophila* scheint es also durch die Etablierung von geschlechtsspezifischem differentiellen Spleißen von *Sxl* zu einer neuen Funktion in einer völlig anderen Regulationskaskade gekommen zu sein.

Die erweiterte mögliche Funktionalität von *CpY* durch die differentiell gespleißten Exone 4 und 8 muß entstanden sein durch die Erzeugung von Exon 4 durch die flankierende Insertion von Intron 3 und 4 sowie die Insertion oder Evolution von Exon 8 (siehe dazu Abbildung 1.2). Da die Genstruktur, abgesehen von der Integration transposabler Elemente in die Intronbereiche, auf Proto X- und Proto Y-Chromosom identisch ist, müssen diese Vorgänge stattgefunden haben, bevor der chromosomale Bereich, in dem *CpY* liegt, von der Rekombination ausgeschlossen wurde. Dabei stellt das Fehlen von Exon 4 und das Vorhandensein von Exon 8 den jeweils abgeleiteten Fall dar. Da in der Transkriptionsanalyse bei beiden Exons eine Geschlechtsspezifität festgestellt wurde, wird ein Zusammenhang der geschlechtsspezifischen Spleißdiversifikation mit der Lokalisation von *CpY* vermutet. Ein Zusammenhang des differentiellen Spleißens per se mit der Lokalisation in einem chromosomalen Bereich, in dem keine Rekombination stattfindet, ist unwahrscheinlich, da in beiden Geschlechtern beide Spleißprodukte gefunden werden, das differentielle Spleißen also evolutionär vor der Unterdrückung der Rekombination von *CpY* entstanden sein muß. Unterschiede in der Funktion der *CpY*-Spleißvarianten könnten z. B. durch einen Vergleich des Färbemusters mit spezifischen Antikörpern dargestellt werden. Diese müßten allerdings durch kurze Oligopeptide generiert werden, denn die beiden differentiell gespleißten Exons sind im Vergleich zum gesamten Gen sehr klein.

#### 4.4 Das Transkriptionsprofil von *DmX* und *CpY*

*DmX* zeigt ein komplexes Transkriptionsmuster mit einer ubiquitären Grundexpression und einer erhöhten spezifischen Transkriptionsrate in den Vorläuferstrukturen des Mitteldarms, dem ZNS und dem Antenna-Maxillar-Komplex. Um Gene zu identifizieren, die das gleiche oder ein ähnliches Transkriptionsmuster aufweisen, wurde die Flybase Expression summary (<http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/exprat>) durchsucht. 2464 Gene, die im Nervensystem transkribiert werden, 599 transkribierte Gene aus dem Verdauungstrakt und 14 Gene aus der Oozyte konnten für einen Vergleich herangezogen werden. Die Transkripte in der Oozyte stammen zum Teil aus den Nährzellen und

somit sollten auch Transkripte aus Nährzellen mit berücksichtigt werden, jedoch konnte nach dieser Kategorie nicht gesucht werden. Die niedrige Zahl von nur 14 für die Oozyte zeigt, daß die Annotation der Gene für dieses Gewebe rudimentär ist. 199 der Kandidatengene werden sowohl im Nervensystem als auch im Verdauungstrakt transkribiert, und lediglich drei der Gene zusätzlich auch in der Oozyte. Es handelt sich dabei um *BtK29A*, *l(2)gl* und *ovo*. Das Transkriptionsmuster von *ovo* (Mével-Ninio et al., 1995) unterscheidet sich signifikant von dem des *DmX*, die Expression ist in späten Embryonen auf die Keimbahn beschränkt. Mutanten des Gens *l(2)gl* bilden Tumore in den optischen Loben. *l(2)gl* spielt eine Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Die Transkription ist während der Stadien 10–12 im Ektoderm stärker als in den Mitteldarm-Vorläufern. Im ZNS findet eine besonders intensive Transkription in den Vorläufern der optischen Loben statt (Klämbt und Schmidt, 1986). Auch dieses Expressionmuster unterscheidet sich von *DmX*. Das Gen *BtK29A* (Katzen et al., 1990) kodiert für eine Protein-Thyrosin-Kinase und zeigt zwar eine ähnliche Gewebespezifität wie *DmX*, es bestehen jedoch signifikante Unterschiede in der quantitativen Verteilung der Transkripte. Bei diesen drei Genen konnte keine Koregulation mit *DmX* festgestellt werden, allerdings ist offensichtlich, daß mit der von Flybase angebotenen Routine nur ein marginaler Teil der bekannten Gene, welche im embryonalen ZNS, den Darmvorläufern und in der Oogenese transkribiert werden, extrahiert werden konnte (vgl. Kapitel 4.9).

#### 4.4.1 *DmX* in der Oogenese

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß es sich bei *DmX* möglicherweise um ein maternales Effektgen handelt (Kapitel 3.2.3). *DmX*-Transkripte werden während der Oogenese massiv in die Oozyte transportiert, aber offensichtlich schon während der Oogenese translatiert, denn in frisch abgelegten Eiern sind fast keine Transkripte nachweisbar. Eine stärkere Färbung kann erst wieder ab Stadium 5 am posterioren Ende des Embryos beobachtet werden. Dies könnte auf embryonale Transkription hindeuten. Vergleicht man das Transkriptionsprofil von *DmX* mit typischen maternalen Effektgenen, lassen sich einige Unterschiede feststellen. Eine Eigenschaft der meisten maternalen Gene ist eine spezifische Beschränkung der Lokalisation in bestimmten Arealen der Oozyte. Solche Gene üben in der Regel eine Funktion bei der Achsendeterminierung und der Organogenese des späteren Embryos aus. Als Beispiele seien hier die Gene *bicoid* (Driever und Nüsslein-Volhard, 1988), *nanos* (Wang und Lehmann, 1991) und *oskar* (Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986) genannt. Die *bicoid*-RNA ist im anterioren Teil des Embryos lokalisiert und initiiert die Determinierung der anterioren Körperstrukturen. *nanos* wird am posterioren Pols des Embryos lokalisiert und bewirkt dort die Differenzierung von posterioren Körperstrukturen. *oskar*-RNA wird ebenfalls am posterioren Ende des Embryos lokalisiert und wird dort wiederum für die Lokalisierung von *nanos* benötigt (Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1986; Schüpbach und Wieschaus, 1986). Die Phänotypen dieser Gene treten erst in der F1 mutanter Tiere auf, da die Genfunktion in den Mutanten selbst durch die maternalen RNAs aufrechterhalten werden. Für Gene, welche

in einem späteren Teil der Regulationskaskade eine Rolle spielen, wie z. B. die Genprodukte von *torso* (Bier, 1998) und *toll* (Gay und Keith, 1991), gilt eine Übereinstimmung von Lokalisation und Wirkungsort nicht. Das Toll Protein ist ubiquitär im Embryo verteilt, wird aber nur auf der ventralen Seite des Eies aktiviert (Morisato und Anderson, 1994; Roth, 1994). Auch der Membranrezeptor Torso ist ubiquitär im Embryo verteilt, wird aber nur im anterioren und posterioren Abschnitt aktiviert (Bier, 1998). Der Zeitpunkt an dem ein maternaler Phänotyp in Erscheinung tritt, hängt von der Abbaugeschwindigkeit der maternalen RNA, sowie vom Beginn der embryonalen Expression ab. Als Beispiele seien wieder *torso* und *toll* angeführt: Bei *torso* treten Fehlentwicklungen bereits während der Embryonalentwicklung auf (Klingler et al., 1988), in Falle von *toll* treten erst während des ersten Larvenstadiums Beeinträchtigungen auf (Anderson et al., 1985a,b). Der massive Transport von *DmX*-RNA in die Oozyte, zeigt, daß dort maternale *DmX*-Transkripte zur Wirkung kommen. Der Zeitpunkt des Auftretens von Schädigungen bei *DmX*-Mutanten im ersten Larvenstadium ist ebenfalls konsistent mit anderen maternalen Genen. Da jedoch in jungen Eiern fast keine maternalen Transkripte nachzuweisen sind, muß das Überleben der mutanten Embryonen bis zum ersten Larvenstadium nicht auf eine fortdauernde Translation maternaler Transkripte zurückzuführen sein, sondern auf die Persistenz von DMX Protein. Durch die Generierung eines *DmX*-spezifischen Antikörpers und einem direkten Nachweis von DMX könnte dieser Sachverhalt genauer analysiert werden.

#### 4.4.2 *DmX* in der Embryogenese

Das Transkriptionsmuster von *DmX* unterscheidet sich von ubiquitär transkribierten Genen, wie am Beispiel der *GAPDH* gezeigt. Es gibt zwei Kopien des *GAPDH*-Gens im Genom von *D. melanogaster*. Beide Kopien werden ubiquitär exprimiert, aber mit gewebespezifisch quantitativ unterschiedlichen Pegeln (Sullivan et al., 1985). Während die eine Kopie gleichmäßig ubiquitär exprimiert ist, wird die zweite Kopie prädominant im Muskel transkribiert. Für die in situ-Analysen wurden stets Sonden für diejenige Kopie der *GAPDH* verwendet, die ubiquitär exprimiert wird. *DmX* besitzt zwar auch eine zum Teil ubiquitäre Transkription, das spezifische Muster unterscheidet *DmX* jedoch von den Haushaltsgenen des Energiestoffwechsels. Als nächstes stellt sich die Frage, ob das Transkriptionsmuster von *DmX* deckungsgleich mit zellteilungsaktiven Regionen des Embryos ist. Ein Vergleich mit Genen, die in der Zellproliferation eine Rolle spielen, wie z. B. *myb* (Katzen und Bishop, 1960) zeigt, daß es sich bei den Geweben, welche *DmX* am intensivsten transkribieren, nicht um die zu diesem Zeitpunkt teilungsaktivsten handelt. Ein direkter Zusammenhang zwischen *DmX* und Zellproliferation ist daher unwahrscheinlich.

Mittlerweile konnten zahlreiche WD-Repeat Proteine aus *Drosophila* charakterisiert werden. Obwohl diese Proteine ein gemeinsames Protein-Motiv besitzen, sind sie an den unterschiedlichsten Vorgängen in der Zelle beteiligt (Kapitel 1.5). Durch einen Vergleich von DMX mit anderen WD-Proteinen aus *Drosophila* sollen Proteine mit einem ähnlichen Transkriptionsmuster und Phänotyp identifiziert werden. Dadurch könnte eine funk-

tionelle Klassifizierung von DMX möglich werden. Das an der Neurogenese beteiligte Gen *Enhancer of split*, *E(spl)* besitzt sechs WD-Repeats (Hartley et al., 1988). Dessen Genprodukt interagiert mit Notch und Delta, welche die Differenzierung von neuroektodermalen Zellen zu Neuroblasten steuern. Das Transkriptionsmuster von *E(spl)* deckt sich mit dem von Notch (Hartley et al., 1987). In Embryonen der Stadien 8 und 9 ist ein nahezu ubiquitäres Muster zu beobachten. Dabei ist der gesamte Keimstreif, sowie die Vorläufer des Verdauungstraktes markiert. Während der Verkürzung des Keimstreifes im Stadium 13 nimmt die Signalstärke in den Darmvorläufern ab, im ZNS hingegen zu. Ab Stadium 16 ist die Transkription nahezu vollständig auf das ZNS beschränkt, im Gegensatz zu *DmX*, welches zusätzlich zum ZNS auch eine starke Färbung im Hinterdarm und im Antenna-Maxillar-Komplex aufweist. *E(spl)*, *notch* und *delta* weisen ein ein sehr ähnliches Transkriptionsmuster auf, welches sich nicht mit dem von *DmX* deckt.

Ein weiteres Gen, das für ein WD-Protein kodiert, ist *esc* (*extra sex combs*). Es handelt sich dabei um ein Mitglied der Polycomb Familie, die für die Aufrechterhaltung des reprimierten Status der homoeotischen Gene verantwortlich ist (Orlando und Paro, 1995). Die *ecs*-mRNA hat eine Länge von 1,8 kb und kodiert sechs WD-Repeats. Sie fungiert als maternale Botschaft und weist in den Embryonalstadien 5–9 ein Expressionsmuster (Gutjahr et al., 1995) auf, das dem von *DmX* sehr ähnlich ist. Es wird vermutet, daß *Esc* über Protein-Protein Wechselwirkungen an der Aufrechterhaltung der reprimierenden Chromatinstruktur beteiligt ist, welche durch Hb1, die Polycomb-Gen Produkte und TFIID-*TAf89* vermittelt werden. Das Muster in Stadium 13 unterscheidet sich jedoch von *DmX* besonders im Kopfbereich, obwohl auch eine Färbung im Hinterdarm nachgewiesen werden kann (Gutjahr et al., 1995). Allerdings führen Mutationen von *esc* im Gegensatz zu Mutationen in *DmX* zu Mißbildungen. NURF-55 (Martínez-Balbás et al., 1998) enthält sieben WD-Repeats und ist identisch zum *Drosophila* chromatin assembly factor dCAF-1 (Tyler et al., 1996). Dieses Protein steht in Wechselwirkung mit Histon-Deacetylasen und der Histon-Acetyltransferase und kann so durch eine Transkriptionsfaktor vermittelte regionale Veränderung der Nukleosomenstruktur eine regulative Funktion ausüben (Tsukiyama et al., 1995; Tsukiyama und Wu, 1995). NURF-55 weist im Gegensatz zu *DmX* ein rein ubiquitäres Expressionsmuster auf (Tyler et al., 1996), das dem der *GAPDH* gleicht, sich aber von der *DmX* -Transkription im ZNS, Antenna-Maxillar-Komplex und Hinterdarm deutlich unterscheidet.

DHH wird von einem 4,1 kb großen Transkript kodiert, besitzt sieben WD-Repeats (Kirov et al., 1998) und gehört zur Familie der HIRA (Histon Regulator) Gene. Es ist auf dem X-Chromosom lokalisiert im Bereich 7B3–4 (Lindsley und Zimm, 1992). Bei *Dhh* handelt es sich um ein maternales Effektag, es unterscheidet sich jedoch im Transkriptionsmuster von *DmX*. Dark ist ein WD-Protein aus *Drosophila*, das starke Homologie zum menschlichen Apaf-1/CED-4 aufweist und in der Apoptose eine Rolle spielt (Rodriguez et al., 1999). *dark*-Mutanten zeigen multiple Mißbildungen an den Flügeln, Augen und Borsten (Rodriguez et al., 1999). Bei dem Vergleich fällt auf, daß das Transkriptionsmuster von WD-Repeat Proteinen in der Regel nicht auf einzelne kleine Gewebeareale beschränkt ist. Dies korreliert mit der Eigenschaft vieler WD-Proteine, wichtige regu-

latorische Funktionen wahrzunehmen. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Transkriptionsmuster von *DmX* trotz einiger Ähnlichkeiten keinem der eruierten Transkriptionsmuster der oben aufgeführten Gene entspricht, so daß keine Rückschlüsse auf eine funktionelle Klassifizierung von *DmX* gezogen werden können.

## 4.5 Inhibierung der *DmX*-Expression

Es gibt in der Literatur zahlreiche Beispiele für das Ausschalten von Genen durch Antisense-RNA, Ribozyme und neuerdings auch RNAi. Bei den aufgeführten Beispielen fällt auf, daß diese in keinem Fall als erste Methode zur Bestimmung des Phänotyps herangezogen wurden. Es konnte zwar in vielen Fällen ein Phänotyp erzeugt werden, dieser ist aber in der Regel nur mit einem sehr schwachen mutanten Allel vergleichbar und konnte in allen Fällen erst mit den entsprechenden für dieses Genprodukt etablierten Nachweismethoden detektiert werden.

### 4.5.1 Inhibierung der Genexpression durch Ribozyme

Wie bereits in Kapitel 3.4 dargestellt wurde, konnten weder mit Antisense-RNA noch mit einem Ribozym ein signifikanter *DmX*<sup>-</sup>-Phänotyp erzeugt werden. In den folgenden Abschnitten sollen mögliche Ursachen hierfür diskutiert werden.

Für den Einsatz von Ribozymen in *Drosophila* liegen nur drei Beispiele aus der Literatur vor. Vanario-Alonso et al. (1995) konstruierten zwei *hsp70*-regulierte Ribozyme für das *paired* (*prd*)-Gen. In *prd* Nullmutanten wird eine ernsthafte Disorganisation von Kopfstrukturen beobachtet. Ein Ribozym wurde direkt hinter das ATG-Startkodon gelegt, das zweite Ribozym zwischen einer Pairedbox und Homoeobox ca. 850 bp weiter in 3'-Richtung. Analysen von Kutikula-Präparationen zeigten, daß die Transformanten eine normale Segmentation, sowie normale Kopfstrukturen aufweisen. Erst durch eine detaillierte Analyse der Kopfstrukturen konnte eine Reduktion von einzelnen sensorischen Organen in etwa 40% der Transformanten beobachtet werden. Leider wurden in diesen Analysen balancierte Fliegen verwendet, welche beide Ribozyme enthielten, so daß keine quantitative Unterscheidung in der Wirkung der beiden Ribozyme vorgenommen werden konnte.

Ein *fushi tarazu*-Phänotyp durch ein *hsp70*-reguliertes Ribozym konnte von Zhao und Pick (1993) erzeugt werden. Diese Arbeit diente als Vorlage für die hier durchgeführten Versuche. Das Ribozym ist komplementär zu der *ftz*-mRNA an den Positionen +721 bis +742 nahe einer Spleißstelle stromaufwärts der Homoeobox. *ftz*-Nullmutanten fehlt jedes zweite Segment und sie sterben noch vor dem Schlüpfen. Der Phänotyp der *ftz*-Ribozym Embryonen wurde durch Anti-Ftz Antikörper dargestellt. Insgesamt entspricht nach Zhao und Pick (1993) die Stärke des durch das Ribozym induzierten Phänotyps dem von Wakimoto et al. (1984) beschriebenen Phänotyp einer temperatursensitiven Mutante mit der entsprechenden Varianz und Abhängigkeit des Phänotyps vom Zeitpunkt der Induktion.

Heinrich et al. (1993) erzeugten transgene Fliegen, die ein Ribozymkonstrukt gegen das native *white* Gen enthielten und konnten eine signifikante Reduktion der Augenfärbung in Stämmen beobachten, die aufgrund ihres genetischen Hintergrundes bereits eine reduzierte Augenfärbung aufwiesen. Weiterhin konnten sie nachweisen, daß die Effektivität der Inhibierung von der Kopienzahl und der chromosomalen Position des Ribozyms abhängt (Heinrich et al., 1995). Längere RNA-Arme, wie sie durch den *hsp70* Transkriptionsstart und den 3'-untranslatierten Bereich am Ribozym zwangsläufig entstehen, können in Einzelfällen durch Selbsthybridisierung der Arme eine Aktivität verhindern (Hendry und McCall, 1995). Ribozyme scheinen also – wenn überhaupt – nur einen schwachen Phänotyp zu induzieren, der zudem nur im entsprechenden genetischen Hintergrund in Erscheinung tritt oder nur mit genspezifischen Detektionsmethoden nachzuweisen ist.

#### 4.5.2 Inhibierung der Genexpression durch Antisense-RNA

Bereits 1985 gelang es Rosenberg et al. (1985) einen *Krüppel*<sup>-</sup> Phänotyp durch Injektion von Antisense-RNA in *Drosophila* Embryonen zu erzeugen. Für dieses Gen konnten Phänotypen verschiedener Stärke beschrieben werden (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980; Wieschaus et al., 1984; Preiss et al., 1984). Der starke Phänotyp ist embryonal letal, während bei schwachen Phänotypen die Embryonen schlüpfen und das Adultstadium erreichen können. Mit einer Antisense-RNA Konzentration, die einem 50-fachen der *Krüppel*-Transkriptmenge entspricht, konnten nur 1,6% starke Phänotypen beobachtet werden. Bei einem 10<sup>3</sup>-fachen Überschuß konnten in bis zu 13% der injizierten Embryonen ein starker Phänotyp detektiert werden.

Der erste Versuch, ein Gen durch die Transfektion eines induzierbaren Antisense Konstruktes zu supprimieren, wurde von Qian et al. (1988) unternommen. Die gesamte kodierende Sequenz von *rpA1* wurde unter Kontrolle von *hsp70* in *Drosophila* transfiziert. In den transgenen Fliegen wurden in einem Prozentsatz von 40–80% der vermutete Phänotyp beobachtet. Schmucker et al. (1992) setzten zur Untersuchung der Rolle von *Krüppel* bei der Entwicklung des Bowig-Organs ein Hitzeschock-Konstrukt ein, welches das ganze *Krüppel*-Gen in inverser Orientierung enthielt. Sie konnten damit bei etwa 30% der hitzegeschockten Tiere nach Antikörperfärbungen einen Phänotyp beobachten, der in seiner Penetranz dem schwacher mutanter Allele entsprach. Auch bei dem Gen *knock-out* konnte durch Expression von Antisense-Konstrukten unter Hitzeschock und GAL4-Kontrolle ein Phänotyp erzeugt werden, allerdings ebenfalls mit verminderter Penetranz (Hartmann et al., 1997). Hier wurde der Phänotyp durch Antikörperfärbung der betroffenen Nervenenden nachgewiesen. Der von Paululat et al. (1997) bei *rolling stone* (*rost*) durch eine UAS gesteuerte Antisense-RNA erzeugte Phänotyp war ebenfalls schwächer als der mutanter Allele. Die betroffenen Muskelgruppen wurden durch Antikörperfärbung dargestellt. Die Inaktivierung der nichtkodierenden RNA *Pgc* durch ein entsprechendes Antisense-Konstrukt unter Hitzeschock-Kontrolle durch Nakamura et al. (1996) führte zu Defekten der Polzellmigration. Dabei wurde eine maximale Reduktion der Polzellen von 34 auf 25–27 beobachtet. Reynaud et al. (1997) zeigten, daß die Oogenese in *Drosophi-*

la durch Antisense Suppression des ribosomalen Proteins S3A unterbrochen wird. Dabei wurde eine komplette S3A cDNA invers hinter einen *hsp70* Promotor kloniert. Nach wiederholten Hitzeschocks wurden allerdings keine Defekte beobachtet. Allerdings ist eine Verzögerung des larvalen und pupalen Entwicklungsstadiums, sowie eine Verminderung der Eierproduktion beobachtet worden. Misquitta und Paterson (1999) konnten unter Verwendung von RNAi in über 75% der injizierten Embryonen einen Phänotyp beobachten. Dabei wurden mehrere Gene getestet und jeweils eine doppelsträngige RNA des gesamten Gens verwendet. Ein weiterer Erfolg mit dieser Methode wurde von Kennerdell und Carthew (1998) in *Drosophila* erzielt. Diese starke inhibierende Wirkung von RNAi („RNA-Interferenz“ Rocheleau et al. (1997)) wurde von Guo und Kemphues (1995) zuerst beobachtet und konnte besonders eindrucksvoll an *C. elegans* eingesetzt werden (Montgomery et al., 1998; Shi und Mello, 1998; Tabara et al., 1998; Timmons und Fire, 1998), eine Zusammenfassung findet sich bei Sharp (1999). Die Interferenz der doppelsträngigen RNA ist über Zellgrenzen hinweg wirksam, so daß die Applikation der RNAi bei *C. elegans* durch Verfütterung, Addition zum Zuchtmedium und sogar durch Verfütterung von transformierten *E. coli*, welche beide Stränge der dsRNA exprimieren (Timmons und Fire, 1998), funktioniert. Die Wirkung der RNA-Interferenz scheint dabei auf zelleigenen posttranskriptionellen (Fire et al., 1998) Prozessen zu beruhen, die in Zusammenhang mit der zellulären Abwehr von Viren stehen (Angell und Baulcombe, 1997). So wird versucht, die um circa eine Größenordnung höhere Wirkung von RNAi gegenüber einzelsträngiger Antisense- oder Sense-RNA zu erklären (Fire et al., 1998), deren relativ schwache inhibitorische Wirkung dann letztendlich auch auf dem RNAi-Prinzip beruhen würde. Dieses würde aber beim Einsatz von einzelsträngiger RNA nur rudimentär zum Einsatz kommen, was im Einklang mit oben gezeigten Ergebnissen steht. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die EMS- oder P-Element Mutagenese zur Zeit immer noch das Mittel der Wahl ist, um den Phänotyp eines mutierten Gens zu bestimmen. Methoden, welche auf der Expression von Antisense-Konstrukten unter *hsp70* oder *GAL4-UAS* Kontrolle stehen, haben nur einen Wert, wenn der Phänotyp bereits bekannt ist und entsprechende molekulare Nachweismethoden für diesen existieren. So kann die Auswirkung schwacher Allele eines Gens zu bestimmten Zeiten und in unterschiedlichem genetischen Hintergrund simuliert werden. Die niedrige Anzahl der Publikationen über den Einsatz von Ribozymen spricht für sich. Die Anzahl der Gene, für die sich mit dieser Methode ein nachweisbarer Phänotyp erzeugen läßt, ist offensichtlich sehr begrenzt. Der Einsatz von doppelsträngiger RNA hat in *C. elegans* zu durchschlagenden Erfolgen geführt. Ob sich dies auf *Drosophila* in gleichem Maße übertragen läßt, wird man an der künftigen Anzahl und Qualität der Publikationen über den erfolgreichen „knockout“ verschiedener Gene beurteilen können.

## 4.6 Die regulatorischen Bereiche von *DmX*, *CpY* und *DmSPX*

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, daß wahrscheinlich der kurze Bereich zwischen den Transkriptionsstartstellen von *DmX* und *DmSPX* in Verbindung mit dem ersten großen Intron von *DmX* (Kapitel 3.2.5) für eine Transkription von *DmX* nicht ausreicht. Erst die zusätzliche Anwesenheit von 2,6 kb stromaufwärts von *DmX* und 830 bp des 3'-untranslatierten Bereichs von *DmX* initiieren eine Transkription. Anhand des Rettungsvektors pCosPerDmX-13 (Abbildung 3.20) und der vollständigen Rettung des Mutantenphänotyps (Kraemer, pers. Mitteilung) konnte gezeigt werden, daß die in pCosPerDmX-13 enthaltenen regulatorischen Bereiche für eine wildtypische Expression vollständig ausreichen. Die Existenz weiterer wichtiger regulatorischer Elemente jenseits dieses klonierten Bereichs ist daher äußerst unwahrscheinlich. Das Reporter-gen des Vektors pCosPerΔ*mX*-EGFP konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, obwohl vorher gezeigt wurde, daß dieser Vektor alle notwendigen regulatorischen Elemente enthält (Kapitel 3.2.5). Eine mögliche Ursache dafür wäre, daß die Nachweisempfindlichkeit von GFP durch Fluoreszenzmikroskopie um einige Größenordnungen kleiner sein dürfte als die der RT-PCR. Es ist also durchaus denkbar, daß die Transkriptionsstärke des transgenen *DmX* zwar ausreicht, seine biologische Funktion zu erfüllen, jedoch nicht für eine fluoreszenzmikroskopisch nachweisbare GFP-Expression.

Auffällig im Vergleich zu *F54E4.1* und *CpY* ist bei *D. melanogaster* der kurze Abstand der Cap-Stelle von *DmX* zur Cap-Stelle des *DmSPX* Gens und die Größe des ersten Introns von *DmX* (Abbildung 3.20). Daß regulatorische Elemente auch im ersten Intron von Genen liegen können, wurde bereits für folgende Gene gezeigt:  $\beta 3$  *tubulin* (Gasch et al., 1989; Bruhat et al., 1990), *period* (Cooper et al., 1994), *engrailed* (Kassis, 1990), *DOPA Carboxylase* Gen (Hodgetts et al., 1995) sowie *Tropomyosin I* (Gremke et al., 1993; Meredith und Storti, 1993; Lin et al., 1996). Es ist jedoch bisher ungeklärt, ob das erste Intron von *DmX* regulatorische Sequenzen enthält, welche für die Transkription von *DmX* oder *DmSPX* benötigt werden. Das Intron könnte durchaus aufgrund seiner Lage und Größe wichtige Regulatorsequenzen sowohl für *DmX* als auch für *DmSPX* enthalten. Diese müßten dann aber mit anderen Regulatoren interagieren, da sie, wie gezeigt wurde, allein keine Transkription initiieren können. Aus oben genannten Gründen müssen sich essentielle Enhancer-Elemente für die *DmX* -Transkription entweder stromabwärts von *DmSPX* befinden, in dessen Intron oder aber im 3'-untranslatierten Bereich des *DmX* -Gens. Eine Möglichkeit besteht darin, daß Intron 1 von *DmX* die entsprechenden Regulatorsequenzen für die Expression des *DmSPX* -Gens enthält. Dafür würde sprechen, daß Intron 1 nur in *DmX* relativ groß ist und nur *DmX* direkt im 5'-Bereich von einem anderen Gen flankiert wird. Ein regulatorischer Einfluß des ersten Introns von *DmX* auf *DmSPX* könnte z. B. durch die Herstellung verschiedener Deletionskonstrukte aus pCosPerDmX-13 und der Einführung einer Markermutation in *DmSPX* durch RT-PCR an transgenen Fliegen untersucht werden. Ebenso könnte der Einfluß der 3'-flankierenden Bereiche von *DmSPX* und *DmX* auf die Transkription von *DmX* mittels weiterer Deletionen des Vektors pCosPerΔ*mX*-2 geklärt werden.



Die starke Konservierung der Position des ersten Introns (siehe Abbildung 4.2) zwischen *Drosophila*, *Chironomus* und *C. elegans* zeigt, daß dieser Bereich der Gene einem besonderen Selektionsdruck unterliegt. Dies kann darauf beruhen, daß dieser Genbereich für eine wichtige Proteindomäne kodiert. Interessanterweise liegen die in ihrer Position konservierten Introns in den Sequenzen, die für die N-terminalen und C-terminalen WD-Repeats kodieren. Aber auch der unmittelbar proximal flankierende Bereich des C-terminalen WD-Repeats scheint von besonderer Bedeutung zu sein. Darauf deutet die konservierte Intronposition in demjenigen Bereich hin, in dem bei *CpY* das zusätzliche differenziell gespleißte Exon 8 inseriert ist. Die Spleißprodukte, welche dieses Exon enthalten, sind in den Geschlechtern in unterschiedlichem Verhältnis enthalten. Diese Unterschiede zeigen an, daß es sich hier um einen Prozeß handelt, bei dem natürlich eine funktionale Domäne durch die Integration von Exon 8 beeinflußt sein muß und potentiell mehrere Funktionen wahrnehmen könnte.

In *Drosophila* konnten noch weitere Gene gefunden werden, welche eine ähnliche Genanordnung wie *DmX* und *DmSPX* aufweisen. Das Gen für die zweitgrößte Unter-einheit der RNA-Polymerase II wird ebenfalls von einem bidirektionalen Promotor reguliert, der das ATG des *polIII*-Gen von dem 467 bp entfernten Startkodon des flankierenden Gens trennt (Sitzler et al., 1991). Der Abstand der Transkriptionsstarts von *DmX* und *DmSPX* beträgt 174 bp, der Abstand der Translationsstarts beträgt 563 bp. Es existieren in *D. melanogaster* jedoch durchaus noch kleinere bidirektionale Promotoren. So umfaßt der Bereich zwischen den Translationsstarts von *serendipity*  $\beta$  (*sry* $\beta$ )-Gen und dem *janus A* (*janA*)-Gen nur 173 bp (Yanicostas et al., 1995). Ähnlich nah beieinander gelegene Transkriptionsstarts wurden außerdem nur bei den F-Elementen gefunden (Minchiotti und di Nocera, 1991). Die Existenz noch kleinerer bidirektionaler Promotoren zeigt, daß selbst in einem so kleinen Promotor wir für *DmX/DmSPX* noch Raum für spezifische regulatorische Elemente ist. Außer den Standard-Boxen konnten mit dem Programm Ma-

*DmX*:

```
GGCTCCGTGGAAGGAATACCATTTACA[gt...ag]GCCTACGCCCGCGGCTGCAATGTG
G S V E G I P F T A Y A A G C N V
```

*CpY*:

```
GGATCTGTGCGAAGGCATTAGTTTTACA[gt...ag]GCGTATGCAGCAGGCTGCAATATT
G S V E G I S F T A Y A A G C N I
```

*F54E4.1*:

```
GGAAATATTGAAGGGCTAACCTTCACG[gt...ag]GCGTGCGCTGTTGGATCAGATGTC
G N I E G L T F T A C A V G S D V
```

**Abbildung 4.2:** Die Position des ersten Introns ist in den Homologen von *DmX* in *D. melanogaster*, *C. piger* und *C. elegans* trotz der unterschiedlichen Introngröße an der gleichen Stelle.

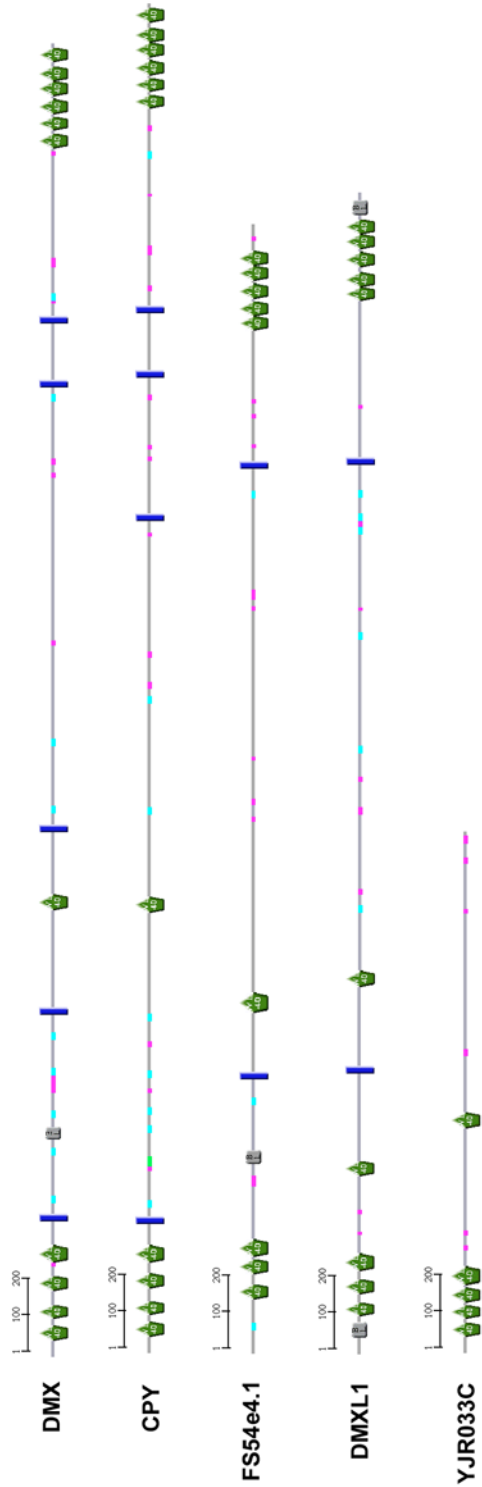
tInspector von Quandt et al. (1995) keine Motive identifiziert werden, die einen Aufschluß über die Funktion geben könnten.

#### 4.7 DMX/CPY besitzt wahrscheinlich zwei WD-Propeller

Um Hinweise für die Existenz möglicher funktioneller Domänen in *DmX* zu erhalten, wurden eine Reihe bioinformatischer Methoden angewandt. Dazu wurden die abgeleiteten Proteinsequenzen der Gene *DmX* und *CpY* mit den Programm-Paketen PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>) von Nakai und Kanehisa (1992) in der aktualisierten Version II, Motifsearch (<http://motif.genome.ad.jp/>), sowie dem SMART-Paket von Schultz et al. (1998) (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 4.2

Das Programm-Paket MOTIF durchsucht verschiedene Motiv-Datenbanken. PROSITE wird mit den Programmen Motifind und Profileind (Hofmann et al., 1999) (ICR, Kyoto Univ.) durchsucht, die BLOCKS-Datenbank (Henikoff et al., 1999a,b) wird mit BLIMS (Fred Hutchinson Cancer Research Center) durchsucht, die ProDom-Datenbank (Sonnhammer und Kahn, 1994; Corpet et al., 1999) mit BLASTp (BLAST2, NCBI), PRINTS (Atwood et al., 1999) ebenfalls mit BLIMS und Pfam (Bateman et al., 1999) mit HMMER (Washington Univ.). PSORTII besteht aus einer Reihe von Unterprogrammen, mit denen eine Aussage über die zelluläre Lokalisation eines Proteins gemacht werden kann. Dazu gehören unter anderem PSG (McGeoch, 1985) und ALOM (Klein et al., 1985). Mit SMART in der Version 3.1 konnte die konsistenteste und damit glaubwürdigste Analyse der homologen Gene durchgeführt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3 zusammengefaßt.

Bei der Analyse von CPY wurde in PROSITE lediglich eine Aminoacyl-transfer RNA Synthetase Klasse-II Signatur 2 detektiert. In Pfam konnte nur 1 WD-Repeat gefunden werden. In PRINTS wurden mit 10 WD-Repeats die größte Anzahl in diesem Programm-Paket gefunden und außerdem eine weitere Domäne, die aber von keinem anderen Programm detektiert wird. In BLOCKS wurden nur fünf WD-Repeats, jedoch auch 107 weitere Motive verschiedenster Funktion gefunden. Für DMX wurden in PROSITE außer der auch in CPY gefundenen Domäne noch ein WD-Repeat und zwei weitere Domänen gefunden, die aber mit keinem anderen Programm detektiert wurden. In Pfam wurde für DMX noch nicht einmal ein WD-Repeat gefunden, während PRINTS immerhin 2 WD-Repeats, eine Transmembrandomäne und zwei weitere Domänen registriert, die aber von keinem anderen Programm detektiert werden. In BLOCKS werden nur drei WD-Repeats, jedoch auch 118 weitere Motive verschiedenster Funktion gefunden. In ProDom wurden jeweils die anderen Homologen der DMX-Familie gefunden. Insgesamt läßt sich festhalten, daß die Ergebnisse, abgesehen von PRINTS eine eindeutige Einordnung von DMX und seinen Homologen in die Familie der WD-Proteine nicht gestatten. Zwar werden von PFAM und PROSITE WD Repeats detektiert, aber da jeweils höchstens ein WD Re-



**Abbildung 4.3:** Vergleich der von dem SMART-Paket (Schultz et al., 1998) (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de/>) postulierten Domänen in den abgeleiteten Proteinen *DmX*-verwandter Gene. Die grünen Pentagone repräsentieren WD-Repeats, an den Positionen der dunkelblauen Rechtecke sagt das Programm TopPred (von Heijne (1992); Nielsen et al. (1999), <http://www.biokemi.su.se/~server/toppred2/toppredServer.cgi>) hochwahrscheinliche Transmembran-domänen vorher, an den hellblauen Stellen besteht eine geringere Wahrscheinlichkeit für die Existenz einer Transmembran-domäne. Bereiche in rosa symbolisieren Bereiche niedriger Komplexität, wie sie von SEG (<http://blast.wustl.edu:81/pub/seg/>, Wootton und Federhen (1996)) detektiert werden.

Programm	Paket	DMX	CPY	F54E4.1
Gehalt an WD-Repeats				
PROSITE	MOTIF	1	–	1
PFAM	MOTIF	–	1	1
PRINTS	MOTIF	2	10	8
BLOCKS	MOTIF	3	5	4
	SMART	12	11	11
Transmembrandomänen				
HMMTOP		–	–	–
SOSUI		–	–	–
ALOM (-2.0)	PSORTII	–	1	1
ALOM (0.5)	PSORTII	2	5	3
TOPPRED	SMART	5	4	2
PRINTS	MOTIF	1	–	1
Signalpeptid				
PSG	PSORTII	–	–	–
Wahrscheinlichkeit der Lokalisation				
	PSORTII	78% Kern	65% Kern	74 % Kern

**Tabelle 4.2:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Computeranalysen von den abgeleiteten Proteinsequenzen von *DmX*, *CpY* und *F54E4.1* mit den Programmen PSORTII, MOTIF, SMART, HMMTOP und SOSUI

peat identifiziert wird, ist dieser unter den falsch-positiven Treffern ebensowenig zu identifizieren wie die 5 WD Repeats, die Blocks findet, unter über 100 anderen Motiven, welche mit Sicherheit nicht alle in den DMX-Verwandten vorkommen. Außerdem wird die Glaubwürdigkeit der WD-Treffer – obwohl richtig – durch die schwankende Zahl zwischen den Homologen (bei PRINTS zwischen 2 und 10) beeinträchtigt. Das Ergebnis von SMART überzeugt im Gegensatz zu den anderen nicht nur durch die hohe Trefferzahl, sondern auch durch die Konsistenz der Ergebnisse zwischen den Homologen (Abbildung 4.3): Hier wurden in allen Homologen zwischen 11 und 12 WD Repeats detektiert. In DMX wurden 12 WD-Repeats identifiziert. Der fünfte gilt als unsicher und ist deswegen als graue Box dargestellt. Dieser Repeat wird in CPY nicht erkannt, sonst weisen CPY und DMX hinsichtlich ihrer WD-Struktur keine Unterschiede auf. Bei beiden Proteinen werden die terminalen sechs WD-Repeats (siehe Kapitel 4.8) erkannt. Dies konnte bis dato von keinem anderen Programm geleistet werden und SMART übertrifft hierbei sogar das vom BMERC entwickelte PSA (vergleiche Kapitel 4.8). Bei F54E4.1 allerdings werden am C-terminalen Ende nur fünf WD-Repeats postuliert, obwohl ein Alignment dieser Bereiche (siehe Abbildung 4.4) klar zeigt, daß diese Bereiche die gleiche Struktur besitzen. DMXL1, ein von (Kraemer et al., 2000a) entdecktes Homolog des Menschen, weist eine sehr starke Strukturähnlichkeit mit F54E4.1 auf.

Die Nachweisgenauigkeit für WD-Repeats hat sich in den letzten zwei Jahren deutlich gesteigert. Konnten mit den damaligen Programmen, ähnlich wie in den MOTIF-Ergebnissen gezeigt, nur ein WD-Repeat detektiert werden, so werden jetzt bis zu 12 gefunden. Durch Suche per Auge wurden von Kraemer et al. (1998) in DMX 30 WD-Repeats gefunden (Abbildung 1.6). Das ist die höchste jemals in einem Protein gefundene Anzahl. Andererseits ist angesichts der postulierten Anzahl von 4–8 Einheiten pro Propellerstruktur (Neer et al., 1994) eine so hohe Anzahl von mindestens fünf Propellern in einem Protein eher unwahrscheinlich. Allerdings erkennen die meisten Programme WD-Repeats nur sehr unzureichend und auch modernere Programme wie SMART übersehen viele Repeats, wie der Vergleich der Homologen in Abbildung 4.3 zeigt. Dies bedeutet, daß die Anzahl der Repeats in WD-Proteinen oft als zu niedrig eingeschätzt wird. Das durch den Vergleich erzeugte Modell liefert den wichtigen Hinweis auf die Existenz von zwei WD-Propellern, von denen der eine am N-terminus, der andere am C-Terminus liegt. Der Strukturvergleich der Proteine in Hinsicht auf die Verteilung von WD-Repeats ist ein gutes Beispiel dafür, wie die Signifikanz einzelner Domänen durch den Vergleich von Homologen verstärkt werden kann.

Über die Existenz von Transmembrandomänen liefern die verschiedenen Programme sehr unterschiedliche Aussagen. HMMTOP (Tusnády und Simon, 1998) und SOSUI (Hirokawa et al., 1998) finden keine Transmembrandomänen, während TopPred in jedem DMX-ähnlichem Protein, außer bei YJR033C aus Hefe, mehrere findet. Im Gegensatz zu den anderen Programmen, die ein lösliches Protein vorhersagen, werden von TopPred für DMX mindestens fünf Transmembrandomänen vorhergesagt (Abbildung 4.3). Diese sind auch in CPY zu finden, zwei davon allerdings nur mit geringer Wahrscheinlichkeit. Eine zusätzliche Transmembrandomäne aus CPY wird nur in DMXL1 kryptisch erkannt. Die

erste potentielle Transmembrandomäne in DMX wird nur in CPY gefunden, in F54E4.1 und DMXL1 nicht. Die zweite Transmembrandomäne von DMX wird in CPY nur kryptisch erkannt, klar jedoch in F54E4.1 und DMXL1. Die letzte Transmembrandomäne wird in allen vier Proteinen detektiert, die vorletzte in F54E4.1 und DMXL1 nur kryptisch. Die dritte in DMX kann in CPY und DMXL1 nur mit geringer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden. Ein *DmX*-ähnliches Gen YJR033C (Tabelle 1.1) aus der Hefe, welches allerdings nur rund ein Drittel so groß ist, weist keine mit diesem Programm nachweisbare Transmembrandomäne auf, jedoch fünf WD-Repeats, die in ihrer Anordnung, dem N-Terminus der anderen Proteine entsprechen. PSG, von McGeoch (1985) modifiziert nach Nakai und Horton (1999), lieferte sowohl bei DMX, CPY als auch bei F54E4.1 einen negativen Wert, was nicht für das Vorhandensein eines Signalpeptids spricht. Auch die Methode nach von Heijne (1986) konnte kein Signalpeptid detektieren. Für die Erkennung von Transmembrandomänen wurde ALOM von Klein et al. (1985) modifiziert nach Nakai und Kanehisa (1992) verwendet. Das Programm benutzt eine Doppelbestimmung mit zwei verschiedenen Werten, von denen der kleinere (-2.0) der stringenter ist und der Diskriminierung Falschpositiver dient. Werden mit diesem Wert keine Domänen gefunden, wird angenommen, daß das betreffende Protein keine Transmembrandomänen besitzt. Mit dem höheren Wert (0,5) wird gerechnet, um bei positiven Proteinen möglichst alle Transmembrandomänen zu erkennen. Bei DMX werden mit -2,0 keine und mit 0,5 zwei Domänen gefunden. Im Gegensatz dazu werden bei CPY mit dem stringenteren Wert eine und mit dem höheren Wert fünf Transmembrandomänen gefunden. Für F54E4.1 liegen die beiden Werte bei eins bzw. drei. PSORTII sagt für DMX eine Wahrscheinlichkeit von 78% für eine Lokalisation im Nukleus voraus. Für CPY beträgt die Wahrscheinlichkeit 65% und für F54E4.1 74%. Diese Werte sind zwar nicht unbedingt aussagekräftig genug, um die Proteine einem zellulären Kompartiment zuzuordnen, aber die Werte der homologen Proteine stimmen in dieser Version von PSORT gut miteinander überein. In der von Kraemer et al. (1998) verwendeten Vorgängerversion divergierten die Vorhersagen ganz erheblich: Dort wurde für DMX eine 96%ige Wahrscheinlichkeit einer nukleären Lokalisation angegeben, für CPY eine 70%ige Wahrscheinlichkeit für eine Lokalisation in der Plasmamembran und für F54E4.1 gar eine 85%ige Wahrscheinlichkeit für das endoplasmatische Retikulum. Die Konsistenz von PSORT hat sich also mit Version II entscheidend verbessert.

Letztendlich kann auf dieser Basis nicht definitiv entschieden werden, ob es sich bei der untersuchten Proteinfamilie um ein Transmembranprotein handelt oder nicht. Ein Nachweis der zellulären Lokalisation mit Antikörpern oder eine nach Zellkompartimenten fraktionierte Proteinaufarbeitung wird darauf eine Antwort geben können.

In Medline- und Entrez-Recherchen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=PubMed> sowie <http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Protein>) konnten nur zwei Proteine gefunden werden, die sowohl WD-Repeats als auch Transmembrandomänen besaßen: Das Sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage-activating protein (SCAP) ist ein zentraler Regulator der Lipidsynthese und -aufnahme in Säugetierzellen (Nakajima et al.,

1999). Bei dem anderen Protein handelt es sich um WdlA aus *Streptomyces lincolnensis* (Tichy und Stoytceva, 1999). Das Bakterium *Streptomyces* ist in der Liste der Taxa, welche WD-Proteine enthalten, am BMERC noch nicht verzeichnet. Dieses Protein enthält sechs WD-Repeats an seinem C-Terminus und zwei Transmembrandomänen. Sowohl SREBP als auch WdlA sind in die Regulation zellulärer Transportmechanismen involviert. Daß DMX/CPY vermutlich ebenfalls beim zellulären Transport eine Rolle spielt, eine Rolle spielt, soll in Kapitel 4.9 diskutiert werden.

## 4.8 Rekonstruktion des C-terminalen WD-Propellers von CPY

Von den vielen potentiellen WD-Einheiten, die man in CPY/DMX und verwandten Proteinen findet (siehe Kapitel 1.5), entsprechen die nahe beieinander gelegenen sechs C-terminalen Wiederholungseinheiten am besten der in anderen WD-Proteinen gefundenen Anordnung. Um Indizien für eine Tertiärstruktur zu finden, wurde am BMERC zunächst mit dem Programmpaket PSA (Protein Sequence Analysis) ein Alignment der paralogen WD-Einheiten von CPY, DMX und F54E4.1 bezüglich ihrer wahrscheinlichen Sekundärstruktur durchgeführt. Es werden für jede Wiederholungseinheit drei  $\beta$ -Faltblattbereiche vorhergesagt. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit der in der Einleitung beschriebenen allgemeinen Konsensus-Struktur für WD-Einheiten. Die  $\beta$ 4-Stränge wurden wahrscheinlich deshalb nicht erkannt, weil bei diesen die Struktur-Variabilität am stärksten ist.

Wie von anderen WD-Proteinen bekannt, sind die orthologen Einheiten stärker konserviert als die paralogen. Folgende Kriterien sprechen stark für das Vorhandensein einer Propellerstruktur: Die Anordnung der  $\beta$ -Abschnitte, der Abstand der paralogen Wiederholungseinheiten, sowie deren Übereinstimmung mit der WD Konsensus Sequenz in Verbindung mit der terminalen Lage der WD-Einheiten am C-Terminus. Ein weiteres Indiz für die tatsächliche Existenz eines WD-Propellers am C-terminalen Molekülende ist die mögliche in silico Rekonstruierung eines WD-Propellers mit G $\beta$  als Faltungsvorlage, die ebenfalls am BMERC berechnet wurde. Die in silico Rekonstruktion eines sechsblättrigen Propellers gelang nur mit CPY (Abbildung 4.5). Im Falle von F54E4.1 und DMX konnte nur eine Teilrekonstruktion durchgeführt werden.

## 4.9 DMX/CPY könnte beim zellulären Transport eine Rolle spielen

Bei der Isolierung von Amphiphysin II (Ramjaun et al., 1997) wurde mit einem Antikörper gegen Amphiphysin II ein Protein kopräzipitiert (McPherson, pers. Mitteilung), bei dem es sich um ein Homologes zu *DmX* aus *Rattus norvegicus* handelt. Kopräzipitation ist oft ein Zeichen dafür, daß die entsprechenden Proteine in vivo in einer relativ stabilen Wechselwirkung stehen. Daher wird diese Technik häufig zur Identifizierung und Isolierung von Interaktionspartnern eingesetzt. Weiterhin konnte das DMX-homologe Protein

```

CPY
-----
cpy.1  HKIDNI  KRMSAH  PLMP    LYITGS  QDG  SVQMWE  WGHQQAVCTPRPP
cpy.2  GTFAKV  TRCRFS  QHGN    KFGIAD  GDG  KLSLWQ  VGLASQSNRSFFANE
cpy.3  CHNKLI  SDFVFL  GSCSLVA TAGHSS  ESK  NVAIWD  TLLPQKKALVQSFA
cpy.4  CHDQGA  SSLVYA  PQHQ    LLISAG  KKG  DVCIFD  IRQRTLRRHFQ
cpy.5  AHDTAI  KCLAVD  PHEE    IFITGS  ADG  DIKIWA  LPAPISTPLFYYPGEHKHSSFFK
cpy.6  HTGQGV  TQIHID  QFG     RLFSCG  ADG  SMKIRS  LPDRDTIVNAIY
-----

DMX
-----
dmx.1  HKVDNV  KRMSAH  PLMP    LYLTGG  QDG  SVQIWE  WGHQQPVCSPTS
dmx.2  GTFAKV  TRCRFS  EQGN    KFGIGD  GDG  KLSLWQ  AGIASQNNRSFISYQ
dmx.3  CHNKAL  SDFVFL  GSCSLLA SAGQSS  ENK  NINIWD  TLLPHKKSCVSAFT
dmx.4  CHDQGS  SCLVFA  PQHQ    VLISCG  KRG  DVCVFD  VRQRTLRRHYQ
dmx.5  AHDSTI  KCIALD  PHEE    FFVTGS  IEG  DIKIWD  MNQFMLINTFPHEHAKNGFFK
dmx.6  HTGQGV  SQVYV  DAFG    RLFSCG  SDG  CMKVRL  LVEKDNIVHSVY
-----

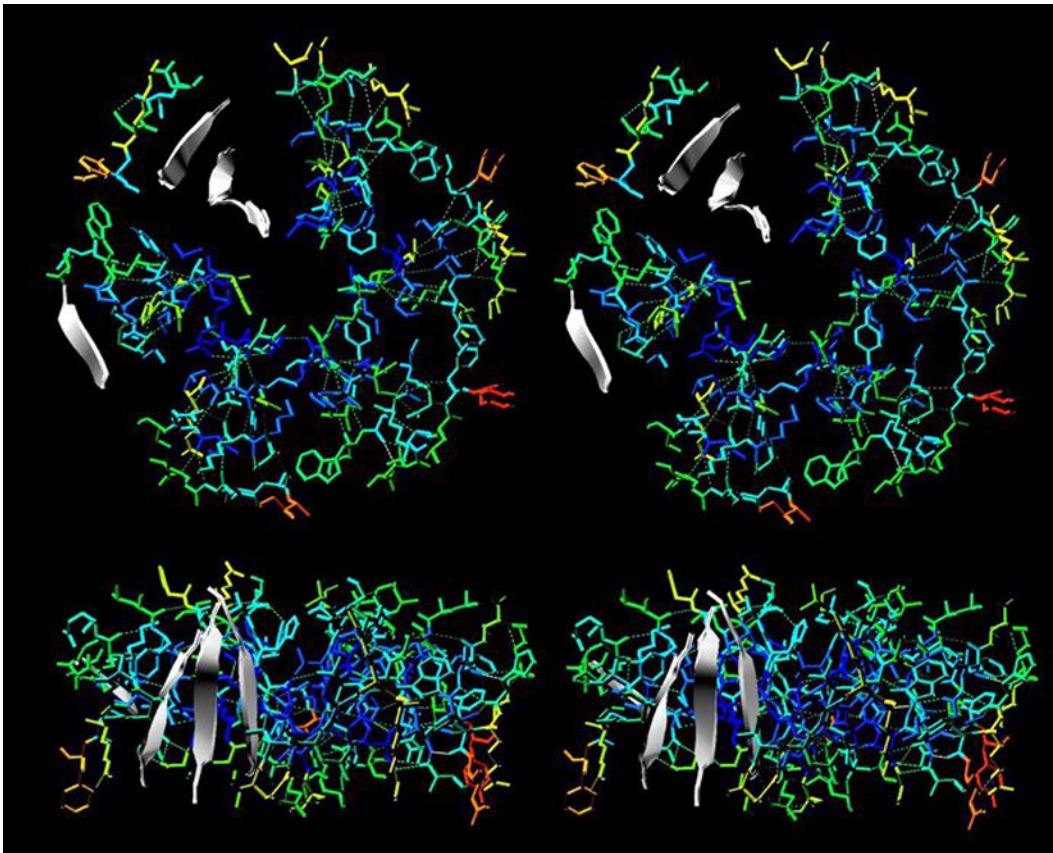
F54E4.1
-----
F54E4.1 RHIPGV  RRIDSH  PHAP    FYVTGS  SDG  SIKVWK  WGAKDTVYTARVA
F54E4.1 GQHAKV  SKIAFS  CNGN    KFAAVD  GDG  MLCLWQ  ASQATEQKKPFFSQR
F54E4.1 CHNKSA  TDVRF  GHSASVLL TAGSSS  LDY  NLGLWD  TLLPTNRALVHSWV
F54E4.1 AHPEGA  TCALYV  PNQQ    TIFSGG  RHG  EICLWD  IRQRQLRHTIKAF
F54E4.1 DQMHVV  KTLATD  SAQD    LIVSGS  SEG  DIKIWS  ADAIPQLMYSPLPGEHTA KGGFSFRQVGO
F54E4.1 STVQGV  QQLFID  QNM     RLFSCG  ADA  SLKFRT  LPSIFNMTSL

```

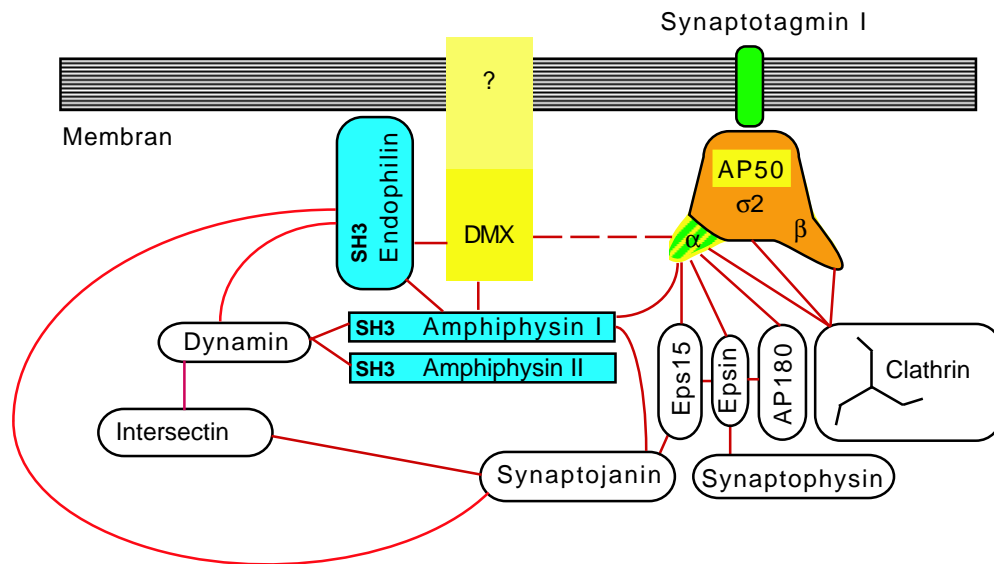
**Abbildung 4.4:** Alignment der abgeleiteten Proteinsequenzen der letzten sechs WD-Einheiten von CPY, DMX und F54E4.1. Die  $\beta$ -Blatt Bereiche sind durch die gestrichelten Linien über und unter dem Alignment gekennzeichnet. Das Alignment über die abgeleitete Sekundärstruktur stimmt mit der Konsensus-Sequenz von WD-Proteinen sehr gut überein.

durch seine Bindungsaffinität zu Endophilin isoliert und durch Protein-Mikrosequenzierung identifiziert werden (McPherson, pers. Mitteilung). Beide Befunde deuten stark darauf hin, daß DMX eine Funktion in der Endozytose oder im zellulären Transport wahrnimmt. Durch einen Vergleich des Transkriptionsprofils von *DmX* mit dem von Genen, welche in der Endozytose eine Rolle spielen und die bei *Drosophila* bekannt sind, konnte dieser Verdacht noch erhärtet werden. Die beste Übereinstimmung des Transkriptionsmusters von *DmX* wurde mit einer Antikörperfärbung gegen  $\alpha$ -Adaptin (Dornan et al., 1997) gefunden. Eine Übereinstimmung mit dem Transkriptionsmuster von Dynamin (*shibire*, Chen et al. (1992b)) ist vorhanden, aber nicht so überzeugend wie diejenige mit  $\alpha$ -Adaptin, welches von allen recherchierten Transkriptionsmustern das dem *DmX* am ähnlichsten ist. Der Vergleich mit anderen Genen, welche in *Drosophila* eine Rolle in der Endozytose spielen, zeigt einige Gemeinsamkeiten, aber auch einige Spezifitäten der einzelnen Gene. Zum Beispiel ist die Expression von Synaptotagmin, das in der Endozytose von synaptischen Vesikeln eine wichtige Rolle spielt, weitgehend auf das Nervensystem beschränkt (Littleton et al., 1993). Mittlerweile wurden von den in Mammaliern existierenden zwölf





**Abbildung 4.5:** Die dreidimensionale Rekonstruktion der C-terminalen WD-Einheiten des CPY-Proteins. Die Berechnung der atomaren Koordinaten wurde am Biomolecular Research Center in Boston (BMERC) mit dem Programmpaket PSA (Protein Sequence Analysis) durchgeführt. Als Faltvorlage diente das bereits in der Einleitung beschriebene G $\beta$ -Proteins. Zur Visualisierung der atomaren Koordinaten, sowie der Berechnung der verschiedenen Ansichten für rechtes und linkes Auge, diente das frei erhältliche-Programm SwissPdbViewer35b1, womit auch die Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte grüne Linien) berechnet wurden. Die Ausgabe erfolgte mit dem ebenfalls frei erhältlichen Raytracing Programm POV-Ray 3.1d. Zur Berechnung wurden lediglich die  $\beta$ -Blatt bildenden Abschnitte der terminalen sechs WD-Einheiten des abgeleiteten CPY-Proteins verwendet. Für die zwischen den Propellerblättern ausschleifenden Aminosäureabschnitte stand keine Faltungsvorlage zur Verfügung da diese Bereiche generell bei WD-Proteinen sehr variabel sind. Dies erklärt die Unterbrechungen zwischen den einzelnen  $\beta$ -Blättern und den Propellerblättern. Zur Verdeutlichung wurde bei einer WD-Einheit die  $\beta$ -Blattstruktur anstatt des Polypeptidstranges dargestellt.



**Abbildung 4.6:** Mögliche Rolle von DMX im Funktionsnetzwerk der Endocytose an Synapsen. Interaktivitäten zwischen Proteinen sind durch rote Striche angedeutet. Für die in blau gehaltenen Proteine liegen experimentelle Evidenzen für eine Interaktion vor. *DmX* zeigt in *Drosophila* ein sehr ähnliches Transkriptionsmuster, wie die Gene der in gelb gehaltenen Proteine. Grün symbolisiert einen sehr ähnlichen Phänotyp in *Drosophila*.

Synaptotagmin Isoformen (Südhof und Rizo, 1996) auch einige aus *Drosophila* isoliert (Littleton et al., 1999), welche sich sowohl in ihren Bindungsspezifitäten als auch in ihrer Gewebespezifität unterscheiden. *Synaptotagmin*-Mutanten und *DmX*-Mutanten besitzen einen sehr ähnlichen Phänotyp: Schläffigkeit, Inaktivität und fast vollständiges Einstellen der Nahrungsaufnahme, sowie verlangsamtes Wachstum und Absterben nach spätestens einer Woche bei 18°C (DiAntonio et al., 1993). Weiterhin ist weder bei *Synaptotagmin*-Mutanten noch bei *DmX*-Mutanten ein Fehlen synaptischer Vesikel festzustellen (Prokop, pers. Mitteilung). Von den an endozytotischen Vorgängen beteiligten Faktoren ist bei *Drosophila* außerdem der Phänotyp von *Dynamamin*-Mutanten (*shibire*, *shi*<sup>2</sup>, *shi*<sup>4</sup>, *shi*<sup>5</sup>, *shi*<sup>6</sup> und *shi*<sup>21</sup>) sowie den  $\alpha$ -*Adaptin*-Mutanten ( $\alpha$ -*Adaptin*<sup>3</sup> und ( $\alpha$ -*Adaptin*<sup>06694</sup>) bekannt. Bei *shibire* handelt es sich um eine temperatursensitive Mutante (Grigliatti et al., 1973; Grant et al., 1998), welche bei einer Temperatur von 32°C in Paralyse verfällt. Dies ist auf das Fehlen von synaptischen Vesikeln zurückzuführen. Bei der Mutante  $\alpha$ -*Adaptin*<sup>3</sup> (Gonzalez-Gaitan und Jäckle, 1997) sind die Muskelkontraktionen nur sporadisch und die Larven sind nicht fähig, die Eihülle aufzubrechen. Die Architektur des Nervensystems ist bei diesen Mutanten nicht verändert die Ultrastruktur der präsynaptischen Nervenenden zeigt das Fehlen synaptischer Endplatten. Bei der Mutante  $\alpha$ -*Adaptin*<sup>06694</sup> (Gonzalez-Gaitan und Jäckle, 1997) bewegen sich die Larven nur sehr langsam und sterben im Pup-

penstadium ab. Hier ist die Bildung synaptischer Vesikel betroffen. Dieser Phänotyp ist dem von *DmX*<sup>-</sup> sehr ähnlich.

Die beiden Gene *α-Adaptin* und *AP50* zeigen ebenfalls ein Expressionsmuster (Zhang und Broadie, 1999), das dem des *DmX* sehr ähnlich ist. Sowohl AP50 als auch *α-Adaptin* werden im embryonalen Nervensystem, den vorderen und hinteren Mitteldarmvorläufern und im Antenna-Maxillar-Komplex exprimiert (Zhang und Broadie, 1999; Dornan et al., 1997). Beide Proteine sind Untereinheiten des AP-2 Komplexes.

Der AP-2 Komplex konnte aus Clathrin-umhüllten Vesikeln („clathrin coated vesicles“ CVV) isoliert werden (Schmid, 1997). Bis jetzt konnten zwei weitere AP-Komplexe nachgewiesen werden, die sich jedoch in ihrer Lokalisation in der Zelle von AP-2 unterscheiden. Während AP-2 hauptsächlich in der Plasmamembran in die CVV vermittelte Endozytose involviert ist, finden sich AP-1 Komplexe hauptsächlich in den Regionen des Trans-Golgi-Netzwerkes, welche den Haupthistokompatibilitätskomplex enthalten. AP-3 ist sowohl im Trans-Golgi-Netzwerk als auch in Endosomen zu finden (Simpson et al., 1997; Dell'Angelica et al., 1998). Alle AP-Komplexe haben eine ähnliche Struktur und Zusammensetzung der Komponenten. Der Ablauf der rezeptorvermittelten Endozytose ist in Synapsen am besten untersucht und geht nach heutigem Verständnis folgendermaßen vonstatten: Die Bildung einer Clathrin-besetzten Stelle an der Membran wird durch die Bindung des AP-2 Komplexes an eine hochaffine Bindungsstelle initiiert, von der Synaptotagmin einen Teil darstellt (Zhang et al., 1994). Darauf folgt die Assemblierung von Clathrin Triskeles, welche bei der Invaginierung der Clathrin-besetzten Stelle („coated pit“) eine Polyederstruktur aufbauen. An der Rekrutierung von Clathrin sind wahrscheinlich Amphiphysin I und Amphiphysin II Heterodimere beteiligt, welche Dynamin über eine SH3-Domäne binden und AP-2 über eine andere, noch nicht näher charakterisierte Bindungsstelle (Wigge et al., 1997). Eine Übersicht über diesen Vorgang findet sich bei Marsh und McMahon (1999). Der Vesikel wächst, bis die ursprüngliche Einstülpung nur noch eine schmale Röhre ist, welche von Dynamin umlagert und schließlich abgeschnürt wird. Bei diesem Vorgang scheint auch Endophilin eine Rolle zu spielen (Schmidt et al., 1999). Ein Überblick über die aktuellen Untersuchungsmethoden sowie über die Ergebnisse der Wechselwirkungen zwischen den AP-Komplexen und verschiedenen Rezeptoren wird bei Heilker et al. (1999) beschrieben.

Bei der weitgehenden Erforschung von *DmX/CPY* ist natürlich der direkte Nachweis der entsprechenden Proteine von großem Interesse. Durch die Generierung spezifischer Antikörper können viele offengebliebene Fragestellungen experimentell angegangen werden. Als wichtigste seien hier die cytologische Lokalisierung der Genprodukte, die detaillierte Diagnose des *DmX*<sup>-</sup>-Phänotyps, sowie die Identifizierung möglicher Interaktionspartner des DMX/CPY-Proteins genannt. In diesem Zusammenhang könnte auch eine Antwort darauf gefunden werden, ob es sich bei DMX/CPY um Transmembranproteine handelt. Durch die genaue Diagnose des Phänotyps wäre die Möglichkeit gegeben, die in dieser Arbeit erzeugten Antisense-RNA transkribierenden Stämme auf schwache Phänotypen hin zu untersuchen. Durch die Generierung von Keimbahnklonen in *D. melanogaster* kann untersucht werden, ob das Fehlen maternaler Transkripte sich in Form

eines „maternalen Effekts“ auf den Phänotyp der Nachkommen auswirkt. Es existiert also eine Vielzahl von Ansätzen, mit denen man der Funktion von *DmX/CpY* in nicht allzu ferner Zukunft auf die Spur kommen wird.

## Funktionale Analyse des *CpY/DmX* Gens aus *Chironomus* und *Drosophila melanogaster*

Bei *CpY* und *DmX* handelt es sich um homologe neuartige Gene aus den Dipteren *C. piger* und *D. melanogaster*. *CpY* und *DmX* bestehen aus 15 Exons, die für eine mRNA von ca. 11,5 kb kodieren. Das Gen hat eine genomische Länge von ca. 15 kb. Die abgeleiteten Genprodukte sind durch eine hohe Anzahl von WD-Repeats gekennzeichnet. WD-Proteine besitzen in der Regel regulatorische Funktionen in allen möglichen Bereichen. Ein Strukturvergleich mit homologen Genen legt die Vermutung nahe, daß sich sowohl am N- als auch am C-Terminus eine WD-Propellerstruktur befindet. *CpY* aus *C. piger* ist in einem chromosomalen Abschnitt lokalisiert, der den Kern eines evolvierenden Geschlechtschromosoms darstellt. Dieses Gen besitzt im Gegensatz zu *DmX* geschlechtsspezifisch in Introns integrierte Transposons und wird quantitativ geschlechtsspezifisch gespleißt (Kraemer, 1994). *DmX* ist auf dem X-Chromosom im Bereich 5D6–5E1 lokalisiert, es konnte jedoch kein geschlechtsspezifisches Expressionsmuster diagnostiziert werden. Die Transkriptionsanalyse ergab, daß *DmX* während der Oogenese und der gesamten Embryonalentwicklung transkribiert wird. Dabei wird neben einer ubiquitären Grundexpression *DmX* in einer gewebespezifischen Weise exprimiert. Die *DmX*-Transkripte wandern offensichtlich – wie die *CpY*-Transkripte – in großer Menge in die reife Oozyte. Bei *DmX/CpY* könnte es sich also um ein maternales Effektgen handeln. Während der Embryogenese können zunächst *DmX*-Transkripte am posterioren Pol nachgewiesen werden. Danach färben die vorderen und hinteren Mitteldarmvorläufer, dann spezifische Zellen im ZNS und in reifen Embryonen das gesamte ZNS, Sinnesorgan-Anlagen im Kopf, sowie der Enddarm. Das dem *DmX* benachbarte Gen *DmSPX*, welches mit diesem einen gemeinsamen 174 bp großen bidirektionalen Promoter besitzt, zeigt ein von *DmX* unterschiedliches Transkriptionsmuster. Mit einer Reihe von Keimbahntransformationen konnten die für eine ordnungsgemäße Expression hinreichenden regulatorischen Bereiche identifiziert werden. In Versuchen, mittels verschiedener „Antisense“-Strategien einen Phänotyp zu generieren, konnte kein spezifischer Phänotyp nachgewiesen werden. Durch die erfolgreiche Keimbahntransformation eines Rettungsvektors, welcher ein intaktes *DmX*-Gen enthält, konnte der Phänotyp der von EMS-*DmX*-Mutanten identifiziert werden: Nach anfänglich normaler Embryonalentwicklung werden die Larven im Laufe des L1-Stadiums schlaff und inaktiv, jedoch nicht paralytisch und stellen Bewegung und Nahrungsaufnahme ein. Kurz nachdem wildtypische Larven das L2-Stadium erreichen, sterben die Mutanten ab. Der Phänotyp weist starke Ähnlichkeit zu *Synaptotagmin I*-Mutanten und  $\alpha$ -*Adaptin*-Mutanten auf. Das Transkriptionsmuster ähnelt dem von  $\alpha$ -*Adaptin*

und *AP50*. Alle diese Gene spielen in der Endozytose eine Rolle. Eine mögliche Rolle von *DMX* in Endozytosevorgängen wird diskutiert.

# Literaturverzeichnis

Acton A. (1957). "Sex chromosome inversions in *Chironomus*". *Am. Nat.*, 91:57–59.

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X., Brandon R.C., Rogers Y.H., Blazej R.G., Champe M., Pfeiffer B.D., Wan K.H., Doyle C., Baxter E.G., Helt G., Nelson C.R., Gabor Miklos G.L., Abril J.F., Agbayani A., An H.J., Andrews-Pfannkoch C., Baldwin D., Ballew R.M., Basu A., and L. Bayraktaroglu J.B., Beasley E.M., Beeson K.Y., Benos P.V., Berman B.P., Bhandari D., Bolshakov S., Borkova D., Botchan M.R., Bouck J., Brokstein P., Brottier P., Burtis K.C., Busam D.A., Butler H., Cadieu E., Center A., Chandra I., Cherry J.M., Cawley S., Dahlke C., Davenport L.B., Davies P., dePablos B., Delcher A., Deng Z., Mays A.D., Dew I., Dietz S.M., Dodson K., Doup L.E., Downes M., Dugan-Rocha S., Dunkov B.C., Dunn P., Durbin K.J., Evangelista C.C., Ferraz C., Ferriera S., Fleischmann W., Fosler C., Gabrielian A.E., Garg N.S., Gelbart W.M., Glasser K., Glodek A., Gong F., Gorrell J.H., Gu Z., Guan P., Harris M., Harris N.L., Harvey D., Heiman T.J., Hernandez J.R., Houck J., Hostin D., Houston K.A., Howland T.J., Wei M.H., Ibegwam C., Jalali M., Kalush F., Karpen G.H., Ke Z., Kennison J.A., Ketchum K.A., Kimmel B.E., Kodira C.D., Kraft C., Kravitz S., Kulp D., Lai Z., Lasko P., Lei Y., Levitsky A.A., Li J., Li Z., Liang Y., Lin X., Liu X., Mattei B., McIntosh T.C., McLeod M.P., McPherson D., Merkulov G., Milshina N.V., Mobarry C., Morris J., Moshrefi A., Mount S.M., Moy M., Murphy B., Murphy L., Muzny D.M., Nelson D.L., Nelson D.R., Nelson K.A., Nixon K., Nusskern D.R., Pacleb J.M., Palazzolo M., Pittman G.S., Pan S., Pollard J., Puri V., Reese M.G., Reinert K., Remington K., Saunders R.D., Scheeler F., Shen H., Shue B.C., Siden-Kiamos I., Simpson M., Skupski M.P., Smith T., Spier E., Spradling A.C., Stapleton M., Strong R., Sun E., Svirskas R., Tector C., Turner R., Venter E., Wang A.H., Wang X., Wang Z.Y., Wassarman D.A., Weinstock G.M., Weissenbach J., Williams S.M., Woodage T., Worley K.C., Wu D., Yang S., Yao Q.A., Ye J., Yeh R.F., Zaveri J.S., Zhan M., Zhang G., Zhao Q., Zheng L., Zheng X.H., Zhong F.N., Zhong W., Zhou X., Zhu S., Zhu X., Smith H.O., Gibbs R.A., Myers E.W., Rubin G.M. und Venter J.C. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science*, 287(5461):2185–95.

Alam J. und Cook J.L. (1990). "Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription". *Anal. Biochem.*, 188:245–254.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. und Lipman D.J. (1990). "Basic local alignment search tool". *J. Mol. Biol.*, 215:403–410.

Anderson K.V., Bokla L. und Nüsslein-Volhard C. (1985a). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the *Toll* gene product". *Cell*, 42:791–798.

- Anderson K.V., Jürgens G. und Nüsslein-Volhard C. (1985b). "Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. Genetic studies on the role of the *Toll* gene product". *Cell*, 42:779–789.
- Angell S.M. und Baulcombe D.C. (1997). "Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA". *EMBO J.*, 16(12):3675–84.
- Ashburner M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual. Two volumes.* Cold Spring Harbor, New York.
- Atwood T.K., Flower D.R., Lewis A.P., Mabey J.E., Morgan S.R., Scordis P., Selley J. und Wright W. (1999). "PRINTS prepares for the new millennium". *Nucleic Acids Res.*, 27:220–225.
- Bateman A. (1950). "New mutants report". *D.I.S.*, 24:54–56.
- Bateman A., Birney E., Durbin R., Eddy S.R., Finn R.D. und Sonnhammer E.L. (1999). "Pfam 3.1: 1313 multiple alignments match the majority of proteins". *Nucleic Acids Res.*, 27:260–262.
- Beermann W. (1953). "Chromosomenpolymorphismus und Bastardierung zweier *Chironomus* - Arten". *Zool. Anz. Suppl.*, 17:290–295.
- Beermann W. (1955). "Cytologische Analyse eines *Camptochironomus*-Artbastards. I. Kreuzungsergebnisse und die Evolution des Karyotypus". *Chromosoma*, 7:198–259.
- Bell L.R., Horabin J.I., Schedl P. und Cline T.W. (1991). "Positive autoregulation of *Sex-lethal* by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*". *Cell*, 65:229–239.
- Bell L.R., Maine E.M., Schedl P. und Cline T.W. (1988). "*Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins". *Cell*, 55:1037–1046.
- Bier E. (1998). "Localized activation of RTK/MAPK pathways during *Drosophila* development". *Bioessays*, 20:189–194.
- Bjorn S.P., Soltyk A., Beggs J.D. und Friesen J.D. (1989). "*PRP4 (RNA4)* from *Saccharomyces cerevisiae*: its gene product is associated with the U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle". *Mol. Cell. Biol.*, 9(9):3698–709.
- Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L. und Boyer H.W. (1977). "Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system". *Gene*, 2:95–113.
- Bowtell D.D. (1999). "Options available—from start to finish—for obtaining expression data by microarray". *Nature Genet.*, 21(1 Suppl):25–32.
- Brand A. und Perrimon N. (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes". *Development*, 118(2):401–415.
- Bridges C.B. (1925). "Sex in relation to genes and chromosomes". *Am. Nat.*, 59:127–137.



- 
- Brown P.O. und Botstein D. (1999). "Exploring the new world of the genome with DNA microarrays". *Nature Genet.*, 21(1. Suppl.):33–37.
- Bruhat A., Tourmente S., Chapel S., Sorbier M.L., Couderc J.L. und Dastugue B. (1990). "Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional regulation of the  $\beta 3$  tubulin gene by 20-hydroxyecdysone in *Drosophila* Kc cells". *Nucl. Acids Res.*, 18:2861–2867.
- Campos-Ortega J.A. und Hartenstein V. (1985). *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg.
- Cech T.R. und Uhlenbeck O.C. (1994). "Hammerhead nailed down". *Nature*, 372:39–40.
- Celis J.E. und Gromov P. (1999). "2D protein electrophoresis: can it be perfected?" *Curr. Opin. Biotechnol.*, 10(10):16–21.
- Chalfie M. und Rain S. (1998). *GFP green fluorescent protein, properties, applications and protocols*. Wiley-Liss. New York.
- Champion-Arnaud P. und Reed R. (1994). "The prespliceosome components SAP 49 and SAP 145 interact in a complex implicated in tethering U2 snRNP to the branch site." *Genes Dev.*, 8(16):1974–83.
- Charlesworth B., Langley C. und Stephan W. (1986). "The evolution of restricted recombination and the accumulation of repeated DNA sequences". *Genetics*, 112:947–962.
- Chen L., Mathews F.S., Davidson V.L., Huizinga E.G., Vellieux F.M. und Hol W.G. (1992a). "Three-dimensional structure of the quinoprotein methylamine dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans* determined by molecular replacement at 2.8 Å resolution." *Proteins*, 14(2):288–99.
- Chen M.S., Burgess C.C., Vallee R.B. und Wadsworth S.C. (1992b). "Developmental stage and tissue specific expression of *shibire*, a *Drosophila* gene involved in endocytosis". *J. Cell Sci.*, 103:619–628.
- Chomczynski P. und Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidine thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal. Biochem.*, 162:156–159.
- Clewell D.B. und Hellinski 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. USA*, 62:1159–1166.
- Cline T.W. und Meyer B.J. (1996). "Vive la différence: males vs females in flies vs worms". *Annu. Rev. Genet.*, 30:637–702.
- Cooper M.K., Hamblen-Coyle M.J., Liu X., Rutila J.E. und Hall J.C. (1994). "Dosage compensation of the *period* gene in *D. melanogaster*". *Genetics*, 138:721–732.
- Corpet F., Gouzy J. und Kahn D. (1999). "Recent improvements of the ProDom database of protein domain families". *Nucleic Acids Res.*, 27:263–267.

- Das B.K., Xia L., Palandjian L., Gozani O., Chyung Y. und Reed R. (1999). "Characterization of a protein complex containing spliceosomal proteins SAPs 49, 130, 145, and 155." *Mol. Cell. Biol.*, 19(10):6796–802.
- DellÁngelica E.C., Klumperman J., Stoorvogel W. und Bonifacino J.S. (1998). "Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin". *Science*, 280:431–434.
- Denhardt D.T. (1966). "A membrane filter technique for the detection of complementary DNA". *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 23:641–645.
- DiAntonio A., Parfitt K.D. und Schwarz T.L. (1993). "Synaptic transmission persists in synaptotagmin mutants of *Drosophila*." *Cell*, 73(7):1281–90.
- Dornan S., Jackson A.P. und Gay N.J. (1997). "α-adaptin, a marker for endocytosis, is expressed in complex patterns during *Drosophila* development". *Mol. Biol. Cell*, 8(8):1391–1403.
- Doyle H. und Bishop J. (1993). "Torso, a receptor tyrosine kinase required for embryonic pattern formation, shares substrates with the sevenless and EGF-R pathways in *Drosophila*." *Genes Dev.*, 7(4):633–646.
- Driever W. und Nüsslein-Volhard C. (1988). "The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner". *Cell*, 54:95–104.
- Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P. und Trent J.M. (1999). "Expression profiling using cDNA microarrays". *Nature Genet.*, 21(1. Suppl.):11–14.
- Erickson J.W. und Cline T.W. (1991). "Molecular nature of the *Drosophila* sex determination signal and its link to neurogenesis". *Science*, 251:1071–1074.
- Estes P.A., Keyes L.N. und Schedl P. (1995). "Multiple response elements in the *sex-lethal* early promoter ensure its female-specific expression pattern". *Mol. Cell. Biol.*, 15:904–917.
- Feinberg A.P. und Vogelstein B. (1983). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". *Anal. Biochem.*, 132:6–13.
- Feldman R.M., Correll C.C., Kaplan K.B. und Deshaies R.J. (1997). "A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p". *Cell*, 91(2):221–30.
- Fields S. und Sternglanz R. (1994). "The two hybrid-system: An assay for protein-protein interactions". *Trends Genet.*, 10(8):286–292.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. und Mello C.C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*". *Nature*, 391:806–811.
- Fischer J. und Tichy H. (1980). "Über eine Heterochromatin-Mutation aus einer Wildpopulation von *Chironomus nuditarsis* I. Zur Funktion des veränderten Genom-Abschnittes". *Genetica*, 54:41–43.

- 
- Fischer J.A., Giniger E., Maniatis T. und Ptashne M. (1988). "GAL4 activates transcription in *Drosophila*." *Nature*, 332(6167):853–6.
- Fokta F. (1997). "personal communication to FlyBase". FBrf0091566.
- Fong H.K., Hurley J.B., Hopkins R.S., Lye R.M., Johnson M.S., Doolittle R.F. und Simon M.I. (1986). "Repetitive segmental structure of the transducin beta subunit: homology with the *CDC4* gene and identification of related mRNAs". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(7):2162–6.
- Franco M.G., Rubini P.G. und Vecchi M. (1982). "Sex-determinants and their distribution in various populations of *Musca domestica* L. of Western Europe". *Genet. Res.*, 40(3):279–93.
- Frischauf A.M., Lehrach H., Poustka A. und Murray N. (1983). "Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences". *J. Mol. Biol.*, 170:827–842.
- Galanopoulos V., Orr W., Szabad J. und Kafatos F. (1989). "Genetic analysis of chorion formation in *D. melanogaster*". *Dev. Genet.*, 10:87–97.
- Gasch A., Hinz U. und Renkawitz-Pohl R. (1989). "Intron and upstream sequences regulate expression of the *Drosophila*  $\beta 3$ -*tubulin* gene in the visceral and somatic musculature, respectively". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3215–3218.
- Gay N.J. und Keith F.J. (1991). "*Drosophila* Toll and IL-1 receptor". *Nature*, 351:355–356.
- Gonzalez-Gaitan M. und Jäckle H. (1997). "Role of *Drosophila* alpha-adaptin in presynaptic vesicle recycling." *Cell*, 88(6):767–76.
- Grant D., Unadkat S., Katzen A., Krishnan K.S. und Ramaswami M. (1998). "Probable mechanisms underlying interallelic complementation and temperature-sensitivity of mutations at the *shibire* locus of *Drosophila melanogaster*." *Genetics*, 149(2):1019–30.
- Green M.M. (1980). "Transposable elements in *Drosophila* and other Diptera". *Annu. Rev. Genet.*, 14:109–20.
- Gremke L., Lord P.C., Sabacan L., Lin S.C., Wohlwill A. und Storti R.V. (1993). "Coordinate regulation of *Drosophila tropomyosin* gene expression is controlled by multiple muscle-type-specific positive and negative enhancer elements". *Dev. Biol.*, 159:513–527.
- Grigliatti T.A., Hall L., Rosenbluth R. und Suzuki D.T. (1973). "Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults." *Mol. Gen. Genet.*, 120(2):107–14.
- Grossniklaus U., Bellen H., Wilson C. und Gehring W. (1989). "P-element-mediated enhancer detection applied to the study of oogenesis in *Drosophila*." *Development*, 107(2):189–200.
- Grunstein M. und Hogness D.S. (1975). "Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene". *Proc. Acad. Natl. Sci. USA*, 72:3961–3965.

- Guo S. und Kemphues K. (1995). “*par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed”. *Cell*, 81:611–20.
- Gutjahr T., Frei E., Spicer C., Baumgartner S., White R.A. und Noll M. (1995). “The Polycomb-group gene, *extra sex combs*, encodes a nuclear member of the WD-40 repeat family”. *EMBO J.*, 14(17):4296–306.
- Hacia J.G. (1999). “Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays”. *Nature Genet.*, 21(1 Suppl.):42–7.
- Hägele K. (1977). “Differential staining of polytene chromosome bands in *Chironomus* by Giemsa banding methods”. *Chromosoma*, 59:207 – 216.
- Hägele K. (1985). “Identification of a polytene chromosome band containing a male sex determiner of *Chironomus thummi thummi*”. *Chromosoma*, 91:167–171.
- Hägele K. (1986). “Localization of a male sex determining chromosome region in *Chironomus thummi piger*”. *Genetica*, 70:187 – 190.
- Hägele K. und Speier H. (1985). “Selection of *thummi* specific chromosome regions in the progeny of *Ch. th. th.* X *Ch. th. pi.* hybrids after long term culturing as a consequence of gonadal sterility”. *Heredity*, 54(2):159.
- Hankeln T. und 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 – 319.
- Hartley D.A., Preiss A. und Artavanis-Tsakonas S. (1988). “A deduced gene product from the *Drosophila* neurogenic locus, *enhancer of split*, shows homology to mammalian G-protein beta subunit”. *Cell*, 55(5):785–95.
- Hartley D.A., Xu T. und Artavanis-Tsakonas S. (1987). “The embryonic expression of the *Notch* locus of *D. melanogaster* and the implications of point mutations in the extracellular EGF-like domain of the predicted protein”. *EMBO J.*, 6:3407–3417.
- Hartmann C., Landgraf M., Bate M. und Jäckle H. (1997). “*Krüppel* target gene knockout participates in the proper innervation of a specific set of *Drosophila* larval muscles”. *EMBO J.*, 16(17):5299–309.
- Haseloff J. und Gerlach W.L. (1988). “Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities”. *Nature*, 334:585–91.
- He M., Wilde A. und Kaderbhai M.A. (1990). “A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids”. *Nucl. Acids Res.*, 18:1660.
- von Heijne G. (1986). “A new method for predicting signal sequence cleavage sites”. *Nucleic Acids Res.*, 14(11):4683–90.

- 
- von Heijne G. (1992). "Membrane protein structure prediction, hydrophobicity analysis and the positive-inside rule". *J. Mol. Biol.*, 225:487–494.
- Heilker R., Spiess M. und Crottet P. (1999). "Recognition of sorting signals by clathrin adaptors". *BioEssays*, 21:558–567.
- Heim R. und Tsien R.Y. (1996). "Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer". *Curr. Biol.*, 6:178–82.
- Heinrich J.C., Tabler M. und Louis C. (1993). "Attenuation of *white* gene expression in transgenic *D. melanogaster*: possible role of a catalytic antisense RNA". *Dev. Genet.*, 14(4):258–65.
- Heinrich J.C., Tabler M. und Louis C. (1995). "Influence of chromosomal position and copy number of a *white*-directed ribozyme gene on the suppression of eye pigmentation in *D. melanogaster*". *Antisense Res. Dev.*, 5(2):155–60.
- Hendry P. und McCall M.J. (1995). "A comparison of the in vitro activity of DNA-armed and all-RNA hammerhead ribozymes". *Nucleic Acids Res.*, 23:3928–3936.
- Henikoff J.G., Henikoff S. und Pietrokovski S. (1999a). "New features of the Blocks database servers". *Nucleic Acids Res.*, 27:226–228.
- Henikoff S., Henikoff J.G. und Pietrokovski S. (1999b). "Blocks+: A non-redundant database of protein alignment blocks derived from multiple compilations". *Bioinformatics*, 15:471–479.
- Higuera I.G., Fenoglio J., Li Y., Lewis C., Panchenko M.P., Reiner O., Smith T.F. und Neer E.J. (1996). "Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit". *Biochemistry*, 35(44):13985–94.
- Higuera I.G., Gaitatzes C., Smith T.F. und Neer E.J. (1998). "Folding a WD repeat propeller. Role of highly conserved aspartic acid residues in the G protein beta subunit and Sec13". *J. Biol. Chem.*, 273(15):9041–9.
- Hirokawa T., Boon-Chieng S. und Mitaku S. (1998). "SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins". *Bioinformatics*, 14(4):378–379.
- Hodgetts R.B., Clark W.C., O'Keefe S.L., Schouls M., Crossgrove K., Guilt G.M. und Kalm L. (1995). "Hormonal induction of DOPA decarboxylase in the epidermis of *Drosophila* is mediated by the broad complex". *Development*, 121:3913–3922.
- Hoey T., Weinzierl R.O., Gill G., Chen J.L., Dynlacht B.D. und Tjian R. (1993). "Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators". *Cell*, 72(2):247–60.
- Hofmann K., Bucher P., Falquet L. und Bairoch A. (1999). "The prosite database, its status in 1999". *Nucleic Acids Res.*, 27:215–219.
- Holmes D.S. und Bonner J. (1985). "Preparation, molecular weight, base composition and secondary structure of giant nuclear ribonucleic acid". *Biochemistry*, 12:2330–2338.

- de Hostos E.L., Bradtke B., Lottspeich F., Guggenheim R. und Gerisch G. (1991). "Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits". *EMBO J.*, 10(13):4097–104.
- Huang M.E., Chuat J.C. und Galibert F. (1995). "Analysis of a 42.5 kb DNA sequence of chromosome X reveals three tRNA genes and 14 new open reading frames including a gene most probably belonging to the family of ubiquitin-protein ligases." *Yeast*, 11(8):775–81.
- Igel H., Wells S., Perriman R. und Ares M.J. (1998). "Conservation of structure and subunit interactions in yeast homologues of splicing factor 3b (SF3b) subunits." *RNA*, 4(1):1–10.
- Inglis A.S. (1991). "Chemical procedures for C-terminal sequencing of peptides and proteins." *Anal. Biochem.*, 195:183–196.
- Iranfar N. und Loomis W.F. (1998). "EMBL:AF076600". Direkte Mitteilung an EMBL-Datenbank.
- Kaiser K. (1990). "From gene to phenotype in *Drosophila* and other organisms." *BioEssays*, 12(6):297–301.
- Kassis J.A. (1990). "Spatial and temporal control elements of the *Drosophila engrailed* gene". *Genes Dev.*, 4:433–443.
- Katzen A.L. und Bishop J.M. (1960). "*myb* provides an essential function during *Drosophila* development". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:13955–13960.
- Katzen A.L., Kornberg T. und Bishop J.M. (1990). "Diverse expression of *Dsrc29A*, a gene related to *src*, during the life cycle of *Drosophila melanogaster*". *Development*, 4(110):1169–1183.
- Keleher C.A., Redd M.J., Schultz J., Carlson M. und Johnson A.D. (1992). "Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast". *Cell*, 68(4):709–19.
- Kennerdell J.R. und Carthew R.W. (1998). "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway". *Cell*, 95(7):1017–26.
- Keyes L.N., Cline T. und Schedl P. (1992). "The primary sex determination signal of *Drosophila* acts at the level of transcription". *Cell*, 68:933–943.
- Keyl H.G. (1957). "Untersuchungen am Karyotypus von *Chironomus thummi*". *Chromosoma*, 8:739–756.
- Keyl H.G. (1961). "Die cytologische Diagnostik der Chironomiden III. Diagnose von *Ch. parathummi* n. sp. und Ergänzungen zur Bestimmungstabelle". *Arch. Hydrobiol.*, 58:1–6.
- Keyl H.G. (1962). "DNA-Konstanz im Heterochromatin von *Glyptotendipes*". *Experimental Cell Research*, 30:245–247.
- Keyl H.G. (1965). "Duplikation von Untereinheiten der chromosomalen DNS während der Evolution von *Chironomus thummi*". *Chromosoma*, 17:139–180.

- 
- Keyl H.G. und Strenzke K. (1956). "Taxonomie und Cytologie von zwei Subspezies der Art *Chironomus thummi*". *Zeitschr. für Naturforschung*, 11b:12.
- Kirov N., Shtilbans A. und Rushlow C. (1998). "Isolation and characterization of a new gene encoding a member of the HIRA family of proteins from *D. melanogaster*". *Gene*, 212(2):323–32.
- Klämbt C. und Schmidt O. (1986). "Developmental expression and tissue distribution of the lethal(2)giant larvae protein of *D. melanogaster*". *EMBO J.*, 5(11):2955–2961.
- Klein P., Kanehisa M. und DeLisi C. (1985). "The detection and classification of membrane-spanning proteins". *Biochim. Biophys. Acta*, 815:468.
- Klingler M., Erdelyi M., Szabad J. und Nüsslein-Volhard C. (1988). "Function of *torso* in determining the terminal Anlagen of the *Drosophila* embryo". *Nature*, 335:275–277.
- Kraemer C. (1994). *Molekulare Analyse der geschlechtsbestimmenden Region von Chironomiden*. Doktorarbeit, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Kraemer C., Enklaar T., Zabel B. und Schmidt E.R. (2000a). "Mapping and structure of *DMXL1*, a human homologue of the *DmX* gene from *D. melanogaster* coding for a WD repeat protein". *Genomics*, 64(1):97–101.
- Kraemer C. und Schmidt E.R. (1993). "The sex determining region of *C. thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements". *Chromosoma*, 102(8):553–62.
- Kraemer C., Weil B., Christmann M. und Schmidt E.R. (1998). "The new gene *DmX* from *D. melanogaster* encodes a novel WD-repeat protein". *Gene*, 216(2):267–76.
- Kraemer C., Weil B. und Schmid E.R. (2000b). "The *SPX* gene product from *D. melanogaster* is highly homologous to the human spliceosome associated protein SAP 49". In Vorbereitung.
- Kuhn R., Schäfer U. und Schäfer M. (1988). "pW-ATG-lac, P-element vectors for *lacZ* transcriptional gene fusions in *Drosophila*". *Nucleic Acids Res.*, 16(9):4163.
- Lalioti M.D., Chen H., Rossier C., Shafaatian R., Reid J.D. und Antonarakis S.E. (1996). "Cloning the cDNA of human *PWF*, which encodes a protein with WD repeats and maps to 21q22.3". *Genomics*, 35:321–327.
- Langer-Safer P.R., Levine M. und Ward D.C. (1982). "Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:4381–4385.
- Langley K.E., Villarejo M.R., Fowler A.V., Zamenhof P.J. und Zabin I. (1975). "Molecular basis of  $\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -complementation". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:1254–1257.
- Lehmann R. und Nüsslein-Volhard C. (1986). "Abdominal segmentation, pole cell formation and embryonic polarity require the localized activity of *oskar*, a maternal gene in *Drosophila*". *Cell*, 47:141–152.

- Li J., Brick P., O'Hare M.C., Skarzynski T., Lloyd L.F., Curry V.A., Clark I.M., Bigg H.F., Hazleman B.L. und et al T.E.C. (1995). "Structure of full-length porcine synovial collagenase reveals a C-terminal domain containing a calcium-linked, four-bladed beta-propeller". *Structure*, 3(6):541–9.
- Lin M.H., Nguyen H.T., Dybala C. und Storti R.V. (1996). "Myocote specific enhancer factor 2 acts cooperatively with a muscle activator region to regulate *Drosophila tropomyosin* gene muscle expression". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:4623–4628.
- Lin X., Kaul S., Rounsley S.D., Shea T.P., Benito M.I., Town C.D., Fujii C.Y., Mason T.M., Bowman C.L., Barnstead M.E., Feldblyum T.V., Buell C.R., Ketchum K.A., Lee J.J., Ronning C.M., Koo H., Moffat K.S., Cronin L.A., Shen M., VanAken S.E., Umayam L., Tallon L.J., Gill J.E., Adams M.D., Carrera A.J., Creasy T.H., Goodman H.M., Somerville C.R., Copenhaver G.P., Preuss D., Nierman W.C., White O., Eisen J.A., Salzberg S.L., Fraser C.M. und Venter J.C. (1999). "Sequence and analysis of chromosome II of *Arabidopsis thaliana*". *Nature*, 402:761–768.
- Lindsley D. und Zimm G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press. San Diego.
- Littleton J.T., Bellen H.J. und Perin M.S. (1993). "Expression of *synaptotagmin* in *Drosophila* reveals transport and localization of synaptic vesicles to the synapse". *Development*, 118:1077–1088.
- Littleton J.T., Serano T.L., Rubin G.M., Ganetzky B. und Chapman E.R. (1999). "Synaptic function modulated by changes in the ratio of synaptotagmin I and IV". *Nature*, 400:757–760.
- Lucchesi J.C. (1996). "Dosage Compensation in *Drosophila* and the complex world of transcriptional regulation". *BioEssays*, 18:541–7.
- Mandel M. und Higa A. (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection". *J. Mol. Biol.*, 53:158–162.
- Marsh M. und McMahon H.T. (1999). "The structural era of endocytosis". *Science*, 285:215–220.
- Martin J., Kuvangkadilok C., Peart D. und Lee B. (1980). "Multiple sex determining regions in a group of related *Chironomus* species (*Diptera: Chironomidae*)". *Heredity*, 44:367–382.
- Martínez-Balbás M.A., Tsukiyama T., Gdula D. und Wu C. (1998). "*Drosophila* NURF-55, a WD repeat protein involved in histone metabolism". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:132–137.
- McDonell M.W., Simon M.N. und 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.*, 110:119–146.
- McGeoch D.J. (1985). "On the predictive recognition of signal peptide sequences". *Virus Res.*, 3(3):271–86.



- 
- Meise M., Hilfiker-Kleiner D., Dübendorfer A., Brunner C., Nöthiger R. und Bopp D. (1998). “*Sex-lethal*, the master sex-determining gene in *Drosophila*, is not sex-specifically regulated in *Musca domestica*”. *Development*, 125:1487–1494.
- Meredith J. und Storti R.V. (1993). “Developmental regulation of the *Drosophila tropomyosin II* gene in different muscles is controlled by muscle-type-specific intron enhancer elements and distal and proximal promoter control elements”. *Dev. Biol.*, 159:500–512.
- Mevel-Ninio M., Terracol R., Salles C., Vincent A. und Payre F. (1995). “*Ovo*, a *Drosophila* gene required for ovarian development, is specifically expressed in the germline and shares most of its coding sequences with *shavenbaby*, a gene involved in embryo patterning”. *Mech. Dev.*, 49:83–95.
- Mewes H.W., Albermann K., Bahr M., Frishman D., Gleissner A., Hani J., Heumann K., Kleine K., Maierl A., Oliver S., Pfeiffer F. und Zollner A. (1997). “Overview of the yeast genome”. *Nature*, 387:7–8.
- Minchiotti G. und di Nocera P.P. (1991). “Convergent transcription initiates from oppositely oriented promoters within the 5’ end regions of *D. melanogaster* F elements”. *Mol. Cel. Biol.*, 11(10):5171–5180.
- Misquitta L. und Paterson B.M. (1999). “Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(4):1451–6.
- Mohler D. und Carroll A. (1984). “Report of new mutants.” *D.I.S.*, 60:236–241.
- Montgomery M.K., S-Xu und Fire A. (1998). “RNA as a target of dsRNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:14687–14692.
- Morgan T.H. (1910). “Sex limited inheritance in *Drosophila*”. *Science*, 32:120–122.
- Morgan T.H. und Bridges C.B. (1916). “Sex-linked inheritance in *Drosophila*”. *Publ. Carnegie Instn.*, 237:1–88.
- Morisato D. und Anderson K.V. (1994). “The *spätzle* gene encodes a component of the extracellular signalling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo”. *Cell*, 76:677–688.
- Muller H.J. (1918). “Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors.” *Genetics*, 3:422–499.
- Muller H.J. (1932). “Some genetic aspects of sex”. *Am. Nat.*, 66:118–138.
- Mullins M., Rio D. und Rubin G. (1989). “Cis-acting DNA sequence requirements for P-element transposition”. *Genes Dev.*, 3(5):729–738.
- Nakai K. und Horton P. (1999). “PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization”. *Trends Biochem. Sci.*, 24(1):34–6.

- Nakai K. und Kanehisa M. (1992). "A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells". *Genomics*, 14:897–911.
- Nakajima T., Hamakubo T., Kodama T., Inazawa J. und Emi M. (1999). "Genomic structure and chromosomal mapping of the human sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage-activating protein (SCAP) gene". *J. Hum. Genet.*, 44(6):402–7.
- Nakamura A., Amikura R., Mukai M., Kobayashi S. und Lasko P.F. (1996). "Requirement for a noncoding RNA in *Drosophila* polar granules for germ cell establishment". *Science*, 274(5295):2075–9.
- Neer E.J., Schmidt C.J., Nambudripad R. und Smith T.F. (1994). "The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins [published erratum appears in Nature 1994 Oct 27;371(6500):812]". *Nature*, 371(6495):297–300.
- Neer E.J., Schmidt C.J. und Smith T. (1993). "LIS is more". *Nature Genet.*, 5(1):3–4.
- Németh K., Salchert K., Putnoky P., Bhalerao R., Koncz-Kálmán Z., Stankovic-Stangeland B., Bakó L., Mathur, Ökrész L., Stabel S., Geigenberger P., Steitt M., Rédei G.P., Schell J. und Koncz C. (1998). "Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*". *Genes Dev.*, 12:3059–3073.
- Nielsen H., Brunak S. und von Heijne G. (1999). "Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals". *Protein Engineering*, 12:3–9.
- Nüsslein-Volhard C. und Wieschaus E. (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*". *Nature*, 287:795–801.
- van Ommen G.J. und Pearson P.L. (1989). "Long-range mapping in the research and diagnosis of genetic disease." *Genome*, 31(2):730–6.
- Orlando V. und Paro R. (1995). "Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns". *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5:174–179.
- Paoli M., Anderson B.F., Baker H.M., Morgan W.T., Smith A. und Baker E.N. (1999). "Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains." *Nat. Struct. Biol.*, 6(10):926–31.
- Parkhurst S.M. und Meneely P.M. (1994). "Sex determination and dosage compensation: lessons from flies and worms". *Science*, 264:924.932.
- Paululat A., Goubeaud A., Damm C., Knirr S., Burchard S. und Pohl R.R. (1997). "The mesodermal expression of *rolling stone* (*rost*) is essential for myoblast fusion in *Drosophila* and encodes a potential transmembrane protein". *J. Cell Biol.*, 138(2):337–48.
- Perrimon N., Engstrom L. und Mahowald A. (1989). "Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *D. melanogaster*". *Genetics*, 121:333–352.

- 
- Perrimon N. und Gans M. (1983). "Clonal analysis of the tissue specificity of recessive female sterile mutations of *D. melanogaster* using a dominant female-sterile mutation". *Dev. Biol.*, 100:365–373.
- Perrimon N., Mohler D., Engstrom L. und Mahowald A. (1986). "X-linked female-sterile loci in *D. melanogaster*". *Genetics*, 113:695–712.
- Plasterk R.H. (1992). "Reverse genetics of *Caenorhabditis elegans*." *BioEssays*, 14(9):629–33.
- Pluthero F.G. (1993). "Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase". *Nucl. Acids Res.*, 21(20):4850–4851.
- Polak J.M. und McGee J.O.D. (Hg.) (1991). *In situ Hybridization: Principles and practice*. Oxford Univ. Press. Oxford.
- Preiss A., Rosenberg U., Kienlin A., Seifert E. und Jäckle H. (1984). "Molecular genetics of *Krüppel*, a gene required for segmentation of the *Drosophila* embryo". *Nature*, 313:27–32.
- Pryer N.K., Salama N.R., Schekman R. und Kaiser C.A. (1993). "Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro". *J. Cell Biol.*, 120(4):865–75.
- Qian S., Hongo S. und Jacobs-Lorena M. (1988). "Antisense ribosomal protein gene expression specifically disrupts oogenesis in *D. melanogaster*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9601–9605.
- Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E. und Werner T. (1995). "MatInd and MatInspector - new and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data". *Nucleic Acids Res.*, 23:4878–4884.
- Ramjaun A.R., Micheva K.D., Bouchelet I. und McPherson P.S. (1997). "Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform". *J. Biol. Chem.*, 272(26):16700–16706.
- Reynaud E., Bolshakov V.N., Barajas V., Kafatos F.C. und Zurita M. (1997). "Antisense suppression of the putative ribosomal protein S3A gene disrupts ovarian development in *D. melanogaster*". *Mol. Gen. Genet.*, 256(4):462–7.
- Rice W.R. (1994). "Degeneration of a nonrecombining chromosome". *Science*, 263:230–232.
- Rio D. (1996). "personal communication to FlyBase". FBrf0090026.
- Robertson E.J. (1991). "Using embryonic stem cells to introduce mutations into the mouse germ line." *Biol. Reprod.*, 44:238–245.
- Robertson H.M., Preston C.R., Phillis R.W., Johnson-Schlitz D., Benz W.K. und Engels W.R. (1989). "A stable genomic source of P element transposase in *D. melanogaster*". *Genetics*, 118:461–470.

- Rocheleau C.E., Downs W.D., Lin R., Wittmann C., Bei Y., Cha Y.H., Ali M., Priess J.R. und Mello C.C. (1997). "Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos". *Cell*, 90(4):707–16.
- Rodriguez A., Holt O., Zou H., Chen P., Wang X. und Abrams J.M. (1999). "Dark is a *Drosophila* homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway". *Nature Cell Biol.*, 1:272–279.
- Ron D., Chen C.H., Caldwell J., Jamieson L., Orr E. und Rosen D.M. (1994). "Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins [published erratum appears in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995 Feb 28;92(5):2016]". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(3):839–43.
- Rong Y.S. und Golic K.G. (2000). "Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*". *Science*, 288(5473):2013–8.
- Rosenberg U.B., Preiss A., Seifert E., Jäckle H. und Knipple D.C. (1985). "Production of phenocopies by *Krüppel* antisense RNA injection into *Drosophila* embryos". *Nature*, 313:703–706.
- Rosin S. und Fischer J. (1972). "Polymorphismus des Realisators für männliches Geschlecht bei *Chironomus*". *Revue Suisse de Zoologie*, 79:119–141.
- Roth S. (1994). "Axis determination. Proteolytic generation of a morphogen". *Curr. Biol.*, 4:755–757.
- Rubin G.M. und Spradling A.C. (1982). "Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors". *Science*, 218:348–353.
- Ruiz-Lozano P., Doevendans P., Brown A., Gruber P.J. und Chien K.R. (1997). "Developmental expression of the murine spliceosome-associated protein mSAP49." *Dev. Dyn.*, 208(4):482–90.
- Saccone B., Peluso I., Artiaco D., Giordano E., Bopp D. und Polito L.C. (1998). "The *Ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated". *Development*, 125:1495–1500.
- Saiki R.K., Gyllenstein U.B. und Ehrlich H.A. (1988). "The polymerase chain reaction". In K.E. Davies (Hg.), "Genome analysis. A practical approach", IRL Press, Oxford.
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977). "DNA sequencing with chain terminating inhibitors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463–5467.
- Sass H. (1990). "P-transposable vectors expressing a constitutive and thermoinducible *Hsp82-neo* fusion gene for *Drosophila* germline transformation and tissue-culture transfection". *Gene*, 89:179–186.

- 
- Schaefer J. und Schmidt E. (1981). "Different repetition frequencies of a 120 base-pair DNA-Element and its arrangement in *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*". *Chromosoma*, 84:61–66.
- Schaefer U., Jäckle H., He Y., Bellen H., Laverty T. und Rubin G. (1999). "persönliche Mitteilung an Flybase". Abrufbar unter <http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbpcq.html?FBrf0109189>.
- Schalet A. (1986). "The distribution of and complementation relationships between spontaneous X-linked recessive lethal mutations recovered from crossing long-term laboratory stocks of *D. melanogaster*". *Mutat. Res.*, 163:115–144.
- Schena M., Heller R.A., Theriault T.P., Konrad K., Lachenmeier E. und Davis R.W. (1998). "Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics". *Trends Biotechnol.*, 16(7):301–6.
- Schmid S.L. (1997). "Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process". *Annu. Rev. Biochem.*, 66:511–548.
- Schmidt A., Wolde M., Thiele C., Fest W., Kratzin H., Podtelejnikov A.V., Witke W., Huttner W.B. und Söling H.D. (1999). "Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid". *Nature*, 400:133–141.
- Schmidt E.R. (1981). "The development of a 120 basepair repetitive DNA sequence in *C. thummi* is correlated to the duplication of defined chromosomal segments". *FEBS Letters*, 129:21–24.
- Schmidt E.R. (1984). "Clustered and interspersed repetitive DNA sequence family of *Chironomus*". *J. Mol. Biol.*, 178:1–15.
- Schmidt E.R. (1992). *Nonradioactive labeling and detection of biomolecules*, Kap. Mapping of polytene chromosomes. C. Kessler. Springer Verlag Berlin, Heidelberg.
- Schmidt E.R. und Godwin E.A. (1983). "The nucleotide sequence of an unusual non-transcribed spacer and its ancestor in the rDNA in *C. thummi*". *EMBO Journal*, 2:1177–1183.
- Schmidt E.R., Godwin E.A., Keyl H.G. und Israelewski N. (1982). "Cloning and analysis of ribosomal DNA of *Chironomus thummi piger* and *Chironomus thummi thummi* - The nontranscribed spacer of *Ch. th. thummi* contains a highly repetitive DNA sequence". *Chromosoma*, 87:389–407.
- Schmucker D., Taubert H. und Jäckle H. (1992). "Formation of the *Drosophila* larval photoreceptor organ and its neuronal differentiation require continuous *Krüppel* gene activity". *Neuron*, 9:1025–1039.
- Schultz J., Milpetz F., Bork P. und Ponting C.P. (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:5857–5864.

- Schüpbach T. und Wieschaus E. (1986). "Maternal effect mutations altering the anterior–posterior pattern of the *Drosophila* embryo". *Roux Arch. Dev. Biol.*, 195:302–317.
- Sharp P.A. (1999). "RNAi and double-strand RNA". *Genes Dev.*, 13(2):139–41.
- Shi Y. und Mello C. (1998). "A CBP/p300 homolog specifies multiple differentiation pathways in *Caenorhabditis elegans*". *Genes Dev.*, 12:943–955.
- Simpson F., Peden A.A., Christopoulou L. und Robinson S. (1997). "A novel adaptor related protein complex". *J. Cell Bio.*, 133:749–760.
- Sitzler S., Oldenburg I., Petersen G. und Bautz E.K.F. (1991). "Analysis of the promoter region of the housekeeping gene *DmPR140* by sequence comparison of *D. melanogaster* and *Drosophila virilis*". *Gene*, 100:155–162.
- Slizynski B. (1938). "Salivary chromosome studies of lethals in *D. melanogaster*". *Genetics*, 23:283–290.
- Smith T.F. (1998). "Functional genomics - bioinformatics is ready for the challenge". *Trends Genet.*, 14(7):291–3.
- Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K. und Neer E.J. (1999). "The WD repeat: a common architecture for diverse functions". *Trends Biochem. Sci.*, 24:181–185.
- Sondek J., Bohm A., Lambright D.G., Hamm H.E. und Sigler P.B. (1996). "Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution [published erratum appears in Nature 1996 Feb 29;379(6568):847]". *Nature*, 379(6563):369–74.
- Sonnhammer E.L. und Kahn D. (1994). "Modular arrangement of proteins as inferred from analysis of homology". *Protein Sci.*, 3:482–492.
- Southern E.M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J. Mol. Biol.*, 98:503–517.
- Stephenson M. (1994). "persönliche Mitteilung an Flybase". Abrufbar unter <http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbpcq.html?FBrf0075260>.
- Südhof T. und Rizo J. (1996). "Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic". *Neuron*, 17:379–388.
- Sullivan D.T., Carroll W.T., Kanik-Ennulat C.L., Hitti Y.S., Lovett J.A. und von Kalm L. (1985). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *D. melanogaster*. Identification of two isozymic forms encoded by separate genes". *J. Biol. Chem.*, 260:4345–4350.
- Tabara H., Grishok A. und Mello C.C. (1998). "RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence". *Science*, 282(5388):430–1.

- 
- Tanaka Y., Ohta A., Terashima K. und Sakamoto H. (1997). "Polycistronic expression and RNA-binding specificity of the *C. elegans* homologue of the spliceosome-associated protein SAP49." *J. Biochem. (Tokyo)*, 121(4):739–45.
- Tautz D. und Pfeifle C. (1989). "A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*". *Chromosoma*, 98:81–85.
- Thaker H. und Kankel D. (1992). "Mosaic analysis gives an estimate of the extent of genomic involvement in the development of the visual system in *D. melanogaster*". *Genetics*, 131:883–894.
- Thomas B.J., Gunning D.A., Cho J. und Zipursky S.L. (1994). "Cell cycle progression in the developing *Drosophila* eye: *roughex* encodes a novel protein required for the establishment of G1". *Cell*, 77(7):1003–1014.
- Thomas K. (1996). "EMBL:Z79639". Direkte Mitteilung an EMBL-Datenbank.
- Thummel C.S., Boulet A.M. und Lipshitz H.D. (1988). "Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection". *Gene*, 74(2):445–56.
- Tichy P. und Stoytceva Z.R. (1999). "EMBL:AF116463". Direkte Mitteilung an GenBank.
- Timmons L. und Fire A. (1998). "Specific interference by ingested dsRNA". *Nature*, 395:854.
- Tsukiyama T., Daniel C., Tamkun J. und Wu C. (1995). "*ISWI*, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor". *Cell*, 83(6):1021–6.
- Tsukiyama T. und Wu C. (1995). "Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor". *Cell*, 83(6):1011–20.
- Tusnády G.E. und Simon I. (1998). "Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: applications to topology prediction". *J. Mol. Biol.*, 283:489–506.
- Tyler J.K., Bulger M., Kamakaka R.T., Kobayashi R. und Kadonaga J.T. (1996). "The p55 subunit of *Drosophila* chromatin assembly factor 1 is homologous to a histone deacetylase-associated protein". *Mol. Cell. Biol.*, 16(11):6149–59.
- Vaisman N., Tsouladze A., Robzyk K., Yehuda S.B., Kupiec M. und Kassir Y. (1995). "The role of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc40p in DNA replication and mitotic spindle formation and/or maintenance". *Mol. Gen. Genet.*, 247(2):123–36.
- Vanario-Alonso C.E., O'Hara E., McGinnis W. und Oick L. (1995). "Targeted ribozymes reveal a conserved function of the *Drosophila* *paired* gene in sensory organ development". *Mech. Dev.*, 53:323–328.
- Verreault A., Kaufman P.D., Kobayashi R. und Stillman B. (1996). "Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4". *Cell*, 87(1):95–104.

- de Vetten N., Quattrocchio F., Mol J. und Koes R. (1997). "The *an11* locus controlling flower pigmentation in *petunia* encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals". *Genes Dev.*, 11(11):1422–34.
- Vidal M. und Legrain P. (1999). "Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems". *Nucleic Acids Res.*, 27(4):919–29.
- Voelker R. und Wisely G. (1982). "Corrected and new information on *l(1)E12<sup>ts</sup>*". *D.I.S.*, 58:150–151.
- van der Voorn L. und Ploegh H.L. (1992). "The WD-40 repeat". *FEBS Lett.*, 307(2):131–4.
- Wakimoto B.T., Turner F.R. und Kaufman T.C. (1984). "Defects in embryogenesis in mutants associated with the *antennapedia* gene complex of *D. melanogaster*". *Dev. Biol.*, 1:147–72.
- Wall M.A., Coleman D.E., Lee E., Lluhi J.A.I., Posner B.A., Gilman A.G. und Sprang S.R. (1995). "The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2". *Cell*, 83(6):1047–58.
- Wang C.I. und Lehmann R. (1991). "*Nanos* is the localized posterior determinant in *Drosophila*". *Cell*, 66:637–647.
- Watson K., Johnson T. und Denell R. (1991). "*Lethal(1)* aberrant immune response mutations leading to melanotic tumor formation in *D. melanogaster*". *Dev. Genet.*, 12:173–187.
- Weil B., Hankeln T. und Schmidt E.R. (1995). "Amplification of a 16 kb gene region from insect genomic DNA with the Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR System". *Biochemica*, 3:14.
- Wieschaus E., Nüsslein-Volhard C. und Kluding H. (1984). "*Krüppel*, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation". *Dev. Biol.*, 104(1):172–86.
- Wigge P., Kohler K., Vallis Y., Doyle C.A., Owen D., Hunt S.P. und McMahon H.T. (1997). "Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis." *Mol. Biol. Cell.*, 8(10):2003–15.
- Williams F.E., Varanasi U. und Trumbly R.J. (1991). "The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex". *Mol. Cell Biol.*, 11(6):3307–16.
- Wilson R.K. (1999). "How the worm was won. The *C. elegans* genome sequencing project." *Trends Genet.*, 15(2):51–8.
- Wootton J.C. und Federhen S. (1996). "Analysis of compositionally biased regions in sequence databases". *Methods Enzymol.*, 266:554–71.
- Wülker W. und Götz P. (1968). "Die Verwendung der Imaginalscheiben zur Bestimmung des Entwicklungszustandes von Chironomus-Larven (Dipt.)". *Z. Morph. Tiere*, 62:363–388.



- 
- Yanicostas C., Ferrer P., Vincent A. und Lepesant J.A. (1995). "Seperate *cis*-regulatory sequences control expression of *serendipity*  $\beta$  and *janus A*, two immediately adjacent *Drosophila* genes". *Mol. Gen. Genet.*, 246:549–560.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. und Messing J. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC18 vectors." *Gene*, 33:103–119.
- Zagulski M., Babinska B., Gromadka R., Migdalski A., Rytka J., Sulicka J. und Herbert C.J. (1995). "The sequence of 24.3 kb from chromosome X reveals five complete open reading frames, all of which correspond to new genes, and a tandem insertion of a Ty1 transposon." *Yeast*, 11(12):1179–86.
- Zhang J.Z., Davletov B.A., Südhof T.C. und Anderson R.G. (1994). "Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: implications for membrane recycling". *Cell*, 78:751–760.
- Zhang Y.Q. und Broadie K. (1999). "Cloning, mapping and tissue-specific expression of *Drosophila* clathrin-associated protein AP50 gene". *Gene*, 233:171–179.
- Zhao J.J. und Pick L. (1993). "Generating loss-of-function phenotypes of the *fushi tarazu* gene with a targeted ribozyme in *Drosophila*". *Nature*, 365(6445):448–51.
- Zweiger G. (1999). "Knowledge discovery in gene-expression-microarray data: mining the information output of the genom". *Trends Biotechnol.*, 17(11):429–36.



# Anhang

BLASTp-Ergebnisse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *DmX* (gekürzt). Die vollständige Datei ist auf der beiliegenden CD zu finden

BLASTP 2.0.14 [Jun-29-2000]

Query= (3429 letters)

Database: nr 521,662 sequences; 163,565,675 total letters

```

-----
Sequences producing significant alignments:

```

	Score	E
	(bits)	Value
pir  T13853 hypothetical protein X - fruit fly (Drosophila ...	7035	0.0
gb AAF46135.1 (AE003437) anon-X gene product [Drosophila m...	7029	0.0
pir  T17121 CPY protein - midge (Chironomus thummi) >gi 309...	3949	0.0
emb CAA06718.2 (AJ005821) X-like 1 protein [Homo sapiens]	1569	0.0
ref NP_005500.1  Dmx-like 1	1568	0.0
pir  T22664 hypothetical protein F54E4.1 - Caenorhabditis e...	1172	0.0
gb AAF68593.1 AF252810_1 (AF252810) unknown [Drosophila sim...	995	0.0
gb AAF68592.1 AF252809_1 (AF252809) unknown [Drosophila sim...	992	0.0
gb AAF68621.1 AF255326_1 (AF255326) unknown [Drosophila yak...	967	0.0
dbj BAA74879.1 (AB020663) KIAA0856 protein [Homo sapiens]	708	0.0
gb AAC31539.1 (AF076600) CpyA [Dictyostelium discoideum]	161	9e-38
gb AAD20167.1 (AC006418) hypothetical protein [Arabidopsis...	156	4e-36
ref NP_012567.1  Ravlp >gi 1352875 sp P47104 YJ03_YEAST HYP...	129	5e-28
emb CAA60726.1 (X87297) J1590 [Saccharomyces cerevisiae]	129	5e-28
pir  T39287 hypothetical protein SPBC1105.10 - fission yeas...	110	3e-22
gb AAA88735.1 (L36344) ORF; putative [Saccharomyces cerevi...	73	5e-11
gb AAD49999.1 AC007259_12 (AC007259) Hypothetical protein [...	65	1e-08
gb AAB71474.1 (AC002294) contains beta-transducin motif [A...	60	5e-07
pir  S35342 Golgi-associated particle 102K chain - human	59	6e-07
sp P35605 COPP_BOVIN COATOMER BETA' SUBUNIT (BETA'-COAT PRO...	59	6e-07
ref NP_004757.1  coatomer protein complex, subunit beta 2 (...	59	6e-07
sp O35142 COPP_RAT COATOMER BETA' SUBUNIT (BETA'-COAT PROTE...	59	1e-06
emb CAA07084.1 (AJ006523) coatomer, beta-prime subunit [Dr...	58	1e-06
emb CAB45034.1 (AL078635) putative WD-repeat containing pr...	58	2e-06
gb AAF53294.1 (AE003639) beta'Cop gene product [Drosophila...	53	3e-05
pir  T02146 coatomer complex alpha chain homolog F8K4.21 - ...	50	5e-04
ref NP_005877.1  katanin p80 (WD40-containing) subunit B 1 ...	49	7e-04
gb AAF09037.1 AC011717_4 (AC011717) putative coatomer prote...	49	7e-04
gb AAD55465.1 AC009322_5 (AC009322) Putative coatomer prote...	49	7e-04
gb AAC95573.1 (AF083424) orf 48 [Ateline herpesvirus 3]	47	0.003
ref NP_011378.1  encodes beta'-subunit of yeast coatomer; S...	46	0.004
gb AAD23699.1 AC006841_15 (AC006841) coatomer alpha subunit...	46	0.004
sp Q20168 COPP_CAEEEL PROBABLE COATOMER BETA' SUBUNIT (BETA'...	46	0.004
gb AAF48571.1 (AE003501) CG9910 gene product [Drosophila m...	46	0.004
gb AAC47809.1 (AF020788) SEL-10 [Caenorhabditis elegans] >...	46	0.006
sp Q93794 SEL10_CAEEEL SEL-10 PROTEIN >gi 7504252 pir  T22703...	46	0.006
gb AAF42472.1 AF163151_1 (AF163151) dentin sialophosphoprot...	46	0.008
pir  T21970 hypothetical protein F38E11.5 - Caenorhabditis ...	46	0.008
pir  T02617 hypothetical protein T19L18.13 - Arabidopsis th...	45	0.010
gb AAF34688.1 AF223065_1 (AF223065) putative microtubule se...	45	0.017
sp Q27954 COPA_BOVIN COATOMER ALPHA SUBUNIT (ALPHA-COAT PRO...	45	0.017
dbj BAA92020.1 (AK001985) unnamed protein product [Homo sa...	45	0.017
gb AAC25503.1 (AC005239) F23149_1 [Homo sapiens]	45	0.017
ref NP_004362.1  coatomer protein complex, subunit alpha; x...	44	0.023
pir  T39962 coatomer complex beta' chain - fission yeast (S...	44	0.023
pir  B40505 hypothetical protein - suid herpesvirus 1 (stra...	44	0.023
ref NP_055224.1  PCAF associated factor 65 beta >gi 3335561...	44	0.023
emb CAA08816.1 (AJ009970) putative transcription factor [H...	44	0.023
gb AAF47534.1 (AE003472) alphaCop gene product [alt 1] [Dr...	44	0.030
emb CAA09492.1 (AJ011114) coatomer alpha subunit [Drosophi...	44	0.030
gb AAD15347.1 (AC004044) putative WD-repeat protein [Arabi...	43	0.039
dbj BAA95098.1 (AB041615) unnamed protein product [Mus mus...	43	0.039
sp Q00808 HET1_PODAN VEGETATIBLE INCOMPATIBILITY PROTEIN HE...	43	0.039
gb AAF70042.1 AF250878_203 (AF250878) orf; hypothetical pro...	43	0.051
ref NP_013156.1  transcription factor, probable member of h...	43	0.051

pir  T34434	hypothetical protein K06A9.1a - Caenorhabditis ...	43	0.051
gb AAC09329.1	(AF052433) katanin p80 subunit [Strongylocen...	43	0.051
sp Q19753 YU00_CAEEL	HYPOTHETICAL 108.4 KDA PROTEIN F23B12...	43	0.067
sp P93107 PF20_CHLRE	FLAGELLAR WD-REPEAT PROTEIN PF20 >gi 7...	43	0.067
pir  S41539	fibrinogen-binding protein - Staphylococcus aur...	43	0.067
gb AAD13113.1	(AF117606) lissencephaly-1 [Drosophila melan...	43	0.067
gb AAC83821.1	(AF098070) Lis1 homolog [Drosophila melanoga...	43	0.067
emb CAB66883.1	(AL035264) hypothetical protein L8032.02 [L...	43	0.067
sp P52287 GBB3_RAT	GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN G(I)/...	43	0.067
gb AAF57798.1	(AE003802) CG10931 gene product [Drosophila ...	42	0.087
gb AAF54051.1	(AE003672) CG10055 gene product [Drosophila ...	42	0.087
gb AAF49568.1	(AE003529) Pka-C3 gene product [Drosophila m...	42	0.087
sp Q93134 GBLP_BIOGL	GUANINE NUCLEOTIDE-BINDING PROTEIN BET...	42	0.11
sp P16912 KDC2_DROME	PROTEIN KINASE DC2 >gi 85238 pir  F317...	42	0.11
pir  S52246	transposable retroelement homolog - perennial t...	42	0.11
ref NP_012151.1	159-kDa nucleoporin with coiled-coil domai...	42	0.11
ref NP_061229.1	zinc finger protein >gi 3298472 dbj BAA315...	41	0.15
pdb 1A0R B Chain B,	Heterotrimeric Complex Of PhosducinTRAN...	41	0.15
gb AAC12787.1	(U67916) dentin sialophosphoprotein precurs...	41	0.15
ref NP_034210.1	dentin sialophosphoprotein >gi 3087814 emb...	41	0.15
ref NP_035681.1	transcription factor UBF >gi 136653 sp P25...	41	0.15
pdb 2TRC B Chain B,	PhosducinTRANSDUCIN BETA-Gamma Complex ...	41	0.15
ref NP_015134.1	nuclear polyadenylated RNA/single strand D...	41	0.20
pir  S60122	probable RNA/ssDNA-binding protein HMD1 - yeast...	41	0.20
pir  T23713	hypothetical protein M04C9.6b - Caenorhabditis ...	41	0.20
gb AAC50902.1	(U75309) TBP-associated factor [Homo sapiens]	41	0.20
sp Q15542 T2D4_HUMAN	TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR TFIID ...	41	0.20
ref NP_008882.1	TATA box binding protein (TBP)-associated ...	41	0.20
gb AAB61638.1	(U81504) beta-3A-adaptin subunit of the AP-3...	41	0.26
gb AAD10618.1	(U02613) surface glycoprotein [Trypanosoma c...	41	0.26
ref NP_013079.1	spindle pole antigen; Spa2p >gi 134781 sp ...	41	0.26
dbj BAA20466.1	(D86074) insoluble protein [Pinctada fucata]	41	0.26
dbj BAA92532.1	(AB037715) KIAA1294 protein [Homo sapiens]	41	0.26
ref NP_003655.1	adaptor-related protein complex 3, beta 1 ...	41	0.26
pir  T01768	hypothetical protein A_IG002P16.8 - Arabidopsis...	40	0.34
gb AAC63098.1	(U95120) truncated form platelet-activating ...	40	0.34
ref NP_033415.1	transducin-like enhancer of split 3, homol...	40	0.34
ref NP_005040.1	PWP2 (periodic tryptophan protein, yeast) ...	40	0.34
ref NP_012277.1	contains multiple WD repeats and interacts...	40	0.34
gb AAB63261.1	(U79774) NNP-1 var [Mus musculus]	40	0.34
ref NP_032168.1	guanine nucleotide binding protein, beta 1...	40	0.34
pir  S36113	LIS-1 protein - human	40	0.34
gb AAD21755.1	(AC006569) putative WD-40 repeat protein [Ar...	40	0.34
ref NP_038653.1	platelet-activating factor acetylhydrolase...	40	0.34
pir  A54138	acidic repetitive protein arpl - Tetrahymena th...	40	0.34

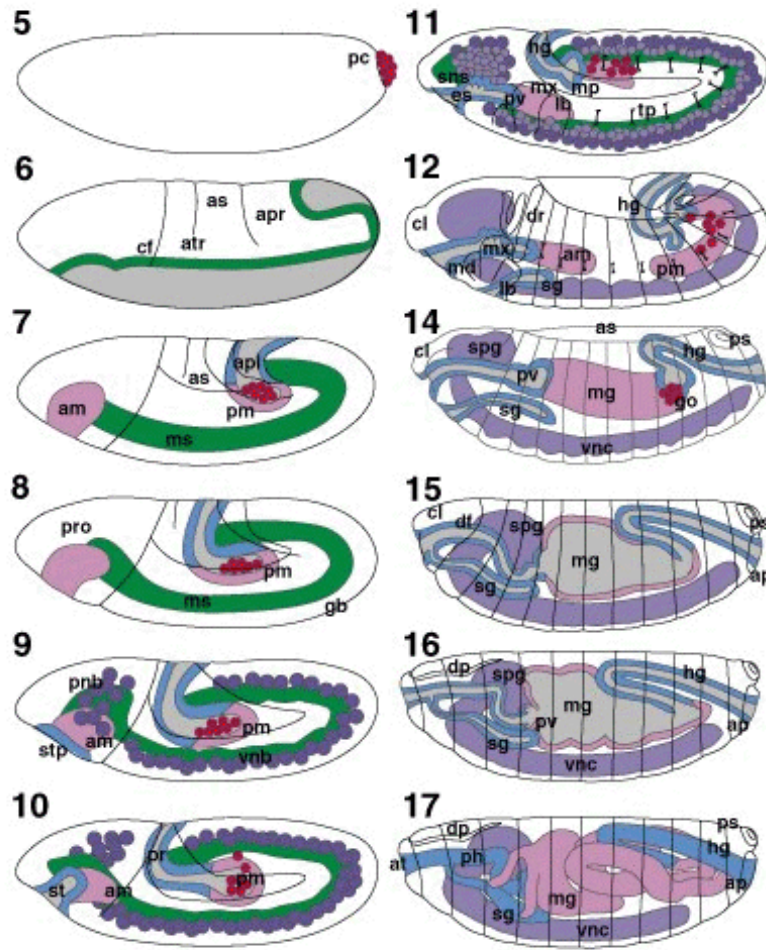
	G A	H	X	X	X	V	X	X	X	V L I C	X	F W L I V	X	(0-?)PDG(0-?)		X	L I V I F	A V L I	S T	G A S C	S G A	X	D	X	T S	I V L A	K R	V L I	W F Y	D N	
														DVD	SSN																TS
396	G	H	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
81	A	H	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
43	S	S	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
35	S	S	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
26	E	T	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
23	N	E	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
23	N	E	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
23	N	E	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
21	T	R	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
21	T	R	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
21	K	N	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
17	H	K	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
16	Q	C	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
12	V	Q	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
12	V	Q	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
11	F	I	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
11	P	F	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
9	I	S	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
8	C	C	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
7	Y	C	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
5	R	A	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
2	W	L	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										
2	W	L	X	X	X	V	X	X	X	V	X	F	X			X	L		S	S	S										

Abbildung 4.7: Häufigkeit des Vorkommens einzelner Aminosäuren an den einzelnen Positionen des WD-Repeats

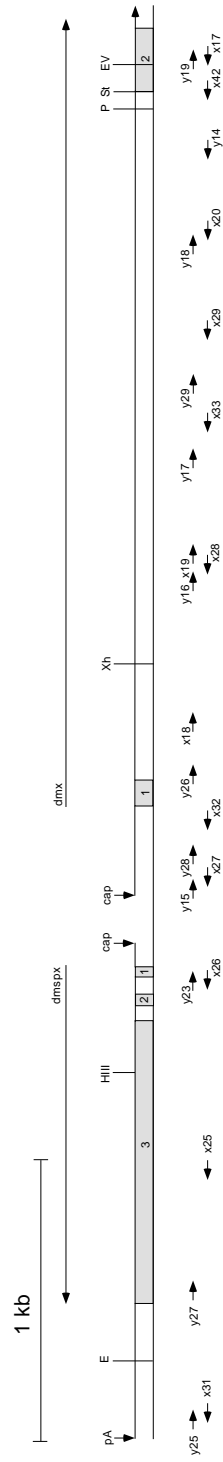
Name	Sequenz
pATG	TGGTACCATGAATTGTCATCAAATATTAAGTGGAG
BgsgpR	TGGTCGACGCCATATGCCCAAACACAACATGCTAGATC
BPr.2Sal	TGGTCGAGGTCAACTGCTTGATGCCATC
Bpuc18cn	AGTTGGTACCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCA
BSR46Kpn	TCGGTACCCTAATGCCTTCGACAGATCCA
CosPern	TTCAATGATGTCCAGTGCAG
CosPerr	TAACCCTTAGCATGTCCGTG
CpYcap	TCGTCGACGGTACCACAAAGAAGTGCTAGAAAAGTGG
crsPr.3	ACATCGTTTTGA ACTTG
EGFP-nB	TGGGATCCGGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
EGFP-rB	TGGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT
GFPnK	ACGGTACCATGAGTAAAGGAGAAGA ACT
GFPnXb	ACTCTAGATTATTTGTATAGTTCATCCA
GFP intern1	TCCGTATGTTGCATCACC
GFP intern2	GATGACGGGA ACTACAAG
Ggsgenn	GCCTTGAGCGCAGTTTCACAGCACATTCC
Ggsgenr	GCCATATGCCCAAACACAACATGCTAGATC
SR2	GCTGATGCCCCCATTCCAC
SR5	CTGTGTCCAGCTGTTGCGAC
SR18	CGAGGAAGTAATGCAGACGAAGAG
SR19	CATCTAAATTGTCTTCTGCGAC
SR49	GTGGATACTTCCTTCAAGCGGCT
SR70	CCTTTATATTCTGTGCGG
SR71	CAGCGCCTTTTATCTATTTT
x32	GATTATCACATCACAGCGCA
x42K	ACGGTACCTGCCAGGATGACCACATTG
y23E	ACGAATTCGCGTCTCCAAGTGGTGC
DmY28BXb	GAATCTAGACGATATTTTCGCCTCCCATGCCGTGTC
pKB256n	AGGCGCTCGTCGACGGA
PKB256r	CCCATCGAGCGTTGAAGT
pw8-poly-C	ATGCGTCGTTTAGAGCAG
pw8-poly-D	CGAATAGAGAATAACGGG

**Tabelle 4.3:** Sequenzen der Laufe der Arbeit verwendeten Primer

**Abbildung 4.8 (gegenüberliegende Seite):** Die Hauptereignisse der *D. melanogaster* -Embryonalentwicklung nach Campos-Ortega und Hartenstein (1985): Twelve drawings of embryos of increasing age illustrating the major events of *Drosophila* embryonic development. The number at the top left of each drawing indicates the embryonic stage (see Chapter 2). Stage 5 shows the blastoderm with the pole cells (**pc**) at the posterior pole. Light shading indicates the larval Anlagen that will invaginate during gastrulation, i.e. Anlagen of the endodermal anterior midgut primordium (**am**), mesoderm (**ms**), proctodeum and posterior midgut primordium (**pm/pr**). Other abbreviations are. **as**. Anlage of the amnioserosa. Stage 6 illustrates morphogenetic movements during gastrulation. Mesoderm (**ms**) and endoderm (**am, pm**) have completed invagination, invaginated regions are shaded in lateral projection (hollow spaces -lumina- in this and following drawings are hatched), pole cells (**pc**) are included in the posterior midgut primordium. The cephalic furrow (**cf**) separates the procephalon from the prospective metameric germ band; anterior (**atr**) and posterior (**ptr**) transverse furrows are visible. **api**. amnioproctodeal invagination; **as**. amnioserosa. Stage 7 illustrates the beginning of germ band elongation. The cephalic furrow is tilted caudalwards; transverse furrows are approaching each other; the amnioproctodeal invagination (**api**) has deepened. During stage 8 germ band elongation proceeds further; the primordia of the posterior midgut and the proctodeum become individualized. In stage 9 germ band elongation enters its slow phase; the stomodeal plate (**stp**) becomes visible; the mesoderm transiently exhibits segmental bulges; segregation of neuroblasts (**vnb**. ventral neuroblasts; **pnb**. procephalic neuroblasts) begins. **cms**. cephalic mesoderm. In stage 10 stomodeal invagination (**st**) takes place; segregation of the neuroblast divisions occur to give rise to ganglion mother cells. In stage 11 epidermal segmentation becomes evident; **tp** tracheal pits; **mx**. maxillary bud; **lb**. labial bud; **es** oesophagus; primordia of the stomatogastric nervous system (**sns**) and Malpighian tubules (**mt**) appear; pole cells leave the posterior midgut pocket (**mp**) and become arranged laterally. **cl**. clypeolabrum; **ph**. pharynx; **pm**. posterior midgut; **hg**. hindgut; **md**. mandibular bud. The germ band retracts during stage 12, the drawing shows the final stages of this retraction. During this process fusion of the anterior and posterior midgut primordia (**am/pm**) takes place and the definitive segmental boundaries appear. Notice that dorsal and ventral divisions of each segmental furrow are not in register. ventrally the furrows correspond to those that appeared in stage 11, whereas dorsally they run through the middle of the tracheal pits, a few cell diameters behind the projection of the ventral furrows. The salivary glands (**sg**) and the dorsal ridge (**dr**) appear. In stage 14 dorsal closure of the midgut (**mg**) and epidermis, and head involution begin. **df**. dorsal fold; **hg**. hindgut; **mt**. Malpighian tubules; **mx**. maxillary bud; **spg**. supraoesophageal ganglion; **ps**. posterior spiracles; **vnc**. ventral cord. In stage 15 head involution is well advanced. Notice growth of the hindgut. The Malpighian tubules have been omitted in this and the following drawings. **ap**. anal pad; **cl**. clypeolabrum; **df**. dorsal fold; **ph**. pharynx; **sg**. salivary glands; **t1**. prothorax. In stage 16 head involution is almost complete, midgut (**mg**) constrictions appear, condensation of the ventral cord (**vnc**) begins. Stage 17 corresponds to the fully developed embryo. **at**. atrium; **cl**. clypeolabrum; **es**. oesophagus; **hg**. hindgut; **mg**. midgut; **ph**. pharynx; **pv**. proventriculus; **sg**. salivary glands; **ps**. posterior spiracles.







**Abbildung 4.9:** Maßstabgetreue Karte von *DmSPX*, dem Intergenbereich, sowie dem ersten Exon und Intron von *DmX*. Die Lage der in diesem Bereich zur Verfügung stehenden Primer und die Primärtranskripte sind ebenfalls verzeichnet. Als Bezugspunkt dienen die Anfänge der Pfeile.

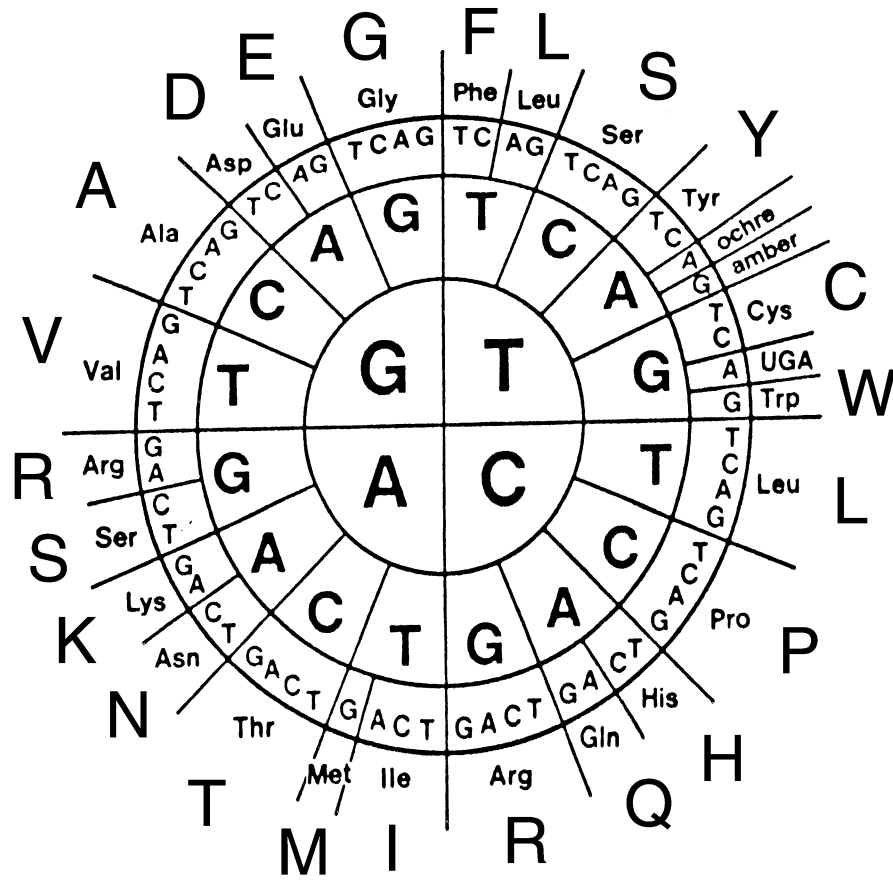


Abbildung 4.10: Genetischer Code, sowie Ein- und Dreibuchstabencode für Aminosäuren

## Veröffentlichungen und Abstracts

- C. Kraemer, B. Weil, E. R. Schmidt: The *SPX* gene product from *D. melanogaster* is highly homologous to the human SAP 49 protein. In Vorbereitung
- S. Wiemann, B. Weil, J. Gassenhuber, W. Ansorge, S. Glassl, H. Blöcker, M. Böcher, H. Blum, S. Bauernsachs, A. Düsterhöft, J. Lauber, K. Köhrer, A. Beyer, H.-W. Mewes, Ch. Gruber, B. Obermaier, B. Ottenwälder, J. Tampe, R. Wambutt, D. Heubner, M. Klein, R. Wellenreuther, A. Poustka (2000): Sequencing and analysis of 500 novel full length cDNAs. In Vorbereitung
- S. Wiemann, B. Weil, J. Gassenhuber, W. Ansorge, S. Krieger, H. Blöcker, M. Böcher, H. Blum, A. Düsterhöft, J. Lauber, K. Köhrer, A. Beyer, H. W. Mewes, Ch. Gruber, B. Obermaier, B. Ottenwälder, R. Wambutt, R. Pepperkok, J. Simpson, R. Wellenreuther, A. Poustka (2000): Sequencing and analysis of full length cDNAs in the German cDNA Consortium. Genome Sequencing & Biology, 10–14 Mai 2000, Cold Spring Harbor
- H. W. Mewes, D. Frishman, C. Gruber, B. Geier, D. Haase, A. Kaps, K. Lemcke, G. Mannhaupt, F. Pfeiffer, C. Schüller, S. Stocker und B. Weil (2000): MIPS: a database for genomes and protein sequences. Nucl. Acids Res. 28(1), 37–40
- S. Wiemann, B. Weil, J. Gassenhuber, W. Ansorge, U. Wirkner, H. Blöcker, M. Böcher, H. Blum, A. Düsterhöft, J. Lauber, K. Köhrer, A. Beyer, H.-W. Mewes, Ch. Gruber, B. Obermaier, B. Ottenwälder, A. Poustka, R. Wellenreuther, R. Wambutt, D. Heubner (1999): Sequencing of full length cDNAs in the course of the german genome project. German Human Genome Project, Implications, Progress and the Future, Congress 28.11 - 1.12.99 in Munich
- C. Kraemer, B. Weil, E. R. Schmidt (1999) Molecular and functional analysis of the *DmX* gene encoding a WD repeat protein. 40th Annual *Drosophila* Research Conference, Bellevue, WA, March 24–28, 1999 (419A)
- C. Kraemer, B. Weil, E. R. Schmidt (1998): The new gene *DmX* from *D. melanogaster* encodes a novel WD-repeat protein. Gene 216 267-276
- C. Kraemer, B. Weil, E. R. Schmidt: (1998): The *DmX* gene from *D. melanogaster* encodes a novel WD repeat protein. Genomics and Proteomics, Functional and Computational Aspects, October 4 - 7, 1998, Heidelberg.

- C. Kraemer, B. Weil, E. R. Schmidt (1998): The sex determining region of *C. thummi* contains repetitive DNA and a highly conserved gene. Abstracts of the VIth European Congress of Entomology, Ceske Budejovice, Czech Republik, August 23 - 29, 1998
- C. Kraemer, B. Weil, E. R. Schmidt (1998) The X chromosomal gene *DmX* is evolutionarily conserved and encodes a novel WD-repeat protein. 39th Annual *Drosophila* Research Conference, Washington, DC, March 25–29, 1998 (615C)
- C. Kraemer, B. Weil, M. Christmann, E. R. Schmidt: Functional analysis of the *CpY/DmX* gene. *Hereditas* 127–3 (1997) 272–273
- C. Kraemer, B. Weil, E. R. Schmidt: Functional analysis of the *CpY/DmX* gene. Abstracts of the 8th Balbiani Ring Workshop, Falsterbo (Sweden), Aug. 30 - Sep. 3, 1997
- B. Weil, T. Hankeln, E. R. Schmidt: Amplification of a 16 kb Gene Region from Insect Genomic DNA with the Expand<sup>TM</sup>Long Template PCR System. *Biochemica* Nr.3 1995, 14
- C. Kraemer, B. Weil, E. R. Schmidt: Analysis of the sex determining region of *C. thummi* with an embryonically expressed gene. *Genes, Chromosomes, Genomes*, Abstracts of the Annual Meeting of the Gesellschaft für Genetik 23–24 September 1993 in Lübeck Vol, 1, 41 Poster)

## Eidesstattliche Versicherung:

Hiermit gebe ich die eidesstattliche Versicherung ab, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Martinsried den 21. Oktober 2000

Bernd Weil