

Charakterisierung und Analyse der
geschlechtsbestimmenden Region von
Chironomus riparius

Dissertation
zur Erlangung des Grades
«Doktor der Naturwissenschaften»
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Elisabeth Funke

geb. am 21.01.1980 in Köln

Mainz, 2011

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	11
1.1. <i>Chironomus</i>	11
1.2. Geschlechtsbestimmungsmechanismen	13
1.2.1. Männliche Heterogamete	13
1.2.2. Weibliche Heterogamete	14
1.2.3. X:A-Verhältnis	14
1.2.4. Haplodiploidie	14
1.2.5. Maternale Geschlechtsbestimmung	16
1.2.6. Umweltbedingte Geschlechtsbestimmung	16
1.3. Geschlechtsbestimmung in Dipteren	17
1.3.1. <i>Drosophila</i>	17
1.3.2. <i>Musca</i> und <i>Ceratitis</i>	20
1.3.3. <i>Megaselia</i>	23
1.3.4. <i>Sciara</i>	24
1.3.5. <i>Chironomus</i>	26
1.4. Evolution von Geschlechtschromosomen und geschlechtsbestimmenden Genkaskaden	29
1.5. Zielsetzung der Arbeit	31
2. Material und Methoden	33
2.1. Versuchstiere	33
2.2. Standardmethoden	33
2.3. DNA-Präparation	34
2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA	34
2.3.2. Plasmid-Präparation nach dem Whitehead-Protokoll (White- head Institute/MIT)	34
2.3.3. Plasmid-Präparation im 96er-Format	35
2.3.4. Isolierung genomischer DNA aus <i>Chironomus</i> -Larven	36
2.4. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	37

2.5. PCR	37
2.6. Klonierung in Plasmid-Vektoren	38
2.6.1. Verwendeter Bakterienstamm	38
2.6.2. Verwendete Vektoren	38
2.6.3. Konstruktion von BAC-Bibliotheken aus <i>C. riparius</i>	39
2.6.4. Konstruktion von Shotgun-Bibliotheken	40
2.7. Transformation von <i>E. coli</i>	40
2.8. DNA-Markierung	41
2.9. Hybridisierungstechniken	41
2.9.1. Koloniefilter-Hybridisierung	41
2.9.2. Southern-Hybridisierung	42
2.9.3. <i>in situ</i> -Hybridisierung	43
2.10. DNA-Sequenzierung	43
2.11. Materialien	44
3. Ergebnisse	45
3.1. Klonierung der SDR	45
3.1.1. Screening von BAC-Bibliotheken	45
3.1.2. Lokalisierung der Klone	47
3.1.3. Sequenz-Analyse	48
3.1.4. Bioinformatische Analyse der SDR	51
3.2. «Skimming» aller BAC-Klone aus der SDR	65
3.3. Geschlechtsspezifische Untersuchungen	73
3.3.1. PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA	73
3.3.2. Southern-Hybridisierung von geschlechtsspezifischer genomischer DNA	78
3.3.3. PCR auf stammspezifische genomische DNA	82
4. Diskussion	89
4.1. Die Gene in der SDR als mögliche Kandidaten für <i>M</i>	89
4.1.1. <i>fs(1)K10-like</i>	89
4.1.2. <i>polyhomeotic-like</i>	91
4.1.3. <i>rpn5-like</i>	92
4.1.4. Mögliche Beteiligung der Gene an der Geschlechtsbestimmung von <i>C. riparius</i>	93
4.2. Unterscheidung von proto-X- und proto-Y-Chromosom	97
4.2.1. Evolution von Geschlechtschromosomen bei <i>C. riparius</i>	97

4.2.2. Die analysierte Sequenz der SDR repräsentiert möglicherweise nur das proto-X-Chromosom	98
4.3. Ausblick	100
5. Zusammenfassung	103
6. Literaturliste	105
A. Anhang	129
A.1. Puffer und Lösungen	129
A.2. Bezugsquellen	132
A.3. Screening-Sonden	133
A.4. Genstrukturen in der SDR	133

Abbildungsverzeichnis

1.1. Geschlechtsbestimmung in <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.2. Geschlechtsbestimmung in <i>Musca domestica</i>	22
2.1. Der Plasmidvektor pBeloBAC11	38
3.1. Situation zu Beginn des Projekts	46
3.2. BAC-Klone in der SDR	48
3.3. Lokalisierung der BAC-Klone 1	49
3.4. Lokalisierung der BAC-Klone 2	50
3.5. Übersicht über die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der Sequenz aus der SDR	53
3.6. Genstruktur <i>GJ16627-like</i>	55
3.7. Genstruktur <i>ACYPI006459-like</i>	55
3.8. Genstruktur <i>spitz 1-like</i>	56
3.9. Genstruktur <i>spitz 2-like</i>	56
3.10. Genstruktur <i>spitz 3-like</i>	56
3.11. Genstruktur <i>CENP-E-like</i>	56
3.12. Genstruktur <i>mi-er1-like</i>	57
3.13. Genstruktur <i>LUC7-like</i>	57
3.14. Genstruktur <i>CG7845-like</i>	58
3.15. Genstruktur <i>fs(1)K10-like</i>	58
3.16. Genstruktur <i>bcn92-like</i>	58
3.17. Genstruktur <i>D-Laktat-DH-like</i>	59
3.18. Genstruktur <i>polyhomeotic-like</i>	59
3.19. Genstruktur <i>CG11203-like</i>	60
3.20. Genstruktur <i>rpn5-like</i>	61
3.21. Genstruktur <i>HPS-like</i>	61
3.22. Genstruktur <i>rpS5-like</i>	62
3.23. Genstruktur <i>CtY</i>	62

3.24. Genstruktur <i>ptr-like</i>	62
3.25. Genstrukturen in der SDR	64
3.26. Skimming aller BAC-Klone der SDR	66
3.27. Indels I18, I61, I84 und I88 im Detail	67
3.28. Indels I98, I100, I101 und I113 im Detail	68
3.29. Indels I114, I116, I135 und I156 im Detail	69
3.30. Aufbau von I18	70
3.31. Aufbau von I101	71
3.32. Aufbau von I113	71
3.33. Aufbau von I116	72
3.34. PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA für I84, I98, I100 und I101	75
3.35. PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA für I113, I116 und I135	76
3.36. PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA für I61, I88 und I18	77
3.37. PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA für I114 und I156 . .	78
3.38. Southern-Hybridisierung von geschlechtsspezifischer genomischer DNA für I84, I98 und I116	81
3.39. Southern-Hybridisierung von geschlechtsspezifischer genomischer DNA für I113	82
3.40. Stammvergleich für I84	85
3.41. Stammvergleich für I98	85
3.42. Stammvergleich für I100	86
3.43. Stammvergleich für I101	86
3.44. Stammvergleich für I113	87
3.45. Stammvergleich für I116	87

Tabellenverzeichnis

2.1. Standard-PCR-Bedingungen	37
3.1. Screening von BAC-Bibliotheken	47
3.2. Übersicht über die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der Sequenz aus der SDR	54
3.3. Gruppenunterschiede: Größere Indels	70
3.4. PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA	74
3.5. Southern-Hybridisierung von geschlechtsspezifischer genomischer DNA	79
3.6. Verwendete <i>C. riparius</i> -Stämme	82
3.7. Übersicht Stammvergleich	84
A.1. Verwendete Puffer und Lösungen	131
A.2. Bezugsquellen	132
A.3. Screening-Sonden	133
A.4. Genstrukturen in der SDR	136

1. Einleitung

Die Determination des Geschlechts geht bei Tieren in den meisten Fällen mit einer Differenzierung von zwei sich unterscheidenden Geschlechtschromosomen einher. Die Situation in der geschlechtsbestimmenden Region («sex determining region»: SDR) von *Chironomus riparius* kann als Beginn einer solchen Differenzierung verstanden werden.

Im Folgenden soll zunächst der untersuchte Organismus *C. riparius* vorgestellt werden. Anschließend werden verschiedene Geschlechtsbestimmungsmechanismen aus dem Tierreich und Theorien zu deren Entstehung erläutert. Die wichtigsten dieser Mechanismen und die dazugehörigen bisher bekannten Genkaskaden werden an ausgewählten Beispielen von Dipteren-Vertretern im Detail gezeigt. Soweit bisher bekannt wird die Geschlechtsdetermination bei *C. riparius* vorgestellt. Abschließend soll in das Thema der Evolution von Geschlechtschromosomen eingeführt werden.

1.1. *Chironomus*

Die Gattung *Chironomus* gehört innerhalb der Insekten zur Ordnung der Zweiflügler (Diptera), der Unterordnung Nematocera (Mücken), der Familie Chironomidae (Zuckmücken) und Unterfamilie Chironominae. Die Familie der Chironomiden umfasst weltweit bis zu 15.000 Arten, davon rund 700 in Deutschland (Armitage et al. 1995). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Art *C. riparius* wurde von Meigen (1804) beschrieben und wird häufig auch als *Chironomus thummi* bezeichnet (Kieffer 1911; Credland 1973).

Zuckmücken sind die am häufigsten vertretenen Insekten in Süßwasser und die geographisch am weitesten verbreiteten holometabolen Insekten, die während ihres Lebens-

1. Einleitung

zyklus eine vollständige Metamorphose mit Larvenstadium, Puppenstadium und Imago durchlaufen. Dabei ist das Larvenstadium der längste Abschnitt im Lebenszyklus der Chironomiden. Während der Entwicklung der Puppe, die gewöhnlich innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen abgeschlossen ist, erfolgen tief greifende Änderungen der inneren und äußeren Organisation. Danach treiben die Puppen an die Wasseroberfläche, wo die adulten Insekten innerhalb weniger Sekunden schlüpfen. Die adulten Männchen lassen sich anhand ihrer langen, wirtelig behaarten Antennen gut von den Weibchen unterscheiden, deren Antennen kleiner und unscheinbar ausgebildet sind. Die Lebensdauer der adulten Insekten beträgt bei den meisten Arten nur einige Tage bis wenige Wochen. Die adulten Tiere nehmen keine Nahrung auf, sondern das wesentliche Ziel ist die Paarung. Unmittelbar nach der Paarung, die im Schwarm erfolgt, kommt es zur Eiablage, wobei die Gelege in einer schützenden Gallerthülle direkt auf der Wasseroberfläche abgeworfen oder an aus dem Wasser ragenden Gegenständen angeheftet werden. Nach einigen Tagen schlüpfen die Larven, welche in der Regel vier distinkte Larvenstadien durchlaufen. Die Dauer der Larvalentwicklung kann in Abhängigkeit von der Temperatur variieren. Chironomiden kommen in nahezu allen limnischen Biotopen der Erde vor. Die Larven der Unterfamilie Chironominae leben in Sedimenten stehender Gewässer, wo sie Gehäuse im Substrat bauen, welche durch das von ihren Speicheldrüsen produzierte Spinnsekret zusammengehalten werden. In diesen Röhren ernähren sich die Larven, indem sie Algen und Teile höherer Pflanzen sowie teilweise Detritus aus dem Wasser filtrieren. Die Larven der Unterfamilie Chironominae besitzen den für Insekten untypischen Blutfarbstoff Hämoglobin in ihrer Hämolymphe. Aufgrund der besonders hohen Sauerstoffaffinität ihres Hämoglobins können diese Zuckmückenlarven auch in sehr sauerstoffarmen Gewässern überleben. Unter diesen Bedingungen können Zuckmückenlarven die einzigen Insekten in benthischen Sedimenten sein (Oliver 1971; Pinder 1986; Armitage et al. 1995). Die Larven der Chironomiden besitzen in ihren Speicheldrüsen gut ausgebildete polytäre Riesenchromosomen, an denen die Balbiani-Ringe entdeckt und erstmals beschrieben wurden (Balbiani 1881). Bei vielen Chironomidenarten dauert der gesamte Lebenszyklus nur einige Tage bis mehrere Wochen. Die meisten Arten sind multivoltin und bringen mehrere Generationen pro Jahr hervor (Armitage et al. 1995).

Die Verbreitung der Arten ist abhängig von den Bedürfnissen der Larven bezüglich Temperatur, pH-Wert, Salzgehalt und Sauerstoffgehalt des verfügbaren Wassers. Aufgrund ihres Vorkommens in nahezu allen Frischwasser-Habitaten und ihrer unterschiedlichen, charakteristischen Ansprüche an Umweltfaktoren werden die Larven verschiedener Chironomidenarten als Wasserindikatoren verwendet (Oliver 1971; Pin-

der 1986; Taenzler et al. 2007). Die Art *C. riparius* dient als Indikator für organische Verschmutzung und Eutrophierung, da sie unter diesen Bedingungen reichlich vorhanden ist (Pinder 1986). Die Art *C. riparius* wird auch für Exotoxizitätstests verwendet (Watts & Pascoe 2000).

1.2. Geschlechtsbestimmungsmechanismen

Aus dem Tierreich ist eine Fülle verschiedener Mechanismen zur Geschlechtsdetermination beschrieben (Bull 1983). Innerhalb der Insekten sind alle bekannten Geschlechtsbestimmungsmechanismen vertreten. Sie können in drei Hauptkategorien unterteilt werden, je nachdem ob der Ursprung des primären geschlechtsbestimmenden Signals zygotisch, maternal oder umweltbedingt ist (Sánchez 2008).

Die Beobachtung, dass sogar in verschiedenen Stämmen derselben Spezies unterschiedliche Mechanismen zur Geschlechtsdetermination realisiert sein können, führte zu der Hypothese, dass alle genotypischen Geschlechtsbestimmungsmechanismen in Insekten auf ein gemeinsames Grundprinzip zurückzuführen sind (Nöthiger & Steinmann-Zwicky 1985). Demnach ist männliche Heterogametie die Grundlage, auf der die regulatorischen Faktoren M , F und in maternalen Geschlechtsbestimmungssystemen F' das Geschlecht kontrollieren. F reguliert im aktiven Zustand die weibliche Entwicklung, wird aber vom dominanten Allel M reprimiert, weshalb Träger von M männlich sind. Das maternale Genprodukt F' wird in maternalen Systemen zur Expression aktiver F -Genprodukte benötigt. Weitere Geschlechtsbestimmungsmechanismen entstehen entsprechend der Hypothese durch Mutationen oder allelische Variationen der Kontrollgene.

1.2.1. Männliche Heterogametie

In diesem System der Geschlechtsbestimmung ist das Weibchen (XX) das homogametische und das Männchen (XY) das heterogametische Geschlecht. Das männliche Geschlecht wird durch die An- oder Abwesenheit eines dominanten Faktors M determiniert, welcher auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist. In Weibchen fehlt M gänzlich, weshalb F aktiv wird. Männliche Heterogametie kommt unter anderem in *Ceratitis*

1. Einleitung

capitata (Willhoeft & Franz 1996), den meisten Stämmen von *Musca domestica* (Dübendorfer et al. 2002) und auch in *Chironomus* (Bauer & Beermann 1952; Beermann 1955; Keyl 1961, 1962) vor. Durch die Realisierung beim Menschen ist dieses System das bekannteste unter den Geschlechtsbestimmungsmechanismen.

1.2.2. Weibliche Heterogametie

In diesem System sind die Weibchen (Chromosomenkonstellation WZ) das heterogametische Geschlecht und die Männchen (ZZ) das homogametische Geschlecht. Die Buchstaben W und Z werden zur Abgrenzung von X- und Y-Chromosom bei männlicher Heterogametie verwendet. Charakteristisch ist hierfür nach der Hypothese von Nöthiger und Steinmann-Zwicky (1985) ein dominanter weiblicher Geschlechtsrealisator F^D auf dem W-Chromosom, welcher nicht von M reprimiert wird. Weibliche Heterogametie ist charakteristisch für Schmetterlinge (Bull 1983; Traut et al. 2008) wie zum Beispiel *Bombyx mori* (Fujii & Shimada 2007) und kommt außerdem in einigen Stämmen von *M. domestica* vor (Schmidt et al. 1997). Bei den Wirbeltieren ist weibliche Heterogametie bei Vögeln realisiert (Stevens 1997).

1.2.3. X:A-Verhältnis

Bei diesem Geschlechtsbestimmungsmechanismus ist M auf einem Autosom lokalisiert, und M -Genprodukte werden durch X-chromosomale Genprodukte titriert. In Weibchen (Chromosomenverhältnis XX:AA) können alle M -Genprodukte «neutralisiert» werden, weshalb F aktiv bleibt. In Männchen (Chromosomenverhältnis X:AA) bleiben M -Genprodukte aktiv, die wiederum F reprimieren und so das männliche Geschlecht realisieren. Dieses System zur Geschlechtsdetermination kommt bei *Drosophila melanogaster* vor (Cline & Meyer 1996; Schütt & Nöthiger 2000).

1.2.4. Haplodiploidie

Lange Zeit galt die Annahme, dass bei Hymenopteren das Geschlecht durch den Ploidiegrad der Individuen bestimmt wird, da sich in der Natur Männchen normalerweise

parthenogenetisch aus unbefruchteten Eiern entwickeln und demnach haploid sind, während Weibchen sich aus befruchteten Eiern entwickeln und daher diploid sind. Diese Annahme wurde von Whiting und Whiting (1925) in Kreuzungsexperimenten mit der parasitären Wespe *Bracon hebetor* durch die Erzeugung diploider Männchen widerlegt. In weiteren Versuchen konnte Whiting (1933, 1943) zeigen, dass bei *B. hebetor* eine komplementäre Geschlechtsbestimmung vorliegt. Dabei besitzen haploide Männchen nur ein Allel eines Geschlechtsfaktors, diploide Weibchen dagegen zwei unterschiedliche Allele. Diploide Männchen, die homozygot für die Geschlechtsallele sind, haben eine geringe Lebenserwartung und eine schwache Konstitution. Sie entstehen bei Paarungen nahe verwandter Individuen von Inzucht-Laborstämmen, nicht aber bei Paarungen nicht-verwandter Stämme. Crozier (1971) stellte daraufhin die heute anerkannte Hypothese zur Geschlechtsbestimmung bei Hymenopteren auf, nach welcher ein oder mehrere multi-allelische geschlechtsbestimmende Faktoren in einer Art auftreten. Dabei sind Weibchen heterozygot für diesen Faktor/diese Faktoren, während Männchen hemizygot (haploid) oder homozygot (diploid) sind. Dieser als *complementary sex determiner*-Genort (*csd*) bezeichnete Faktor stellt das primäre Signal der Geschlechtsbestimmung dar (Cook 1993). Nach der Hypothese von Nöthiger und Steinmann-Zwicky (1985) hat in diesem System *M* seine Funktion verloren, wohingegen mehrere Allele von *F* existieren. Beim am besten untersuchten Vertreter dieses Systems, der Honigbiene *Apis mellifera*, existieren mindestens fünfzehn verschiedene Allele eines einzelnen *csd*-Gens. Es kodiert für ein Arginin-Serin-reiches (SR-) Protein, welches Strukturähnlichkeiten mit den *transformer*-Genprodukten der Dipteren aufweist (siehe Kapitel 1.3). Das Gen *csd* wird in beiden Geschlechtern transkribiert, doch es besitzt eine hochvariable Region, die zur Produktion verschiedener Isoformen führt. Es wird angenommen, dass heterozygote Weibchen zwei funktionelle Csd-Isoformen bilden, die einen Komplex formen, welcher zu weiblicher Entwicklung führt. Hemizygotie oder allelische Homozygotie beim Männchen generiert nur eine Csd-Isoform, die keinen funktionellen Komplex formen kann und so zu männlicher Entwicklung führt (Beye et al. 2003; Beye 2004).

Dagegen wird die Geschlechtsbestimmung bei der haplodiploiden Schlupfwespe *Nasonia vitripennis* nicht durch komplementäre Allele an einem oder mehreren Genorten reguliert, da sich homozygote diploide Individuen zu Weibchen entwickeln. In *N. vitripennis* unterliegt das maternale *transformer*-Gen einem Imprinting, wodurch es stillgelegt wird. Männchen besitzen nur dieses maternale Gen im Gegensatz zu den diploiden Weibchen, die zusätzlich das paternale Gen besitzen, welches exprimiert werden kann, was in der Folge zu weiblicher Entwicklung führt (Beukeboom et al. 2007).

1.2.5. Maternale Geschlechtsbestimmung

In diesem System der Geschlechtsdetermination existieren keine heteromorphen Geschlechtschromosomen. Das Geschlecht der Zygote wird ausschließlich durch den Genotyp der Mutter bestimmt. Dabei kommen zwei Kategorien von Weibchen vor, thelygene (Weibchen erzeugende) und arrhenogene (Männchen erzeugende). Thelygene Weibchen sind heterozygot für F' , welches für einen maternalen Faktor kodiert, der während der Oogenese in der Oozyte akkumuliert und durch Aktivierung von F eine weibliche Entwicklung der Nachkommen bewirkt. Arrhenogene Weibchen und Männchen sind dagegen homozygot für das rezessive Allel f' , welches keinen funktionsfähigen maternalen Faktor produziert. Vertreter dieses Systems sind *Chrysomya rufifacies* (Ullerich 1975) und Angehörige der Gattung *Sciara* (Metz & Schmuck 1929; Sánchez 2008).

1.2.6. Umweltbedingte Geschlechtsbestimmung

Bei umweltbedingter Geschlechtsbestimmung ist das Geschlecht abhängig von bestimmten Umweltfaktoren. So entwickeln sich die verschiedenen Geschlechter beispielsweise nur bei bestimmten Temperaturen ohne die Anwesenheit von heteromorphen Geschlechtschromosomen. Bei vielen Reptilien, unter anderem Krokodilen (Janzen & Paukstis 1991), den meisten Schildkrötenfamilien (Bull & Vogt 1979, 1981) sowie einigen Echsen (Charnier 1966; Bull 1987), wird das Geschlecht der Nachkommen durch die Inkubationstemperatur der Eier während der Embryogenese determiniert, wobei in der Regel eine niedrigere Temperatur zur Entwicklung von Männchen und eine höhere Temperatur zur Entwicklung von Weibchen führt (Bull 1980; Janzen & Paukstis 1991). Innerhalb der Insekten ist eine vergleichbare temperaturabhängige Verschiebung des Geschlechterverhältnisses außerdem bei den Nachkommen von *Sciara ocellaris* zu beobachten (Nigro et al. 2007).

1.3. Geschlechtsbestimmung in Dipteren

Im Folgenden sollen einige Geschlechtsbestimmungsmechanismen und -kaskaden, die innerhalb der Dipteren verwirklicht sind, im Detail vorgestellt werden. Zunächst wird der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* vorgestellt, dessen Geschlechtsbestimmungsmechanismus und die dazugehörigen Genkaskaden weitgehend bekannt sind und welcher daher als Bezugspunkt für alle Dipterenarten dient. Um Abweichungen von diesem Mechanismus der Geschlechtsdetermination zu illustrieren, wurden weitere Arten ausgewählt, die ebenfalls eng mit *Chironomus* verwandt sind wie *Musca domestica*, *Ceratitis capitata*, *Megaselia scalaris* und *Sciara*.

1.3.1. *Drosophila*

Die Taufliege *D. melanogaster* gehört zur Unterordnung Brachycera (Fliegen) und dort zur Familie der Drosophilidae (Taufliegen) und ist ein Modellorganismus in der Genetik. Die Geschlechtsdifferenzierung in *D. melanogaster* inklusive Morphologie, Physiologie und Verhalten, geschlechtsspezifischer Keimzellentwicklung und Dosiskompensation ist abhängig vom Verhältnis der Zahl der X-Chromosomen zum Autosomensatz. Dieses primäre chromosomale Signal führt zur Aktivierung oder Repression des Schlüsseligens *Sex-lethal* (*Sxl*). Ein Verhältnis von 1 (2X:2A) führt zu weiblicher Entwicklung und von 0,5 (1X:2A) zu männlicher Entwicklung. Das Y-Chromosom hat keine geschlechtsbestimmende Funktion, trägt jedoch Gene, die notwendig für die männliche Fertilität sind. Das Ziel des komplexen X:A-Signals ist das Schlüsseligens *Sxl*, dessen früher Promotor nur bei $X:A \geq 1$ aktiviert wird, was in der frühen Embryogenese kurz vor dem Blastodermstadium geschieht. Zu dieser Zeit ist das X:A-Verhältnis zellautonom in jeder somatischen Zelle festgelegt (Bopp et al. 1991). Das X:A-Signal wird mit Hilfe von drei Genklassen umgesetzt, Numeratoren, Denominatoren und maternalen Elementen, die alle für Transkriptionsfaktoren kodieren. Die Numeratorgene befinden sich auf dem X-Chromosom und liegen daher im weiblichen Genom in zwei Kopien, im männlichen Genom dagegen nur in einer Kopie vor. Bisher wurden vier verschiedene Numeratorgene identifiziert, die drei *sisterless*-Gene (*sisA*, *sisB*, *sisC*) und *runt* (*run*) (Cline 1988; Duffy & Gergen 1991; Deshpande et al. 1995). Das einzige bisher bekannte Denominatorgen *deadpan* (*dpn*) liegt auf einem Autosom und kodiert für einen negativen Regulator von *Sxl* (Younger-Shepherd et al. 1992). Die Produkte von *sisB*, *run* und *dpn* binden an spezifische Stellen des *Sxl*-Promotors

1. Einleitung

und aktivieren bzw. reprimieren dadurch *Sxl* (Hoshijima et al. 1995; Kramer et al. 1999). An der Interpretation des X:A-Signals sind zusätzlich vier maternale Gene beteiligt. Die Produkte von *daughterless* (*da*) und *hermaphrodite* (*her*) sind positive *Sxl*-Regulatoren (Cronmiller et al. 1988; Pultz & Baker 1995), wohingegen diejenigen von *extramacrochaetae* (*emc*) und *groucho* (*gro*) als negative Regulatoren wirken (Paroush et al. 1994). Die unterscheidende Wirkung geht von den Numeratoren auf dem X-Chromosom aus. Sowohl der Denominator als auch die maternalen Komponenten kommen in beiden Geschlechtern in gleicher Menge vor und dienen zur Umsetzung des Numeratorsignals, was durch einen Titrationsmechanismus verwirklicht wird. Bei einem X:A-Verhältnis von 0,5 sind alle Numeratormoleküle durch den Denominator *dpn* gebunden. Bei einem Verhältnis von 1 werden doppelt so viele Numeratoren gebildet, da zu diesem Zeitpunkt die Dosiskompensation noch nicht in Kraft getreten ist. Aus diesem Grund bleiben einige Numeratormoleküle frei und können mit maternalem DA einen Komplex bilden, der die Transkription von *Sxl* aktiviert. Zusätzlich binden die verschiedenen positiven und negativen Transkriptionsfaktoren kooperativ den *Sxl*-Promotor (Schütt & Nöthiger 2000). Auf diese Weise wird in XX-Embryonen ein früher *Sxl*-Promotor (*SxlP_e*) aktiviert. Von diesem Promotor gestartete Transkripte werden weibchenspezifisch gespleißt, was zur Produktion des frühen SXL-Proteins führt (Estes et al. 1995). Nach kurzer Zeit stellt dieser Promotor seine Aktivität ein und ein später *Sxl*-Promotor (*SxlP_m*) wird in beiden Geschlechtern aktiv. *Sxl*-Transkripte werden nun durch alternatives Spleißen geschlechtsspezifisch prozessiert. Männliche Transkripte beinhalten das 190 Bp lange Exon 3, welches ein Stoppcodon enthält, wodurch die Translation vorzeitig beendet wird. In Weibchen wird dieses Exon entfernt und damit eine vollständige Translation der mRNA ermöglicht. Initiiert durch eine autoregulatorische Schleife wirkt SXL dabei selbst als Spleißfaktor, der für das Herausspleißen von Exon 3 in Weibchen sorgt. Da in Männchen kein frühes SXL produziert wird, kann Exon 3 nicht herausgespleißt und die Autoregulation nicht etabliert werden (Bell et al. 1991). Ist der Aktivitätszustand von *Sxl* einmal festgelegt, werden in späteren Entwicklungsstadien die X-chromosomalen Produkte durch Dosiskompensation ausgeglichen (Schütt & Nöthiger 2000).

SXL ist ein RNA-bindendes Protein mit zwei konservierten RNA-Erkennungsmotiven (Bell et al. 1988). Zusätzlich zur Aufrechterhaltung seiner eigenen Aktivität kontrolliert *Sxl* die Expression von weiter stromabwärts gelegenen Genen der regulatorischen Kaskaden, wobei das Zielgen in der geschlechtsbestimmenden Genkaskade *transformer* (*tra*) ist. Ähnlich wie *Sxl* produziert *tra* eine prä-mRNA in beiden Geschlechtern, wobei SXL auch hier als weibchenspezifischer Spleißfaktor wirkt, der ein Exon mit Stoppcodon entfernt. Das führt zur Bildung von funktionsfähigem TRA im Weibchen,

1.3. Geschlechtsbestimmung in Dipteren

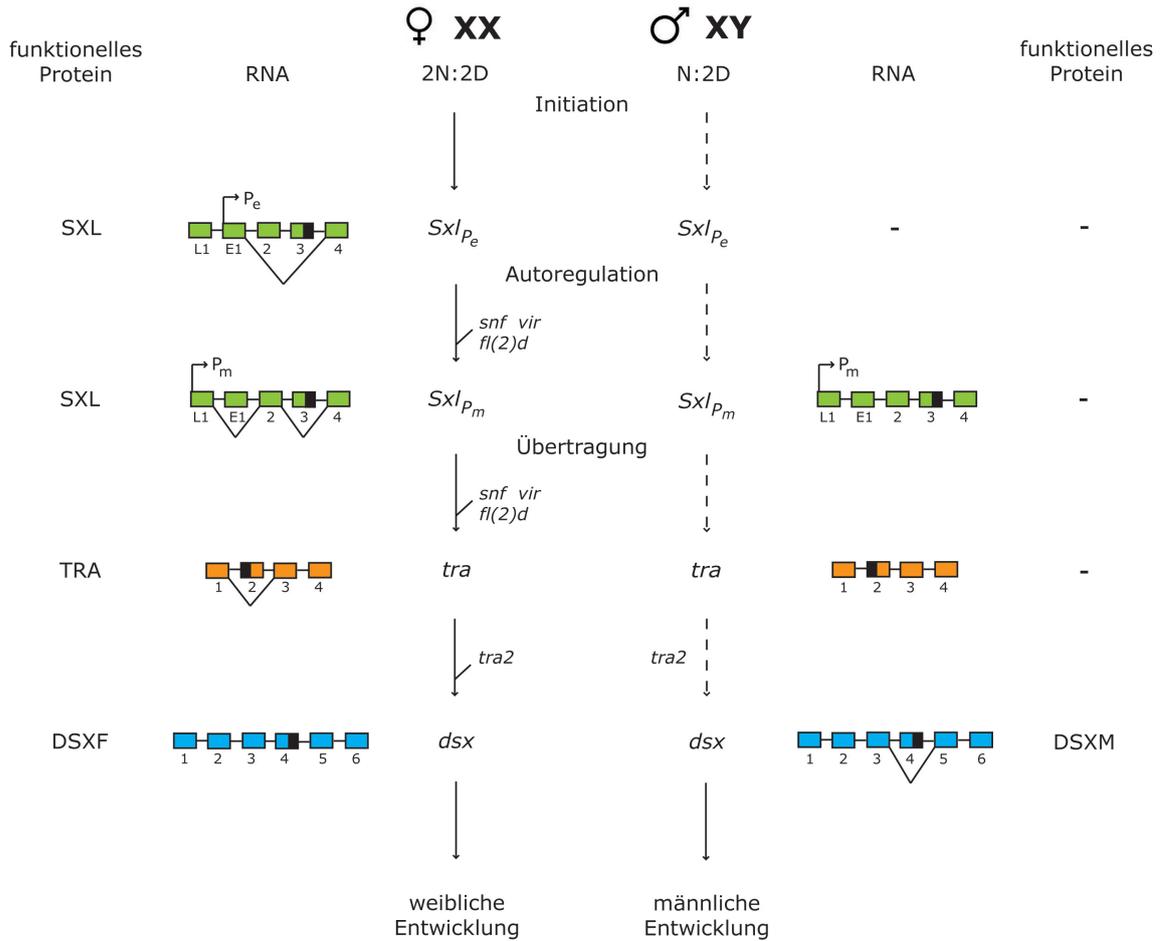


Abbildung 1.1.: Geschlechtsbestimmung in *Drosophila melanogaster*. Schematisch dargestellt ist die regulatorische Genkaskade im Soma modifiziert nach Pomiankowski et al. (2004). N: Numerator; D: Denominator; Bunte Kästchen: Exons; Schwarze Kästchen: Stoppcodons; dreieckige Linien: herausgespleißte Exons.

die im Männchen ausbleibt (Sosnowski et al. 1989). Für das weibchenspezifische Spleißen sowohl der späten *Sxl*-prä-mRNA als auch der *tra*-prä-mRNA wird die Funktion weiterer Gene wie *sans fille* (*snf*; Albrecht & Salz 1993; Salz & Flickinger 1996; Samuels et al. 1998; Cline et al. 1999), *female-lethal-2-d* (*fl(2)d*; Granadino et al. 1990, 1996; Penalva et al. 2000) und *virilizer* (*vir*; Hilfiker & Nöthiger 1991; Hilfiker et al. 1995; Niessen et al. 2001) benötigt. Das TRA-Protein bewirkt zusammen mit dem Produkt des konstitutiv aktiven Gens *transformer-2* (*tra2*) (Amrein et al. 1988) ein weibchenspezifisches Spleißen der prä-mRNA des bifunktionalen Proteins Doublesex (DSX). Das Gen *dsx* wird wiederum in Männchen und Weibchen transkribiert (Hosijima et al. 1991). Die beiden Produkte von *dsx*, DSXM und DSXF, sind Transkriptionsfaktoren, die die Aktivität der endgültigen, für die Geschlechtsdifferenzierung notwendigen Zielgene kontrollieren. DSXM und DSXF stimmen am N-Terminus

1. Einleitung

(die ersten drei Exons auf DNA-Ebene) überein, unterscheiden sich jedoch an den C-terminalen Enden. Die gemeinsame Sequenz enthält eine DNA-Bindedomäne, mit der die DSX-Proteine an ihre Zielgene binden, wohingegen der C-Terminus verantwortlich für den geschlechtsspezifischen Effekt auf diese Gene ist. DSXM reprimiert Gene, die für die weibliche Differenzierung benötigt werden und aktiviert männliche Differenzierungsgene, wohingegen DSXF eine umgekehrte Wirkung zeigt (Burtis & Baker 1989). Ein Schema der geschlechtsbestimmenden Genkaskade von *D. melanogaster* ist in Abbildung 1.1 gezeigt.

1.3.2. *Musca* und *Ceratitis*

Die Stubenfliege *M. domestica* gehört innerhalb der Ordnung Diptera zur Unterordnung Brachycera (Fliegen) und dort zur Familie Muscidae (Echte Fliegen). Bei *Musca* unterscheiden sich das X-Chromosom und das männliche Y-Chromosom genetisch nur in der Anwesenheit eines Männchen-bestimmenden Faktors *M* auf dem Y-Chromosom. Beide Heterosomen sind vorwiegend heterochromatisch, unterscheiden sich aber morphologisch (Hediger et al. 1998). In *M. domestica* können einzelne Genmutationen die Art der Geschlechtsbestimmung sowohl in der Natur als auch im Labor verändern, weshalb es verschiedene Stämme mit unterschiedlichen Geschlechtsbestimmungsmechanismen gibt. Diese verschiedenen Systeme haben eine gemeinsame Basis und funktionieren nach folgendem Prinzip: Das Gen *F* agiert als Hauptschalter in der Geschlechtsdetermination. Aktives *F* führt zu weiblicher Entwicklung, wohingegen es bei Inaktivität von *F* zu männlicher Entwicklung kommt. Für die Aktivierung von *F* in der Zygote wird maternale *F*-Aktivität benötigt, was zu der Annahme führte, dass dieses Gen auf eine selbstversorgende Feedback-Schleife angewiesen ist, um die Vermittlung der weiblichen Entwicklung aufrecht zu erhalten. Die Anwesenheit des dominanten Männchenbestimmers *M* in der Zygote verhindert die Aktivierung von *F* und führt so zu männlicher Entwicklung (Dübendorfer et al. 2002). Hediger et al. (2010) konnten das *transformer*-Ortholog von *M. domestica* identifizieren und zeigen, dass es sich dabei um das Hauptschaltergen *F* handelt, da alle für *F* beschriebenen Funktionen nachgewiesen werden konnten. Da aus historischen Gründen an allen Stellen die Bezeichnung *F* geführt wird, folgt das vorliegende Kapitel weiterhin dieser Konvention.

Auch in *C. capitata* konnte das *tra*-Ortholog als Hauptschalter in der geschlechtsbestimmenden Genkaskade identifiziert werden. Auswahl und Aufrechterhaltung des weiblichen Geschlechts basiert auf einer autoregulatorischen Funktion von *Cetra* (Panne et al. 2002). Die nahe phylogenetische Verwandtschaft zwischen *Ceratitis* und *Musca* ist ein weiteres Indiz für dieselbe *tra*-Funktion in *M. domestica*. Hediger et al. (2004) konnten zeigen, dass das *doublesex*-Homolog von *Musca* das Haupteffektorgen stromabwärts von *F* darstellt und geschlechtsspezifisch gespleißt wird. Zudem konnten Burghardt et al. (2005) nachweisen, dass das *tra2*-Homolog von *M. domestica* benötigt wird, um die autarke Feedback-Schleife von *F* aufrecht zu erhalten. Ebenso wie in *Cetra*-prä-mRNA wurden in *Mdtra*-prä-mRNA Cluster möglicher TRA/TRA2-Bindestellen gefunden, die darauf hinweisen, dass TRA und TRA2 in beiden Spezies einen Komplex bilden, um durch Assoziation mit der *tra*-prä-mRNA zu weibchenspezifischem Spleißen zu führen (Salvemini et al. 2009; Hediger et al. 2010).

Für *M. domestica* sind mehrere Arten der Geschlechtsbestimmung beschrieben worden (Dübendorfer et al. 2002). In sogenannten Standardstämmen existiert ein Männchen-bestimmender Faktor *M* auf dem Y-Chromosom (Hiroyoshi 1964). Zusätzlich kommen in der Natur Stämme vor, in denen *M* auf jedem der fünf Autosomen oder sogar auf dem X-Chromosom lokalisiert sein kann (Hiroyoshi 1964; Wagoner 1969; Denholm et al. 1983). In manchen Populationen sind alle Individuen homozygot für *M*, und das weibliche Geschlecht wird durch die Anwesenheit eines dominanten Weibchenbestimmers F^D determiniert (McDonald et al. 1978). Dieses natürlich vorkommende, dominante, Weibchen-bestimmende Allel ist resistent gegen die Repression durch *M* und unabhängig von der autoregulatorischen Funktion (Dübendorfer & Hediger 1998). Das rezessive Allel F^{man} , welches in einem Laborstamm identifiziert wurde, stellt eine Funktionsverlustmutation dar, welche bei homozygoten Individuen zu männlicher Entwicklung ohne die Anwesenheit von *M* führt (Schmidt et al. 1997). Es existieren sogar Stämme, in welchen das Geschlecht durch den maternalen Genotyp bestimmt wird. In diesen Stämmen gibt es zwei Arten von Weibchen, arrhenogene ($Ag/+$), die nur männliche Nachkommen und thelygene ($+/+$), die nur weibliche Nachkommen hervorbringen (Inoue & Hiroyoshi 1981).

Die Geschlechtsbestimmung bei *M. domestica* lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: *Mdtra* stellt den zentralen AN/AUS-Schalter in der Geschlechtsbestimmungskaskade dar. Seine kontinuierliche Aktivität wird benötigt, um eine weibliche Entwicklung in Gang zu setzen, was durch eine autoregulatorische Feedback-Schleife gewährleistet wird, die schon in der frühen Zygote etabliert wird. Maternale Ansamm-

1. Einleitung

lungen von funktionellen *Mdtra*- und *Mdtra2*-Produkten initiieren und aktivieren die Schleife in der Zygote. Der paternale *M*-Faktor hat die Funktion, die Etablierung dieser Weibchen-bestimmenden selbstregulierenden *Mdtra*-Schleife in der Zygote zu verhindern, was anscheinend durch eine spezifische Beeinflussung der Funktionen im *Mdtra*-Spleißen geschieht. Der Kollaps der Feedback-Schleife führt durch Unterbindung von weibchenspezifischem *Mdtra*-Spleißen über männchenspezifisches DSX zu männlicher Entwicklung (Hediger et al. 2010; siehe Abbildung 1.2).

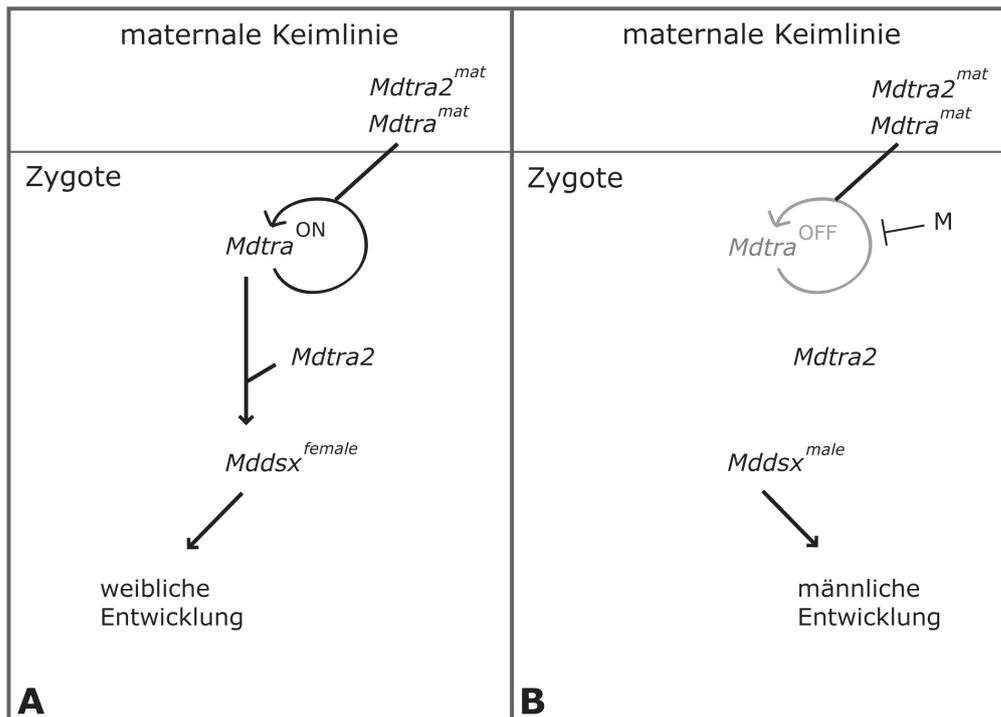


Abbildung 1.2.: Geschlechtsbestimmung in *Musca domestica*. Gezeigt ist die regulatorische Genkaskade in Standardstämmen modifiziert nach Hediger et al. (2010). A: Weibchen; B: Männchen.

Die Beispiele der verschiedenen *M. domestica*-Stämme zeigen, dass kleine Veränderungen auf der Ebene der *Mdtra*-Regulation zu unterschiedlichen Mechanismen der Geschlechtsbestimmung führen können. Dies unterstützt die Hypothese von Nöthiger und Steinmann-Zwicky (1985), dass verschiedene Strategien sich aus Variationen einer ansonsten gut konservierten Kaskade entwickeln können. Die geschlechtsbestimmenden Genkaskaden von *Drosophila* und *Musca* unterscheiden sich oberhalb der Ebene der *dsx*-Regulation. Die Kaskade von *Drosophila* ist durch ein weiteres Kontrollgen, *Sxl*, verlängert, welches die autoregulatorische Funktion von *Mdtra* übernommen hat (Dübendorfer et al. 2002; Hediger et al. 2010). Im *Musca*-Genom existiert ein gut

konserviertes *Sxl*-Gen, doch es wird nicht geschlechtsspezifisch gespleißt und ist demnach vermutlich nicht an der Geschlechtsdetermination beteiligt (Meise et al. 1998). Ausgehend von der Hypothese von Nöthiger und Steinmann-Zwicky (1985) ist anzunehmen, dass der Mechanismus von *M. domestica* der ursprünglichere ist, während sich derjenige von *D. melanogaster* durch die Rekrutierung von *Sxl* weiterentwickelt hat. Diese Annahme wird zusätzlich durch die Erkenntnisse zum Geschlechtsbestimmungsmechanismus von *C. capitata* gestützt, der demjenigen von *M. domestica* sehr ähnlich ist.

1.3.3. *Megaselia*

Die Buckelfliege *M. scalaris* gehört innerhalb der Ordnung Diptera zur Unterordnung Brachycera (Fliegen) und zur Familie Phoridae (Buckelfliegen). *M. scalaris* stellt ein Modell für die sehr frühe Differenzierung von Geschlechtschromosomen dar. Diese sind in dieser Spezies homomorph und weisen keine sichtbare X-Y-Differenzierung auf cytologischer, wohl aber auf molekularer Ebene auf. Geringe molekulare Unterschiede zwischen dem genetischen X- und Y-Chromosom konnten durch Männchen-spezifische Banden in Southern-Hybridisierungen genomischer DNA (Willhoeft & Traut 1990) und spezifische RAPD-Marker (random amplified polymorphic DNAs) gezeigt werden, die X und Y unterscheiden (Traut 1994). Traut und Wollert (1998) konnten ein kleines, etwa 1,8 kb (Kilobasen) großes Segment des X-Chromosoms und den homologen Abschnitt vom Y-Chromosom isolieren, deren Sequenzen zu 72 Prozent übereinstimmen und sich durch einige SNPs (single nucleotide polymorphisms) und Indels (Insertionen/Deletionen) unterscheiden. Dieser niedrige Grad an molekularer Differenzierung zwischen X und Y ist von jungen Geschlechtschromosomen zu erwarten. Crossover kommt in *M. scalaris*-Männchen vor, allerdings mit einer im Vergleich zu Weibchen stark reduzierten Rate im Bereich von 1/6–1/2000 der weiblichen Crossoverrate je nach untersuchter Chromosomenregion (Springer 1958; Burisch 1963).

In Wildstämmen von *M. scalaris* übernimmt das Chromosomenpaar 2 die Funktion der Geschlechtschromosomen. In Laborstämmen können allerdings auch Männchen mit dem genetischen Y auf Chromosom 1 oder 3 vorkommen (Mainx 1964, 1966). Mainx (1964, 1966) stellte daraufhin die Hypothese auf, dass diese Veränderungen von der Translokation eines Chromosomensegments herrühren, welches einen dominanten oder epistatischen Männchen-bestimmenden Faktor (*M*) enthält. Green

1. Einleitung

(1980) postulierte Transposition als Ursache für diesen Vorgang. Traut und Willhoeft (1990) konnten zeigen, dass in Laborstämmen von *M. scalaris* ein epistatischer Männchen-bestimmender Faktor mit einer Frequenz von mindestens 0,06 Prozent auf ein ursprüngliches Autosom springen und so ein neues Y-Chromosom kreieren kann.

Der Männchen-bestimmende Faktor als primäres Signal der Geschlechtsbestimmungskaskade von *M. scalaris* konnte bisher nicht isoliert werden und bleibt unbekannt (Traut 2010). Der nächste Schritt aus der geschlechtsbestimmenden Genkaskade von *Drosophila*, *Sxl*, ist in *Megaselia* konserviert, wird aber nicht geschlechtsspezifisch gespleißt. Diese Tatsache legt nahe, dass *Sxl* keine Rolle in der Geschlechtsbestimmung von *M. scalaris* spielt (Sievert et al. 1997, 2000). Ein *tra*-Homolog konnte in *Megaselia* bisher nicht isoliert werden (Traut 2010). Dagegen hat *dsx*, der letzte Schritt der Geschlechtsbestimmungskaskade von *Drosophila*, ein konserviertes Ortholog mit geschlechtsspezifischen Spleißprodukten in *M. scalaris*. Die Existenz einer konservierten TRA2/RBP1/TRA-Bindestelle im *dsx* von *Megaselia* legt nahe, dass auch *tra* Bestandteil der geschlechtsbestimmenden Genkaskade von *M. scalaris* ist (Sievert et al. 1997; Kuhn et al. 2000).

1.3.4. *Sciara*

Die Gattung *Sciara* gehört innerhalb der Diptera zur Unterordnung Nematocera (Mücken) und zur Familie Sciaridae (Trauermücken). In dieser Familie wird die Determination des Geschlechts durch die differentielle Eliminierung von Geschlechtschromosomen während der ersten Stadien der Embryonalentwicklung realisiert. Alle Zygoten weisen zu Beginn eine 3X:2A-Chromosomenkonstellation auf, wovon ein X-Chromosom mütterlicher und zwei X-Chromosomen väterlicher Herkunft sind. Die zwei paternalen X-Chromosomen entstehen durch asymmetrische Teilungen während der Spermatogenese. Bei der ersten meiotischen Teilung der Spermatozyte werden selektiv maternale und paternale Homologe getrennt, wovon nur die maternalen in die zweite meiotische Teilung eingehen, während die paternalen Homologen degenerieren. Die zweite Teilung läuft ebenfalls ungleich ab, da es hier nicht zur Trennung der zwei X-Schwesterchromatiden kommt. Aus diesem Grund bringt die Spermatozyte zwei X-Chromosomen in die Zygote ein im Gegensatz zum einzelnen X-Chromosom der Oozyte. Der Verlust von einem bzw. zwei dieser paternalen X-Chromosomen im Soma

legt fest, ob der Embryo sich zu einem Weibchen (2X:2A) oder zu einem Männchen (X:2A) entwickelt (Metz & Schmuck 1929; Metz 1938; Crouse 1960).

Innerhalb der Gattung *Sciara* kommen monogene Arten vor, bei welchen die Weibchen Nachkommen nur eines Geschlechts produzieren (thelygene und arrhenogene Weibchen). Außerdem existieren digene Arten, deren Nachkommen aus einer Mischung von Männchen und Weibchen mit hochvariablem Geschlechterverhältnis bestehen (Moses & Metz 1928; Metz & Schmuck 1929).

Bei der monogenen Art *Sciara coprophila* unterscheiden sich die thelygenen Weibchen durch den Besitz eines speziellen X'-Chromosoms von den arrhenogenen Weibchen. Die arrhenogenen Weibchen (XX) produzieren nur Männchen, wohingegen die thelygenen Weibchen (X'X) sowohl thelygene als auch arrhenogene Weibchen im Verhältnis 1:1 produzieren (Moses & Metz 1928; Metz & Schmuck 1929; Metz 1938). Das X'-Chromosom trägt eine Inversion, welche die Rekombination mit dem homologen X-Chromosom verhindert, wodurch der Faktor für die Produktion von Weibchen auf dem X' fixiert wird. Thelygene Weibchen produzieren zwei Klassen von Oozyten, die entweder das X'- oder das X-Chromosom tragen. Beide enthalten den maternalen Faktor für die X-Chromosom-Eliminierung, so dass beide Oozytentypen dazu bestimmt sind, ein paternales X-Chromosom zu eliminieren. X'-Oozyten führen zur Produktion von thelygenen Weibchen, X-Oozyten führen zur Produktion von arrhenogenen Weibchen in der nächsten Generation. Arrhenogene Weibchen produzieren eine einheitliche Klasse von X-Oozyten ohne maternalen Faktor, was zur Eliminierung von zwei paternalen X-Chromosomen und somit zur Produktion von Männchen führt (Sánchez 2008).

Bei der digenen Art *Sciara ocellaris* wird das Geschlecht der Nachkommen ebenfalls durch die Produktion von Oozyten mit oder ohne maternalen Faktor bestimmt. Die Nachkommen bestehen aus einer Mischung von Männchen und Weibchen, wobei das Geschlechterverhältnis stark variiert (Metz 1938). Diese Variation ist temperaturabhängig. In einem Temperaturbereich von 18-20°C bei der Embryonalentwicklung pendelt sich das Verhältnis bei ungefähr 1:1 ein, bei 24-29°C verschiebt es sich zugunsten der Produktion von mehr Weibchen. Diese Verschiebung wird durch eine Transformation von Männchen in Weibchen verursacht, da die Anzahl an Embryonen, die statt zwei nur ein X-Chromosom väterlicher Herkunft eliminieren, ansteigt (Nigro et al. 2007; Sánchez 2008).

1. Einleitung

Ausgehend von Beobachtungen zur X-Chromosom-Eliminierung unter anderem unter UV-Bestrahlung stellten Sánchez und Perondini (1999) ein theoretisches Modell für die Kontrolle der differentiellen X-Chromosom-Eliminierung bei *Sciara* auf.

- 1) Ein chromosomaler Faktor (CF), der in ähnlichen Konzentrationen in männlichen und weiblichen Embryonen gebildet wird, bindet an paternale X-Chromosomen und verursacht ihre Eliminierung.
- 2) Ein maternaler Faktor (MF) legt die Anzahl der zu eliminierenden paternalen X-Chromosomen fest. MF interagiert mit CF und inaktiviert ihn, so dass der CF-MF-Komplex nicht mit dem paternalen X-Chromosom interagieren kann. So ist die Anzahl der eliminierten X-Chromosomen abhängig von der Menge freien CF, die wiederum von den MF-Mengen abhängig ist.
- 3) In den maternalen Chromosomen findet ein Imprinting statt, welches sich in der Unfähigkeit des maternalen X-Chromosoms zur CF-Bindung äußert, wodurch es nicht eliminiert werden kann.

1.3.5. *Chironomus*

Chironomiden besitzen keine heteromorphen Geschlechtschromosomen, sondern im haploiden Chromosomensatz meistens vier homomorphe Chromosomen (Bauer 1936; Bauer & Beermann 1952). Durch die geschlechtsgebundene Vererbung von Inversionen konnte jedoch für *Chironomus tentans*, *Chironomus pallidivittatus* und *Chironomus annularius* eine genotypische Geschlechtsbestimmung mit männlicher Heterogamete nachgewiesen werden. Auf diese Weise konnten verschiedene Orte für den männchenbestimmenden Faktor *M* und damit für ein proto-Y-Chromosom (Vorläufer eines Y-Chromosoms) identifiziert werden, wobei *M* in allen untersuchten Fällen nahe dem Telomer lokalisiert ist. Sowohl in *C. annularius* als auch in einer schwedischen Population von *C. tentans* liegt die mit *M* gekoppelte männchenspezifische Inversion nahe des Telomers des Chromosomenarms F von Chromosom III (Beermann 1955). Die meisten *Chironomus*-Spezies besitzen allerdings keine geschlechtsgebundenen Inversionen. Für *C. australis* (Martin et al. 1980), *C. obtusidens* (Keyl 1961, 1962) und *C. riparius* (Hägele 1985) konnte jedoch eine mit *M* assoziierte heterochromatische Bande identifiziert werden, die hemizygot ist und nur in Männchen vorkommt. Martin (2010) hat die Lokalisierung von *M* in vielen *Chironomus*-Arten untersucht und von 24 Arten zusammengefasst und verglichen, wobei er sechs verschiedene Chromosomenarme als Orte für *M* identifizieren konnte.

Zur Lokalisierung von *M* in den Spezies *C. riparius* und *C. piger* (früher *C. thummi thummi* und *C. thummi piger*) führte Hägele (1985) Rückkreuzungen von FI-Hybrid-Männchen der Kreuzung *C. riparius* x *C. piger* mit jeweiligen Weibchen der beiden Elternarten durch. Nachkommen dieser Kreuzungen zeigen geschlechtsspezifische Unterschiede im Paarungsverhalten ihrer Polytänychromosomen in der Region D_3d-g auf dem Chromosomenarm F. Die Chromosomen von *C. riparius* und *C. piger* der Hybriden zeigen in dieser Region Asynapsis. Durch Analyse des Bandenmusters der Region D_3d-g mit Hilfe der RB- und Quinacrin-Bandentechnik (Hägele 1977) wurde gezeigt, dass *C. riparius* an Position D_3e_1 eine männchenspezifische, hemizygoten Bande besitzt. Diese Bande wurde in FI-Hybrid-Männchen nur im *C. riparius*-Chromosom gefunden und kommt niemals in Weibchen vor, weshalb sie eng gekoppelt mit dem dominanten männchenbestimmenden Faktor *M* sein muss. Damit markiert sie das proto-Y-Chromosom von *C. riparius* und zeigt, dass auch hier männliche Heterogamete als geschlechtsbestimmender Mechanismus vorliegt. Der heterochromatische Charakter dieser hemizygoten Bande konnte durch den spezifischen Nachweis mit der RB-Bandentechnik gezeigt werden. Der hohe AT-Gehalt der DNA dieser Bande wurde durch ihre spezifische Anfärbbarkeit mit Quinacrin nachgewiesen. In *C. piger* zeigen weder Männchen noch Weibchen diese spezifische Bande, obwohl gezeigt werden konnte, dass *M* in den beiden Spezies an homologen Loci liegt. Daher kann der Männchen-bestimmende Faktor in *C. piger* in der chromosomalen Region D_3d-g nicht genauer lokalisiert werden (Hägele 1985, 1986). Die Tatsache, dass das proto-Y-Chromosom in der Region um den männchenbestimmenden Faktor *M* von *C. riparius* heterochromatisch ist, legt die Vermutung nahe, dass die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede auf einer Akkumulation von nicht-kodierenden Sequenzen beruhen. In *C. piger* findet sich kein Heterochromatin in dieser Region. Das könnte bedeuten, dass die Akkumulation von heterochromatischen Sequenzen eine Konsequenz von Crossover-Suppression und nicht deren Auslöser ist. Diese Heterochromatinisierung aufgrund unterdrückter Rekombination in der geschlechtsbestimmenden Region von *C. riparius* muss in dem relativ kurzen Zeitraum der evolutionären Trennung von *C. riparius* und *C. piger* erfolgt sein. Daher bietet sich mit dem proto-Y-Chromosom von *C. riparius* die Möglichkeit, ein frühes Stadium in der Evolution von Geschlechtschromosomen zu untersuchen (Kraemer 1994).

Die Menge und Verteilung von heterochromatischen Regionen und repetitiver DNA unterscheidet sich in diesen beiden Schwesternarten grundsätzlich. Keyl (1965) konnte in zytologischen Untersuchungen zeigen, dass *C. riparius* mit einer Genomgröße von 3×10^{-13} g (diploid; entspricht $2,7 \times 10^8$ Bp) ca. 30 Prozent mehr DNA als *C.*

1. Einleitung

piger aufweist. Dadurch unterscheidet sich *C. riparius* von *C. piger* und allen anderen Arten der Gattung *Chironomus*, was zu der Schlussfolgerung führte, dass *C. riparius* die abgeleitete Art darstellt und die DNA-Vermehrung während der Evolution von *C. riparius* stattfand (Keyl 1962, 1965). Ein großer Teil der erhöhten DNA-Menge bei *C. riparius* besteht aus Cla-Elementen. Cla-Elemente sind tandem-repetitive DNA-Elemente mit einer Monomerlänge von 110–119 Bp und einem hohen AT-Gehalt (> 80 Prozent A+T), die nach einer charakteristischen *Cla* I-Restriktionsschnittstelle benannt wurden. Diese hoch repetitiven DNA-Elemente kommen im *C. riparius*-Genom mit 70.000 Kopien in den Centromeren und an über 200 euchromatischen Loci dispergiert auf den Chromosomen vor, wo sie in kleinen (vier Elemente) bis mittelgroßen (> 30 Elemente) tandem-repetitiven Clustern organisiert sind (Schmidt et al. 1980; Schaefer & Schmidt 1981; Schmidt 1981, 1984). Zusätzlich sind die Cla-Elemente bei *C. riparius* in die nichttranskribierten Spacer der rDNA eingedrungen (Schmidt et al. 1982; Israelewski & Schmidt 1982). Im Genom von *C. piger* sind die Cla-Elemente dagegen auf die Centromere der Chromosomen beschränkt (Schmidt 1981). Cla-Elemente haben unter bestimmten Umständen die Fähigkeit zur Transposition (Schmidt & Godwin 1983).

Der dominante männchenbestimmende Faktor auf Chromosom III von *C. riparius* ist eng gekoppelt mit einem deutlich nachweisbaren Cla-Element-Cluster, was durch *in situ*-Hybridisierungen von Cla-Elementen an Polytänchromosomen von *C. riparius* gezeigt werden konnte. Das immer hemizygote Hybridisierungssignal ist nur in Männchen vorhanden. In wenigen Fällen konnte eine weitere, schwächer mit Cla-Elementen hybridisierende Bande in der Chromosomenregion *D*_{3f} nachgewiesen werden. Mit Cla-Elementen als Hybridisierungssonde konnten zwei das hemizygote Cla-Element-Cluster zu beiden Seiten flankierende Klone aus einer genomischen DNA-Bibliothek von *C. riparius* identifiziert werden. Ausgehend von beiden Klonen, dem centromerwärts gelegenen proximalen Klon λ Cla1.8Z und dem telomerwärts gelegenen distalen Klon λ Cla1.1Y, konnte mit Hilfe von «chromosome walks» ein Teil der SDR kloniert werden (Kraemer & Schmidt 1993).

1.4. Evolution von Geschlechtschromosomen und geschlechtsbestimmenden Genkaskaden

Die Vorteile von geschlechtlicher Fortpflanzung im Gegensatz zu Parthenogenese bestehen darin, dass sie vorteilhafte Mutationen in einer Population verteilt und erhält, wohingegen schädliche Mutationen durch Tod oder Unfruchtbarkeit aus der Population entfernt werden (Ayling & Griffin 2002). Charlesworth (1991) postulierte, dass Diözie sich aus Monözie entwickelte und dieser Übergang der Auslöser für die Entwicklung von heteromorphen Geschlechtschromosomen war. Das am weitesten verbreitete Prinzip der Geschlechtsbestimmung, die männliche oder weibliche Heterogamete, ist häufig mit dem Auftreten differenzierter Geschlechtschromosomen verbunden. Nach Muller (1918) entwickelten sich die zwei verschiedenen Geschlechtschromosomen aus einem ursprünglich homologen Autosomenpaar. In einer Modellvorstellung, die sich auf männliche Heterogamete bezieht, entwickelt sich zuerst eine kleine geschlechtsbestimmende Region auf einem Autosomenpaar mit Allelen für männliche bzw. weibliche Sterilität, wodurch ein proto-X- und ein proto-Y-Chromosom entstehen. In dieser Region wird die Rekombination unterdrückt, um die männchen- bzw. weibchenbestimmende Funktion zu erhalten. Im Falle der männlichen Heterogamete wird im Männchen die Rekombination in der geschlechtsbestimmenden Region unterdrückt, wodurch es zur Akkumulation von Mutationen, repetitiver DNA und transposablen Elementen auf dem hemizygot vorliegenden proto-Y-Chromosom kommt. Unter der Voraussetzung, dass sie einen Selektionsvorteil bieten, können zu dem geschlechtsbestimmenden Gen auf dem proto-Y-Chromosom weitere Gene wie zum Beispiel Fertilitätsfaktoren hinzukommen. Auf diese Weise wird die Region, in der keine Rekombination stattfindet, größer. Diese Phänomene resultieren schließlich in der Degeneration und Heterochromatinisierung des proto-Y, was wiederum in vielen Fällen zu einer reduzierten Größe des endgültigen Y-Chromosoms führt (Clark & Wall 1996; Ayling & Griffin 2002). Dieser Mechanismus, durch welchen schädliche Mutationen ohne Möglichkeit zur Regeneration auf dem Y-Chromosom akkumulieren, wurde von Muller (1964) beschrieben, woraufhin Felsenstein (1974) den Begriff «Muller's Ratchet» prägte. Hinweise darauf, dass die Entwicklung tatsächlich in dieser oder ähnlicher Form stattfindet, finden sich in Geschlechtschromosomen oder geschlechtsbestimmenden Regionen von Chromosomen vieler verschiedener Spezies. Ohno (1967) entdeckte morphologisch unterschiedliche Gonosomen in verschiedenen verwandten Schlangenarten. Die Regionen, in welchen diese Chromosomen in der meiotischen Prophase paaren, unterscheiden sich in ihrer Größe. Daraufhin stellte Ohno

1. Einleitung

die Hypothese auf, dass diese Unterschiede Intermediate zwischen undifferenzierten und stark differenzierten Geschlechtschromosomen darstellen, was wiederum die Annahme stützt, dass Geschlechtschromosomen aus einem homologen Autosomenpaar entstehen (Ohno 1967). Ohnos Hypothese ist heute die akzeptierte Vorstellung für die Evolution von Geschlechtschromosomen.

Die Degeneration und das Fehlen der meisten Gene auf dem Y-Chromosom bei vielen Organismen (z. B. *D. melanogaster* oder *Homo sapiens*) machte eine Dosiskompensation notwendig. Diese stellt sicher, dass trotz der chromosomalen Imbalance die Zahl der Genprodukte von heterosomalen Genen im Männchen genauso hoch ist wie im Weibchen. In Säugetieren wird die Dosiskompensation durch die Inaktivierung des einen X-Chromosoms im Weibchen realisiert, wohingegen in *Drosophila* die Transkription des X-Chromosoms im Männchen erhöht wird (Bull 1983).

In Säugetieren gibt es nur zu wenigen X-gebundenen Genen Homologe auf dem Y-Chromosom, wogegen einige Y-gebundene Gene keine Homologie zu X-chromosomalen Genen zeigen und vermutlich von anderen Loci auf das Y-Chromosom transloziert wurden (Lahn et al. 2001). Ein klassisches Beispiel für einen solchen Vorgang ist das neo-Y-Chromosom von *Drosophila miranda*, welches durch die Translokation eines Autosoms auf das Y-Chromosom entstand (Dobzhansky 1935; MacKnight 1939). Bestimmte Gene, die ursprünglich auf dem homologen Autosom aktiv waren, wurden als Teil des neo-Y-Chromosoms inaktiv. Die Inaktivierung geht einher mit der Anreicherung an Retrotransposons und anderen transposablen Elementen. Das legt die Vermutung nahe, dass transposable Elemente eine treibende Kraft in der Evolution von Geschlechtschromosomen darstellen (Steinemann & Steinemann 1992, 1998). Demnach sind die charakteristischen Merkmale von heteromorphen Geschlechtschromosomen Dosiskompensation sowie die Anreicherung mit repetitiver DNA, die ausgelöst durch Crossover-Suppression zur Degeneration und Heterochromatinisierung des Y-Chromosoms führt.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Die geschlechtsbestimmenden Gene/das Gen der Chironomiden sind nach wie vor unbekannt. Die geschlechtsbestimmende chromosomale Region bei *C. riparius* ist dagegen bekannt, und der molekulare Zugang ist möglich. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte bereits ein großer Teil der SDR von *C. riparius* kloniert werden (Kraemer 1994; Kunz 2001; Knies 2006). In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe von BAC-Bibliotheken (BAC: Bacterial Artificial Chromosome) die SDR von *C. riparius* vollständig kloniert und sequenziert werden. Die resultierenden DNA-Sequenzen sollten bioinformatisch analysiert und nach repetitiven und transposablen Elementen und vor allem nach Genen durchsucht werden, die möglicherweise eine Rolle in der Geschlechtsdetermination von *C. riparius* spielen und so einen Hinweis auf *M* liefern können. Problematisch war die Zuordnung von Klonen bzw. DNA-Sequenzen zu dem jeweiligen proto-X- bzw. dem proto-Y-Chromosom. Zu diesem Zweck sollten die Sequenzen aller in der SDR lokalisierten BAC-Klone detailliert verglichen werden, um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede zu detektieren. Dabei sollten nicht nur Auffälligkeiten in kodierenden Bereichen analysiert werden, da auch regulatorische Sequenzen von Bedeutung für die Geschlechtsdetermination sein können. Vorrangig sollte versucht werden, alle Unterschiede von klonierten oder sequenzierten Abschnitten der Region daraufhin zu überprüfen, ob der jeweils gefundene Unterschied geschlechtsspezifisch ist und damit relevant für den Mechanismus der Geschlechtsbestimmung sein könnte. Dazu sollten gefundene Sequenzunterschiede durch verschiedene PCRs und Southern-Hybridisierungen von geschlechtsspezifischer genomischer DNA auf eine mögliche Herkunft vom proto-X- oder proto-Y-Chromosom überprüft werden. Weiterhin sollte eine mögliche Stammspezifität der detektierten Unterschiede untersucht werden, wofür drei verschiedene *C. riparius*-Stämme zur Verfügung standen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für alle Versuche wurden Larven der Spezies *C. riparius* verwendet. Diese stammten entweder aus der permanenten Laborzucht des Instituts oder aus Freilandgelegen, die 2008 bzw. 2009 in Zucht gebracht wurden. Die Larven wurden in belüfteten Schalen bei Raumtemperatur bis zum vierten Larvenstadium aufgezogen. Als Futter diente insektizidfreies Brennesselpulver und Zellstoff. Die Geschlechtsbestimmung der Larven erfolgte anhand der Imaginalscheiben in den letzten zwei Segmenten, die mikroskopisch untersucht und mit den Abbildungen in Wülker und Götz (1968) verglichen wurden.

2.2. Standardmethoden

Zur Aufreinigung von DNA bzw. zur Inaktivierung und Entfernung von Enzymen wurde eine Extraktion mit Phenol durchgeführt, das mit 50 mM Tris gesättigt und zusätzlich mit Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 gemischt war. Zur Entfernung von verbliebenem Phenol aus der wässrigen Phase wurde grundsätzlich ein Extraktionsschritt mit Chloroform angeschlossen. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Nucleo Spin® Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet.

DNA aus einer Lösung wurde mit 1/10 Vol. 10x Dialysepuffer und 2 Vol. Ethanol abs. mindestens 30 min bei -20°C gefällt und anschließend bei 4°C und 12000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

2. Material und Methoden

DNA-Fragmente im Bereich zwischen 100 Bp und 25 kb wurden in verschiedenen großen Agarosegelen aufgetrennt, deren Konzentration je nach gewünschtem Trennbereich 0,8–3 % betrug. Als Molekulargewichtsstandards dienten der Lambda DNA/HindIII Marker 2 (50 ng/ μ l), der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (50 ng/ μ l) und der Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (50 ng/ μ l) von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot). Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung (5 μ g Ethidiumbromid/ml in 1x E-Puffer) gefärbt, unter UV-Licht betrachtet und mit dem «Electrophoresis documentation and analysis system 120» der Firma Kodak (Stuttgart) dokumentiert.

Die Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach der Methode von McDonell et al. (1977) durch Elektroelution oder mit dem Nucleo Spin® Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach den Angaben des Herstellers.

2.3. DNA-Präparation

2.3.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Allen angewendeten Plasmid-Präparationen liegt die Methode der alkalischen Lyse zugrunde (Birnboim & Doly 1979). Die pBeloBAC11-DNA wurde nach dem «Whitehead-Protokoll» isoliert. Plasmid-DNA von BAC-Klonen wurde mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Maxiprep System der Firma Promega (Fitchburg, WI, USA) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus Shotgun-Subklonen wurden Plasmid-Präparationen im 96er-Format durchgeführt. Nach der Klonierung von PCR-Produkten in den Plasmidvektor pGEM®T Easy (Promega, Fitchburg, WI, USA) wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des peqGold Plasmid Miniprep Kit I der Firma Peqlab (Erlangen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.2. Plasmid-Präparation nach dem Whitehead-Protokoll (Whitehead Institute/MIT)

500 ml einer Bakterienkultur (12–18 h bei 37°C; LB-Medium mit 15 μ g/ μ l Chloramphenicol) wurden durch Zentrifugieren (5400 UpM, 4°C, 15 min) pelletiert, in 20 ml

Lösung I resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 20 ml Lösung II zugegeben, einige Male vorsichtig invertiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Neutralisiert wurde das Gemisch durch Zugabe von 15 ml Lösung III. Nachdem einige Male invertiert wurde, folgten 10 min Inkubation auf Eis. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (13000 UpM, 4°C, 20 min) vom Überstand getrennt und verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt bis ein klarer Überstand vorlag. Die im Überstand gelöste Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol gefällt und anschließend durch Zentrifugation (5000 UpM, RT, 20 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 6 ml TE-Puffer resuspendiert und mit 3 ml 7,5 M Kaliumacetat versetzt. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei -80°C zum Ausfällen von SDS, welches anschließend durch Zentrifugation von der Lösung getrennt wurde. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von zwei Volumen Ethanol abs. und 20 min Inkubation bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation (5000 UpM, 4°C, 15 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, anschließend wurde das Pellet in 700 µl 50T/50E-Puffer resuspendiert. Es wurde 1 µl RNase-Lösung (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I der Firma Peqlab, Erlangen) zugesetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden drei Extraktionen mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1; v/v/v) und eine Extraktion mit einem Volumen Chloroform durchgeführt. Die in der wässrigen Phase gelöste Plasmid-DNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde getrocknet und in HPLC-Wasser gelöst.

2.3.3. Plasmid-Präparation im 96er-Format

Vor der Präparation wurde die Sephadex™ G-50 Fine MTP vorbereitet. Dazu wurde jede Position einer 96er Multiscreen™ HV-Filterplatte der Firma Millipore (Billerica, MA, USA) mit etwa 30 mg Sephadex™ G-50 Fine der Firma Amersham (UK; gehört heute zu General Electric Healthcare) gefüllt, welches anschließend mit 300 µl HPLC-Wasser zur Quellung gebracht wurde. Nach mindestens 4 h bei 4°C wurde das Wasser durch Zentrifugation (2750 UpM, 4°C, 3 min) aus der Mikrotiterplatte entfernt. Die Sephadex™ G-50 Fine MTP wurde noch zweimal mit je 150 µl HPLC-Wasser gespült und zur späteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (5000 UpM, 4°C, 15 min) pelletiert und vom Überstand getrennt. Die Bakterienpellets wurden 20 min bei -80°C gefroren, kurz

2. Material und Methoden

aufgetaut und wieder gefroren. Daraufhin wurden die Pellets durch Vortexen in 335 μl Lösung I.1 resuspendiert und 2 min auf Eis inkubiert. Zur Lyse der Zellen und zur Alkalidenaturierung wurden 665 μl Lösung II.1 zugegeben, einige Male vorsichtig invertiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Neutralisation wurden schließlich 500 μl kalte Lösung III zugesetzt und wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (5000 UpM, 4°C, 15 min) pelletiert. Vom Überstand wurde jeweils 1 ml (möglichst ohne Präzipitat) in eine neue 96er Kulturplatte überführt und mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation (5000 UpM, 4°C, 45 min) pelletiert, getrocknet und in 70 μl HPLC-Wasser gelöst. Die gelöste Plasmid-DNA wurde vollständig auf die vorbereitete SephadexTM MTP gegeben. Durch Zentrifugation (2750 UpM, 4°C, 5 min) wurde die Plasmid-Lösung aus der Sephadex-Matrix eluiert.

2.3.4. Isolierung genomischer DNA aus *Chironomus*-Larven

Die DNA-Isolierung wurde modifiziert nach Schmidt et al. (1980) durchgeführt. 1 g Larven wurden in 2 ml Homogenisierungspuffer mit 1/10 Vol. 10%igem Triton-X-100 in einem Glashomogenisator unter Eiskühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Gaze filtriert und das Filtrat bei 4°C und 5000 UpM zentrifugiert. Für die Isolierung von DNA aus einzelnen Larven wurden 50 μl Homogenisierungspuffer verwendet ohne anschließende Filtration. Das Kernpellet wurde jeweils dreimal mit Homogenisierungspuffer gewaschen und anschließend mit 1/10 Vol. 10x Dialysepuffer und 10% SDS und einer Spatelspitze Proteinase K 45 min bei 60°C inkubiert. Darauf folgten mehrere Extraktionen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bzw. Chloroform. Danach wurde die DNA von gepoolten Larven durch Überschichten mit 2 Vol. Ethanol abs. gefällt und auf einen Glasstab aufgewickelt. Die aufgewickelte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und in HPLC-Wasser abgewickelt und gelöst. Die DNA von Einzellarven wurde standardgemäß mit Ethanol gefällt und ebenfalls in HPLC-Wasser gelöst.

2.4. CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Für die CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wurde die aufzureinigende Plasmid-DNA (ca. 30-50 μg) in 1x TE-Puffer gelöst. Die DNA-Lösung wurde mit in 1x TE-Puffer gelöstem CsCl (1 g/ml) auf ein Volumen von 1,6 ml (Mindestvolumen für die Zentrifugenröhrchen) aufgefüllt. Diese Lösung wurde mit 64 μl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml) überschichtet und durch schnelles Invertieren gemischt. Mittels eines Refraktometers erfolgte die Einstellung des Brechungsindexes auf 1,391–1,395 (20°C) unter Zugabe von gesättigter CsCl-Lösung. Die DNA-Lösung wurde 24 h bei 20°C und 40000 Upm zentrifugiert (Sorvall® Discovery M120 SE, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Anschließend wurde die Bande der supercoiled DNA unter UV-Licht mit Hilfe einer Pipette abgezogen. Die Entfernung des Ethidiumbromids erfolgte durch Extraktion mit Isoamylalkohol und des CsCl durch Dialyse gegen 1x Dialysepuffer mit anschließender Ethanol-Fällung und Lösen in HPLC-Wasser.

2.5. PCR

Die Amplifikationsreaktionen erfolgten entweder auf einem Primus96-Gerät der Firma Peqlab (Erlangen) oder einem DNA Engine-Gerät der Firma Biorad (München). Die PCR (Saiki et al. 1988) wurde mit 10 ng genomischer DNA, je 0,4 pM Primer, 0,2 mM dNTPs und 1 U Taq-Polymerase (KlearTaq Hot Start DNA polymerase) der Firma KBioscience (England) in 1x KlearTaq-Puffer B in einem Reaktionsvolumen von 50 μl durchgeführt. Die PCR-Bedingungen entsprachen im Standardfall der Tabelle 2.1.

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1. Hot-Start-Denaturierung	94°C	15 min	1
2. Annealing	50–53°C	30 sec	
3. Elongation	72°C	90 sec	
4. Denaturierung	94°C	30 sec	35
5. Finale Elongation	72°C	6 min	1

Tabelle 2.1.: Standard-PCR-Bedingungen

2. Material und Methoden

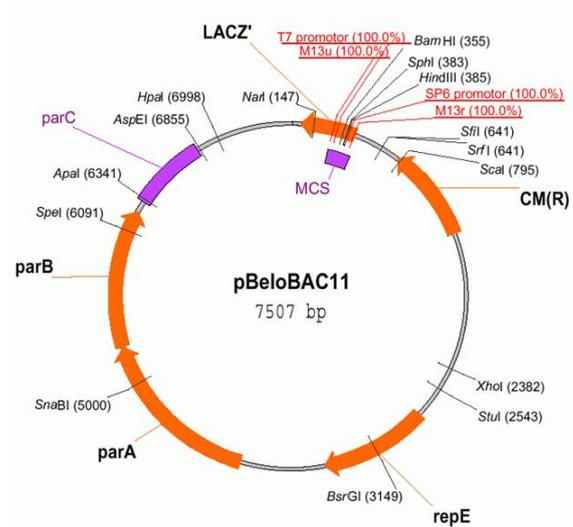


Abbildung 2.1.: Der Plasmidvektor pBeloBAC11 (Kim et al. 1996) erlaubt die Klonierung sehr großer DNA-Fragmente (>300 kb).

2.6. Klonierung in Plasmid-Vektoren

2.6.1. Verwendeter Bakterienstamm

Der verwendete *E. coli*-Stamm DH10B wurde erstmals von Grant et al. (1990) erstellt und besitzt folgenden Genotyp:

F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ -rpsL nupG

2.6.2. Verwendete Vektoren

Zur Konstruktion der BAC-Bibliotheken wurde der in Abbildung 2.1 gezeigte Plasmidvektor pBeloBAC11 (Mori et al. 1986; Shizuya et al. 1992; Kim et al. 1996) eingesetzt. Für die Subklonierung der BAC-Klone in Shotgun-Bibliotheken wurde der Plasmidvektor pUC18/19 (Yanisch-Perron et al. 1985) verwendet. Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde wegen der T-Überhänge der Plasmidvektor pGEM®T Easy der Firma Promega (Fitchburg, WI, USA) verwendet.

2.6.3. Konstruktion von BAC-Bibliotheken aus *C. riparius*

Vorbereitung der Integrat-DNA

Aus jeweils 2–3 g Larven des 4. Larvenstadiums erfolgte die Chromatingewinnung mit Hilfe von Ultrazentrifugation modifiziert nach Marshall und Burgoyne (1976). Dazu wurden die Larven unter Eiskühlung in Homogenisierungspuffer mit 1/10 Vol. 10% Triton-X-100 in einem Glashomogenisator homogenisiert und durch Gaze filtriert. 1 Vol. kalte Underlay-Lsg. 1 wurde mit dem Filtrat überschichtet und 20 min bei 4°C und 12000 UpM zentrifugiert. Das Kernpellet wurde in 5 ml kalter Underlay-Lsg. 2 homogenisiert. In den Ultrazentrifugenröhrchen wurden 650 μ l Underlay-Lsg. 2 mit 1300 μ l Homogenat überschichtet und 90 min bei 4°C und 35000 UpM zentrifugiert (Sorvall® Discovery M120 SE, Thermo Scientific, USA). Anschließend wurde das Kernpellet vorsichtig vom Überstand befreit und in warmem (37°C) L-Puffer homogenisiert. Die Kernlösung wurde zur Isolierung der hochmolekularen genomischen DNA mit SDS und Proteinase K 10 min bei 60°C und anschließend 60 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Dialyse gegen Wasser wurde die DNA in 1 ml-Ansätzen mit 1 U *Sau3AI* und dem dazugehörigen Restriktionspuffer (Roche, Mannheim) 1 Min. bei 37°C restringiert, um eine unvollständige Restriktion zu gewährleisten. Die restringierte DNA wurde gefällt und in einem 0,8 %igen Agarosegel in 1x E-Puffer bei 20 mA über 1,5 Tage aufgetrennt. Der Bereich ab 20 kb aufwärts wurde «blind» aus dem Gel ausgeschnitten, indem nur die Markerabschnitte mit Ethidiumbromid gefärbt wurden. Die ausgeschnittene DNA wurde durch Elektroelution in 0,5x TBE (100 mA, 2 h) aus dem Gel wiedergewonnen. Darauf folgte eine zweite Größenselektion wie oben beschrieben. Nach der zweiten Wiedergewinnung wurde die DNA gefällt und in HPLC-Wasser gelöst.

Vorbereitung des Vektors pBeloBAC11

Die pBeloBAC11-DNA wurde ausgehend von einer Einzelkolonie nach dem Whitehead-Protokoll (siehe 2.3.1.1) isoliert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Die Plasmid-DNA wurde mit *Bam*HI (Roche, Mannheim) restringiert und anschließend mit Antarctic Phosphatase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) dephosphoryliert. Die Vollständigkeit von Restriktion und Dephosphorylierung wurde durch Religationstests überprüft.

Ligation

Für die Ligation wurden ca. 20 ng pBeloBAC11-DNA und ca. 2–3 μg unvollständig *Sau3AI*-restringierte genomische *C. riparius*-DNA mit einer Größe von etwa 20–50 kb eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem Volumen von 10 μl mit 1 U T4 DNA-Ligase (Roche, Mannheim) ü. N. bei Raumtemperatur. Zur Entfernung von Salzen wurden die Ligationsprodukte vor der Transformation gefällt und in 10 μl HPLC-Wasser gelöst.

2.6.4. Konstruktion von Shotgun-Bibliotheken

Die Plasmid-DNA wurde durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und anschließend mit Hilfe eines Nebulizers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bei einem Druck von 1 bar 25 Sekunden lang mechanisch geschert. Die DNA wurde durch Auftrennung auf einem Agarosegel größenfraktioniert. Vor der Ligation wurden die unterschiedlichen Enden der drei DNA-Fractionen (1,5–2,5 kb, 2,5–5 kb, größer als 5 kb) mit dem Klenow-Fragment (Fermentas, St. Leon-Rot) der DNA-Polymerase I aus *E. coli* aufgefüllt (Sambrook et al. 2001). Der Vektor pUC19 erhielt durch Restriktion mit *SmaI* (Roche, Mannheim) glatte Enden und wurde mit der fraktionierten DNA ligiert.

2.7. Transformation von *E. coli*

E. coli-Zellen des Stamms DH10B wurden im Stadium des optimalen Wachstums (OD_{600} 0,71–0,72) durch mehrere Waschschrte mit eiskaltem HPLC-Wasser bzw. 10% Glyzerin auf die Elektroporation vorbereitet. Die Zellen wurden in 10% Glyzerin in Portionen von 40 μl bei -80°C gelagert. 40 μl der elektrokompenten Zellen wurden mit jeweils 1 μl Ligationsansatz gemischt und in Küvetten mit einer Spaltweite von 1 mm (Biozym, Hess. Oldendorf) bei einer Pulsstärke von 1800 Volt mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes (MicroPulserTM) der Firma Biorad (München) transformiert. Anschließend wurde sofort 1 ml 37°C warmes LB-Medium zugegeben und die Zellen eine Stunde bei 37°C auf einem Schütteltisch bei 200–400 UpM inkubiert. Daraufhin

wurde der Transformationsansatz auf Agarplatten ausplattiert, die Chloramphenicol bzw. Ampicillin, X-Gal und IPTG enthielten, und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.8. DNA-Markierung

Die Markierung von DNA wurde radioaktiv mit dem «Random Primed Oligo Labeling Kit» oder nichtradioaktiv mit dem «DIG DNA Labeling Kit» (Roche, Mannheim) nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) bzw. nichtradioaktiv mit dem «BioNickTM Labeling System» (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) nach der Methode von MacGregor und Mizuno (1976) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Für radioaktive genomische Southern-Analysen wurden 0,5–1 µg Sonden-DNA und 30–50 µCi $\alpha^{32}\text{P}$ dATP, für Koloniefilter-Hybridisierungen 0,5–1 µg Sonden-DNA und 50–70 µCi $\alpha^{32}\text{P}$ dATP eingesetzt. Für Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen wurde ca. 1 µg Plasmid-DNA bzw. synthetische Cla-Elemente mit dem «BioNickTM Labeling System» (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bzw. dem «DIG DNA Labeling Kit» (Roche, Mannheim) markiert.

2.9. Hybridisierungstechniken

2.9.1. Koloniefilter-Hybridisierung

Um selektiv BAC-Klone mit einer radioaktiv markierten Sonde aus einer DNA-Bibliothek herauszusuchen, wurde eine Koloniefilter-Hybridisierung nach Grunstein und Hogness (1975) durchgeführt. Dazu wurde ein «Abklatsch» der Bakterienkolonien einer BAC-Bibliothek auf runde Nitrozellulose-Filter erzeugt, indem ein Filter auf eine Agarplatte gelegt wurde, dort zusammen mit der Agarplatte asymmetrisch markiert wurde und anschließend vorsichtig wieder abgezogen wurde. Zur Verifizierung positiver Klone aus einer BAC-Bibliothek wurden die entsprechenden Bakterienkolonien auf zwei gerasterte Nitrozellulosefilter, die auf chloramphenicolhaltigen Agarplatten lagen, in identischer Weise überimpft und diese bei 37°C über Nacht bebrütet. Ein Filter wurde anschließend auf die Koloniefilter-Hybridisierung vorbereitet. Der Filter wurde zur Denaturierung der bakteriellen DNA 7 min auf mit 0,5

2. Material und Methoden

M NaOH getränktem Filterpapier inkubiert, getrocknet und 5 min auf mit 1,5 M Tris/HCl pH 7,4 getränktem Filterpapier neutralisiert. Anschließend wurde der Filter in 0,5 M Tris/1,5 M NaCl pH 7,4 inkubiert und erneut getrocknet. Zur Entfernung bakterieller Proteine folgte eine 20-minütige Inkubation in Proteinase K-Lösung (1 mg/ml in 1x SSC), die durch kurzes Eintauchen des Filters in Ethanol abs. beendet wurde. Der getrocknete Filter wurde 5 min in 0,3 M NaCl inkubiert und zur Entfernung von Bakterienresten anschließend kurz zwischen Filterpapier gepresst. Durch eine zweistündige Inkubation bei 80°C wurde die DNA auf dem Filter fixiert. Anschließend wurde der Filter 2–4 h in 2x PM in 6x SSC (Denhardt 1966) mit 1% SDS präinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Hybridisierung mit einer zusammen mit 50 µg heterologer *E. coli*-DNA in 1x PM in 3x SSC mit 0,5% SDS gelösten radioaktiv markierten Sonde erfolgte über Nacht bei 60°C in einer Petrischale. Ungebundene Sondenmoleküle wurden durch zwei- bis dreimaliges Waschen der Filter (ca. 30 min.) in 2x SSC bei 60°C entfernt. Die getrockneten Filter wurden zur Detektion der Signale mit einem Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm, Tokyo, Japan) und einer Verstärkerfolie bei -80°C 5–24 h exponiert.

2.9.2. Southern-Hybridisierung

Der Transfer von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen auf Nitrozellulosefilter erfolgte nach der Methode von Southern (1975) in der Anordnung von Sambrook et al. (2001, S. 6.39–6.49) entweder unidirektional oder bidirektional. Nach Transfer und Fixierung der DNA für 2 h bei 80°C folgte eine zwei- bis vierstündige Präinkubation in 2x PM in 6x SSC (Denhardt 1966) mit 1% SDS. Anschließend wurde die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde in 1x PM in 3x SSC mit 0,5% SDS in Hybridisierungsröhren bei 60°C über Nacht durchgeführt. Durch mehrmaliges Waschen der Nitrozellulosefilter bei 60°C in 2x SSC über 30–60 min wurden ungebundene Sondenmoleküle abgewaschen. Zur Detektion der Signale wurden die getrockneten Filter mit einem Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm, Tokyo, Japan) und einer Verstärkerfolie bei -80°C 5 h bis 14 Tage exponiert.

2.9.3. *in situ*-Hybridisierung

Die mikroskopische Lokalisierung Digoxygenin- und Biotin-markierter DNA-Fragmente auf Polytänchromosomen erfolgte durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH; Langer-Safer et al. 1982) mit anschließender Detektion mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Anti-DIG- bzw. Anti-Biotin-Antikörper der Firma Roche (Mannheim). Die Präparation und Behandlung der Polytänchromosomen, die Hybridisierung und Detektion wurde nach der Anweisung von Schmidt (1992) durchgeführt, wobei die Denaturierung der chromosomalen DNA in 0,05 M NaOH erfolgte. Zur Auswertung und Dokumentation diente ein «Olympus BX61»-Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus (Hamburg). Die Dokumentation erfolgte mit der Software «Cell_F» und einer «Color View III»-Kamera der Firma Soft Imaging System GmbH (Münster).

2.10. DNA-Sequenzierung

Die durchgeführten automatischen Sequenzierungen beruhen auf dem Prinzip der Kettenabbruchsynthese (Sanger et al. 1977; Prober et al. 1987; Carothers et al. 1989; Lee et al. 1992) und wurden von der Firma Genterprise Genomics (Mainz) durchgeführt. Für die Sequenzierung besonders GC-reicher Sequenzen wurde den Sequenzierungsansätzen 1/10 Vol. 100 mM Tris pH 8 und 1/5 Vol. 5 M Betain (Henke et al. 1997) zugesetzt mit anschließender fünf- bis zehnminütiger Denaturierung bei 98°C vor Zugabe von Big Dye® 3.1 und dem dazugehörigen Puffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), um einen vorzeitigen Abbruch der Sequenzierung zu verhindern. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm «FinchTV v1.4.0» der Firma Geospiza Inc. (Seattle, WA, USA), den Programmen des Software-Pakets Lasergene der Firma DNASTAR Inc. (Madison, WI, USA), BLAST (Altschul et al. 1990) und dem internetbasierten Programm GENSCAN (Burge und Karlin 1997).

2.11. **Materialien**

Agarplatten: 14 g Agar-Agar in 1000 ml LB-Medium. Hinzugefügt wurde nach Bedarf: Ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oder Chloramphenicol 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und X-Gal 0,25 M, IPTG 0,2 M

Dialyseschläuche der Firma Medicell (London, UK; Durchschnitts-Porenradius: 28 Å; Durchmesser 15,9 mm) wurden in ca. 30 cm lange Streifen geschnitten und mit Siedesteinen in einem Becherglas in 0,5 M Natriumcarbonatlösung zweimal 10 min aufgekocht, zwischendurch mit A. bidest gespült und in 10 mM EDTA bei 4°C aufbewahrt.

Eine Auflistung der Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen sowie der Bezugsquellen befindet sich im Anhang.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung der SDR

Für die Charakterisierung der SDR von *C. riparius* konnte ein Bereich von 200012 Bp (Basenpaaren) kloniert werden. Dazu wurde ausgehend von den bereits vorliegenden Lambda-Klonen, λ Cl1.8Z und λ Cl1.1Y, ein «chromosome walk» durchgeführt, wobei mehrere BAC-Bibliotheken mit «single copy»-Sonden aus der SDR mittels Koloniefilterhybridisierung durchsucht wurden. Positive Klone wurden durch Randsequenzierung und anschließenden Sequenzvergleich mit vorhandenen Sequenzen der SDR analysiert. Außerdem wurden alle erhaltenen BAC-Klone durch *in situ*-Hybridisierungen an Polytänchromosomen von *C. riparius* lokalisiert. Ausgewählte BAC-Klone wurden mit Hilfe eines «random sequencings» vollständig sequenziert. Die einzelnen BAC-Klon-Sequenzen wurden zu einem Gesamtcontig der SDR assembliert. Die so erhaltene 200012 Bp lange Sequenz wurde bioinformatisch analysiert und auf Genstrukturen und repetitive Elemente hin untersucht.

3.1.1. Screening von BAC-Bibliotheken

Zu Beginn dieser Arbeit lagen schon einige BAC-Klone aus der SDR vor, die größtenteils aus den BAC-Bibliotheken L92 und L99 resultierten (Funke 2006; Knies 2006). Auf einige dieser Klone (L99J4/1-1, L99E1-1, L99E2/2-5, L99B3/2-7, L92G2-2Y, L92F2.2Y) und die Sequenzen der Klone L99J4/1-1, L99E1-1 und L99E2/2-5 (Knies 2006) konnte bei der Erstellung des Contigs der SDR zurückgegriffen werden. Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Übersicht über die Situation zu Beginn des Projekts. Zu den vorliegenden BAC-Klonen lag größtenteils keine Information über ihre Lage und Orientierung in der SDR vor, da zu diesem Zeitpunkt nicht genügend Vergleichs-

3. Ergebnisse

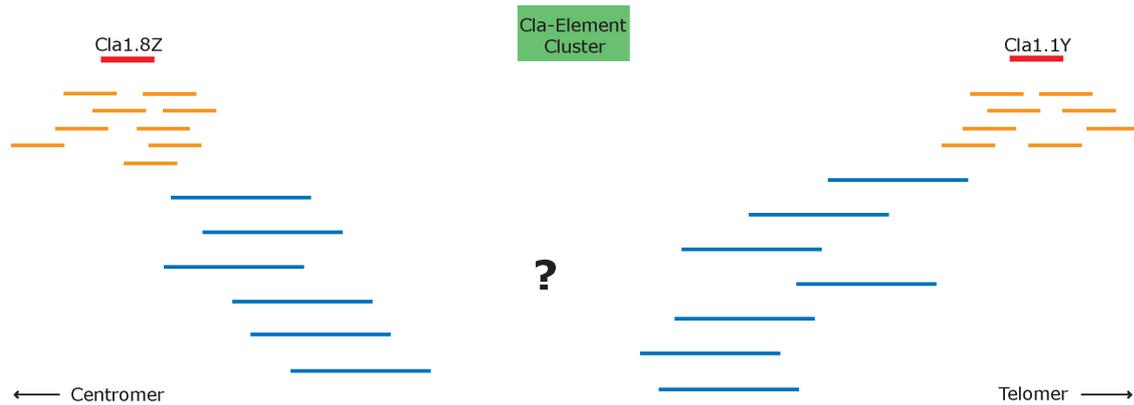


Abbildung 3.1.: Situation zu Beginn des Projekts. In Rot sind die beiden Ausgangspunkte des «chromosome walks» dargestellt und in Orange Lambda-Klone, welche zu Beginn dieses Projekts isoliert worden waren. Aufgrund der geringen Größe von Lambda-Klonen (≤ 10 kb) und teilweise großen Inverted Repeat-Strukturen in der SDR bewegte sich der «chromosome walk» zunächst nur sehr langsam und teilweise auch in die falsche Richtung. Erst die Umstellung auf BAC-Bibliotheken, die Klone mit Integratgrößen von 20-45 kb bereitstellen, brachte den Durchbruch. Die Lage der BAC-Klone (hier in Blau dargestellt) konnte allerdings größtenteils aufgrund fehlender Vergleichssequenzen nicht exakt bestimmt werden.

sequenzen existierten. Zudem war unklar, in welche Richtung sich der begonnene «chromosome walk» bewegte. Aus diesem Grund wurden zunächst bereits vorliegende BAC-Klone vollständig sequenziert (L99B3/2-7, L92G2-2Y; Berwanger 2007) und die zusätzliche Sequenzinformation zur Sondengenerierung genutzt. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht über die durchsuchten BAC-Bibliotheken, die verwendeten «single copy»-Sonden und die jeweils daraus resultierenden neuen BAC-Klone. Die Lage der verwendeten Sonden im Contig der SDR und die gegebenenfalls verwendeten Primer finden sich im Anhang. Im Folgenden konnte aus einem pUC18-Subklon des BAC-Klons L99B3/2-7 eine «single copy»-Sonde hergestellt werden. Der mit dieser Sonde gefundene BAC-Klon L116I1/1-1Y wurde vollständig sequenziert (Berwanger 2007) und zur weiteren Sondengenerierung verwendet. Mit einem PCR-Produkt aus diesem Klon als Sonde wurde die *C. piger*-BAC-Bibliothek L127 durchsucht. Durch den Vergleich der Randsequenzen dieser BAC-Klone und der Sequenzen von L99B3/2-7 und L116I1/1-1 konnte die Position der BAC-Klone in der SDR festgelegt werden. Dieses Ergebnis wurde durch die Bestimmung der Lage dieser BAC-Klone auf Chromosom III relativ zum männchenspezifischen Cla-Element-Cluster mittels *in situ*-Hybridisierungen (Herold 2008) bestätigt. Mit Hilfe der Sequenzierung des BAC-Klons L114B1-3 konnte eine noch bestehende Sequenzlücke geschlossen werden. Um den gesamten Bereich zwischen den Ausgangspunkten des «chromosome walks»,

Sonden	BAC-Bibliothek				
	L114 + L115	L116 + L120	L127	L158 + L159	L168
L99E2/2-5	L114A2-3 L114B1-3	L116C2/1-6 L116G1-6 L116I1-1			
L99B3/2-7		L116I1/1-1			
piYD5Z		L116E2/2-26 L120C2/1-7			
L116I1/1-1			L127B1-2		
Sonden-Mix				L158D4/3-3 L158E1/2-5	L168D2-8
Luc7p					L168A3-1 L168C3/1-1

Tabelle 3.1.: Screening von BAC-Bibliotheken. Aufgelistet sind die durchsuchten BAC-Bibliotheken, die verwendeten «single copy»-Sonden und die jeweils daraus resultierenden BAC-Klone aus der SDR.

λ Cla1.8Z und λ Cla1.1Y, mit Sequenzen abzudecken, wurde ein PCR-Produkt aus dem vorhandenen λ -Klon piYD5Z aus *C. piger* als Screening-Sonde verwendet und der daraus resultierende BAC-Klon L120C2/1-7 vollständig sequenziert. Darüber hinaus wurde der telomerwärts gelegene vorhandene BAC-Klon L92F2.2Y vollständig sequenziert. Die assemblierten BAC-Klon-Sequenzen ergaben einen Contig von ca. 180000 Bp Länge. Zusammen mit Sequenzen des *CtY*-Gens und eines Primerwalks (Krämer, persönliche Mitteilung) ergab sich ein Contig von insgesamt 200012 Bp Länge, der bioinformatisch analysiert werden konnte. Die Anordnung aller BAC-Klone in der SDR ist in Abbildung 3.2 gezeigt.

3.1.2. Lokalisierung der Klone

Durch Randsequenzierung mithilfe von T7- und Sp6-Primern und Alignment dieser Randsequenzen mit vorhandenen Sequenzen konnten die aus dem Screening der BAC-Bibliotheken hervorgehenden positiven BAC-Klone in der SDR lokalisiert werden. Daraus ist ersichtlich, dass die zu Beginn dieses Projekts vorhandenen BAC-Klone durch eine Lücke von etwa 20 kb getrennt waren. Durch Zuhilfenahme der neuen Klone und die Sequenzierung einiger weiterer BAC-Klone konnte die SDR lückenlos kloniert und sequenziert werden. Cytologisch wurden die BAC-Klone mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) auf Polytänchromosomen von *C. riparius* lokalisiert. Dazu wurden die BAC-Klone jeweils zusammen mit Cla-Elementen

3. Ergebnisse

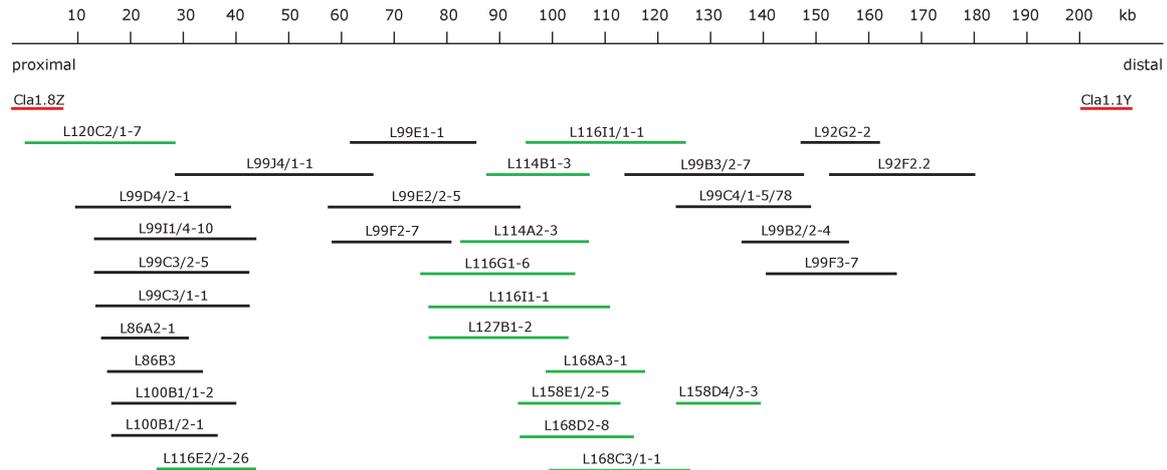


Abbildung 3.2.: BAC-Klone in der SDR. In Schwarz sind vorliegende BAC-Klone aus der Region gezeigt, in Grün diejenigen, die im Rahmen dieses Projekts beim Durchsuchen von BAC-Bibliotheken gefunden wurden (siehe Tabelle 3.1). In Rot sind die beiden Ausgangsklone des «chromosome walks» dargestellt.

hybridisiert, wobei die BAC-Klone grundsätzlich mit Biotin markiert und mit Avidin-Rhodamin (Roche, Mannheim) detektiert, die Cla-Elemente hingegen mit Digoxigenin markiert und mit Anti-Digoxigenin-Fluorescein (Roche, Mannheim) nachgewiesen wurden. Die Abbildungen 3.3 und 3.4 zeigen die *in situ*-Hybridisierungen der BAC-Klone neben den repetitiven Signalen der Cla-Elemente. Der Klon L116C2/1-6 (siehe Tabelle 3.1) ist in Abbildung 3.2 nicht gezeigt, da er sich nach detaillierten molekularen Analysen als *in vitro*-Ligat herausstellte (Herold 2008), was durch die *in situ*-Hybridisierung bestätigt wird (siehe Abbildung 3.3C). Daher wurde dieser Klon trotz der enthaltenen SDR-Anteile aus den weiteren Analysen der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen. Die verbleibenden dreizehn BAC-Klone konnten mit einer «single copy»-Bande in der SDR auf Chromosom III lokalisiert werden.

3.1.3. Sequenz-Analyse

Für die weitere Analyse wurden ausgewählte BAC-Klone in Shotgun-Bibliotheken subkloniert und jeweils eine ausreichende Anzahl von Subklonen zunächst von einer Seite ansequenziert (in der Regel mit M13 forward Primer). Hierfür wurden Subklone mit Integratgrößen von ca. 2,5–5 kb verwendet. Bei der anschließenden Assemblierung der Sequenzen wurden geeignete Subklone ausgewählt, die zusätzlich von der anderen Seite ansequenziert wurden (M13 reverse Primer). Für die vollständige Se-

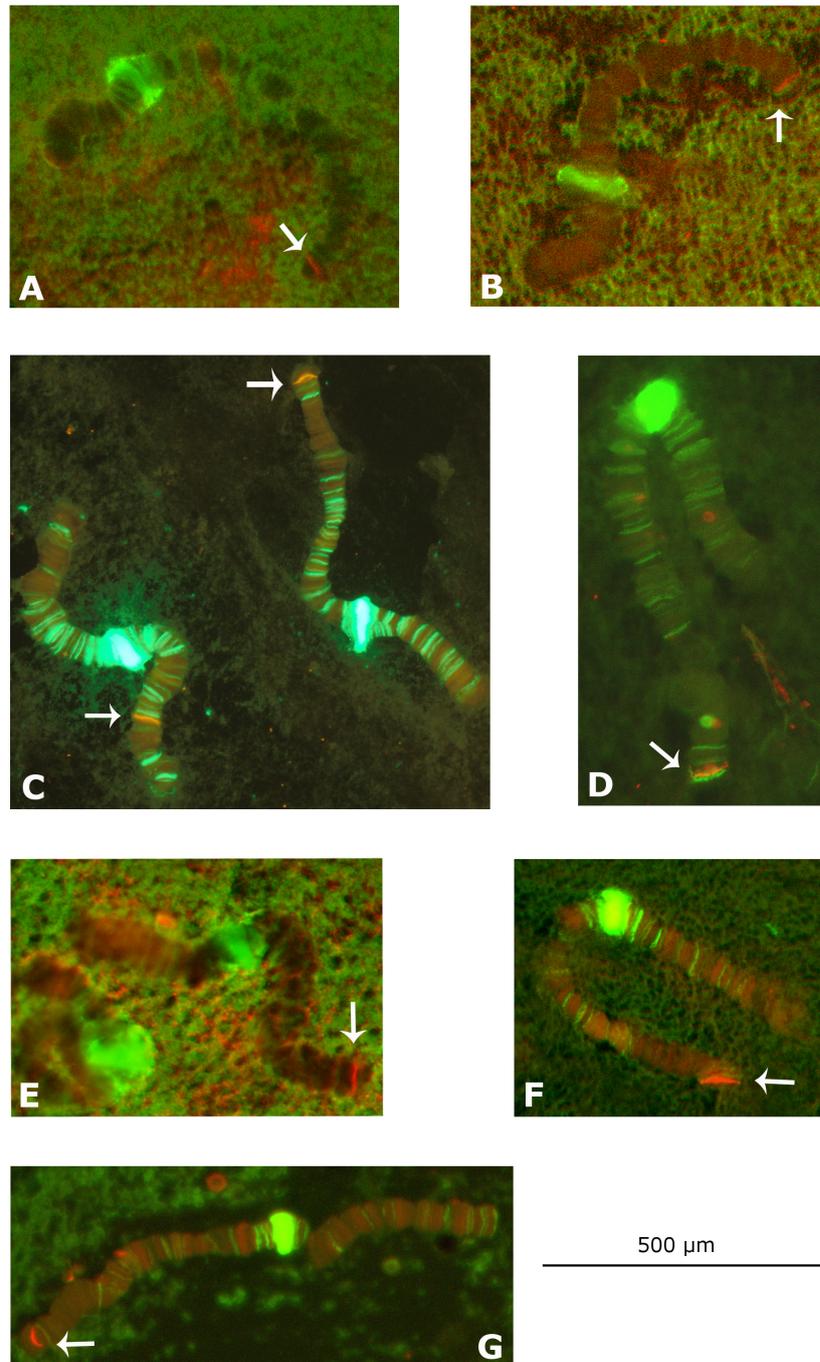


Abbildung 3.3.: Lokalisierung der BAC-Klone durch FISH an Polytäanchromosomen von *C. riparius* 1. In Grün (FITC) sind jeweils Hybridisierungen von synthetischen Clon-Elementen gezeigt, in Rot (TRITC) die der BAC-Klone (Pfeil). A: L114A2-3; B: L114B1-3; C: L116C2/1-6; D: L116E2/2-26; E: L116G1-6; F: L116I1-1; G: L116I1/1-1. Sechs der dargestellten BAC-Klone zeigen nur ein Hybridisierungssignal, welches in der SDR liegt. Dagegen zeigt der Klon L116C2/1-6 ein zusätzliches zweites Signal auf einem anderen Chromosom. Dieser Klon enthält zwei Chromosomenabschnitte, die sehr wahrscheinlich während der Ligations im Klonierungsprozess verknüpft wurden, und stellt somit ein Klonierungsartefakt dar.

3. Ergebnisse

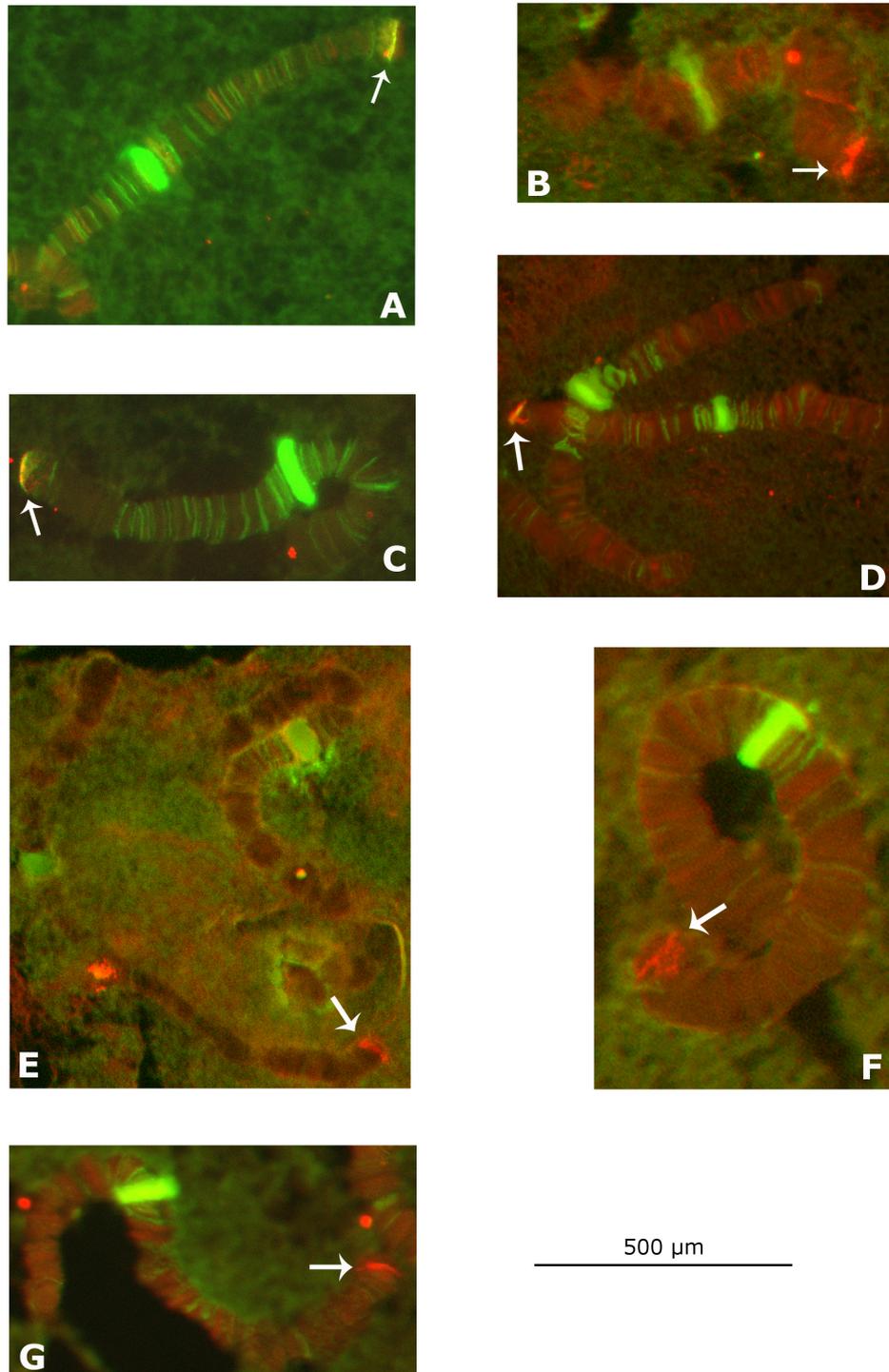


Abbildung 3.4.: Lokalisierung der BAC-Klone durch FISH an Polytäanchromosomen von *C. riparius* 2. In Grün (FITC) sind jeweils Hybridisierungen von synthetischen Cla-Elementen gezeigt, in Rot (TRITC) die der BAC-Klone (Pfeil). A: L120C2/1-7; B: L127B1-2; C: L158D4/3-3; D: L158E1/2-5; E: L168A3-1; F: L168C3/1-1; G: L168D2-8. Alle dargestellten Klone zeigen nur ein Hybridisierungssignal in der SDR. Damit kann davon ausgegangen werden, dass ihre Herkunft aus der SDR bestätigt ist.

quenzierung von etwa 30 kb großen BAC-Klonen mit redundanter Abdeckung (fünf- bis zehnfache Redundanz) waren meist 400–600 Sequenzierungen nötig. Zur Shotgun-Sequenzierung wurden die BAC-Klone L120C2/1-7 und L92F2.2Y am äußersten distalen und proximalen Ende des klonierten Bereichs und L168A3-1 als möglicherweise proto-Y-chromosomaler Klon ausgewählt (siehe Kapitel 3.2). Außerdem wurde der Klon L114B1-3 teilweise sequenziert. Da nur eine verbleibende Sequenzlücke von etwa 1000 Bp abgedeckt werden musste, war hier die Sequenzierung von wenigen Subklonen ausreichend. Die Sequenzen der drei vollständig sequenzierten Klone befinden sich im elektronischen Anhang.

3.1.4. Bioinformatische Analyse der SDR

Die Sequenzen der BAC-Klone L120C2/1-7, L99J4/1-1, L99E1-1, L99E2/2-5, L114B1-3, L116I1/1-1, L99B3/2-7, L92G2-2Y und L92F2.2Y wurden assembliert und mit den Sequenzen des *CtY*-Gens und des Primerwalks zum Gesamtcontig der SDR von *C. riparius* vervollständigt. Die entstandene 200012 Bp lange Sequenz wurde bioinformatisch analysiert. Dazu wurden überlappende Abschnitte von 10000 Bp Länge mit den Algorithmen BLASTn und BLASTx und in Aminosäuresequenzen übersetzte offene Leserahmen mit dem Algorithmus BLASTp auf mögliche annotierte Gene vor allem in anderen Insektenarten hin untersucht. Nach offenen Leserahmen wurde mit dem «ORF Finder» der NCBI-Datenbank bzw. der «Sequence Manipulation Suite» (<http://www.geneinfinity.org>) gesucht. Weiterhin wurde die Sequenz mit Hilfe des internetbasierten Programms GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) nach Genstrukturen und zusätzlich mit Hilfe des Programms PROSCAN (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>) nach Promotorregionen durchsucht. Diese Ergebnisse wurden «per Hand und Auge» kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert oder vervollständigt, um sicherzustellen, dass besonders kleine Exons (< 100 Bp), wie sie bei *C. riparius* häufig vorkommen können (siehe *CtY/CpY*; Kraemer 1994), nicht übersehen wurden. An 20 Stellen dieser Sequenz wurden Genstrukturen (Exon/Intron, PolyA) gefunden, die jeweils mit einem signifikanten BLAST-Ergebnis zusammenfielen (siehe Abbildung 3.25). Promotorstrukturen konnten nicht für alle gefundenen Gene bestimmt werden. Neben Genstrukturen konnten an mehreren Stellen verschiedene *Chironomus*-typische repetitive Elemente sowie am distalen Ende des klonierten Bereichs eine große, sich über 50 kb erstreckende «Inverted Repeat»-Struktur identifiziert werden. Eine Übersicht über die bioinformatische Analyse der Sequenz ist in

3. Ergebnisse

Abbildung 3.5 und Tabelle 3.2 gezeigt. Die genauen Positionen aller offenen Leserahmen und Exons der gezeigten Gene sind in einer Tabelle im Anhang zusammengefasst. Die BLAST-Ergebnisse befinden sich im elektronischen Anhang.

Auf die gefundenen Gene und ihre Struktur im Genom von *C. riparius* und auf die repetitiven Elemente soll im folgenden kurz eingegangen werden. Einige dieser Gene sind Bestandteil dreier Diplomarbeiten, die im Rahmen dieses Projekts bearbeitet wurden. Weitere Details zu den Genen *spitz/keren*, *mi-er1*, *LUC7*, *CG7845*, *fs(1)K10*, *d-Laktat-Dehydrogenase* und *polyhomeotic* sind daher in diesen Arbeiten zu finden (Berwanger 2007; Mack 2009; Blumensatt 2009). In den folgenden Abbildungen 3.6 bis 3.24 zu den potentiellen Genstrukturen sind die durch rein bioinformatische Analysen vorhergesagten 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) grundsätzlich in Grün, Exons in Blau und Introns in Gelb dargestellt. Alle Längen sind in Bp angegeben. Für den Fall, dass keine Promotorregion identifiziert werden konnte, ist die 5'-untranslatierte Region in Hellgrün mit gestrichelter Linie gezeigt.

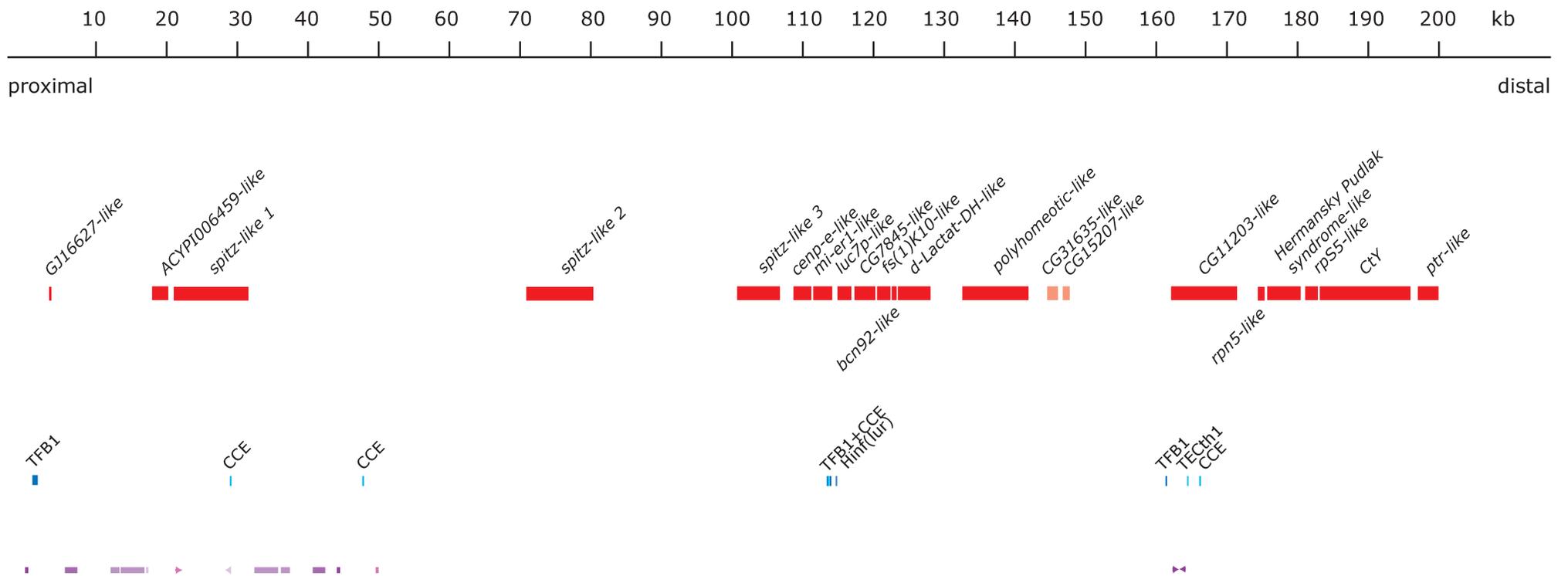


Abbildung 3.5.: Übersicht über die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der Sequenz aus der SDR. Dargestellt sind alle in der Sequenz gefundenen Gene, repetitiven Elemente und größere «Inverted Repeats». Durch BLAST-Suchen und Identifizierung von Genstrukturen gefundene Gene sind in Rot gezeigt, in Blau repetitive Elemente und in Violett «Inverted Repeat»-Strukturen. Die beiden «Gene» CG31635 und CG15207 sind in Hellrot gezeigt, da an den entsprechenden Stellen zwar BLAST-Ergebnisse, aber jeweils nur ein Exon zu finden war.

3. Ergebnisse

Position (Bp)	Gen	Repetitives Element	Inverted Repeat
69–540			IR1
3116–3984	<i>GJ16627-like</i>		
3565–4301		TFB1	
5759–7230			IR2
12000–13439			IR3a
13730–16820			IR3b
17000–17400			IR4
18996–19248		CCE	
17794–20225	<i>ACYPI006459-like</i>		
21270–21910			IR5
20685–33015	<i>spitz-like 1</i>		
28701–29110			IR4
32340–35430			IR3b
35810–37258			IR3a
40938–42424			IR2
44041–44510			IR1
47698–47847		CCE	
49411–50050			IR5
70145–81050	<i>spitz-like 2</i>		
101929–107219	<i>spitz-like 3</i>		
108639–111082	<i>CENP-E-like</i>		
111216–114160	<i>mi-er1-like</i>		
113430–113457		TFB1	
113458–113647		CCE	
113648–113937		TFB1	
114528–114714		Hinf(lur)	
114948–116987	<i>LUC7-like</i>		
117100–120211	<i>CG7845-like</i>		
120143–122339	<i>fs(1)K10-like</i>		
122699–123309	<i>bcn92-like</i>		
122592–128444	<i>d-Laktat-Dehydrogenase-like</i>		
132545–139599	<i>polyhomeotic-like</i>		
144342–146015	<i>CG31635-like</i>		
146622–147497	<i>CG15207-like</i>		
161414–161686		TFB1	
162169–171517	<i>CG11203-like</i>		
162419–163115			IR6
163316–164012			IR6
164492–164673		TECth1	
166460–166800		CCE	
173725–175435	<i>rpn5-like</i>		
175462–180208	<i>Hermansky-Pudlak Syndrome-like</i>		
180785–182242	<i>rpS5-like</i>		
182303–196314	<i>CtY</i>		
197093–199998	<i>ptr-like</i>		

Tabelle 3.2.: Übersicht über die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse der Sequenz aus der SDR. Aufgelistet sind alle in der Sequenz gefundenen Gene, repetitiven Elemente und größeren «Inverted Repeats» und ihre Lage innerhalb der Sequenz. Die Lage der Gene umfasst jeweils den Bereich vom ggf. identifizierten Promotor bzw. ersten Exon bis zur PolyA-Sequenz.

Gene

GJ16627

GJ16627 wurde für *Drosophila virilis* als proteinkodierend beschrieben, doch bisher ist seine molekulare Funktion unbekannt (GENE ID: 6633611 Dvir GJ16627; Drosophila 12 Genomes Consortium 2007). Die für *C. riparius* vorhergesagte Struktur des *GJ16627*-ähnlichen Gens ist in Abbildung 3.6 gezeigt. Ob es sich dabei wirklich um ein funktionelles Gen handelt, ist unklar, wegen der geringen Größe und des Fehlens von Introns jedoch eher unwahrscheinlich.

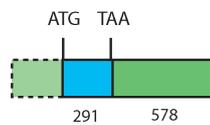


Abbildung 3.6.: Genstruktur *GJ16627-like*

ACYPI006459

ACYPI006459 bzw. *LOC100165513* aus *Acyrtosiphon pisum* ist proteinkodierend (GENE ID: 1001165513 LOC100165513) und ähnelt dem Gen für den nuklearen Rezeptor-Coaktivator GT198 (Ko et al. 2002). Die Struktur des *ACYPI006459*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Der lange 5'-UTR dieser Genstruktur ist eher unwahrscheinlich.

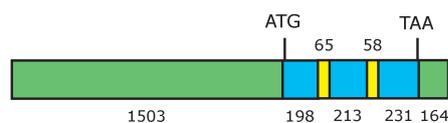


Abbildung 3.7.: Genstruktur *ACYPI006459-like*

spitz

Spitz kodiert für ein TGF (transforming growth factor)- α -Homolog, und sein Genprodukt ist der Hauptligand bei der Aktivierung des EGF (epidermal growth factor)-Rezeptors in *Drosophila*, wodurch *Spitz* eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellentwicklung spielt (Rutledge et al. 1992). Außerdem ist *Spitz* beteiligt an der Rekrutierung von Photorezeptoren während der Retinaentwicklung von *Drosophila*

3. Ergebnisse

(Freeman 1994; Tio & Moses 1997). *Spitz* kommt mit drei Kopien in der SDR von *C. riparius* vor. Die Strukturen der drei *spitz*-ähnlichen Gene im Genom von *C. riparius* sind in Abbildung 3.8 bis 3.10 dargestellt. Die Transkription von *spitz 1-like* und *spitz 2-like* konnte in *C. riparius* nachgewiesen werden (Mack 2009). Die langen 5'- und 3'-UTR sind nicht durch RACE-Experimente abgesichert und daher nicht sehr wahrscheinlich.

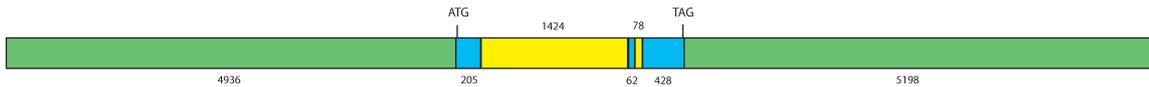


Abbildung 3.8.: Genstruktur *spitz 1-like*

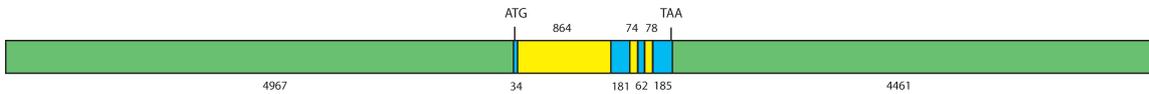


Abbildung 3.9.: Genstruktur *spitz 2-like*



Abbildung 3.10.: Genstruktur *spitz 3-like*

CENP-E

Das Protein CENP-E (centromer-associated protein E) wurde ursprünglich beim Menschen identifiziert und ist ein Kinesin-ähnliches Motorprotein, das an Kinetochore bindet. Es wird benötigt für die Zusammenlagerung der Chromosomen in der Prometaphase und für eine effiziente, stabile Erfassung der Mikrotubuli an den Kinetochoren. Eine funktionale Störung von CENP-E resultiert in ungepaarten Chromosomen während der Mitose und kann zu einer Unterbrechung der Mitose führen (McEwen et al. 2001; Weaver et al. 2003; Tranudji et al. 2004). Die Struktur des *CENP-E*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

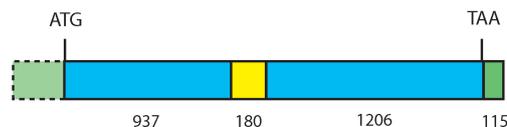


Abbildung 3.11.: Genstruktur *CENP-E-like*

mi-er1

mi-er1 (*mesoderm induction early response 1*) kodiert für ein im Nukleus lokalisiertes Protein, welches in der Zellentwicklung für die Differenzierung zu mesodermalen Zellen benötigt wird (Slack et al. 1989, 1990; Paterno et al. 1997). Die Struktur des *mi-er1*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius*, welche teilweise durch Sequenzierung von RT-PCR-Produkten bestätigt werden konnte (Mack 2009), ist in Abbildung 3.12 dargestellt.

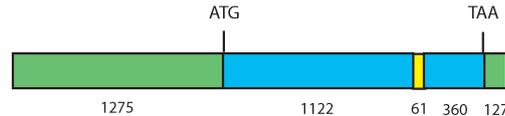


Abbildung 3.12.: Genstruktur *mi-er1-like*

LUC7 (lethal unless CBC is produced)

LUC7 wurde erstmals identifiziert als eine letale Mutation in einem Hefe-Stamm, welchem der nukleare Cap-Bindekomplex (CBC) fehlte. Das Protein Luc7p ist eine Komponente des U1 snRNPs. Die U1 snRNP-CBC-Interaktion trägt zur 5'-Spleißstellen-Erkennung bei, welche bei Verlust von *LUC7* gestört wird (Fortes et al. 1999). Die Struktur des *LUC7*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Die Transkription von *LUC7-like* konnte in *C. riparius* nachgewiesen werden (Mack 2009).

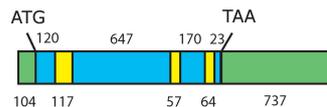


Abbildung 3.13.: Genstruktur *LUC7-like*

CG7845

Die Funktion dieses für *D. melanogaster* beschriebenen Gens ist unbekannt (GENE ID: 35536 CG7845). Das abgeleitete Protein enthält eine WD40-Domäne. Das WD40-Motiv kommt in vielen eukaryotischen Proteinen vor, die in verschiedene zelluläre Prozesse involviert sind (Neer et al. 1994; Smith et al. 1999). Die Struktur des *CG7845*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Mack (2009) konnte zeigen, dass *CG7845-like* in *C. riparius* transkribiert wird.

3. Ergebnisse

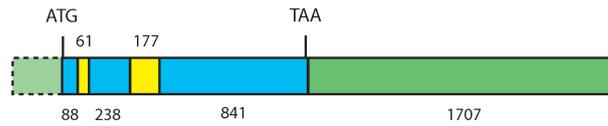


Abbildung 3.14.: Genstruktur *CG7845-like*

fs(1)K10

Die Expression von *fs(1)K10* wird in der frühen Oogenese für die Etablierung der dorso-ventralen Achse der Oocyte in *Drosophila* benötigt (Haenlin et al. 1987; Prost et al. 1988; Serano et al. 1995). Eine homozygote Mutation von *fs(1)K10* in *Drosophila*-Weibchen verursacht eine abweichende Chorionmorphologie, die zu weiblicher Sterilität führt (Wieschaus et al. 1978). Die Struktur des *fs(1)K10*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius*, welche teilweise durch cDNA-Analysen bestätigt werden konnte (Mack 2009), ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

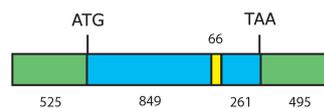


Abbildung 3.15.: Genstruktur *fs(1)K10-like*

bcn92

bcn92 wurde für *D. melanogaster* als proteinkodierend beschrieben. Seine molekulare Funktion ist bisher unbekannt, doch wird für das Protein eine Oxidoreduktase-Aktivität vermutet (Cirera et al. 1995; Beisswanger et al. 2006). Das Genprodukt gehört zur Komplex 1 LYR-Proteinfamilie, welche nach einem hochkonservierten Tripeptid-Motiv nahe des N-Terminus dieser Proteine benannt ist. Für Proteine mit LYR-Motiv wird eine Beteiligung am Eisen-Schwefel-Metabolismus vermutet (Ghezzi et al. 2009). Die Struktur des *bcn92*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Die Transkription von *bcn92-like* konnte in *C. riparius* nachgewiesen werden (Mack 2009).

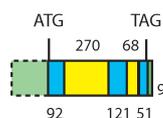


Abbildung 3.16.: Genstruktur *bcn92-like*

D-Laktat-Dehydrogenase

Das Enzym D-Laktat-Dehydrogenase gehört zur «FAD binding 4»-Familie und katalysiert die Oxidation von D-Laktat zu Pyruvat, weshalb es eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle spielt (Fraaije et al. 1998). Die Struktur des Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Der vorhergesagte lange 5'-UTR dieser Genstruktur ist sehr unwahrscheinlich.



Abbildung 3.17.: Genstruktur *D-Laktat-DH-like*

polyhomeotic

Polyhomeotic wird benötigt für die korrekte Expression und Aufrechterhaltung der segmentalen Identität in *Drosophila* ebenso wie für die epidermale Entwicklung. *Polyhomeotic* gehört zur Polycomb-Gruppe von Genen, die zur Kontrolle der homöotischen Genexpression benötigt werden. Der *polyhomeotic*-Lokus besteht aus tandemartig duplizierten Regionen, wobei Umstrukturierungen in einem Repeat die Funktion des ganzen Genortes verändern (Dura et al. 1987; DeCamillis et al. 1992). Eine Überexpression von *polyhomeotic* während der frühen Oogenese führt zu Defekten in der Follikelzellen-Formung und damit zu einer deutlichen Abnahme der weiblichen Fertilität (Narbonne et al. 2004). Die Struktur des *polyhomeotic*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Durch cDNA-Analysen konnte die Struktur von *polyhomeotic-like* teilweise bestätigt und eine Transkription in *C. riparius* nachgewiesen werden (Mack 2009)

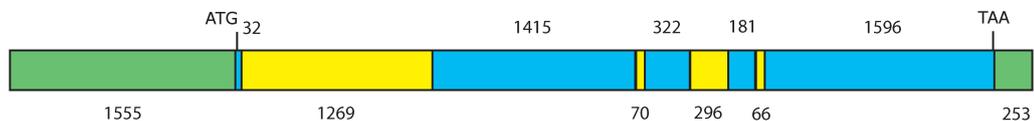


Abbildung 3.18.: Genstruktur *polyhomeotic-like*

3. Ergebnisse

CG31635

CG31635 aus *D. melanogaster* ist proteinkodierend, doch bisher ist seine Funktion unbekannt (Drosophila 12 Genomes Consortium 2007). Da in der SDR von *C. riparius* nur ein übereinstimmendes Exon gefunden wurde, ist hier keine Genstruktur gezeigt.

CG15207

CG15207 aus *D. melanogaster* ist laut Datenbankeintrag ebenfalls proteinkodierend, doch mit bisher unbekannter Funktion (Drosophila 12 Genomes Consortium 2007). Ebenso wie bei *CG31635* ist in der analysierten Sequenz nur ein übereinstimmendes Exon vorhanden, so dass keine potentielle Genstruktur rekonstruiert werden kann.

CG11203

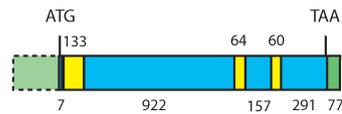
CG11203 aus *D. melanogaster* ist als proteinkodierend beschrieben mit bisher unbekannter molekularer Funktion (FLYBASE:FBgn0030249; Adams et al. 2000). Die Struktur des *CG11203*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.19 dargestellt.



Abbildung 3.19.: Genstruktur *CG11203-like*

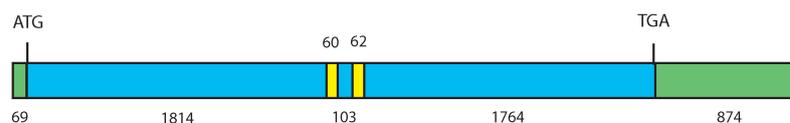
rpn5

Rpn5 ist ein Dosis-abhängiger Proteasom-Regulator und eine Untereinheit des 26S-Proteasoms. Rpn5 vermittelt den korrekten Zusammenbau des 26S-Proteasoms und seine Funktionen sind hoch konserviert in Eukaryoten und Prokaryoten (Yen et al. 2003). In *Arabidopsis* ist Rpn5 essentiell für die männliche Gametogenese (Book et al. 2009). Die Struktur des *rpn5*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

Abbildung 3.20.: Genstruktur *rpn5-like*

Hermansky-Pudlak Syndrome (HPS) 3

HPS bezeichnet eine Gruppe von genetischen Funktionsstörungen, die durch Defekte in Organellen des endosomal-lysosomalen Systems charakterisiert sind. Dafür verantwortlich sind etwa ein Dutzend Gene, wovon die Mehrheit für neue Polypeptide kodiert, die in einzelligen Eukaryoten nicht konserviert sind. Diese Proteine sind Komponenten von mindestens drei allgegenwärtig exprimierten Proteinkomplexen, die als «biogenesis of lysosome-related organelles complex» (BLOC)-1, -2 und -3 bezeichnet werden (Dell'Angelica 2004). Eine Mutation des Gens *HPS3* verursacht beim Menschen einen milden Subtyp von HPS mit minimaler Depigmentation von Haut und Augen, die durch den Fehltransport von melanozytenspezifischen Proteinen zum Melanosom verursacht wird. *HPS3* kodiert für ein zu BLOC-2 gehörendes Protein mit unbekannter Funktion, welches ein Clathrin-bindendes Motiv besitzt und für das eine Funktion in Bildung und Transport von Vesikeln vermutet wird (Boissy et al. 2005; Helip-Wooley et al. 2005). Das *HPS5*-homologe Gen *pink* aus *D. melanogaster* gehört zur Granulozytengruppe für Augenpigmentation (Falcón-Pérez et al. 2007). Die Struktur des *HPS*-ähnlichen Gens in *C. riparius* ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

Abbildung 3.21.: Genstruktur *HPS-like*

rpS5

rpS5 kodiert in *Aedes aegypti* für das 28S ribosomale Protein S5 und ist in vielen anderen Arten wie z. B. Mensch, Maus, Zebrafisch und *Drosophila* konserviert (GENE ID: 5578994 AaeL AAEL003801; Nene et al. 2007). Die Struktur des *rpS5*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

3. Ergebnisse



Abbildung 3.22.: Genstruktur *rpS5-like*

Chironomus thummi Y-chromosomales Gen (CtY)

CtY bzw. *CpY* aus *C. piger* wurde in früheren Arbeiten zur Klonierung der SDR von *C. riparius* identifiziert (Kraemer & Schmidt 1993). Es ist homolog zum Gen *DmX* aus *D. melanogaster* und kodiert für ein neues WD-Repeat-Protein mit mindestens 30 WD-Repeat-Einheiten (Neer et al. 1994; Smith et al. 1999). *DmX* ist evolutionär hochkonserviert und findet sich in anderen Dipteren, aber auch in *C. elegans* und Säugern (Kraemer 1994; Kraemer et al. 1998, 2000). Die Struktur von *CtY* ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

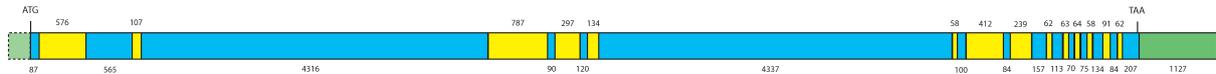


Abbildung 3.23.: Genstruktur *CtY*

ptr (proximal to raf)

ptr wurde für *D. melanogaster* als proteinkodierend beschrieben, doch bisher ist seine molekulare Funktion unbekannt (Hoskins et al. 2007). Laut FlyBase existieren Orthologe in anderen *Drosophila*-Arten und weiteren Insekten wie *Aedes aegypti*, *Apis mellifera*, *Nasonia vitripennis* und *Tribolium castaneum*. Die Struktur des *ptr*-ähnlichen Gens im Genom von *C. riparius* ist in Abbildung 3.24 dargestellt.



Abbildung 3.24.: Genstruktur *ptr-like*

Repetitive Elemente

Thummi Foldback Element (TFB1)

TFB1 ist ein Foldback-transposables Element, welches ursprünglich in der Histon H1–H3 Intergenregion von *C. riparius* gefunden wurde, aber auch über das restliche Genom von *C. riparius* verteilt vorkommt. Es besteht aus großen (140 Bp/162 Bp) invertierten Repeats (IR), die durch einen 746 Bp langen DNA-Abschnitt getrennt sind. Die invertierten Repeats werden flankiert von kurzen direkten Repeats (DR) (Hankeln & Schmidt 1990). In der SDR von *C. riparius* wurden drei TFB1 gefunden.

CCC-Element (CCE)

CCC-Elemente stellen eine neue Klasse von transposablen Elementen dar, die nach den sehr G/C-reichen direkten Repeats benannt sind und ursprünglich in *C. riparius* gefunden wurden. Sie bestehen jeweils aus zwei perfekten terminalen invertierten Repeats (27 Bp), zwei G/C-reichen internen direkten Repeats (62/64 Bp) und einer internen AT-reichen Region, enthalten jedoch keinen offenen Leserahmen (Kraemer & Schmidt 1993). Die vier in der SDR vorkommenden CCC-Elemente sind allerdings alle unvollständig.

Hinf(lur)-Element

Das repetitive Hinf(lur)-Element ist nach einer charakteristischen *Hinf*I-Restriktionschnittstelle benannt und wurde in *Chironomus luridus* gefunden. Es enthält als integralen Bestandteil Cla-Element-ähnliche Sequenzen (Ross et al. 1997) und kommt mit einer Kopie in der SDR von *C. riparius* vor.

TECth1-Element

TECth1 ist ein 1,7 kb langes transposables Element, welches ursprünglich in der 3'-flankierenden Region eines Balbiani-Ring-Gens von *C. riparius* identifiziert wurde. Charakteristisch für dieses transposable Element sind perfekte 17 Bp lange invertierte Repeats und eine duplizierte 8 Bp lange «target site». Eine Verwandtschaft mit P-Elementen von *D. melanogaster* wird vermutet, obwohl kein durchgehender offener Leserahmen für eine Transposase gefunden wurde (Wobus et al. 1990). Dieses transposable Element wurde an einer Stelle der SDR von *C. riparius* gefunden.

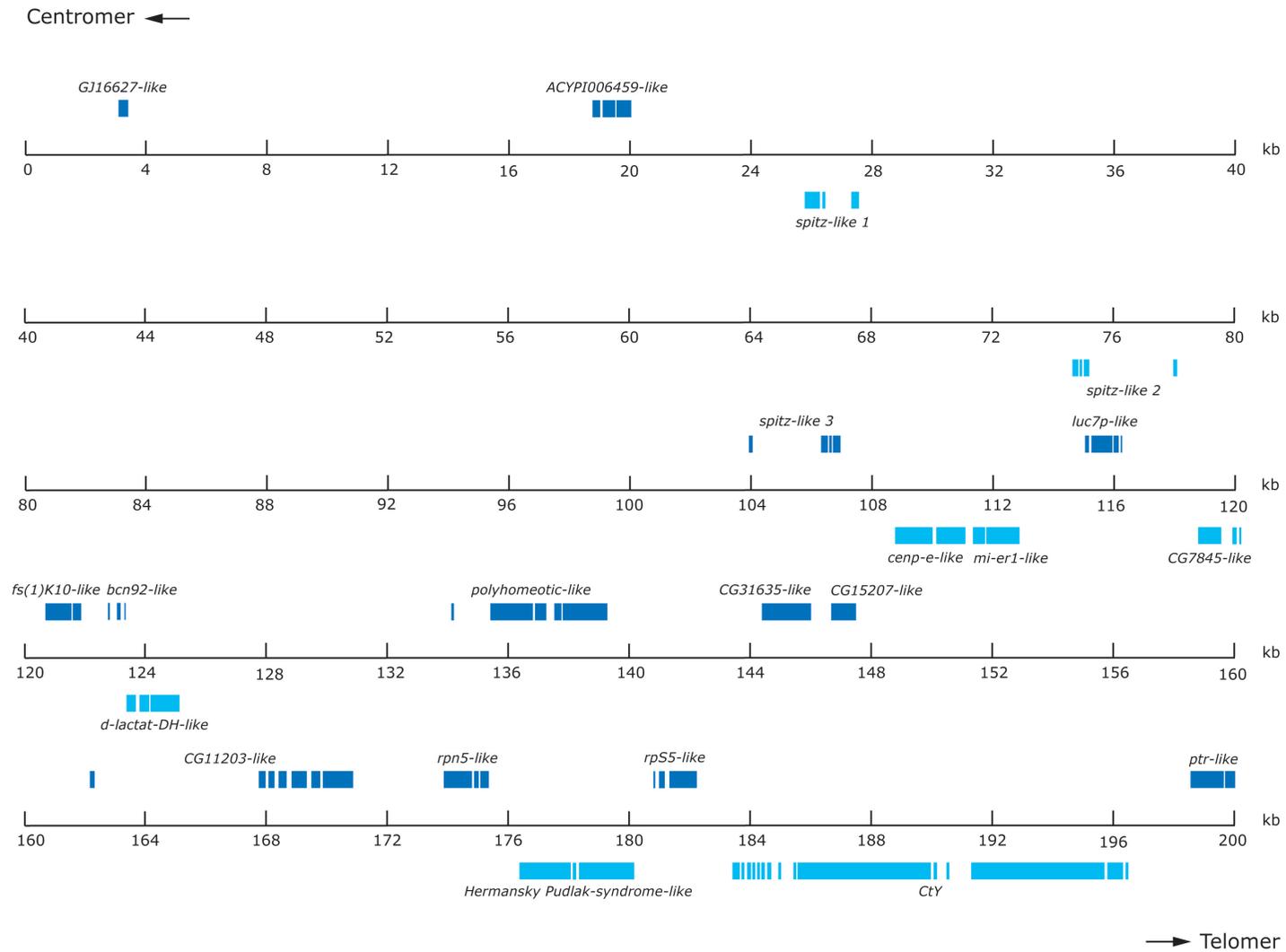


Abbildung 3.25.: Genstrukturen in der SDR. In Dunkelblau sind Genstrukturen auf dem «Watson»-Strang, in Hellblau diejenigen auf dem «Crick»-Strang dargestellt. Gezeigt sind jeweils Exons, die eindeutig identifiziert werden konnten. Im Fall von *GJ16627-like* handelt es sich um eine «single exon»-Genstruktur (SEG).

3.2. «Skimming» aller BAC-Klone aus der SDR

Durch die Verwendung von etwa gleich vielen männlichen (XY) und weiblichen (XX) Tieren zur Konstruktion der BAC-Bibliotheken ist theoretisch eine Verteilung von Klonen proto-X- und proto-Y-chromosomaler Herkunft im Verhältnis 3:1 zu erwarten. Das tatsächliche Geschlechterverhältnis der eingesetzten Tiere wurde jedoch nicht bestimmt, weshalb diese Zahlen durchaus abweichen können. Ebenso ist die chromosomale Zuordnung (X/Y) der BAC-Klone aus der SDR unklar. Daher wurden alle vorhandenen BAC-Klone einem Sequenz-«Skimming» unterzogen, um Unterschiede zwischen parallelen BAC-Klonen zu detektieren, die möglicherweise X- oder Y-spezifisch sind. Dazu wurden Primer zur Sequenzierung entworfen bzw. schon vorhandene verwendet, die im Abstand von etwa 1000 Bp über die gesamte SDR verteilt sind. Alle vorhandenen BAC-Klone wurden mit den jeweils passenden Primern sequenziert. Auf diese Weise konnten die Sequenzen parallel liegender Klone verglichen werden. Bei dem Vergleich paralleler Sequenzen stellte sich heraus, dass sich die Klone an vielen Stellen durch «single nucleotide polymorphisms» (SNPs) und Insertionen/Deletionen (Indels) voneinander unterscheiden. Dabei ist auffällig, dass jeder Klon einer von zwei Gruppen zugeordnet werden kann. Das bedeutet, dass im Fall eines SNPs entweder die eine oder die andere Base in der Sequenz vorhanden ist, aber keine dritte. Im Fall von Indels ist ein Sequenzabschnitt entweder vorhanden oder nicht. Die Existenz von zwei sich unterscheidenden Klongruppen legt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um proto-X- und proto-Y-chromosomale Klone handeln könnte. Bei der Zuordnung der BAC-Klone zu den Klongruppen ist auffällig, dass alle vollständig sequenzierten Klone, deren Sequenzen den Contig der SDR bilden, ein und derselben Gruppe zugeordnet werden, im folgenden als Gruppe 1 bezeichnet (siehe Abbildung 3.26). In Bezug auf die chromosomale Herkunft der BAC-Klone könnte das bedeuten, dass die analysierte Sequenz der SDR nur ein Geschlechtschromosom, vermutlich das proto-X-Chromosom repräsentiert.

Die SNPs (500) wurden katalogisiert und befinden sich in einer Tabelle im elektronischen Anhang. Der Großteil der SNPs liegt in Intergenbereichen und nur 23 liegen in Exonbereichen von Genen. Die SNPs in Exons sind in 50 Prozent aller Fälle stille Mutationen, führen jedoch in keinem Fall zum Einfügen eines Stoppcodons. Aus diesem Grund wurden die SNPs nicht in weitere Analysen einbezogen. Ebenso sind alle Indels (110), ihre Länge und ihre Lage im Contig der SDR in einer Tabelle im elektronischen Anhang aufgelistet. Darunter befinden sich zwölf Indels, die länger als 15 Bp sind (17–795 Bp; siehe Tabelle 3.3). Diese Indels, welche nach ihrer unge-

3. Ergebnisse

fähren Lage in der analysierten Sequenz in kb benannt wurden, wurden in weiteren Versuchen näher untersucht (siehe Kapitel 3.3). In den Abbildungen 3.27, 3.28 und 3.29 sind diese zwölf Indels im Detail gezeigt. Die Sequenzen der Indels befinden sich als Sequenz-Datei im elektronischen Anhang. Der Großteil der Indels enthält keine bekannten Sequenzen mit Ausnahme von Indel 113, welches ein zusätzliches CCC-Element in Klongruppe 1 darstellt. Allerdings ist auffällig, dass fünf der Indels, I18, I61, I101, I114 und I116, an ihren Rändern «target site»-Duplikationen aufweisen, welche auf einen Transpositionsvorgang hinweisen. Die Indels I18, I101 und I116 enthalten weitere Transposon-typische Merkmale wie «Inverted Repeats» (IRs) und «Direct Repeats» (DRs). Keine Sequenz dieser drei Indels enthält jedoch Hinweise auf eine Transposase. Die Existenz von «target site»-Duplikationen und terminalen IRs in allen drei Indels ist charakteristisch für Fold-back-Elemente, welche üblicherweise nicht für eine eigene Transposase kodieren (Potter et al. 1980). So weist I18 terminale 9 Bp lange DRs («target site»-Duplikation; Abbildung 3.27 A) und 280 Bp lange terminale IRs (Abbildung 3.30) auf. I101 besitzt terminale DRs mit einer Länge von 5 Bp (Abbildung 3.28 C) und 21 Bp lange terminale IRs (Abbildung 3.31). I116 besitzt 9 Bp lange terminale DRs (Abbildung 3.29 B) und 230 Bp lange, perfekte terminale IRs (Abbildung 3.33).

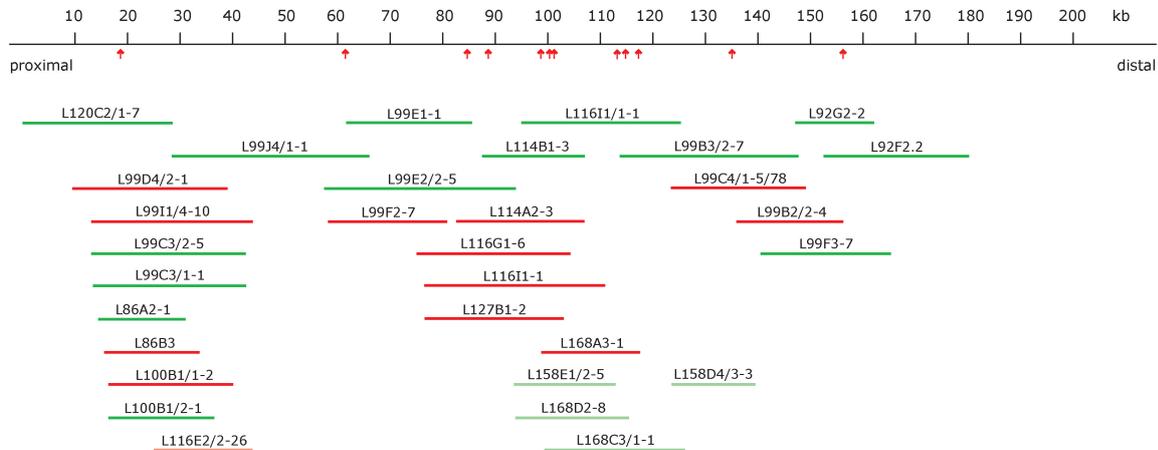


Abbildung 3.26.: Skimming aller BAC-Klone der SDR. Nach Analyse und Vergleich der Sequenzen aller Klone konnte jeder BAC-Klon einer von zwei Gruppen zugeordnet werden, die sich durch viele SNPs und Indels unterscheiden. In Grün gezeigte Klone gehören zur Klongruppe 1, worunter sich sämtliche Klone befinden, die zur Erstellung des Contigs der SDR vollständig sequenziert wurden. In Rot dargestellte Klone bilden die Klongruppe 2. In Hellgrün bzw. Hellrot sind diejenigen Klone gezeigt, die nicht in das Skimming einbezogen wurden und daher nur aufgrund ihrer Randsequenzen eingeordnet werden konnten. Rote Pfeile markieren die Stellen in der Sequenz der SDR, wo sich größere Indels (17–795 Bp) befinden, durch die sich die beiden Klongruppen unterscheiden.

3.2. «Skimming» aller BAC-Klone aus der SDR

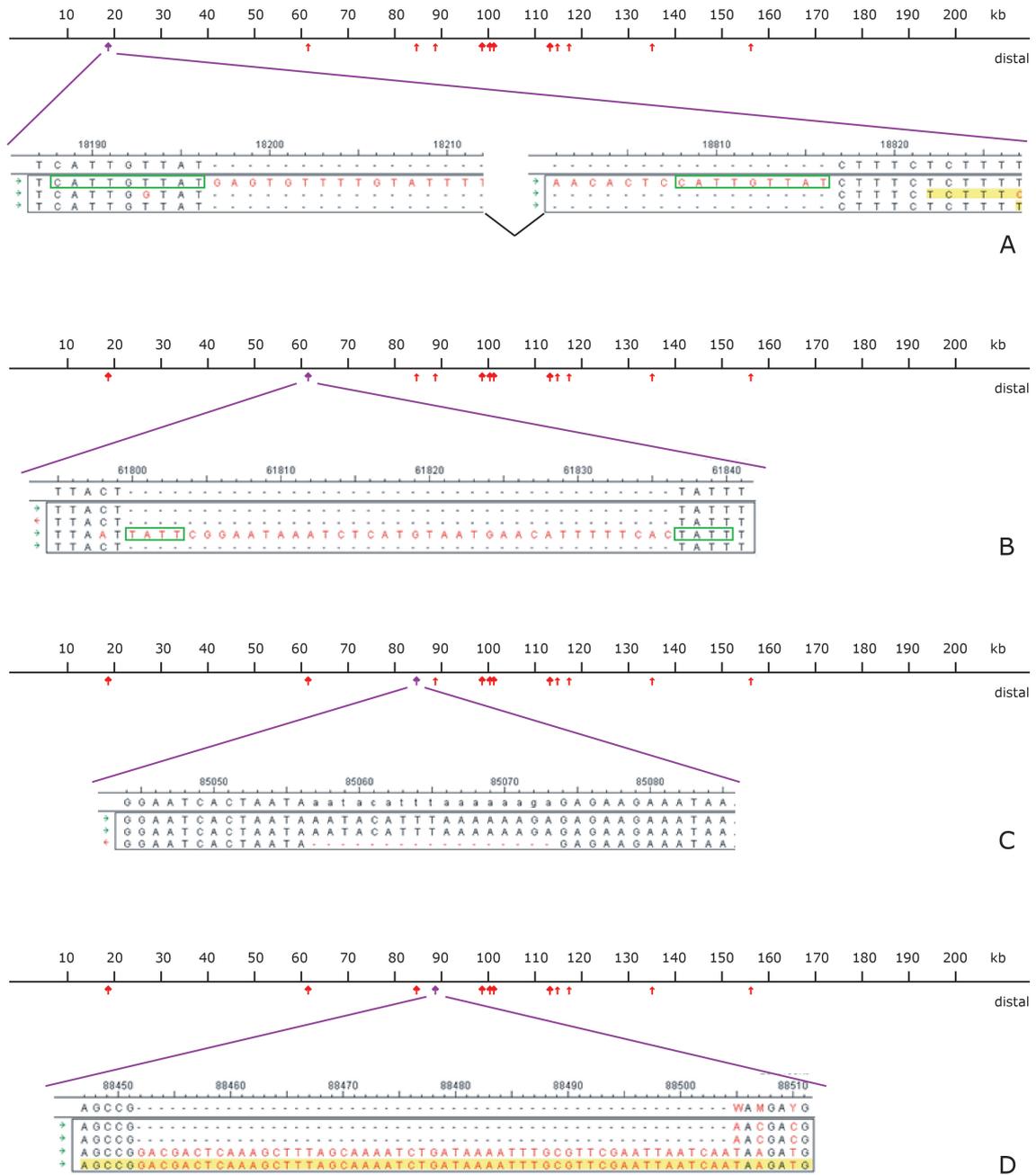


Abbildung 3.27.: Indels I18, I61, I84 und I88 im Detail. Dargestellt ist jeweils die Übersicht über die Konsensussequenz der SDR mit allen größeren Indels (Pfeile), durch die sich die beiden Klongruppen unterscheiden. Der violette Pfeil bezeichnet jeweils dasjenige Indel, welches darunter im Detail auf Sequenzebene als Alignment der Skimming-Sequenzen (Seq-Man) dargestellt ist, die roten Pfeile bezeichnen alle übrigen Indels. Die grünen Kästen markieren «target site»-Duplikationen. I18 (A) enthält zusätzlich zur «target site»-Duplikation ein großes terminales IR (siehe Abb. 3.30). A: I18; B: I61; C: I84; D: I88.

3. Ergebnisse

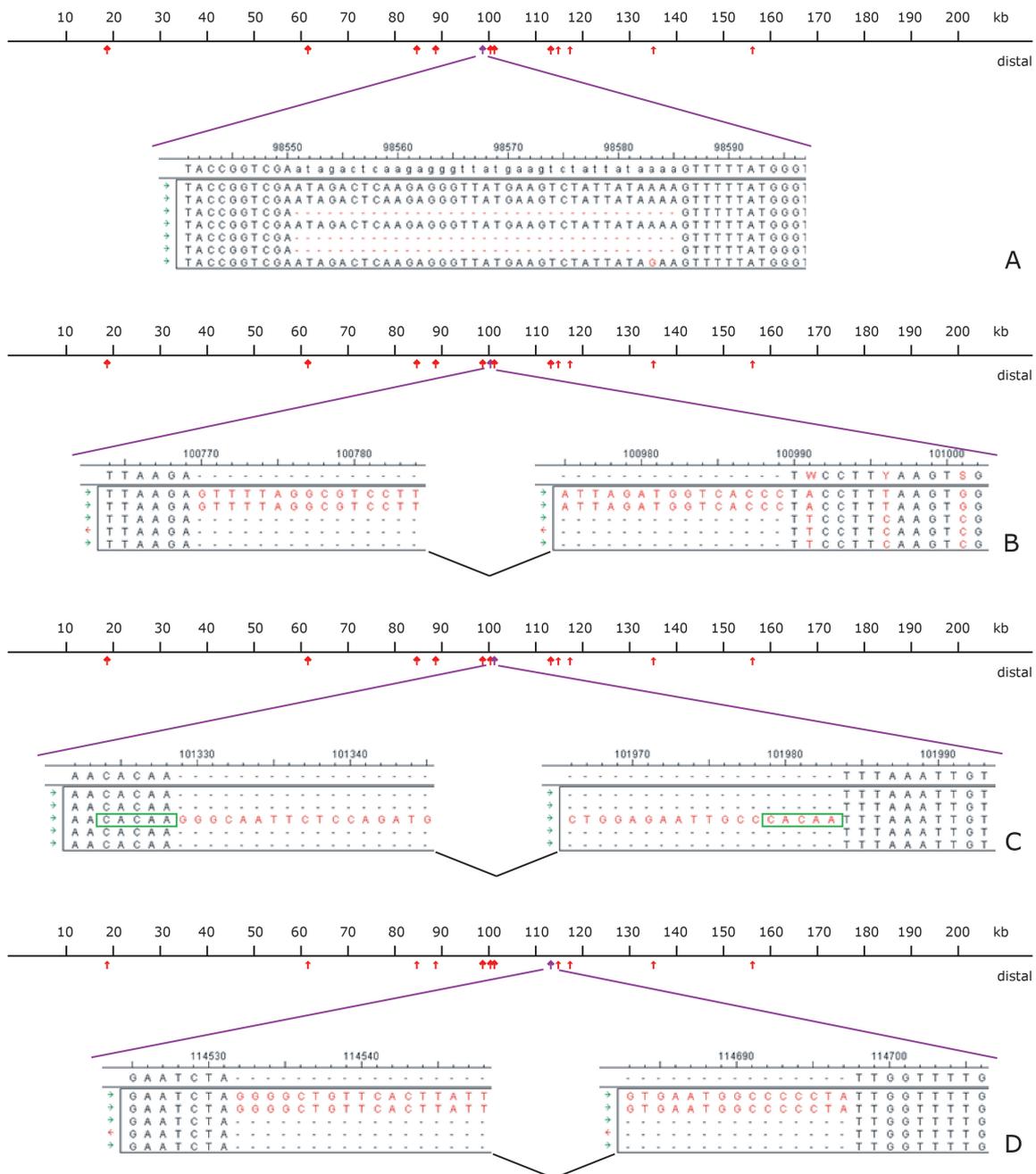


Abbildung 3.28.: Indels I98, I100, I101 und I113 im Detail. Dargestellt ist jeweils die Übersicht über die Konsensussequenz der SDR mit allen größeren Indels (Pfeile), durch die sich die beiden Klongruppen unterscheiden. Der violette Pfeil bezeichnet jeweils dasjenige Indel, welches darunter im Detail auf Sequenzebene als Alignment der Skimming-Sequenzen (SeqMan) dargestellt ist, die roten Pfeile bezeichnen alle übrigen Indels. Die grünen Kästen markieren «target site»-Duplikationen. I101 (C) enthält zusätzlich zur «target site»-Duplikation mehrere IRs und ein DR (siehe Abb. 3.31). I113 (D) stellt ein CCE dar (siehe Abb. 3.32). A: I98; B: I100; C: I101; D: I113.

3.2. «Skimming» aller BAC-Klone aus der SDR

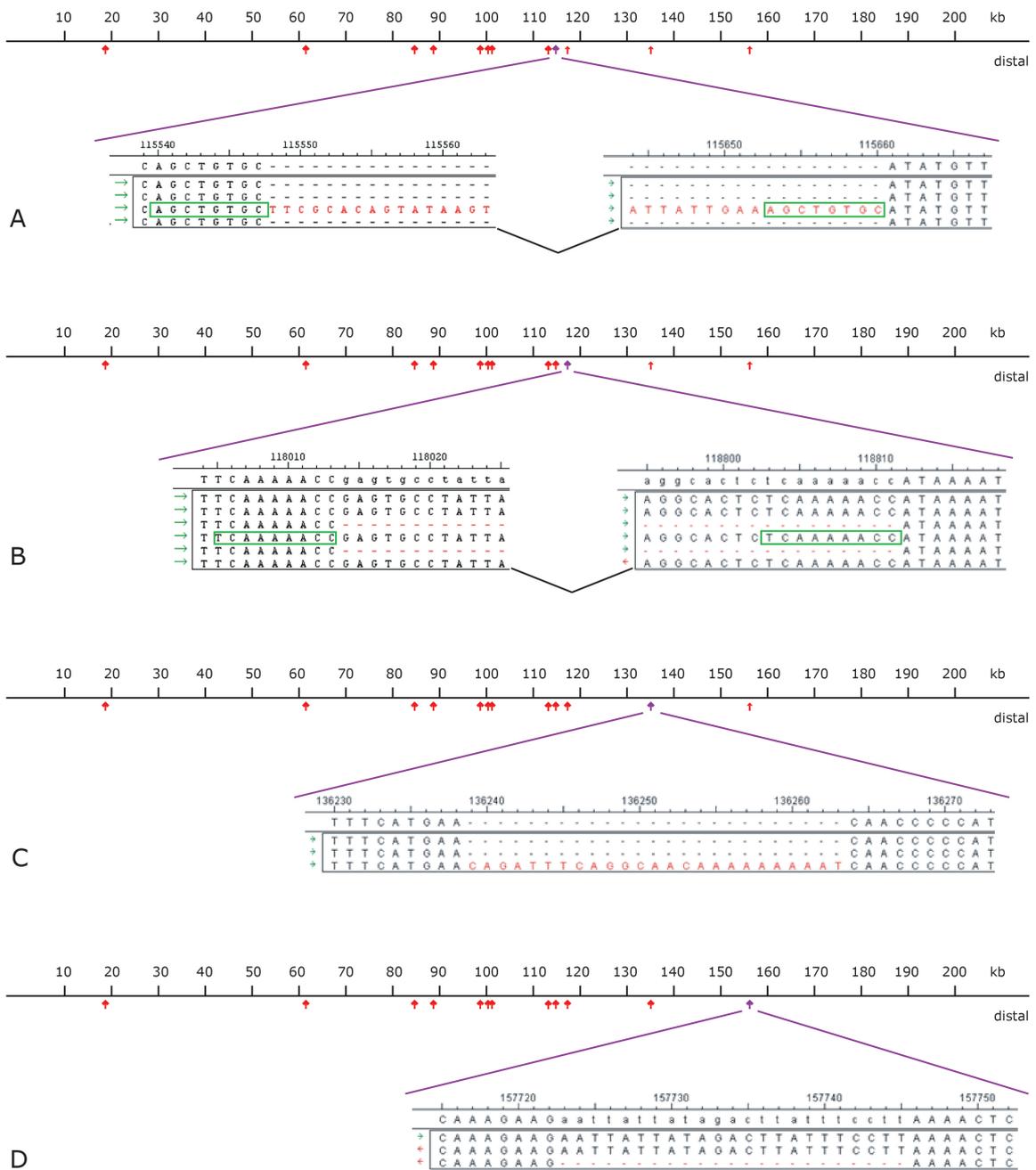


Abbildung 3.29.: Indels I114, I116, I135 und I156 im Detail. Dargestellt ist jeweils die Übersicht über die Konsensussequenz der SDR mit allen größeren Indels (Pfeile), durch die sich die beiden Klengruppen unterscheiden. Der violette Pfeil bezeichnet jeweils dasjenige Indel, welches darunter im Detail auf Sequenzebene als Alignment der Skimming-Sequenzen (SeqMan) dargestellt ist, die roten Pfeile bezeichnen alle übrigen Indels. Die grünen Kästen markieren «target site»-Duplikationen. I116 (B) enthält zusätzlich zur «target site»-Duplikation ein großes, perfektes terminales IR und weitere kleinere IRs und DRs (siehe Abb. 3.33). A: I114; B: I116; C: I135; D: I156.

3. Ergebnisse

Indel	Gruppe 1	Gruppe 2	Position im Contig (Bp)	Länge (Bp)
I18	Insertion	Deletion	18194–18813	620
I61	Deletion	Insertion	61593	37
I84	Insertion	Deletion	84776–84793	17
I88	Deletion	Insertion	88165	53
I98	Insertion	Deletion	98157–98191	35
I100	Insertion	Deletion	100373–100591	219
I101	Deletion	Insertion	100930	655
I113	Insertion	Deletion	113465–133630	166
I114	Deletion	Insertion	114525	115
I116	Insertion	Deletion	116822–117616	795
I135	Deletion	Insertion	135016	25
I156	Insertion	Deletion	156342–156364	23

Tabelle 3.3.: Gruppenunterschiede: Größere Indels. Aufgelistet sind beim Skimming gefundene Indels in der SDR, die größer als 15 Bp sind und daher als für die weitere Analyse interessant erachtet wurden. Bei Insertionen in Klongruppe 1 ist der Bereich in der Konsensussequenz der SDR angegeben, über den sich die Insertion erstreckt. Bei Insertionen in Klongruppe 2 ist dagegen nur die Insertionsstelle in der Konsensussequenz angegeben, da diese ausschließlich aus Sequenzen von zu Klongruppe 1 zugeordneten BAC-Klonen erstellt wurde.

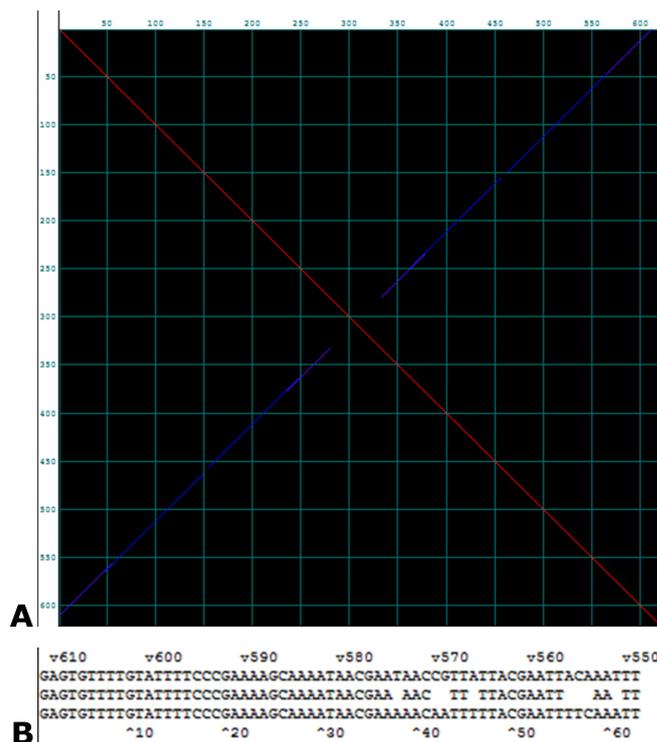


Abbildung 3.30.: Aufbau von I18. A: Dotplot (MegAlign) der I18-Sequenz. Die rote Linie stellt die Übereinstimmung der vollständigen Indel-Sequenz mit sich selbst dar. Die diagonal verlaufenden blauen Linien stellen ein etwa 280 Bp langes IR dar, welches direkt an die «target site»-Duplikation anschließt und welches den Großteil der Sequenz des 620 Bp langen Indels ausmacht. B: Alignment des ersten Sequenzabschnitts des in A gezeigten IR, welcher über 37 Bp eine hundertprozentige Übereinstimmung zeigt.

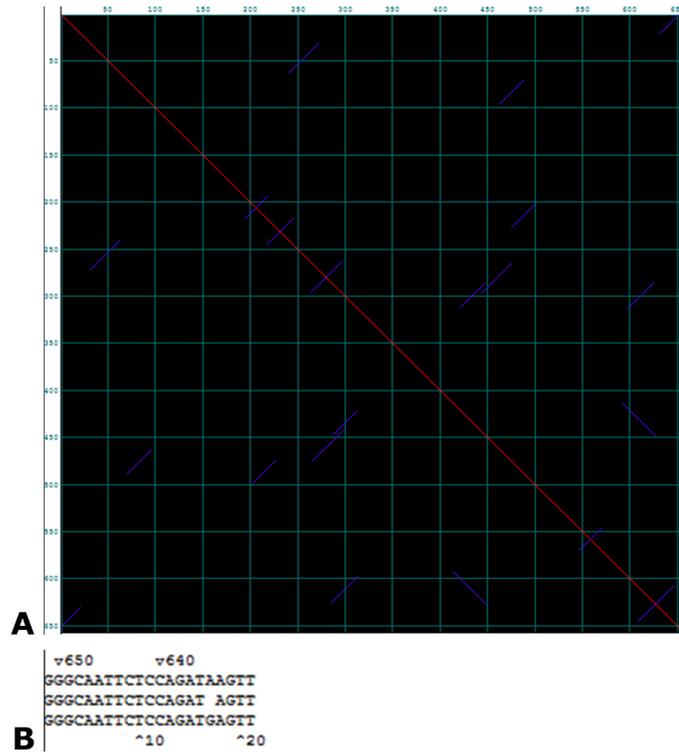


Abbildung 3.31.: Aufbau von I101. A: Dotplot (MegAlign) der I101-Sequenz. Die rote Linie stellt die vollständige Indel-Sequenz dar. Die vielen diagonal verlaufenden blauen Linien zeigen, dass I101 aus vielen kurzen IRs und einem DR (parallel zur roten Linie) besteht. B: Alignment der Sequenzen des an die «target site»-Duplikation anschließenden IR.

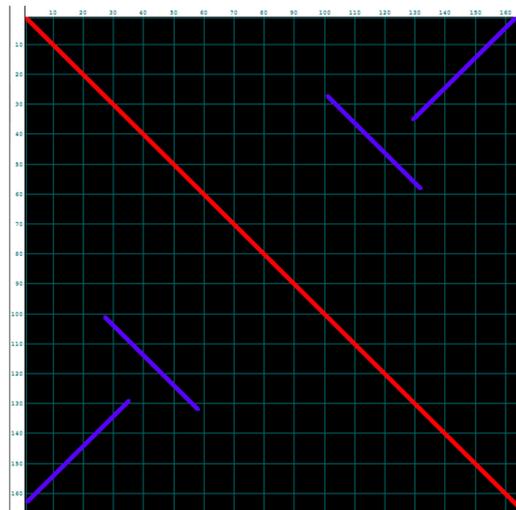


Abbildung 3.32.: Aufbau von I113. Gezeigt ist ein Dotplot (MegAlign) der Indelsequenz. Die rote Linie stellt die Übereinstimmung der vollständigen Indel-Sequenz mit sich selbst dar. Aus den blauen Linien ist ersichtlich, dass I113, welches ein CCE darstellt, ein IR und ein DR enthält.

3. Ergebnisse

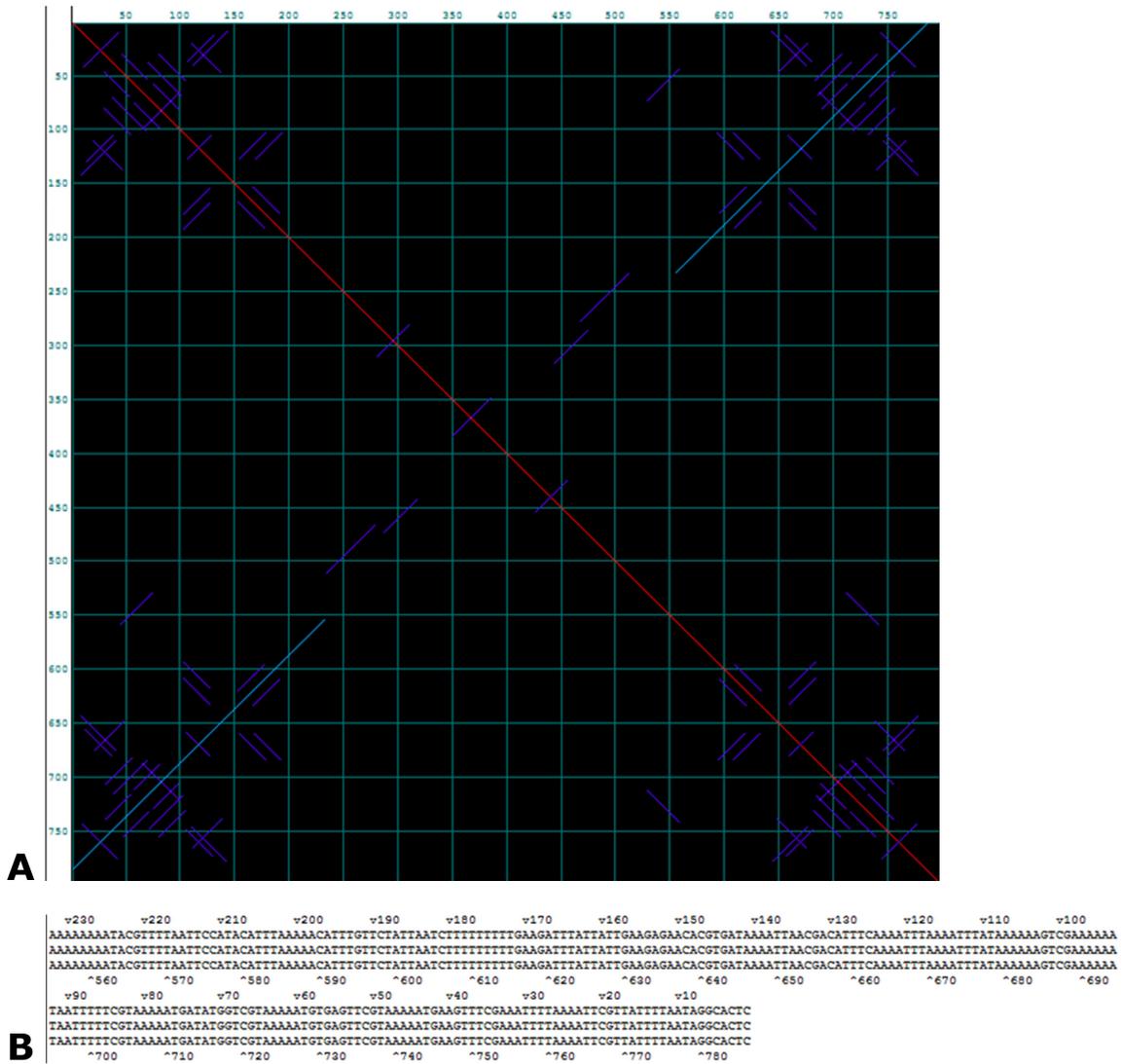


Abbildung 3.33.: Aufbau von I116. A: Dotplot (MegAlign) der I116-Sequenz. Die rote Linie stellt die vollständige Indel-Sequenz dar. Die diagonal verlaufenden hellblauen Linien stellen ein etwa 230 Bp langes terminales IR dar, welches direkt an die «target site»-Duplikation anschließt. Die vielen kurzen blauen Linien stellen verschiedene kurze IRs und DRs dar. B: Alignment der Sequenz des in A gezeigten langen IRs, welches über seine gesamte Länge eine hundertprozentige Übereinstimmung aufweist.

3.3. Geschlechtsspezifische Untersuchungen

In den folgenden Untersuchungen sollte mit Hilfe der identifizierten Indels die Hypothese überprüft werden, ob die BAC-Klone der Klongruppe 1 proto-X-chromosomaler und die der Klongruppe 2 proto-Y-chromosomaler Herkunft sind. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Indels durch PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA untersucht. Deren Ergebnisse sollten, wenn möglich, durch Southern-Hybridisierungen von geschlechtsspezifischer genomischer DNA verifiziert werden. Um auszuschließen, dass es sich bei den Indels nicht um «normale», d. h. nicht geschlechtsgekoppelte Polymorphismen handelt, wurden drei verschiedene *C. riparius*-Stämme verglichen.

3.3.1. PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA

Um zu untersuchen, ob ein oder mehrere der gefundenen Indels spezifisch für das X- oder Y-Chromosom sind, wurden PCRs auf genomische DNA von jeweils zehn verschiedenen männlichen und weiblichen *C. riparius*-Larven durchgeführt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden für die Untersuchung aller Indels jeweils dieselben DNAs verwendet. Hierfür wurden Primer entworfen, die die Indels eng umspannen, um keine unnötig großen Amplifikate zu erzeugen und so mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede auch im Fall der kleineren Indels (17–53 Bp bei I61, I84, I88, I98, I135 und I156) auf Agarosegelen sichtbar machen zu können. Die erwarteten Amplifikatgrößen für proto-X- und proto-Y-chromosomale Sequenzen basieren auf den Sequenzen von Klongruppe 1 bzw. 2 (siehe Tabelle 3.4), wobei für die weiblichen Larven ein Amplifikat (nur proto-X-Chromosom) und für männliche Larven zwei Amplifikate (proto-X- und proto-Y-Chromosom) erwartet wurden. Die Ergebnisse der PCRs auf geschlechtsspezifische genomische DNA entsprechen nur teilweise den Erwartungen. Wie in den Abbildungen 3.34 und 3.35 zu sehen ist, entsprechen im Fall der Indels I84, I98, I100, I101, I113, I116 und I135 die Amplifikatgrößen der für Männchen und Weibchen erzeugten PCR-Produkte denjenigen, die anhand der Sequenzen der beiden Klongruppen vorhergesagt wurden. Allerdings treten teilweise zusätzliche PCR-Produkte auf. Bei den Untersuchungen zu den Indels I114 und I156 konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied gezeigt werden. Im Fall von Indel I114 trat bei Männchen und Weibchen nur das für das proto-Y-Chromosom vorhergesagte Amplifikat auf, im Gegensatz zu Indel I156, für welches sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren nur das für das proto-X-Chromosom vorhergesagte

3. Ergebnisse

Amplifikat nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.37). Die Indels I18, I61 und I88 repräsentieren eine dritte «Gruppe» von Indels, da in diesen Fällen weder die Vorhersagen bestätigt wurden noch nur die vorhergesagten Amplifikate auftraten. Die Ergebnisse der für diese Indels durchgeführten PCRs sind uneinheitlich. Für I61 konnten in Weibchen sowohl nur das «X»-Amplifikat als auch beide Amplifikate, in Männchen hingegen sowohl nur das «Y»-Amplifikat als auch ebenfalls beide Amplifikate nachgewiesen werden. Im Fall von I88 ist das Ergebnis noch stärker polymorph. In weiblichen Tieren traten nur das «X»- bzw. nur das «Y»-Amplifikat, aber auch beide Amplifikate auf. In männlichen Tieren verhielt es sich ähnlich, mit dem Unterschied, dass bei keinem Tier nur das für das proto-X-Chromosom vorhergesagte PCR-Produkt auftrat. Ebenso weichen auch die Ergebnisse der PCR für I18 deutlich von den Vorhersagen ab. Hier konnte nur in einem Teil der Weibchen überhaupt das «X»-Amplifikat nachgewiesen werden, die übrigen zeigten nur das «Y»-Amplifikat. Dagegen trat in allen Männchen nur das für das proto-Y-Chromosom vorhergesagte Amplifikat auf (siehe Abbildung 3.36). Die Ergebnisse der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA legen nahe, dass nicht alle Unterschiede zwischen den beiden Klongruppen auf spezifische Unterschiede zwischen dem X- und Y-Chromosom zurückzuführen sind, da bei fünf von zwölf Indels keine Geschlechtsspezifität durch PCR nachgewiesen werden konnte (siehe Tabelle 3.4).

Indel	erwartete Amplifikatgrößen (Bp)		Ergebnis
	X	Y	
I18	779	139	Polymorph
I61	138	175	Polymorph
I84	160	143	Vorhersage bestätigt
I88	114	167	Polymorph
I98	201	166	Vorhersage bestätigt
I100	1101	882	Vorhersage bestätigt
I101	1058	1713	Vorhersage bestätigt; zusätzl. Amplifikat
I113	470	304	Vorhersage bestätigt; zusätzl. Amplifikate
I114	243	358	Kein geschlechtsspezifischer Unterschied
I116	1168	374	Vorhersage bestätigt
I135	118	143	Vorhersage bestätigt; zusätzl. Amplifikat
I156	125	106	Kein geschlechtsspezifischer Unterschied

Tabelle 3.4.: PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA. Gezeigt sind für alle Indels die jeweils anhand von Vorhersagen aus den Sequenzen der Klongruppen erwarteten Amplifikatgrößen für X- und Y-Chromosom und die jeweiligen Ergebnisse der PCRs. X = Klongruppe 1; Y = Klongruppe 2. Vorhersage bestätigt bedeutet: Weibchen: vorhergesagtes X-Amplifikat; Männchen: vorhergesagte X- und Y-Amplifikate. Polymorph bedeutet: kein durchgängig einheitliches Ergebnis für jeweils alle Weibchen und Männchen; X- und Y-Amplifikate bei Weibchen und Männchen; variierende Amplifikatanzahl.

3.3. Geschlechtsspezifische Untersuchungen

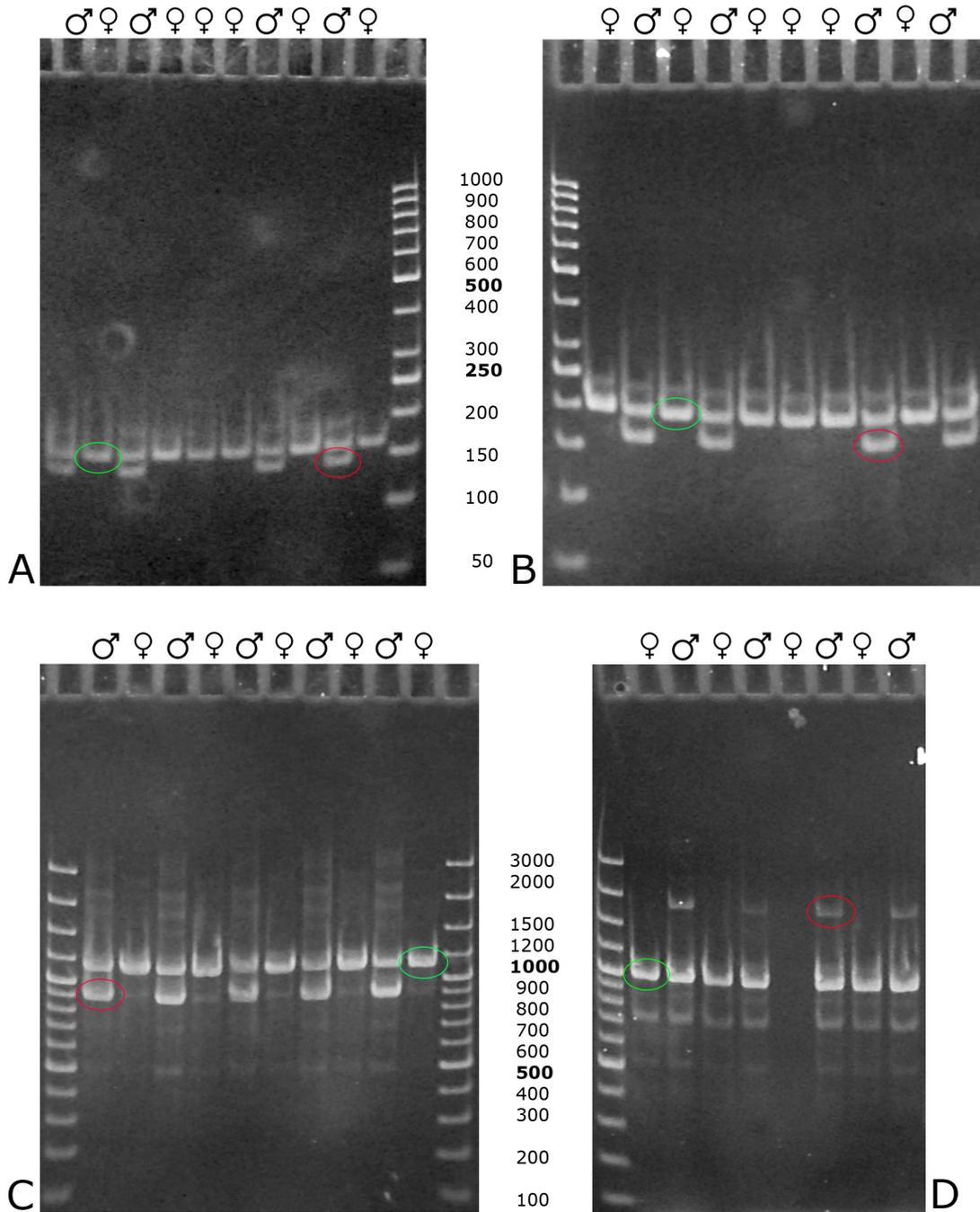


Abbildung 3.34.: PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA für I84, I98, I100 und I101. Gezeigt sind Gelbilder der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte. In Grün sind exemplarisch die für das proto-X-Chromosom vorhergesagten Amplifikatbanden, in Rot die für das proto-Y-Chromosom vorhergesagten Amplifikatbanden markiert. Für die gezeigten vier Indels stimmen die Ergebnisse bei Weibchen und Männchen mit den von den beiden Klongruppen ausgehenden Vorhersagen überein. A: I84, B: I98, C: I100, D: I101. Als Molekulargewichtsstandards dienten der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus und der Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).

3. Ergebnisse

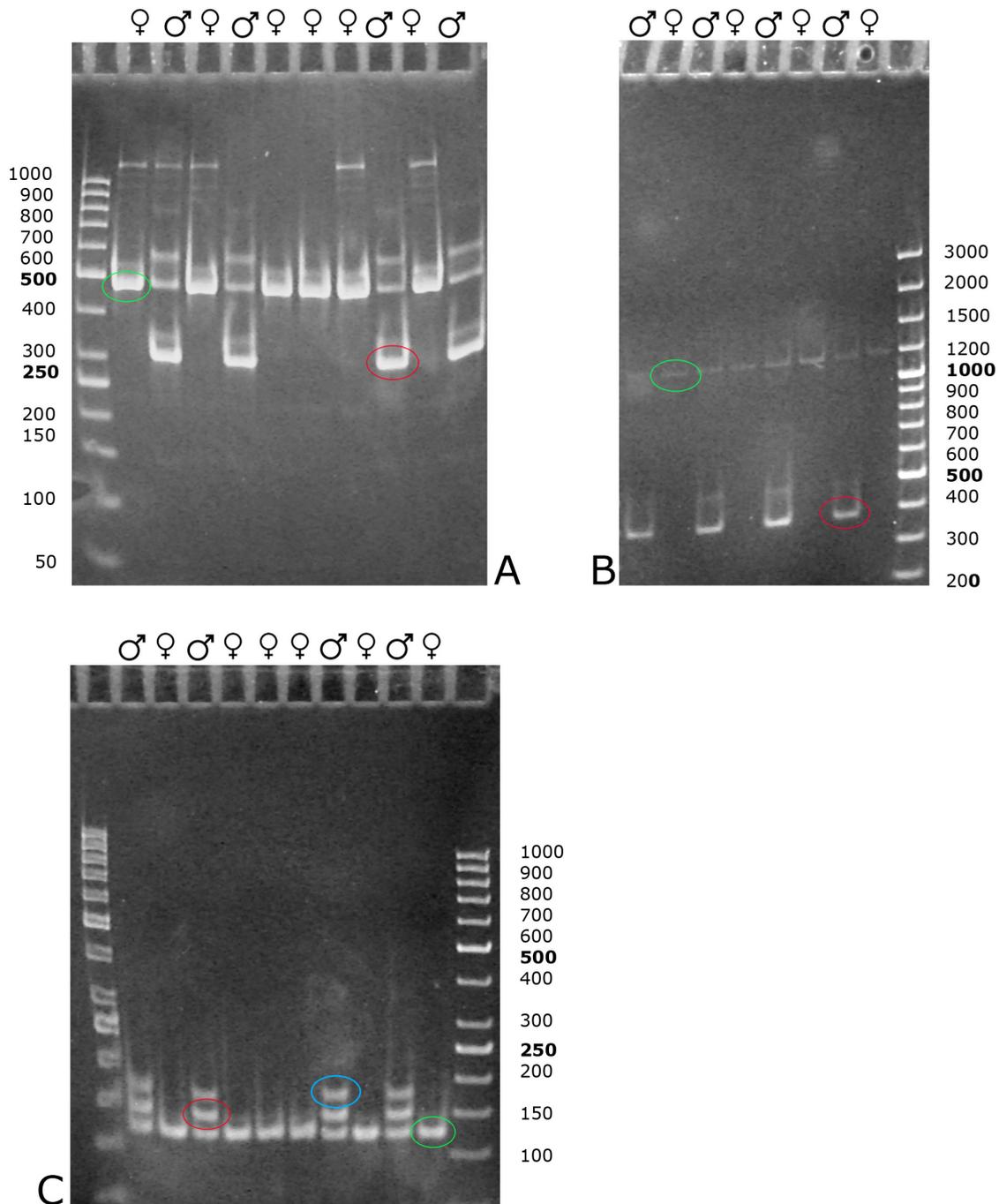


Abbildung 3.35.: PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA für I113, I116 und I135. Gezeigt sind Gelbilder der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte. In Grün sind exemplarisch die für das proto-X-Chromosom vorhergesagten Amplifikatbanden, in Rot die für das proto-Y-Chromosom vorhergesagten Amplifikatbanden markiert. Für die gezeigten drei Indels stimmen die Ergebnisse bei Weibchen und Männchen mit den von den beiden Klongruppen ausgehenden Vorhersagen überein, wobei für I135 bei Männchen eine zusätzliche dritte Bande auftritt, welches in Blau markiert ist. A: I113, B: I116, C: I135. Als Molekulargewichtsstandards wurden der Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder Plus und der Gene RulerTM 50 bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

3.3. Geschlechtsspezifische Untersuchungen

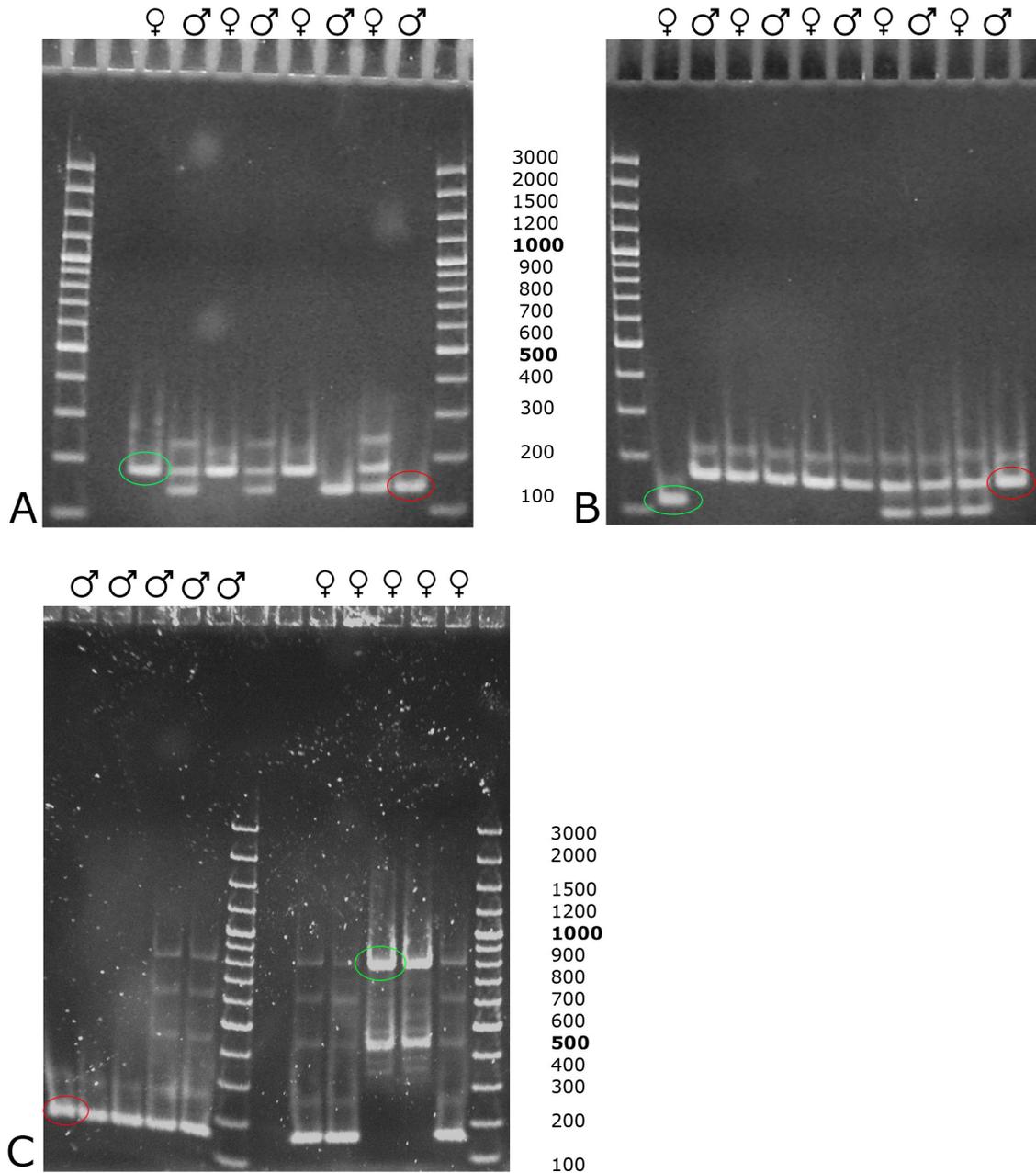


Abbildung 3.36.: PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA für I61, I88 und I18. Gezeigt sind Gelbilder der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte. In Grün sind exemplarisch die für das proto-X-Chromosom vorhergesagten Amplifikatbanden, in Rot die für das proto-Y-Chromosom vorhergesagten Amplifikatbanden markiert. Im Fall der Indels I18, I61 und I88 zeigt die PCR ein polymorphes Ergebnis, welches nicht oder nur teilweise mit den Vorhersagen übereinstimmt. Für I18 konnte in Männchen nur das «Y»-Amplifikat und demnach nur ein Allel nachgewiesen werden. Bei den Weibchen gibt es Individuen, die für dieses Indel nur das «Y»-Amplifikat zeigen und andere, für die das «X»-Amplifikat und ein weiteres Allel nachgewiesen werden konnte. Für I61 zeigen Weibchen das «X»-Amplifikat, wohingegen bei Männchen teilweise nur das «Y»-Allel vorkommt. Für I88 konnte geschlechtsunspezifisch nur in wenigen Individuen das «X»-Amplifikat, jedoch in fast allen Tieren das «Y»-Amplifikat nachgewiesen werden. A: I61, B: I88, C: I18. Als Molekulargewichtsstandard diente der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot).

3. Ergebnisse

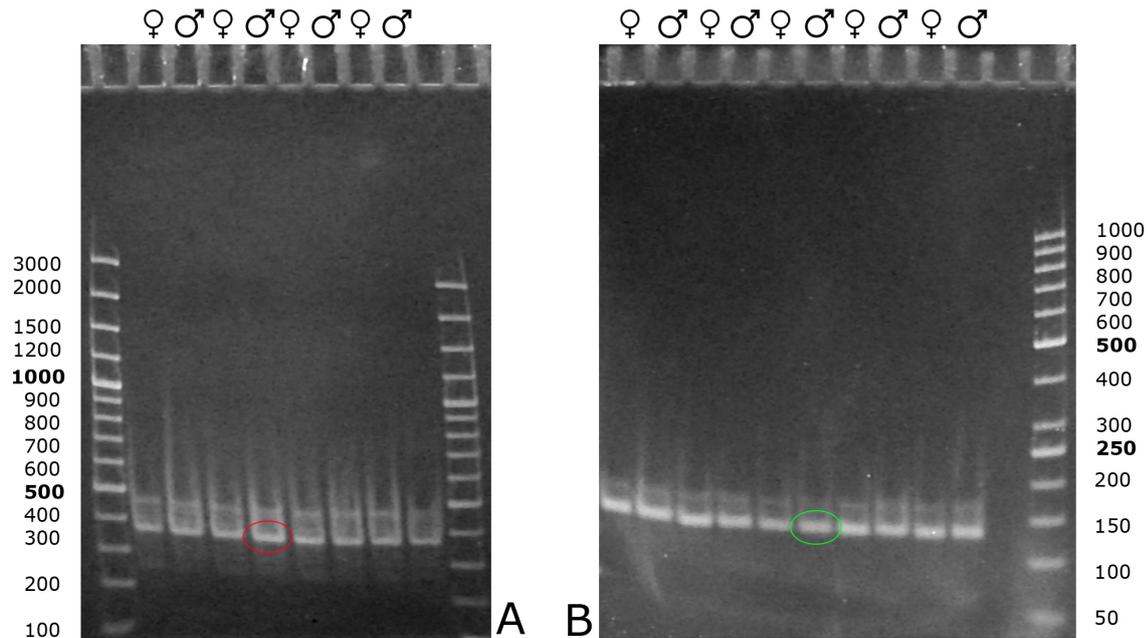


Abbildung 3.37.: PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA für I114 und I156. Gezeigt sind Gelbilder der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte. In Grün sind exemplarisch die für das proto-X-Chromosom vorhergesagten Amplifikatbanden, in Rot die für das proto-Y-Chromosom vorhergesagten Amplifikatbanden markiert. Im Fall der Indels I114 und I156 konnten mithilfe der PCR keine geschlechtsspezifischen Unterschiede detektiert werden. Stattdessen konnte in beiden Geschlechtern für I114 nur das für das proto-Y-Chromosom vorhergesagte Amplifikat und für I156 nur das für das proto-X-Chromosom vorhergesagte Amplifikat nachgewiesen werden. A: I114, B: I156. Als Molekulargewichtsstandards dienten der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus und der Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).

3.3.2. Southern-Hybridisierung von geschlechtsspezifischer genomischer DNA

Zur Verifizierung der Ergebnisse der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA für die Indels I84, I98, I100, I101, I113 und I116 wurden Southern-Hybridisierungen mit geschlechtsspezifischer genomischer DNA durchgeführt. Dazu wurden die Indel-Sequenzen nach zusätzlichen Restriktionsschnittstellen durchsucht. Da sich in der Sequenz von I135 (25 Bp) keinerlei Restriktionsschnittstellen befinden, konnte dieses Indel nicht in diese Analysen einbezogen werden. Im Fall der übrigen sechs Indels wurden Restriktionssenzyme ausgewählt, die eine zusätzliche Schnittstelle innerhalb des Indels aufweisen und gleichzeitig leicht nachweisbare Restriktionsfragmente erzeugen (siehe Tabelle 3.5). Die durch die «Insertion» zusätzlich auftretenden Restriktionsfragmente sollten bei der Hybridisierung eindeutig von den übrigen Fragmenten zu

3.3. Geschlechtsspezifische Untersuchungen

Indel	Enzym	Fragmente X	Fragmente Y	Sonde	Ergebnis
I84	<i>DraI</i>	339 + 671 Bp	993 Bp	I84 F	PCR bestätigt
I98	<i>HinfI</i>	729 + 361 Bp	1055 Bp	I98 F	PCR nicht bestätigt
I100	<i>Sau96I</i>	5360 + 1649 Bp	6790 Bp	I100 F	Sonde repetitiv
I101	<i>HindIII</i>	6054 Bp	885 + 5824 Bp	I101 M	Sonde repetitiv
I113	<i>Sau96I</i>	1715 + 5644 Bp	2614 + 5644 Bp	LUC7	Polymorph
I116	<i>HindIII</i>	3380 Bp	4786 Bp	LUC7	PCR nicht bestätigt

Tabelle 3.5.: Southern-Hybridisierung von geschlechtsspezifischer genomischer DNA. Gezeigt sind die verwendeten Restriktionsendonukleasen, die im jeweiligen Indel eine zusätzliche Schnittstelle aufweisen sowie die Größen der erwarteten Restriktionsfragmente vom proto-X- bzw. proto-Y-Chromosom, die mit der verwendeten Sonde hybridisieren sollten. Als Hybridisierungssonden wurden die PCR-Produkte der geschlechtsspezifischen genomischen PCR eingesetzt, die die zusätzliche DNA-Sequenz enthielten (F = Weibchen/X; M = Männchen/Y) bzw. ein PCR-Produkt aus dem Genbereich von *LUC7* (I113 + I116), welches schon zum Screening von BAC-Bibliotheken verwendet wurde.

unterscheiden sein. Außerdem sollten die zu vergleichenden Fragmente nicht zu klein sein (< 100 Bp), um eine ausreichende DNA-Menge zur Erzeugung eines Signals auf dem Autoradiogramm zu gewährleisten. Zur Restriktion wurde die genomische DNA von jeweils 20–30 Männchen bzw. Weibchen eingesetzt oder die DNA von mehreren einzelnen Tieren. Als Hybridisierungssonden wurden nach Möglichkeit «single copy»-Sonden aus Genbereichen und ansonsten die Amplifikate aus der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA, die die zusätzliche DNA-Sequenz enthalten, verwendet. In Tabelle 3.5 sind die für die Untersuchung des jeweiligen Indels verwendeten Restriktionsenzyme und Hybridisierungssonden sowie Anzahl und Größe der erwarteten hybridisierenden Restriktionsfragmente und die Ergebnisse der Southern-Hybridisierungen im Vergleich zur PCR zusammengefasst.

Wie in Abbildung 3.38 A zu sehen ist, konnte für Indel I84 das Ergebnis der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA verifiziert werden. Alle anhand der Sequenz vorhergesagten und erwarteten Restriktionsfragmente (zwei im Weibchen und drei im Männchen) hybridisieren mit der Sonde. Im Gegensatz dazu zeigt die Southern-Hybridisierung auf geschlechtsspezifische genomische DNA für I98 keinen Unterschied zwischen Männchen und Weibchen. Hier hybridisieren sowohl im Weibchen als auch im Männchen lediglich die beiden für das proto-X-Chromosom erwarteten Restriktionsfragmente mit der Hybridisierungssonde, während das für das proto-Y-Chromosom erwartete Fragment mit einer Größe von 1055 Bp beim Männchen fehlt (siehe Abbildung 3.38 B). Die Southern-Hybridisierung konnte für I116 ebenfalls nicht das Ergebnis der PCR bestätigen. Hier treten die für proto-X- und proto-Y-Chromosom vorhergesagten hybridisierenden Restriktionsfragmente geschlechtsun-

3. Ergebnisse

spezifisch auf und unterscheiden sich dabei in Männchen und Weibchen lediglich in der Signalstärke. Im Männchen hybridisiert das «Y»-Fragment (4786 Bp) stärker, im Weibchen dagegen das «X»-Fragment (3380 Bp; siehe Abbildung 3.38 C). Im Fall von I113 wurde sowohl «gepoolte» DNA als auch DNA von einzelnen Larven restringiert und hybridisiert. Die Southern-Analyse zeigt unterschiedliche sowie auch von der PCR abweichende Ergebnisse (siehe Abbildung 3.39). Dabei entsprechen die Ergebnisse weder bei Männchen noch bei Weibchen den Erwartungen, und die Ergebnisse der Hybridisierung von «gepoolter» DNA stimmen nicht mit den Ergebnissen der Einzellarven-Hybridisierungen überein. Erwartet waren zwei hybridisierende Restriktionsfragmente beim Weibchen und drei beim Männchen. Stattdessen treten beim Weibchen fünf Hybridisierungssignale auf, wovon zwei den für proto-X- (1715 Bp) und proto-Y-Chromosom (2614 Bp) erwarteten Restriktionsfragmenten und eins dem erwarteten geschlechtsunspezifischen Fragment (5644 Bp) entspricht (siehe Abbildung 3.39 A). Die Herkunft der zwei zusätzlichen Signale ist unbekannt. In Abbildung 3.39 B ist zu sehen, dass eins dieser Signale bei den Einzellarven-Hybridisierungen fehlt. Beim Männchen zeigen sich drei Hybridisierungssignale, wovon eins das erwartete «Y»-Fragment, ein weiteres das geschlechtsunspezifische Restriktionsfragment und das dritte ein Signal unbekannter Herkunft darstellt. Dieses Signal tritt bei den Einzellarven-Hybridisierungen nicht bei allen Männchen auf. Das erwartete «X»-Fragment fehlt beim Männchen bei beiden Hybridisierungen (siehe Abbildung 3.39 A und B). Im Fall von I100 und I101 waren die Hybridisierungen nicht aussagekräftig, da sich beide verwendeten Sonden als repetitiv herausstellten und keine geeigneten «single copy»-Sonden im untersuchten Bereich zu finden waren.

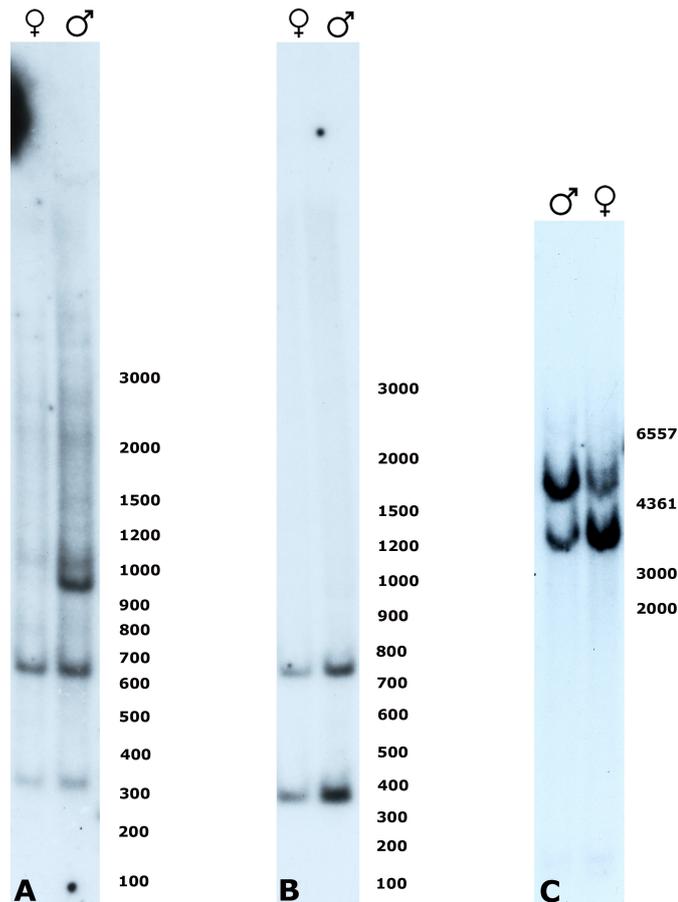


Abbildung 3.38.: Southern-Hybridisierung von geschlechtsspezifischer genomischer DNA für I84, I98 und I116. Dargestellt sind die Autoradiogramme der Southern-Hybridisierungen. **A:** I84, Expositionszeit 70 h. Das Ergebnis entspricht der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA und zeigt den erwarteten Unterschied zwischen Männchen und Weibchen mit einer zusätzlichen hybridisierenden Bande (993 Bp) beim Männchen. **B:** I98, Expositionszeit 70 h. In der Southern-Hybridisierung zeigt sich im Gegensatz zur PCR kein geschlechtsspezifischer Unterschied, da die erwartete zusätzliche Bande beim Männchen (1055 Bp) fehlt. **C:** I116, Expositionszeit 18 h. Das Ergebnis der PCR konnte nicht bestätigt werden, da die Hybridisierungssignale geschlechtsunspezifisch auftreten. Die jeweils für proto-X- und proto-Y-Chromosom erwarteten Restriktionsfragmente unterscheiden sich lediglich in der Signalstärke, wobei im Männchen das «Y»-Fragment (4786 Bp), im Weibchen dagegen das «X»-Fragment (3380 Bp) stärker hybridisiert.

3. Ergebnisse

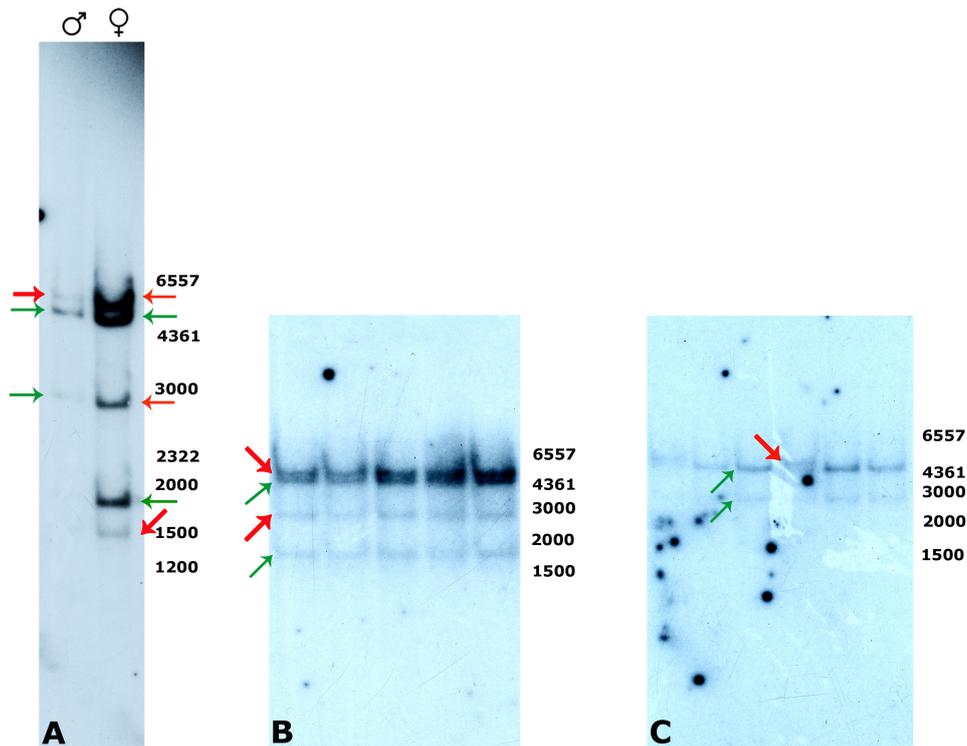


Abbildung 3.39.: Southern-Hybridisierung von geschlechtsspezifischer genomischer DNA für I113. Dargestellt sind die Autoradiogramme der Southern-Hybridisierung einerseits mit «gepoolter» DNA und andererseits mit DNA von einzelnen Larven. **A:** «gepoolte» DNA, Expositionszeit: 3 Tage; **B:** Einzellarven Weibchen, Expositionszeit: 12 Tage; **C:** Einzellarven Männchen, Expositionszeit: 12 Tage. Grüne Pfeile markieren erwartete Hybridisierungssignale, rote Pfeile markieren zusätzliche Signale.

3.3.3. PCR auf stammspezifische genomische DNA

Bezeichnung	Erläuterung	in Zucht seit
K12	ältester Laborstamm; Käfig 12	ca. 30 Jahren
KPBa	Wildfang	2008
DÜW	Wildfang	2009

Tabelle 3.6.: Verwendete *C. riparius*-Stämme

Die Tatsache, dass sich die Ergebnisse von PCR und Southern-Hybridisierung mit geschlechtsspezifischer genomischer DNA teilweise widersprechen, könnte dadurch erklärt werden, dass die Indels möglicherweise stammspezifisch sind. Dafür spricht, dass zur Isolierung der für die Southern-Hybridisierung von geschlechtsspezifischer genomischer DNA eingesetzte «gepoolte» DNA *C. riparius*-Larven verschiedener Laborstämme verwendet wurden. Aus diesem Grund wurden bezüglich der Indels drei ver-

schiedene *C. riparius*-Stämme verglichen, unter anderem der älteste Laborstamm, der auch zur Konstruktion der BAC-Bibliotheken diente und für die PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA eingesetzt wurde (siehe Tabelle 3.6). Mit genomischer DNA von jeweils zehn Weibchen und zehn Männchen aus jedem Stamm wurden die PCRs wiederholt. Die Ergebnisse des ältesten Stamms (K12) entsprechen den bisherigen der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA, wohingegen die der Stämme, die sich erst seit 2008 bzw. 2009 in Zucht befinden, davon abweichen. Die Ergebnisse der PCR auf stammspezifische genomische DNA sind in den Abbildungen 3.40 bis 3.45 gezeigt.

Für den Stamm K12 konnte das Ergebnis der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA mit einem Amplifikat bei Weibchen und zwei beim Männchen für vier von sechs Indels bestätigt werden. Für das Indel I113 konnte durch die PCR auf stammspezifische genomische DNA das für das proto-Y-Chromosom vorhergesagte PCR-Produkt (304 Bp; «Y»-Amplifikat) auch im Weibchen nachgewiesen werden, wohingegen das für das proto-X-Chromosom vorhergesagte PCR-Produkt (470 Bp; «X»-Amplifikat) bei Männchen teilweise fehlt (siehe Abbildung 3.44). Im Fall von I116 ist in Weibchen und einigen Männchen entgegen den Erwartungen nur das «Y»-Amplifikat (374 Bp) nachweisbar, während in einigen Männchen nur das «X»-Amplifikat (1168 Bp) zusammen mit zusätzlichen PCR-Produkten auftritt (siehe Abbildung 3.45). Die Ergebnisse der beiden jüngeren Stämme fallen für die verschiedenen Indels sehr unterschiedlich aus, wobei in keinem Fall die Ergebnisse der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA zuverlässig und eindeutig bestätigt werden konnten. Für I84 konnte in allen untersuchten Individuen beider Stämme das «X»-Amplifikat (160 Bp) nachgewiesen werden, wohingegen sich das «Y»-Amplifikat (143 Bp) nur in einem Weibchen des Stamms KPBa zeigt (siehe Abbildung 3.40). Im Fall von I98 tritt das «X»-Amplifikat (201 Bp) in allen untersuchten Individuen beider Stämme auf. Das «Y»-Amplifikat (166 Bp) konnte in einigen Weibchen beider Stämme und einigen Männchen des Stamms DÜW, nicht aber in Männchen des Stamms KPBa nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.41). Für I100 zeigen Männchen und Weibchen der Stämme KPBa und DÜW wie erwartet das «X»-Amplifikat (1101 Bp), doch das zusätzliche «Y»-Amplifikat (882 Bp) tritt nicht bei allen Männchen auf (siehe Abbildung 3.42). Bei der PCR für I101 tritt in Tieren des Stamms KPBa sowie Männchen des Stamms DÜW durchweg nur das «X»-Amplifikat (1058 Bp) auf, während das «Y»-Amplifikat (1713 Bp) fehlt. Für Weibchen des Stamms DÜW konnte auch nach mehrfacher Wiederholung und Veränderung der Versuchsbedingungen kein PCR-Produkt nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.43). Im Fall von I113 fallen

3. Ergebnisse

die Ergebnisse sehr unterschiedlich aus. So zeigen sowohl Männchen als auch Weibchen des Stamms KPBa grundsätzlich nur das «X»-Amplifikat (470 Bp), wohingegen in allen untersuchten Weibchen des Stamms DÜW zusätzlich das «Y»-Amplifikat (304 Bp) auftritt. In Männchen des Stamms DÜW ist durchweg das «Y»-Amplifikat nachweisbar, während in einigen das «X»-Amplifikat fehlt, jedoch viele zusätzliche PCR-Produkte auftreten (siehe Abbildung 3.44). Abbildung 3.45 zeigt, dass für I116 in allen untersuchten Tieren der Stämme KPBa und DÜW nur das «Y»-Amplifikat (374 Bp) nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse aller PCRs auf stammsspezifische genomische DNA sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst. Um auszuschließen, dass es sich bei den von den Erwartungen abweichenden Ergebnissen um eine Verwechslung der Geschlechter handelt, wurden zusätzlich zu den «Indel-PCRs» mit denselben DNAs der drei Stämme weitere PCRs durchgeführt, für die eindeutige geschlechtsspezifische Ergebnisse erwartet wurden. Mit Hilfe eines im Rahmen einer Diplomarbeit (Stiehl 2009) identifizierten, kurzen männchenspezifischen Sequenzabschnitts wurde ein Primerpaar für eine PCR so gewählt, dass nur im Männchen ein Amplifikat entstehen konnte. Hier wurden die Erwartungen mit einem Amplifikat im Männchen und keinem im Weibchen bestätigt (nicht gezeigt), was bedeutet, dass die Geschlechter in allen Fällen korrekt bestimmt waren.

	K12	KPBa	DÜW
I84	W: «X» M: «X» + «Y»	W: «X» M: «X»	W: «X» M: «X»
I98	W: «X» M: «X» + «Y»	W: «X» + teilweise «Y» M: «X»	W: «X» + teilweise «Y» M: «X» + teilweise «Y»
I100	W: «X» M: «X» + «Y»	W: «X» M: «X» + teilweise «Y»	W: «X» M: «X» + teilweise «Y»
I101	W: «X» M: «X» + «Y»	W: «X» M: «X»	W: «X» M: «X» + teilweise «Y»
I113	W: «X» + teilweise «Y» M: «Y» + teilweise «X»	W: «X» M: «X»	W: «X» + «Y» M: «Y» + teilweise «X»
I116	W: «Y» M: «X» oder «Y»	W: «Y» M: «Y»	W: «Y» M: «Y»

Tabelle 3.7.: Übersicht Stammvergleich. Aufgelistet sind die Ergebnisse aller PCRs auf stammsspezifische genomische DNA. W: Weibchen; M: Männchen; «X»: für das proto-X-Chromosom vorgesehntes PCR-Produkt («X»-Amplifikat); «Y»: für das proto-Y-Chromosom vorgesehntes PCR-Produkt («Y»-Amplifikat)

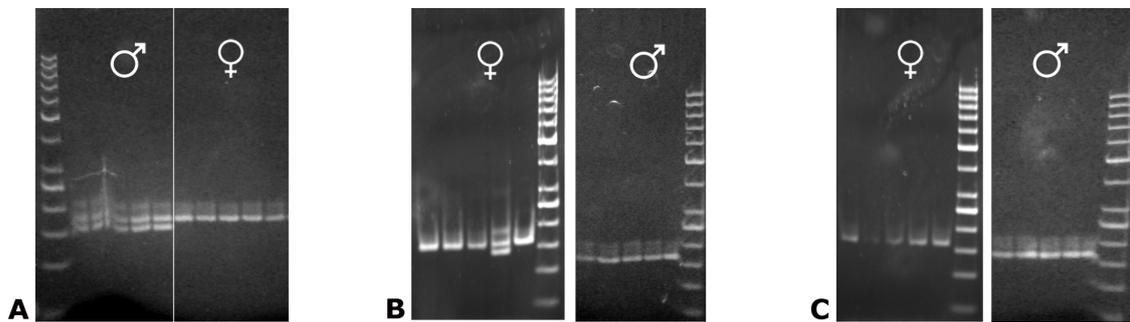


Abbildung 3.40.: Stammvergleich für I84. Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der drei verschiedenen *C. riparius*-Stämme. Für K12 konnte das Ergebnis der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA mit einem Amplifikat bei Weibchen und zwei beim Männchen bestätigt werden, für KPBa und DÜW nicht. Bei den Tieren des Stamms KPBa zeigt sich beim Männchen durchweg nur das «X»-Amplifikat, wohingegen ein Weibchen zusätzlich zu diesem das «Y»-Amplifikat aufweist. Beim Stamm DÜW tritt grundsätzlich nur das «X»-Amplifikat auf. A: K12; B: KPBa; C: DÜW. Als Molekulargewichtsstandard diente der Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).

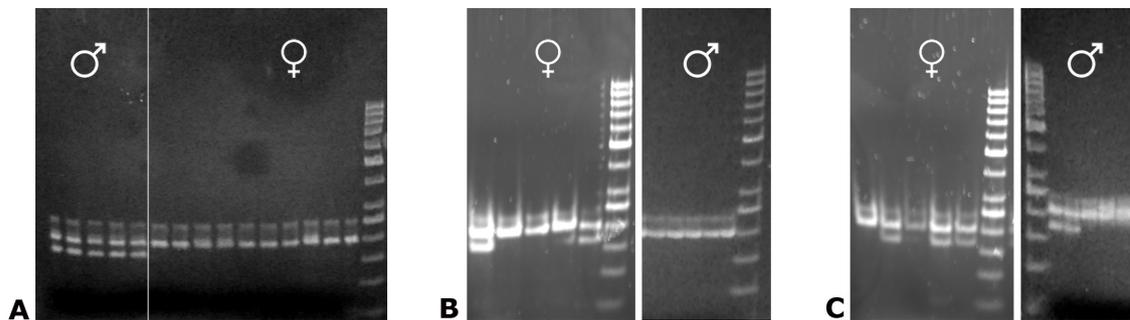


Abbildung 3.41.: Stammvergleich für I98. Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der drei verschiedenen *C. riparius*-Stämme. Für K12 konnte das Ergebnis der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA mit einem Amplifikat bei Weibchen und zwei beim Männchen bestätigt werden, für KPBa und DÜW fällt das Ergebnis polymorph aus. Männchen des Stamms KPBa zeigen ausschließlich das «X»-Amplifikat, wohingegen in einigen Weibchen zusätzlich auch das «Y»-Amplifikat auftritt. Beim Stamm DÜW zeigen geschlechtsunspezifisch einige Individuen nur das «X»-Amplifikat, andere beide Amplifikate. A: K12; B: KPBa; C: DÜW. Als Molekulargewichtsstandards dienten der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus und der Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot).

3. Ergebnisse

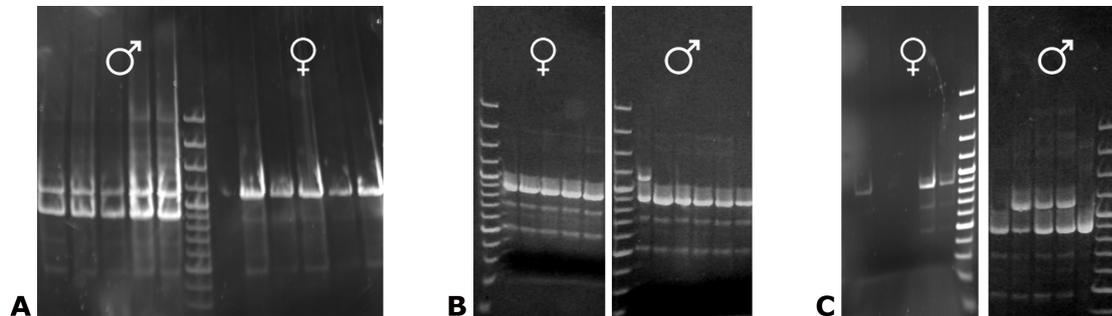


Abbildung 3.42.: Stammvergleich für I100. Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der drei verschiedenen *C. riparius*-Stämme. Für K12 konnte das Ergebnis der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA mit einem Amplifikat bei Weibchen und zwei beim Männchen bestätigt werden, für KPBa und DÜW weicht das Ergebnis in einigen Fällen ab. Männchen und Weibchen der Stämme KPBa und DÜW zeigen wie erwartet das «X»-Amplifikat, doch das zusätzliche «Y»-Amplifikat tritt nicht bei allen Männchen auf. A: K12; B: KPBa; C: DÜW. Als Molekulargewichtsstandard diente der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot).

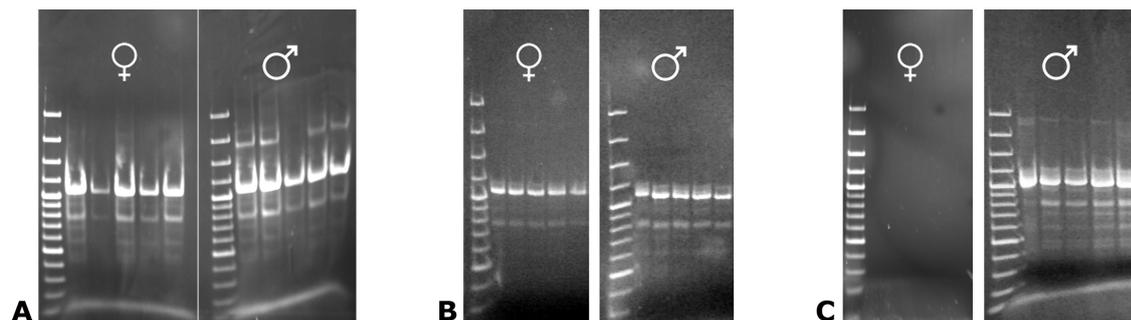


Abbildung 3.43.: Stammvergleich für I101. Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der drei verschiedenen *C. riparius*-Stämme. Für K12 konnte das Ergebnis der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA mit einem Amplifikat bei Weibchen und zwei beim Männchen bestätigt werden, für KPBa und DÜW nicht. Tiere des Stamms KPBa sowie Männchen des Stamms DÜW zeigen durchweg nur das «X»-Amplifikat. Für Weibchen des Stamms DÜW konnte auch nach mehrfacher Wiederholung kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. A: K12; B: KPBa; C: DÜW. Als Molekulargewichtsstandard diente der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot).

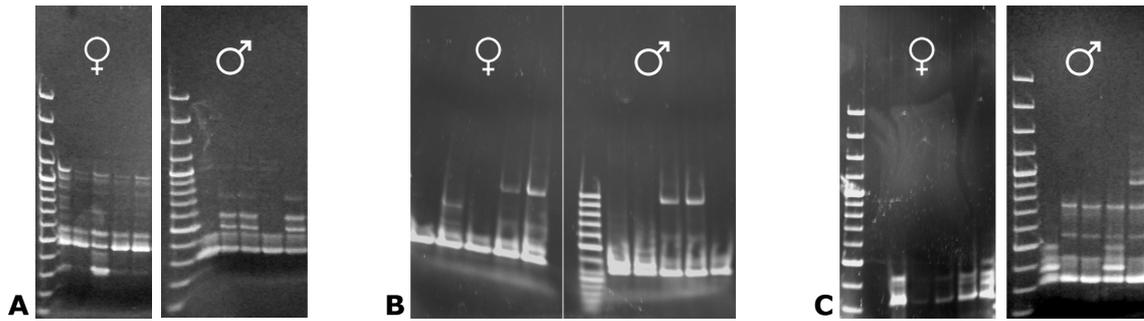


Abbildung 3.44.: Stammvergleich für I113. Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der drei verschiedenen *C. riparius*-Stämme. Die Ergebnisse fallen bei den Stämmen K12 und DÜW polymorph aus, was bedeutet, dass «X»- und «Y»-Amplifikat sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen auftreten können und bei Männchen teilweise das «X»-Amplifikat fehlt. Für den Stamm KPBa konnte nur das «X»-Amplifikat nachgewiesen werden. A: K12; B: KPBa; C: DÜW. Als Molekulargewichtsstandard diente der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot).

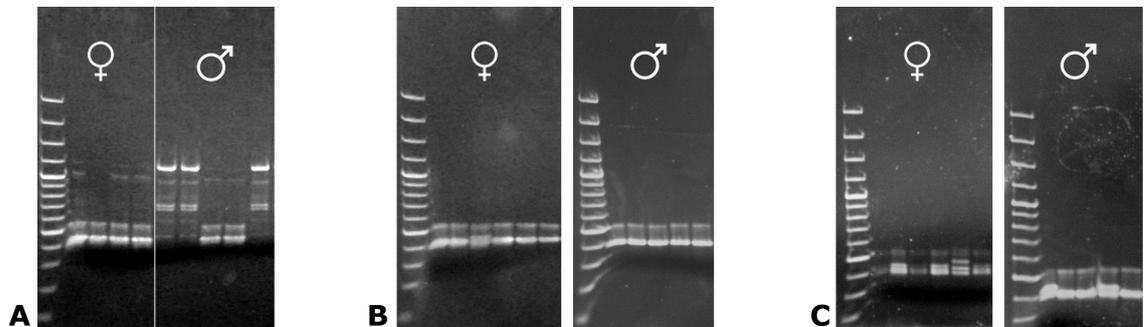


Abbildung 3.45.: Stammvergleich für I116. Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte der drei verschiedenen *C. riparius*-Stämme. Für keinen Stamm konnte das Ergebnis der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA bestätigt werden. Weibchen des Stamms K12 und Tiere der Stämme KPBa und DÜW zeigen durchweg nur das «Y»-Amplifikat, während in K12-Männchen entweder das «X»- oder das «Y»-Amplifikat auftritt. A: K12; B: KPBa; C: DÜW. Als Molekulargewichtsstandard diente der Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot).

Die Ergebnisse der PCR auf stammspezifische genomische DNA deuten darauf hin, dass die beim Vergleich der im «Skimming» ermittelten Klongruppen (siehe Kapitel 3.2) identifizierten Indels nicht stammspezifisch sind, da bei den beiden jüngeren *C. riparius*-Stämmen KPBa und DÜW in keinem Fall das Ergebnis der geschlechtsspezifischen PCR bestätigt werden konnte. Dagegen sind allem Anschein nach die Indels I84, I98, I100 und I101 für den ältesten Laborstamm K12 stammspezifisch geschlechtsspezifisch, da in diesen Fällen die Ergebnisse der PCR auf stammspezifische genomische DNA mit denen der PCR auf geschlechtsspezifische genomische DNA übereinstimmen.

4. Diskussion

4.1. Die Gene in der SDR als mögliche Kandidaten für *M*

Unter den in der SDR durch bioinformatische Analysen gefundenen Genen befindet sich keines, das aus Geschlechtsbestimmungskaskaden anderer Insekten wie z. B. *Drosophila* bekannt ist. Zudem wurde für keines der gefundenen Gene eine eindeutige Funktion in der Geschlechtsdetermination beschrieben. Der größte Anteil der Gene hat allgemein benötigte Funktionen in der Zelldifferenzierung (*spitz*, *mi-er1*), Mitose (*CENP-E*), RNA-Prozessierung (*LUC7*), Ribosomenaufbau (*rpS5*), Oxidations- und Reduktionsprozessen in der Zelle (*bcn92* und *d-Laktat-DH*), was eine Beteiligung an der Geschlechtsbestimmung unwahrscheinlich macht. Daneben wurden jedoch drei Gene gefunden, für die geschlechtsspezifische Funktionen in verschiedenen Entwicklungsprozessen beschrieben wurden: *female sterile(1)K10-like*, *polyhomeotic-like* und *rpn5-like*. Diese drei Gene könnten möglicherweise Kandidaten für *M* sein oder mit *M* in Beziehung stehen.

4.1.1. *fs(1)K10-like*

Die Expression des Gens *fs(1)K10* wird in der frühen Oogenese von *Drosophila* für die Etablierung der dorsoventralen Polarität der Oozyte und später des Embryos benötigt. Hierbei ist die Transkription nicht nur spezifisch für die Keimbahn, sondern außerdem zellspezifisch, da sie auf den Oozyten-Nukleus beschränkt ist. Die Expression findet in den Ovarien adulter Weibchen ab Stadium fünf der Oogenese (King 1970) in der Zelle statt, die später zur Oozyte wird. Damit ist *fs(1)K10* eines der ersten als Resultat der Oozytendifferenzierung exprimierten Gene. Aus diesem Grund wird

4. Diskussion

eine Funktion in der Aktivierung bzw. Regulation von verschiedenen Genen, die in der Entwicklung der dorsoventralen Achse eine Rolle spielen, erwogen (Haenlin et al. 1987). Die Bewegung der *gurken*-mRNA in der Oozyte in Stadium acht der Oogenese (King 1970) stellt einen kritischen Schritt in der dorsoventralen Musterbildung in *Drosophila* dar (Neumann-Silberberg & Schüpbach 1993). Serano et al. (1995) konnten zeigen, dass diese Bewegung abhängig von *fs(1)K10* ist. Angenommen wird eine Funktion in der Aktivierung eines *gurken*-mRNA-Ankers als Komponente der *gurken*-Lokalisierung.

Die X-chromosomale rezessive Mutation des Gens *fs(1)K10* hat einen maternalen Effekt und führt zu weiblicher Sterilität, indem sie die Form der Eier abnorm verändert. Die *fs(1)K10*-Eimorphologie ist strikt abhängig vom Genotyp der Keimbahn. Dabei fehlen den Eiern, die von für die Mutation homozygoten Weibchen produziert werden, die zwei dorsalen Filamente von Wildtyp-Eiern, so dass sich in 99 Prozent der Fälle keine Larven entwickeln. Dieser Phänotyp ist extrem konstant und zu 100 Prozent penetrant, was bedeutet, dass er in allen Fällen auf dieselbe Weise vollständig ausgeprägt ist (Wieschaus et al. 1978; Wieschaus & Szabad 1979).

In *C. riparius* konnten durch RFLP-Analysen mit Bereichen von *fs(1)K10-like* als Hybridisierungssonden zusätzliche Restriktionsfragmente in Männchen nachgewiesen werden. Zudem war es möglich, in der Nähe des Gens eine kurze männchenspezifische Sequenz zu identifizieren (Stiehl 2009). Ausgehend von dieser Sequenz konnte gezeigt werden, dass sich die *fs(1)K10-like*-Sequenz auf dem proto-Y-Chromosom im 3'-Bereich von derjenigen auf dem proto-X-Chromosom unterscheidet und zudem fast vollständig dupliziert vorliegt. Dabei unterscheiden sich beide Y-Allele sowohl voneinander als auch vom X-Allel (Kraemer, persönliche Mitteilung). Für den Fall, dass das in der SDR identifizierte Gen *fs(1)K10* entspräche, könnte eine höhere Gendosis im Männchen möglicherweise geschlechtsspezifische Auswirkungen haben. Allerdings ist die Homologie zu *fs(1)K10* mit einer Übereinstimmung von 46 Prozent über einen Bereich von 89 Aminosäuren auf Proteinebene nur schwach. Die Analyse von «next generation sequencing»-Daten zeigte, dass im *C. riparius*-Genom weitere, «bessere» *fs(1)K10*-Homologe vorkommen (Kraemer, persönliche Mitteilung).

4.1.2. *polyhomeotic-like*

Polyhomeotic gehört zur Polycomb-Gruppe (PcG) von mindestens 20 Genen mit ähnlichem Phänotyp (Jürgens 1985), welche in *Drosophila* für die Aufrechterhaltung der Segment-spezifischen Genexpression benötigt werden, da sie die ANT-C (Antennapedia-Genkomplex)- und BX-C (Bithorax-Genkomplex)-Expression regulieren. *Polyhomeotic* unterscheidet sich von anderen PcG-Genen, da es außer seiner Funktion in der Segmentspezifizierung auch für die Lebensfähigkeit der epidermalen Zellen während der Embryonalentwicklung benötigt wird. Der *polyhomeotic*-Genort besteht aus zwei tandemartig duplizierten Regionen. Veränderungen in einer der beiden Einheiten zeigen den selben Phänotyp während der Embryonalentwicklung (Dura et al. 1987). Die Inaktivierung einer Einheit wird transkriptionell durch die andere kompensiert (Fauvarque et al. 1995). Eine somatische Überexpression von *polyhomeotic* führt zu einer signifikanten Reduktion der weiblichen Fertilität durch spezifische Defekte in der Follikelstruktur, wodurch die Oogenese gestört wird. Das Fehlen der *polyhomeotic*-Funktion hat ebenfalls die Produktion von abnormen Follikeln zur Folge. Narbonne et al. (2004) erklären dies durch ihre Beobachtung, dass die *polyhomeotic*-Funktion für die Differenzierung und Proliferation der somatischen Zellen des Germariums benötigt wird. Das Polyhomeotic-Protein enthält verschiedene Domänen, die in DNA-Bindeproteinen vorkommen, was darauf hindeutet, dass Polyhomeotic eine Rolle in der DNA-Protein-Interaktion spielt. Eine Rolle im Zusammenhang mit der Chromatinstruktur wird angenommen (DeCamillis et al. 1992). Außerdem enthält Polyhomeotic eine SAM-Domäne (sterile alpha motif). Diese Proteindomäne ist nach ihrem Vorkommen in einigen Hefeproteinen benannt, die essentiell für die sexuelle Differenzierung sind und deren Fehlen zu Sterilität führt. Proteine mit SAM-Domäne sind beteiligt an Entwicklungsprozessen in ein- und mehrzelligen Eukaryoten. SAM-Domänen sind Protein-bindende Module, die an andere SAM-Domänen bzw. über die Phosphorylierung eines konservierten Tyrosins an SH2-Domänen anderer Proteine binden können (Ponting 1995; Schultz et al. 1997).

Das in der Konsensussequenz der SDR von *C. riparius* durch Sequenzanalysen identifizierte Gen *polyhomeotic-like* zeigt eine Aminosäuresequenz-Identität von etwa 40 Prozent zu *polyhomeotic*, doch die für die Funktion des Proteins essentielle SAM-Domäne ist mit hoher Übereinstimmung (95 Prozent) enthalten. Aus diesem Grund könnte *polyhomeotic-like* funktionell homolog zu *polyhomeotic* sein und eine ähnliche geschlechtsspezifische Funktion in der Follikelbildung ausüben.

4.1.3. *rpn5-like*

Das Rpn5-Protein ist eine Untereinheit des «Deckel»-Subkomplexes des regulatorischen Partikels des 26 S-Proteasoms. Das 26 S-Proteasom ist ein ATP-abhängiger Proteasekomplex, welcher zuständig für die selektive Proteindegradation in Nukleus und Cytoplasma von Eukaryoten ist. Die Hauptfunktion dieses Proteasekomplexes ist die Proteolyse ubiquitinylierter Proteine (Voges et al. 1999). Das 26 S-Proteasom ist aus einem katalytischen Core-Komplex (20 S core) und dem regulatorischen Komplex (19 S cap) aufgebaut. Das 19 S cap besteht seinerseits aus zwei Subkomplexen, Basis und Deckel, welche jeweils mindestens acht Untereinheiten beinhalten. Der Core-Komplex benötigt die Zusammenlagerung mit dem regulatorischen Partikel für die Funktion des 26 S-Proteasoms (Glickman et al. 1998).

Rpn5 ist essentiell in *Saccharomyces cerevisiae* (Yang et al. 2004) und wird in *Schizosaccharomyces pombe* benötigt als Dosis-abhängiger Regulator des 26 S-Proteasoms, welcher den korrekten Zusammenbau von katalytischem und regulatorischem Komplex und die Lokalisierung des Proteasoms vermittelt. Dabei sind die Funktionen von Rpn5 in Eukaryoten evolutionär hoch konserviert, z. B. kann menschliches Rpn5 einen *rpn5*Δ-Phänotyp in Hefezellen «retten» (Yen et al. 2003). Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *S. pombe* zeigen *rpn5*-Mutanten Defekte in der Zellteilung in Übereinstimmung mit der Bedeutung von Ubiquitinylierung und des 26 S-Proteasoms für zahlreiche Checkpoints des Zellzyklus (Yen et al. 2003; Isono et al. 2007).

In *Arabidopsis* kommen zwei Isoformen von Rpn5, Rpn5a und Rpn5b, vor. Das pflanzliche Rpn5-Protein ist funktionell ortholog zu denjenigen anderer Organismen (Yang et al. 2004). Rpn5 ist essentiell in *Arabidopsis*: Pflanzen, welchen sowohl Rpn5a als auch Rpn5b fehlt, sind nicht lebensfähig. *Arabidopsis* benötigt Rpn5a und Rpn5b für die Pollenproduktion, da homozygote *rpn5a*-Mutanten keinen Pollen produzieren und der Pollen von heterozygoten *rpn5a rpn5b*-Mutanten nicht lebensfähig ist. Außerdem wird mindestens ein wildtypisches *rpn5a*-Allel für eine normale Embryogenese benötigt, da homozygote *rpn5a*-Mutanten kleinere Embryonen mit weniger Zellen produzieren. Für die Produktion lebensfähiger Samen müssen mindestens zwei der vier *rpn5*-Loci funktionsfähig sein. Die Defekte in der männlichen Gametogenese und die veränderten Zellteilungsmuster im Embryo von *Arabidopsis* weisen auf eine kritische Rolle von Rpn5 während der Meiose und Mitose in Pflanzen hin (Book et al. 2009).

Aufgrund des hohen Konserviertheitsgrades von *rpn5* ist auch in Insekten und damit in *Chironomus* eine Beteiligung von Rpn5 an Mitose und Meiose wahrscheinlich. Wie

in *Arabidopsis* könnte diese Funktion ebenfalls Auswirkungen auf die Gametogenese und Embryogenese haben und auf diese Weise geschlechtsspezifisch sein.

4.1.4. Mögliche Beteiligung der Gene an der Geschlechtsbestimmung von *C. riparius*

Alle drei vorgestellten Gene haben Funktionen, die essentiell für geschlechtsspezifische Entwicklungsschritte sind. *fs(1)K10* und *polyhomeotic* wirken dabei in *Drosophila* in der Oogenese und kommen daher als zygotisch wirkende geschlechtsbestimmende Gene nicht infrage, da die Oogenese stattfindet, wenn das Geschlecht bereits festgelegt ist (Zissler 1999). Eine Beteiligung von in der Oogenese wirkenden maternalen Faktoren an der Geschlechtsbestimmung wie bei *Cryomya rufifacies* und *Sciara* (maternale Monogenie; Ullerich 1975; Metz 1938) ist bei *C. riparius* allerdings ausgeschlossen, da hier beim Männchen ein genetisches Y-Chromosom existiert, auf dem ein Männchen-bestimmender Faktor liegt (männliche Heterogamete; Hägele 1985; Kraemer & Schmidt 1993). Da nicht bekannt ist, wo und wann die in *C. riparius* vorkommenden verwandten Gene ihre Funktion ausprägen, können sie trotz allem zygotisch wirksam und an der Geschlechtsbestimmung beteiligt sein.

Die mögliche Funktion von *rpn5* in der Embryogenese lässt eine Beteiligung dieses Gens an der Geschlechtsbestimmung möglich erscheinen. Da Geschlechtsbestimmungskaskaden sich evolutionär allerdings vergleichsweise schnell verändern (Marín & Baker 1998), ist es schwer einzuschätzen, ob *rpn5* in *Chironomus* die in *Arabidopsis* nachgewiesene Funktion haben könnte.

Das Gen *doublesex* konnte in *C. riparius* durch Sequenzvergleiche bereits identifiziert werden. Dabei wurden durch die Analyse von «next generation sequencing»-Daten fünf verschiedene *dsx*-verwandte Gene im Genom von *C. riparius* identifiziert, wovon eins differentiell gespleißt wird (Kraemer, persönliche Mitteilung). Da neben *Drosophila* für viele Dipteren wie *Musca domestica* (Hediger et al. 2004), *Ceratitis capitata* (Saccone et al. 2008), *Megaselia scalaris* (Kuhn et al. 2000) sowie die mit *Chironomus* näher verwandte Art *Anopheles gambiae* (Scali et al. 2005) das Gen *doublesex* mit konservierter Struktur und geschlechtsspezifischen Transkripten nachgewiesen werden konnte, ist die beschriebene Funktion sehr wahrscheinlich für *C. riparius*. Die hohe Konserviertheit von *doublesex* in Struktur und Funktion als Schlüsselgen für die Ausprägung beider Geschlechter ist konsistent mit Wilkins' (1995) Hypothese, dass

4. Diskussion

Geschlechtsbestimmungskaskaden von unten her evolvieren und damit das letzte Gen der Kaskade das konservierteste ist. Aus diesen Gründen ist *dsx* kein Kandidat für den Geschlechtsbestimmer *M*, für den eine Funktion als primäres Signal angenommen wird. Daher entspricht es auch den Erwartungen, dass *dsx* nicht in der SDR gefunden wurde.

In der Geschlechtsbestimmungskaskade von *Drosophila* ist *transformer* das *double-sex* vorgeschaltete Gen und weist hier im Gegensatz zu diesem eine viel geringere Konserviertheit auf. *Transformer* zeigt zwischen verschiedenen *Drosophila*-Arten eine hohe Variabilität auf Nukleotid- und Proteinebene (O’Neil & Belote 1992; McAllister & McVean 2000; Kulathinal et al. 2003). In anderen Dipteren ist *transformer* aufgrund der noch höheren Variabilität nur schwer zu identifizieren. Dennoch konnte in *C. capitata* ein zu *transformer* homologes Gen kloniert werden, welches trotz funktioneller Konserviertheit nur eine geringe Übereinstimmung (18 % auf Aminosäureebene) mit dem *Drosophila*-Gen aufweist (Pane et al. 2002, 2005). Ebenso wurde ein *transformer*-Ortholog in *M. domestica* gefunden, welches die Funktion des Weibchen-bestimmenden Faktors *F* hat. Es konnte gezeigt werden, dass *transformer* ebenso wie in *Drosophila* geschlechtsspezifisch gespleißt wird und dass das funktionelle Transkript für die Ausbildung des weiblichen Geschlechts benötigt wird. Darüber hinaus hat *transformer* in *M. domestica* wie in *C. capitata* eine autoregulatorische Funktion, wodurch der weibliche Spleißmodus während des gesamten Lebens eines Individuums aufrechterhalten wird und ein Zellgedächtnis des geschlechtlichen Status gebildet wird. Damit stellt *transformer* in *M. domestica* das binäre Schaltergen in der Geschlechtsbestimmungskaskade dar, welches als An/Aus-Schalter für die Entwicklung eines Geschlechts wirkt (Hediger et al. 2010). Diese Funktion übernimmt in *Drosophila* *Sex-lethal* (Cline & Meyer 1996). In *C. riparius* konnte *transformer* ebenso wie in *M. scalaris* (Traut 2010), *A. gambiae* und vielen weiteren Dipteren bisher nicht identifiziert werden, was möglicherweise durch die geringe evolutionäre Konserviertheit dieses Gens zu erklären ist. Es ist trotzdem durchaus denkbar, dass *transformer* in *C. riparius* vorkommt und eine vergleichbare Funktion wie in anderen Dipteren übernimmt. Daher ist zu überprüfen, ob eines der Gene aus der SDR homolog zu *transformer* sein könnte. Wie aus *Apis mellifera* bekannt ist, wo das Genprodukt des geschlechtsbestimmenden Gens *csd* Strukturähnlichkeiten zu TRA aufweist, kann auch dieses Gen die Funktion des primären Signals übernehmen (Beye et al. 2003; Beye 2004).

TRA gehört ebenso wie TRA2 zur Familie der SR-Proteine (Boggs et al. 1987; Amrein et al. 1988; Long & Cáceres 2009). Diese Proteine wirken als wichtige Spleiß-

faktoren, die unter anderem konzentrationsabhängig alternatives Spleißen vieler prä-mRNAs regulieren, indem sie die Auswahl der 5'-Spleißstellen beeinflussen (Ge & Manley 1990; Krainer et al. 1990 a und b; Zahler et al. 1993). SR-Proteine haben üblicherweise eine modulare Struktur, bestehend aus ein oder zwei Kopien eines «RNA recognition motifs» (RRM) am N-Terminus, welches die Spezifität der RNA-Bindung gewährleistet (Dreyfuss et al. 1988; Mattaj 1989; Kenan et al. 1991), und eine C-terminale charakteristische Arginin- und Serin-reiche Domäne (RS-Domäne), die Protein-Protein-Interaktionen zur Spliceosom-Rekrutierung vermittelt (Wu & Maniatis 1993; Kohtz et al. 1994). Die RS-Domäne kann allerdings die prä-mRNA auch direkt über den «branch-point» und die 5'-Spleißstelle kontaktieren (Shen et al. 2004; Shen & Green 2004; Hertel & Graveley 2005). Zudem ist die RS-Domäne an der subnukleären Lokalisierung der SR-Proteine beteiligt (Cáceres et al. 1997; Kataoka et al. 1999; Lai et al. 2000). Verschiedene SR-Proteine interagieren während der frühen Stadien des Spliceosom-Assemblies mit der prä-mRNA und stimulieren die Bindung des U1 snRNP-Partikels (Untereinheit des Spliceosoms) an die 5'-Spleißstelle (Eperon et al. 1993; Fu 1993; Kohtz et al. 1994; Staknis & Reed 1994; Zahler & Roth 1995). Für klassische Fälle von alternativem Spleißen konnte gezeigt werden, dass cis-agierende RNA-Sequenzelemente, sogenannte «exonic splicing enhancers» (ESEs) die Einbeziehung von Exons erhöhen. Diese ESEs, die von SR-Proteinen erkannt werden, rekrutieren durch die Bereitstellung von Bindestellen einen Multikomponenten-Komplex von Spleiß-Enhancern und wirken so als Aktivatoren schwacher Spleißstellen (Blencowe 2000; Graveley 2000; Graveley et al. 2001; Lam & Hertel 2002; Black 2003; Lam et al. 2003). Ein solcher heterotrimerer Komplex, bestehend aus den SR-Proteinen TRA, TRA2 und RBP1, ist verantwortlich für die Aktivierung des weibchenspezifischen Spleißens von *dsx* bei *Drosophila* (Nagoshi & Baker 1990; Lynch & Maniatis 1996; Hertel & Maniatis 1998; Sciabica & Hertel 2006).

Ob eines der Gene in der SDR von *C. riparius* homolog zu *tra* sein könnte, kann nach derzeitigem Kenntnisstand nicht entschieden werden. Allerdings wurde für das menschliche Gen *LUC7L* (UniProt Q9NQ29) eine mögliche Ähnlichkeit zur Funktion von *LUC7* beschrieben (Fortes et al. 1999; Tufarelli et al. 2001). Es kodiert für das Protein LUC7B1, welches ein mögliches SR-Protein mit RS- und Zinkfinger-Domäne darstellt. Diese Attribute sind ebenfalls für das an der 5'-Spleißstellen-Erkennung beteiligte Protein Luc7p möglich. Für den Fall, dass das in der SDR von *C. riparius* identifizierte Gen *LUC7-like* tatsächlich homolog zu *LUC7* ist, wäre es möglich, dass es für eine *tra*-ähnliche Funktion rekrutiert wurde.

4. Diskussion

Sex-lethal ist das Schlüsselgen in der Geschlechtsbestimmungskaskade von *Drosophila* und wird hier geschlechtsspezifisch gespleißt (Cline & Meyer 1996). Zu *Sex-lethal* homologe Gene konnten in vielen verschiedenen Dipteren identifiziert werden, unter anderem in *M. domestica* (Meise et al. 1998), *C. capitata* (Saccone et al. 1998), *M. scalaris* (Sievert et al. 1997, 2000) und *C. riparius* (Kraemer, persönliche Mitteilung). Doch im Unterschied zu *Drosophila* wurden in keiner Art geschlechtsspezifische Transkripte gefunden, was darauf hindeutet, dass *Sex-lethal* ausschließlich in *Drosophila* eine Funktion bei der Geschlechtsbestimmung ausübt. Auch diese Tatsache unterstützt Wilkins' (1995) «bottom up»-Hypothese, nach welcher sich die Gene am Anfang von Geschlechtsbestimmungskaskaden evolutionär am schnellsten verändern. Nöthiger und Steinmann-Zwicky (1985) postulieren ein gemeinsames Prinzip der Geschlechtsbestimmung in Insekten, welches aus drei Komponenten besteht: ein primäres Signal, ein binäres Schaltergen und ein bifunktionales Schaltergen, welches in Abhängigkeit vom binären Schalter zu männlicher oder weiblicher Differenzierung führt. In Übereinstimmung mit diesem Prinzip und unter Berücksichtigung der vermuteten Konserviertheit sowohl von *doublesex* als auch *transformer* in *C. riparius* steht ein Kandidat für das primäre Signal, den männchenbestimmenden Faktor, noch aus. Innerhalb der Dipteren ist dieser Faktor bisher nur bei *Drosophila* bekannt, wurde aber auch für andere Ordnungen (Hymenoptera: *Apis mellifera*; Beye et al. 2003) beschrieben. Es ist zu vermuten, dass ein Gen, welches als primäres Signal in der Geschlechtsbestimmung rekrutiert wird, die Möglichkeit zur Interaktion mit *transformer* aufweisen muss.

Der derzeitige Kenntnisstand erlaubt keine Aussage darüber, ob eines der vorgestellten Gene die Voraussetzungen als Kandidat für das primäre Signal besitzt und damit eine Rolle in der Geschlechtsdetermination von *C. riparius* spielen könnte.

Da die im Rahmen dieser Arbeit analysierte Sequenz der SDR von *C. riparius* vermutlich dem proto-X-Chromosom entspricht, ist es allerdings durchaus denkbar, dass ein ausschließlich proto-Y-chromosomaler männchenbestimmender Faktor bisher noch nicht identifiziert werden konnte (siehe Kapitel 4.2.2). Selbst wenn dies nicht der Fall ist, besteht die Möglichkeit, dass *M* bei der Sequenzanalyse unentdeckt geblieben ist. Die Sequenz der SDR enthält zusätzlich zu den identifizierten Genstrukturen mit Homologie zu bekannten Genen anderer Insektenarten weitere, teilweise kleinere offene Leserahmen, die keine signifikante Übereinstimmung bei BLAST-Suchen zeigten (siehe elektronischer Anhang).

4.2. Unterscheidung von proto-X- und proto-Y-Chromosom

4.2.1. Evolution von Geschlechtschromosomen bei *C. riparius*

Nach Muller (1918, 1932) entstehen heteromorphe Geschlechtschromosomen aus zwei homologen Autosomen, von denen eines einen geschlechtsbestimmenden Faktor trägt. Dieser Unterschied führt zu verminderter Rekombination im entsprechenden Chromosomenabschnitt, der so zur SDR wird. Durch die fehlende Rekombination des proto-Y-Chromosoms mit dem proto-X-Chromosom kommt es zu einer Akkumulation repetitiver Sequenzen wie transposable Elemente und repetitive DNA, da sich diese unbegrenzt vermehren können. Mit der Zeit wird das proto-Y-Chromosom auf diese Weise heterochromatisch (Charlesworth 1991). Diese Theorie stimmt mit der Beobachtung überein, dass Y-Chromosomen häufig heterochromatisch sind und große Mengen repetitiver DNA enthalten (Bull 1983). Steinemann & Steinemann (1992) postulieren, dass Retrotransposons und andere transposable Elemente die treibenden Kräfte in der Degeneration von Y-Chromosomen sind, da sie durch Insertionen und Exzisionen zu Chromosomenrearrangements führen und somit genetische Aktivität auf dem Y-Chromosom zerstören. Zu dieser Hypothese passt die Tatsache, dass in der Sequenz der SDR von *C. riparius* an neun Stellen *Chironomus*-typische transposable bzw. repetitive Elemente zu finden sind. Zudem wird bei fünf der bei den «Skimming»-Analysen gefundenen Indels (I18, I61, I101, I114 und I116) die «Insertion» von direkten Repeats wie bei «target site»-Duplikationen flankiert, was auf die Anwesenheit von transposablen Elementen hinweist. Drei dieser Indels (I18, I101 und I116) weisen terminale invertierte Repeats auf, die bei I18 und I116 jeweils länger als 200 Bp sind. Diese Charakteristika zusammen mit fehlenden Transposasegenen deuten auf transposable DNA-Elemente aus der Gruppe der Foldback-Elemente hin (Potter et al. 1980). Die Anwesenheit von Transposons wird dadurch untermauert, dass durch die PCRs auf stammspezifische genomische DNA eine grundsätzliche Geschlechtsspezifität der untersuchten Indels ausgeschlossen werden konnte. Von den fünf Indels mit «target site»-Duplikationen ist nur eins (I101) bei dem *C. riparius*-Laborstamm K12 geschlechtsspezifisch, was ebenfalls mit der Zufälligkeit der Transposition zu vereinbaren ist. Weiterhin enthält die zusätzliche Sequenz eines sechsten Indels (I113) ein weiteres *Chironomus*-typisches transposables Element, ein unvollständiges CCC-Element (Kraemer und Schmidt 1993). Zusätzlich zu bekannten

4. Diskussion

transposablen und repetitiven Elementen enthalten die «Insertionen» zweier Indels hochrepetitive Sequenzen, was sich bei der Verwendung dieser als Hybridisierungssonden für Southern-Hybridisierungen mit geschlechtsspezifischer genomischer DNA zeigte. Weiterhin wurde am distalen Ende des analysierten Bereichs der SDR von *C. riparius* eine große, sich über 50 kb erstreckende «Inverted Repeat»-Struktur identifiziert. Diese Struktur ist insoweit hochinteressant, als die männchenspezifische Region des humanen Y-Chromosoms ähnliche große IR- und Palindrom-Strukturen enthält (Skaletsky et al. 2003). Insgesamt handelt es sich bei all diesen Phänomenen um eine große Anzahl repetitiver und transposabler Elemente. Um zu beurteilen, ob es sich bei dieser Anzahl um eine signifikante Anhäufung dieser Elemente handelt, wäre es nötig, die Sequenzen von proto-X- und proto-Y-Chromosom miteinander zu vergleichen. Dies ist derzeit nicht möglich, da bisher nur eine vollständige Sequenz der SDR vorliegt, deren Ursprung noch nicht eindeutig geklärt werden konnte.

4.2.2. Die analysierte Sequenz der SDR repräsentiert möglicherweise nur das proto-X-Chromosom

Verschiedene Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Konsensussequenz der SDR das proto-X-Chromosom darstellt. Zum ersten deutet die Tatsache, dass die von Stiehl (2009) nachgewiesene kurze männchenspezifische Sequenz nicht in der hier analysierten Sequenz der SDR enthalten ist, darauf hin, dass diese zumindest größtenteils das proto-X-Chromosom repräsentiert.

Ein weiteres Indiz für eine möglicherweise rein proto-X-chromosomale Sequenz der SDR ist das Fehlen von Cla-Elementen in der analysierten Sequenz. Auf männlichen Polytänchromosomen kann grundsätzlich immer das hemizygote Cla-Element-Cluster nachgewiesen werden, welches ursprünglich den Ausgangspunkt für die Erschließung der SDR von *C. riparius* darstellte. Da der Bereich zwischen den das männchenspezifische Cla-Element-Cluster flankierenden Klonen (λ Cla1.8Z und λ Cla1.1Y) mittlerweile vollständig charakterisiert und analysiert ist, müsste eine proto-Y-chromosomale Sequenz Cla-Elemente enthalten. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass das Cla-Element-Cluster auch in einer proto-Y-chromosomalen Sequenz nicht nachzuweisen ist, da Cla-Elemente häufig instabil und schwierig klonierbar sind. Bei Klonierung größerer Cla-Element-Cluster in Plasmidvektoren und Vermehrung in *E. coli* wurde mehrfach beobachtet, dass tandemrepetitive Cla-Elemente, vermutlich durch intra-

4.2. Unterscheidung von proto-X- und proto-Y-Chromosom

molekulare Rekombination, nach wenigen Vermehrungszyklen aus den Klonen nahezu vollständig eliminiert werden (Schmidt et al. 1982).

Weiterhin ergab die Skimminganalyse aller BAC-Klone aus der SDR, dass zwei unterschiedliche Klongruppen existieren, wobei alle vollständig sequenzierten Klone, deren Sequenzen die Konsensussequenz der SDR bilden, ein und derselben Klongruppe zugeordnet werden. Die beiden Klongruppen könnten jeweils proto-X- bzw. proto-Y-Chromosom repräsentieren, was bedeutet, dass die vollständig analysierte Sequenz nur einem Geschlechtschromosom und leider vermutlich dem X-Chromosom entspricht.

Die Zuordnung der BAC-Klone zu den beiden sich durch SNPs und Indels unterscheidenden Klongruppen ist größtenteils sehr eindeutig. Natürlich gibt es einzelne, wenige Stellen, an welchen ein Klon durch SNPs abweicht, was auch durch natürliche Polymorphismen erklärt werden kann. An chromosomalen Positionen, die durch viele Parallelklone und daraus resultierende Parallelsequenzen abgedeckt sind, kann diese Aussage durch die mehrfache Abdeckung sehr sicher getroffen werden. Unterschiede, die nur durch den Vergleich von zwei Sequenzen sichtbar sind, können mit ebenso hoher Wahrscheinlichkeit durch natürliche Polymorphismen herrühren wie durch die Zugehörigkeit zu einer der beiden Klongruppen.

Die Häufigkeit von natürlich auftretenden Nukleotidsubstitutionen wird beeinflusst von der Mutationsrate (Kimura 1983), der Generationszeit und dem Selektionsdruck auf die Nukleotidsequenz (Ohta & Tachida 1990). Für den Menschen wurden 1,42 Millionen über das gesamte menschliche Genom verteilte SNPs beschrieben, von denen 60.000 innerhalb von Exonbereichen liegen. Das entspricht einem Anteil an der Gesamt-SNP-Menge von 4,2 Prozent (The International SNP Map Working Group 2001). In der im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten, 200 kb umfassenden SDR von *C. riparius* konnten 500 SNPs identifiziert werden, von denen 22 in Exonbereichen zu finden sind. Dieser Anteil macht 4,5 Prozent der SNPs in der SDR aus, was eine mit dem Menschen vergleichbare Größenordnung darstellt. Allerdings sind die Zahlen aus der Skimming-Analyse nicht repräsentativ, da mit 200 kb nur ein kleiner Teil des Genoms untersucht wurde und sich durch die Lücken zwischen den untersuchten Sequenzen und der teilweise mangelnden Redundanz durch fehlende BAC-Klone Abweichungen ergeben können. Daher ist zu vermuten, dass die absolute SNP-Anzahl in der SDR größer ist. Unter der Annahme, dass die SNP-Zahlen der SDR repräsentativ sind, kann die im Vergleich zum Menschen höhere Substitutionsrate (*C. riparius*: hochgerechnet 487.000 in $2 \cdot 10^8$ Bp; Mensch: 1.420.000 in $3 \cdot 10^9$ Bp)

4. Diskussion

durch kürzere Generationszeiten und somit mehr DNA-Replikationen pro Jahr erklärt werden (Britten 1986; Kimura 1983, 1991). Für *Drosophila* konnte eine zwei bis drei Mal höhere durchschnittliche Substitutionsrate als in Säugetieren nachgewiesen werden (Sharp & Li 1989), was mit der SNP-Rate in der SDR von *C. riparius* übereinstimmt. Aus diesen Gründen ist es möglich, dass die durch die Skimming-Analyse ermittelten SNPs, durch die sich die zwei Klongruppen unterscheiden, ursprünglich durch natürliche Polymorphismen herrühren und nicht geschlechtsspezifisch sind.

Durch verschiedene PCRs und Southern-Hybridisierungen mit geschlechtsspezifischer genomischer DNA konnte gezeigt werden, dass die für die Klongruppen der SDR spezifischen Indels mit großer Wahrscheinlichkeit nicht geschlechtsspezifisch, sondern lediglich stammspezifisch sind. Die Indels konnten nur im ältesten Laborstamm als geschlechtsspezifisch nachgewiesen werden, wohingegen die für die beiden Klongruppen erwarteten PCR-Produkte in den beiden Wildfangpopulationen nicht zuverlässig nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich zeigten die Indels mit einer Ausnahme auch in den RFLP-Analysen mit «gepoolter» DNA verschiedener *C. riparius*-Stämme keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Daher ist es möglich, dass im 30 Jahre alten Laborstamm zufällig aufgetretene Insertionen und Deletionen durch den limitierten Genpool, die andauernde Inzucht sowie die fehlende Rekombination des proto-Y-Chromosoms sich als geschlechtsspezifische Unterschiede manifestierten, ohne tatsächlich an der Geschlechtsdetermination beteiligt zu sein. Die Tatsache, dass ein Teil der Indels Transposons darstellt, erklärt bei vorausgesetzter geringer, aber vorhandener Rekombination zwischen proto-X- und proto-Y-Chromosom ihr uneinheitliches Vorkommen in den beiden Wildfangpopulationen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wären mögliche regionale Unterschiede in der Herkunft, da die beiden Wildfangstämme in Rheinhessen gesammelt wurden, der Laborstamm K12 jedoch ursprünglich möglicherweise aus Russland stammt.

4.3. Ausblick

Von der SDR auf Chromosom III von *C. riparius*, in welcher der männchenbestimmende Faktor *M* liegt, konnte in der vorliegenden Arbeit ein Abschnitt von 200 kb charakterisiert und analysiert werden. Durch bioinformatische Analysen konnten einige Gene identifiziert werden. Diese Gene sollten in Zukunft durch Expressionsanalysen überprüft werden. Zu den tatsächlich exprimierten Genen sind Untersuchungen

zu geschlechtsspezifischer Expression in Embryonen von *C. riparius* von großer Bedeutung. Im Folgenden sind Funktionsanalysen der Gene in der SDR, besonders derer mit beschriebenen geschlechtsspezifischen Funktionen in anderen Organismen, durch das Ausschalten der Genfunktion in Embryonen essentiell.

Zusätzlich zur genaueren Untersuchung der identifizierten Gene sollte das proto-Y-Chromosom von *C. riparius* kloniert werden, einerseits durch die Konstruktion von männchenspezifischen BAC-Bibliotheken und andererseits durch die Verwendung männchenspezifischer Screeningsonden.

5. Zusammenfassung

Die durch eine männchenspezifisch auftretende heterochromatische Bande und ein hemizygoten Cla-Element-Cluster gekennzeichnete geschlechtsbestimmende Region («sex determining region»: SDR) auf Chromosom III von *C. riparius* stellt ein frühes Stadium in der Evolution von Geschlechtschromosomen dar. Diese eindeutig lokalisierte chromosomale Region, die den molekular noch unbekanntem männchenbestimmenden Faktor *M* enthalten muss, ist im Vergleich zu den Y-Chromosomen anderer Dipterenarten wie unter anderem *M. domestica*, die ebenfalls einen dominanten Männchenbestimmer besitzen, relativ klein. Aus diesem Grund bietet die SDR von *C. riparius* eine Möglichkeit, den männchenbestimmenden Faktor einzugrenzen und zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Bereich einer Größe von ca. 200 kb aus der SDR von *C. riparius* charakterisiert und analysiert werden. Durch bioinformatische Sequenzanalysen konnten an 20 Stellen der SDR mögliche Genstrukturen nachgewiesen werden. Von den gefundenen möglichen Genen ist bisher die Funktion in *C. riparius* unbekannt. Bei den Genen mit vermuteter Funktion deutet nichts eindeutig auf eine Beteiligung an der Geschlechtsbestimmung von *C. riparius* hin. Da allerdings davon auszugehen ist, dass für die Funktion des Männchenbestimmers *M* ein Gen rekrutiert wurde, welches zur Interaktion mit dem nachgeschalteten Gen der Geschlechtsbestimmungskaskade fähig ist, muss die geschlechtsbestimmende Funktion des Gens *M* nicht unbedingt offensichtlich sein. Aus geschlechtsbestimmenden Genkaskaden anderer Dipteren bekannte Gene wie *transformer* und *doublesex* konnten im analysierten Bereich nicht nachgewiesen werden, obwohl zumindest zu *doublesex* homologe Gene im Genom von *C. riparius* vorkommen.

Um möglicherweise proto-X- und proto-Y-Chromosom miteinander vergleichen zu können und einen Hinweis auf die chromosomale Herkunft der analysierten Sequenzen aus der SDR zu erlangen, wurden Sequenzen von 31 teilweise parallel liegenden BAC-Klonen aus der untersuchten Region verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Klone zwei Gruppen bilden, deren Sequenzen sich durch 500 SNPs und 110 In-

5. Zusammenfassung

dels unterschiedlicher Größe (1–800 Bp) unterscheiden, was für eine Herkunft von zwei sich erst seit kurzer Zeit unterscheidenden Geschlechtschromosomen spricht. Die zwölf größten dieser Indels wurden auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen den beiden Klongruppen zwar im 30 Jahre alten Laborstamm, der auch für die Konstruktion der durchsuchten BAC-Bibliotheken verwendet wurde, tatsächlich geschlechtsspezifisch sind, in zwei Wildfangpopulationen jedoch keine derartige Geschlechtsspezifität aufweisen. Somit kann keine Aussage zur Herkunft der untersuchten Klone aus der SDR von *C. riparius* getroffen werden, und es bleibt unklar, ob die analysierten Sequenzen vom proto-X- oder vom proto-Y-Chromosom stammen.

6. Literaturliste

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185–2195

Albrecht EB, Salz HK (1993) The *Drosophila* sex determination gene *snf* is utilized for the establishment of the female-specific splicing pattern of *Sex-lethal*. *Genetics* **134**: 801–807

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403–410

Amrein H, Gorman M, Nöthiger R (1988) The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell* **55**: 1025–1035

Armitage P, Cranston PS, Pinder LCV (1995) The Chironomidae. The biology and ecology of non-biting midges. *Chapman & Hall, London*.

Ayling L-J, Griffin DK (2002) The evolution of sex chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* **99**: 125–140

Balbani EG (1881) Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*. *Zool. Anz.* **4**: 637–641

Bauer H (1936) Beiträge zur vergleichenden Morphologie der Speicheldrüsenchromosomen (Untersuchungen an den Riesenchromosomen der Dipteren. II.). *Zool. Jahrbücher (Abt. f. Physik)* **56**: 239–276

Bauer H, Beermann W (1952) Der Chromosomenzyklus der Orthoclaadiinen (Nematocera, Diptera). *Z. Naturforsch.* **7b**: 557–563

6. Literaturliste

Beermann W (1955) Geschlechtsbestimmung und Evolution der genetischen Y-Chromosomen bei *Chironomus*. *Biol. Zbl.* **74**: 525–544

Beisswanger S, Stephan W, De Lorenzo D (2006) Evidence for a selective sweep in the *wapl* region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **172**: 265–274

Bell LR, Maine EM, Schedl P, Cline TW (1988) *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similar to RNA binding proteins. *Cell* **55**: 1037–1046

Bell LR, Horabin JI, Schedl P, Cline TW (1991) Positive autoregulation of *Sex-lethal* by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell* **65**: 229–239

Berwanger C (2007) Sequenzbestimmung und bioinformatische Analyse der geschlechtsbestimmenden Chromosomenregion der Chironomiden. *Diplomarbeit, Fachhochschule Bingen*

Beukeboom LW, Kamping A, van de Zande L (2007) Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): A critical consideration of models and evidence. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**: 371–378

Beye M (2004) The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honeybee, *Apis mellifera*. *BioEssays* **26**: 1131–1139

Beye M, Hasselmann M, Kim Fondrk M, Page RE Jr., Omholt SS (2003) The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* **114**: 419–429

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* **7**: 1513–1523

Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 291–336

Blencowe BJ (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 106–110

Blumensatt M (2009) Klonierung und Analyse der geschlechtsbestimmenden Region von *Chironomus piger* durch *in vitro* Amplifikation. *Diplomarbeit, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz*

Boggs RT, Gregor P, Idriss S, Belote JM, McKeown M (1987) Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene. *Cell* **50**: 739-747

Boissy RE, Richmond B, Huizing M, Helip-Wooley A, Zhao Y, et al. (2005) Melanocyte-specific proteins are aberrantly trafficked in melanocytes of Hermansky-Pudlak syndrome type 3. *Am J. Pathol.* **165**: 231-240

Book AJ, Smalle J, Lee KH, Yang P, Walker JM, et al. (2009) The RPN5 subunit of the 26S proteasome is essential for gametogenesis, sporophyte development, and complex assembly in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 460-478

Bopp D, Bell LR, Cline TW, Schedl P (1991) Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **5**: 403-415

Britten RJ (1986) Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science* **231**: 1393-1398

Bull JJ (1980) Sex determination in reptiles. *Q. Rev. Biol.* **55**: 3-21

Bull JB (1983) Evolution of sex determining mechanisms. *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, USA*

Bull JJ (1987) Temperature-sensitive periods of sex determination in a lizard: similarities with turtles and crocodilians. *J. Exp. Zool.* **241**: 143-148

Bull JJ, Vogt RC (1979) Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science* **206**: 1186-1188

Bull JJ, Vogt RC (1981) Temperature-sensitive periods of sex determination in emydid turtles. *J. Exp. Zool.* **218**: 435-440

Burge C, Karlin S (1997) Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* **268**: 78-94

6. Literaturliste

Burghardt G, Hediger M, Siegenthaler C, Moser M, Dübendorfer A, Bopp D (2005) The *transformer2* gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. *Dev. Genes Evol.* **215**: 165–176

Burisch E (1963) Beiträge zur Genetik von *Megaselia scalaris* Loew (Phoridae). *Z. Vererbungsl.* **94**: 322–330

Burtis KC, Baker BS (1989) *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* **56**: 997–1010

Cáceres JF, Misteli T, Screatton GR, Spector DL, Krainer AR (1997) Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *J. Cell Biol.* **138**: 225–238

Carothers AM, Urlaub G, Mucha J, Grunberger D, Chasin LA (1989) Point mutation analysis in a mammalian gene: rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method. *Biotechniques* **7**: 494–496, 498–499

Charlesworth B (1991) The evolution of sex chromosomes. *Science* **251**: 1030–1033

Charnier M (1966) Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'*Agama agama* (Agamidae, Lanceritilien). *Soc. Biol. Ouest Afr.* **160**: 620–622

Cirera S, Martín-Campos JM, Segarra C, Aguadé M (1995) Molecular characterization of the breakpoints of an inversion fixed between *Drosophila melanogaster* and *D. subobscura*. *Genetics* **139**: 321–326

Clark MS, Wall WJ (1996) Chromosomes, the complex code. *Chapman and Hall, London*

Cline TW (1988) Evidence that *sisterless-a* and *sisterless-b* are two of several discrete «numerator elements» of the X/A sex determination signal in *Drosophila* that switch *Sxl* between two alternative stable expression states. *Genetics* **119**: 829–862

Cline TW, Meyer BJ (1996) Vive la différence: males vs females in flies vs worms. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 637–702

- Cline TW, Rudner DZ, Barbash DA, Bell M, Vutien R (1999)** Functioning of the *Drosophila* integral U1/U2 protein Snf independent of U1 and U2 small ribonucleoprotein particles is revealed by *snf* gene dose effects. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **96**: 14451–14458
- Cook JJ (1993)** Sex determination in the hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity* **71**: 421–435
- Credland PF (1973)** The taxonomic status of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus thummi* Kieffer (Diptera: Chironomidae). *J. nat. Hist.* **7**: 209–216
- Cronmiller C, Schedl P, Cline TW (1988)** Molecular characterization of *daughterless*, a *Drosophila* sex determination gene with multiple roles in development. *Genes Dev.* **2**: 1666–1676
- Crouse HV (1960)** The nature of the influence of X-translocations on sex of progeny of *Sciara coprophila*. *Chromosoma* **11**: 146–166
- Crozier RH (1971)** Heterozygosity and sex determination in haplo-diploidy. *Amer. Natur.* **105**: 399–412
- DeCamillis M, Cheng N, Pierre D, Brock HW (1992)** The *polyhomeotic* gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with *Polycomb*. *Genes Dev.* **6**: 223–232
- Dell’Angelica EC (2004)** The building BLOC(k)s of lysosomes and related organelles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 458–464
- Denhardt DT (1966)** A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **23**: 641–645
- Denholm I, Franco MG, Rubini PG, Vecchi M (1983)** Identification of a male determinant on the X chromosome of housefly (*Musca domestica*) populations in South-East England. *Genet. Res.* **42**: 311–322
- Deshpande G, Stukej J, Schedl P (1995)** *scute* (*sis-b*) function in *Drosophila* sex determination. *Mol. Cell Biol.* **15**: 4430–4440
- Dobzhansky T (1935)** *Drosophila miranda*, a new species. *Genetics* **20**: 377–391

6. Literaturliste

Dreyfuss G, Swanson S, Pinol RS (1988) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem. Sci.* **13**: 86–91

Drosophila 12 Genomes Consortium (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* **450**: 203–218

Dübendorfer A, Hediger M (1998) The female-determining gene *F* of the housefly, *Musca domestica*, acts maternally to regulate its own zygotic activity. *Genetics* **150**: 221–226

Dübendorfer A, Hediger M, Burghardt G, Bopp D (2002) *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* **46**: 75–79

Duffy JB, Gergen JP (1991) The *Drosophila* segmentation gene *runt* acts as a positive-specific numerator element necessary for the uniform expression of the sex-determining gene *Sex-lethal*. *Genes Dev.* **5**: 2176–2187

Dura J-M, Randsholt NB, Deatrick J, Erk I, Santamaria P, et al. (1987) A complex genetic locus, *polyhomeotic*, is required for segmental specification and epidermal development in *D. melanogaster*. *Cell* **51**: 829–839

Eperon IC, Ireland DC, Smith RA, Mayeda A, Krainer AR (1993) Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *EMBO J.* **12**: 3607–3617

Estes PA, Keyes LN, Schedl P (1995) Multiple response elements in the *Sex-lethal* early promoter ensure its female-specific expression pattern. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 904–917

Falcón-Pérez JM, Romero-Calderón R, Brooks ES, Krantz DE, Dell'Angelica EC (2007) The *Drosophila* pigmentation gene *pink* (*p*) encodes a homologue of human Hermansky-Pudlak Syndrome 5 (*HPS5*). *Traffic* **8**: 154–168

Fauvarque MO, Zuber V, Dura JM (1995) Regulation of *polyhomeotic* transcription may involve local changes in chromatin activity in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **52**: 343–355

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6–13

Felsenstein J (1974) The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* **78**: 737–756

Fortes P, Bilbao-Cortés D, Fornerod M, Rigaut G, Raymond W, et al. (1999) Luc7p, a novel yeast U1 snRNP protein with a role in 5' splice site recognition. *Genes Dev.* **13**: 2425–2438

Fraaije MW, Van Berkel WJH, Benen JAE, Visser J, Mattevi A (1998) A novel oxidoreductase family shares a conserved FAD-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 206–207

Freeman M (1994) The *spitz* gene is required for photoreceptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor. *Mech Dev.* **48**: 25–33

Fu X-D (1993) Specific commitment of different pre-mRNAs to splicing by single SR proteins. *Nature* **365**: 82–85

Fujii T, Shimada T (2007) Sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*: A female determinant on the W chromosome and the sex-determining gene cascade. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **18**: 379–388

Funke E (2006) Molekulare Analyse der geschlechtsbestimmenden Region von *Chironomus thummi*. *Diplomarbeit, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz*

Ge H, Manley JL (1990) A protein factor, ASF, controls alternative splicing of SV40 early pre-mRNA *in vitro*. *Cell* **62**: 25–34

Ghezzi D, Goffrini P, Uziel G, Horvath R, Klopstock T, et al. (2009) *SDHAF1*, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nature Genetics* **41**: 654–656

Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, et al. (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**: 615–623

Granadino B, Campuzano S, Sánchez L (1990) The *Drosophila melanogaster fl(2)d* gene is needed for the female-specific splicing of *Sex-lethal* RNA. *EMBO J.* **9**: 2597–2602

6. Literaturliste

Granadino B, Penalva LOF, Sánchez L (1996) The gene *fl(2)d* is needed for the sex-specific splicing of *transformer* pre-mRNA but not for *doublesex* pre-mRNA in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 26–31

Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645–4649

Graveley BR (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* **6**: 1197–1211

Graveley BR, Hertel KJ, Maniatis T (2001) The role of U2AF35 and U2AF65 in enhancer-dependent splicing. *RNA* **7**: 806–818

Green MM (1980) Transposable elements in *Drosophila* and other Diptera. *Annu. Rev. Genet.* **14**: 109–120

Grunstein M, Hogness DS (1975) Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 3961–3965

Haenlin M, Roos C, Cassab A, Mohier E (1987) Oocyte-specific transcription of *fs(1)K10*: a *Drosophila* gene affecting dorsal-ventral developmental polarity. *EMBO J.* **6**: 801–807

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

Hankeln T, Schmidt ER (1990) New foldback transposable element TFB1 found in histone genes of the midge *Chironomus thummi*. *J. Mol. Biol.* **215**: 477–482

Hediger M, Niessen M, Müller-Navia J, Nöthiger R, Dübendorfer A (1998) Distribution of different types of heterochromatin on the mitotic chromosomes of the housefly

(*Musca domestica* L.). *Chromosoma* **107**: 267–271

Hediger M, Burghardt G, Siegenthaler C, Buser N, Hilfiker-Kleiner D, et al. (2004) Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator *doublesex*. *Dev. Genes Evol.* **214**: 29–42

Hediger M, Henggeler C, Meier N, Perez R, Saccone G, Bopp D (2010) Molecular characterization of the key switch *F* provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. *Genetics* **184**: 155–170

Helip-Wooley A, Westbroek W, Dorward H, Mommaas M, Boissy RE, et al. (2005) Association of the Hermansky-Pudlak syndrome type-3 protein with clathrin. *BMC Cell Biology* **6**: 33

Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3957–3958

Herold T (2008) Molekulare Charakterisierung der geschlechtsdifferenzierenden Chromosomenregion bei Chironomiden. *Diplomarbeit, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz*

Hertel KJ, Graveley BR (2005) RS domains contact the pre-mRNA throughout spliceosome assembly. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 115–118

Hertel KJ, Maniatis T (1998) The function of multisite splicing enhancers. *Mol. Cell* **1**: 449–455

Hilfiker A, Nöthiger R (1991) The temperature-sensitive mutation *vir* (*virilizer*) identifies a new gene involved in sex determination of *Drosophila*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **200**: 240–248

Hilfiker A, Amrein H, Dübendorfer A, Nöthiger R (1995) The gene *virilizer* is required for female-specific splicing controlled by *Sxl*, the master gene for sexual development in *Drosophila*. *Development* **121**: 4017–4026

Hiroyoshi T (1964) Sex-limited inheritance and abnormal sex ratios in strains of the housefly. *Genetics* **50**: 373–385

Hoshijima K, Inoue K, Sakamoto H, Shimura Y (1991) Control of *doublesex* alter-

6. Literaturliste

native splicing by *transformer* and *transformer-2* in *Drosophila*. *Science* **252**: 833–836

Hoshijima K, Kohyama A, Watakabe I, Inoue K, Sakamoto H, Shimura Y (1995) Transcriptional regulation of the *Sex-lethal* gene by helix-loop-helix proteins. *Nucleic Acids Res.* **23**: 3441–3448

Hoskins RA, Carlson JW, Kennedy C, Acevedo D, Evans-Holm M, et al. (2007) Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science* **316**: 1625–1628

Inoue H, Hiroyoshi T (1981) A maternal effect mutant of the housefly that transforms sex. *Jpn. J. Genet.* **56**: 604–605

Isono E, Nishihara K, Saeki Y, Yashiroda H, Kamata N, et al. (2007) The assembly pathway of the 19 S regulatory particle of the yeast 26S proteasome. *Mol. Biol. Cell* **18**: 569–580

Israelewski N, Schmidt ER (1982) Spacer size heterogeneity in ribosomal DNA of *Chironomus thummi* is due to a 120 bp repeat homologous to a predominantly centromeric repeated sequence. *Nucleic Acids Res.* **10**: 7689–7700

Janzen FJ, Paukstis GL (1991) Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. *Q. Rev. Biol.* **66**: 149–179

Jürgens G (1985) A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*. *Nature* **316**: 153–155

Kataoka N, Bachrik JL, Dreyfuss G (1999) Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J. Cell Biol.* **145**: 1145–1152

Kenan DJ, Query CC, Keene JD (1991) RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 214–220

Keyl H-G (1961) Chromosomenevolution bei *Chironomus* I. Strukturabwandlungen an Speicheldrüsen-Chromosomen. *Chromosoma (Berl.)* **12**: 26–47

Keyl H-G (1962) Chromosomenevolution bei *Chironomus* II. Chromosomenumbauten und phylogenetische Beziehungen der Arten. *Chromosoma (Berl.)* **13**: 464–514

- Keyl H-G (1965)** Duplikationen von Untereinheiten der chromosomalen DNS während der Evolution von *Chironomus thummi*. *Chromosoma* **17**: 139–180
- Kieffer J-J (1911)** Nouvelles descriptions de Chironomides obtenus d'éclosion. *Bull. Soc. Hist. nat. Metz* **27**: 1–60
- Kim U-J, Birren BW, Slepak T, Mancino V, Boysen C, et al. (1996)** Construction and characterization of a human Bacterial Artificial Chromosome library. *Genomics* **34**: 213–218
- Kimura M (1983)** The neutral theory of molecular evolution. *Cambridge University Press, Cambridge*
- Kimura M (1991)** The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn. J. Genet.* **66**: 367–386
- King RC (1970)** Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. *Academic Press, New York*
- Knies D (2006)** Sequenzierung, *in situ* Lokalisation und genomische Analyse eines ca. 55656 Bp langen Chromosomenabschnitts aus der geschlechtsbestimmenden Region von *C. thummi*. *Diplomarbeit, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz*
- Ko L, Cardona GR, Henrion-Caude A, Chin WW (2002)** Identification and characterization of a tissue-specific coactivator, GT 198, that interacts with the DNA-binding domains of nuclear receptors. *Mol. Cell Biol.* **22**: 357–369
- Kohtz JD, Jamison SF, Will CL, Zuo P, Luhrmann R, et al. (1994)** Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**: 119–124
- Kraemer C (1994)** Molekulare Analyse der geschlechtsbestimmenden Region von Chironomiden. Dissertation, *Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz*
- Kraemer C, Schmidt ER (1993)** The sex determining region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. *Chromosoma* **102**: 553–562

6. Literaturliste

Kraemer C, Weil B, Christmann M, Schmidt ER (1998) The new gene *DmX* from *Drosophila melanogaster* encodes a novel WD-repeat protein. *Gene* **216**: 267–276

Kraemer C, Enklaar T, Zabel B, Schmidt ER (2000) Mapping and structure of *DMXL1*, a human homologue of the *DmX* gene from *Drosophila melanogaster* coding for a WD repeat protein. *Genomics* **64**: 97–101

Krainer AR, Conway GC, Kozak D (1990 a) The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites. *Cell* **62**: 35–42

Krainer AR, Conway GC, Kozak D (1990 b) Purification and characterization of SF2, a human pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev.* **4**: 1158–1171

Kramer SG, Timothy MJ, Schedl P, Gergen JP (1999) Direct activation of *Sex-lethal* transcription by the *Drosophila* Runt protein. *Development* **126**: 191–200

Kuhn S, Sievert V, Traut W (2000) The sex-determining gene *doublesex* in the fly *Megaselia scalaris*: conserved structure and sex-specific splicing. *Genome* **43**: 1011–1020

Kulathinal RJ, Skwarek L, Morton RA, Singh RS (2003) Rapid evolution of the sex-determining gene, *transformer*: structural diversity and rate heterogeneity among sibling species of *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 441–452

Kunz, S (2001) Struktur der geschlechtsbestimmenden Region von *Chironomus thummi* (Diptera, Insecta) und Vergleich der Gene *CtY* und *CpY*. *Dissertation, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz*

Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K (2001) The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 207–216

Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW, Tarn WY (2000) A human importin- β family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J. Biol. Chem.* **275**: 7950–7957

Lam BJ, Hertel KJ (2002) A general role for splicing enhancers in exon definition. *RNA* **8**: 1233–1241

Lam BJ, Bakshi A, Ekinici FY, Webb J, Graveley BR (2003) Enhancer-dependent

5'-splice site control of *fruitless* pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* **278**: 22740–22747

Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC (1982) Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 4381–4385

Langley KE, Villarejo MR, Fowler AV, Zamenhof PJ, Zabin I (1975) Molecular basis of β -galactosidase alpha-complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 1254–1257

Lee LG, Connell CR, Woo SL, Cheng RD, McArdle BF, et al. (1992) DNA sequencing with dye-labelled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res.* **20**: 2471–83

Long JC, Cáceres JF (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.* **417**: 15–27

Lynch KW, Maniatis T (1996) Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the *Drosophila doublesex* splicing enhancer. *Genes Dev.* **10**: 2089–2101

MacGregor HC, Mizuno S (1976) *In situ* hybridization of «nick-translated» 3H-ribosomal DNA to chromosomes from Salamanders. *Chromosoma* **54**: 15–25

MacKnight RH (1939) The sex-determining mechanism of *Drosophila miranda*. *Genetics* **24**: 118–201

Mack TS (2009) Genexpressionsanalyse der geschlechtsdeterminierenden Region von *Chironomus thummi*. *Diplomarbeit, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz*

Mainx F (1964) The genetics of *Megaselia scalaris* Loew (Phoridae): a new type of sex determination in Diptera. *Am. Nat.* **98**: 415–430

Mainx F (1966) Die Geschlechtsbestimmung bei *Megaselia scalaris* Loew (Phoridae). *Z. Vererbungsl.* **98**: 49–60

Marín I, Baker BS (1998) The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* **281**: 1990–1994

6. Literaturliste

Marshall AJ, Burgoyne LA (1976) Interpretation of the properties of chromatin extracts from mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **3**: 1101–1110

Martin J (2010) A phylogenetic analysis of the change in genomic location of the sex determining region in the genus *Chironomus* (Diptera: Chironomidae). *VOGiS Herald* **14**: 62–69

Martin J, Kuvangkadilok C, Peart DH, Lee BTO (1980) Multiple sex determining regions in a group of related *Chironomus* species (Diptera: Chironomidae). *Heredity* **44**: 367–382

Mattaj IW (1989) A binding consensus: RNA-protein interactions in splicing, snRNPs and sex. *Cell* **57**: 1–3

McAllister BF, McVean GAT (2000) Neutral evolution of the sex-determining gene *transformer* in *Drosophila*. *Genetics* **154**: 1711–1720

McDonald IC, Evenson P, Nickel CA, Johnson OA (1978) Housefly genetics: isolation of a female determining factor on chromosome 4. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **71**: 692–694

McDonell MW, Simon MN, Studier FW (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

McEwen BF, Chan GKT, Zubrowski B, Savoian MS, Sauer MT, Yen TJ (2001) CENP-E is essential for reliable bioriented spindle attachment, but chromosome alignment can be achieved via redundant mechanisms in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**: 2776–2789

Meigen JW (1804) Klassifikation und Beschreibung der Europäischen zweiflügeligen Insekten (Diptera, Linn.). *Reichard, Braunschweig*

Meise M, Hilfiker-Kleiner D, Dübendorfer A, Brunner C, Nöthiger R (1998) *Sex-lethal*, the master sex-determining gene in *Drosophila*, is not sex-specifically regulated in *Musca domestica*. *Development* **125**: 1487–1494

Metz CW (1938) Chromosome behavior, inheritance and sex determination in *Sciara*. *Amer. Nat.* **72**: 485–520

- Metz CW, Schmuck ML (1929)** Unisexual progenies and the sex chromosomes mechanism in *Sciara*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **15**: 863–866
- Mori H, Kondo A, Ohshima A, Ogura T, Hiraga S (1986)** Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *J. Mol. Biol.* **192**: 1–15
- Moses MS, Metz CW (1928)** Evidence that the female is responsible for the sex ratio in *Sciara* (Diptera). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **14**: 928–930
- Muller HJ (1918)** Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. *Genetics* **3**: 422–499
- Muller HJ (1932)** Some genetic aspects of sex. *Am. Nat.* **66**: 118–138
- Muller HJ (1964)** The relation of recombination to mutational advance. *Mutat. Res.* **1**: 2–9
- Nagoshi RN, Baker BS (1990)** Regulation of sex-specific RNA splicing at the *Drosophila doublesex* gene: *cis*-acting mutations in exon sequences alter sex-specific RNA splicing patterns. *Genes Dev.* **4**: 89–97
- Narbonne K, Besse F, Brissard-Zahraoui J, Pret A-M, Busson D (2004)** *Polyhomeotic* is required for somatic cell proliferation and differentiation during ovarian follicle formation in *Drosophila*. *Development* **131**: 1389–1400
- Neer E, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994)** The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**: 297–300
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, et al. (2007)** Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* **316**: 1718–1723
- Neumann-Silberberg FS, Schüpbach T (1993)** The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF α -like protein. *Cell* **75**: 165–174
- Niessen M, Schneiter R, Nöthiger R (2001)** Molecular identification of *virilizer*, a gene required for the expression of the sex-determining gene *Sex-lethal* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **157**: 679–688

6. Literaturliste

- Nigro RG, Campos CC, Perondini ALP (2007)** Temperature and the progeny sex-ratio in *Sciara ocellaris* (Diptera, Sciaridae). *Genet. Mol. Biol.* **30**: 152–158
- Nöthiger R, Steinmann-Zwicky M (1985)** A single principle for sex determination in insects. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **50**: 615–621
- Ohno S (1967)** Sex chromosomes and sex linked genes. *Springer, Berlin*
- Ohta T, Tachida H (1990)** Theoretical study of near neutrality. I. Heterozygosity and rate of mutant substitution. *Genetics* **126**: 219–229
- Oliver DR (1971)** Life history of the Chironomidae. *Annu. Rev. Entomol.* **16**: 211–230
- O’Neil MT, Belote JM (1992)** Interspecific comparison of the *transformer* gene of *Drosophila* reveals an unusually high degree of evolutionary divergence. *Genetics* **131**: 113–128
- Paterno GD, Li Y, Luchman HA, Ryan PJ, Gillespie LL (1997)** cDNA cloning of a novel, developmentally regulated immediate early gene activated by fibroblast growth factor and encoding a nuclear protein. *Biol. Chem.* **272**: 25591–25595
- Pane A, Salvemini M, Delli Bovi P, Polito C, Saccone G (2002)** The *transformer* gene in *Ceratitits capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development* **129**: 3715–3725
- Pane A, De Simone A, Saccone G, Polito C (2005)** Evolutionary conservation of *Ceratitits capitata transformer* gene function. *Genetics* **171**: 615–624
- Paroush Z, Finley RL, Kidd T, Wainwright SM, Ingham PW, et al. (1994)** *groucho* is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation and sex determination and interacts directly with *hairy*-related bHLH proteins. *Cell* **79**: 805–815
- Penalva LOF, Ruiz MF, Ortega A, Granadino B, Vicente L, et al. (2000)** The *Drosophila fl(2)d* gene, required for female-specific splicing of *Sxl* and *tra* pre-mRNAs, encodes a novel nuclear protein with a HQ-rich domain. *Genetics* **155**: 129–139
- Pinder LCV (1986)** Biology of freshwater Chironomidae. *Ann. Rev. Entomol.* **31**: 1–23
- Pomiankowski A, Nöthiger R, Wilkins A (2004)** The evolution of the *Drosophila*

dex-determination pathway. *Genetics* **166**: 1761–1773

Ponting CP (1995) SAM: A novel motif in yeast sterile and *Drosophila* polyhomeotic proteins. *Protein Science* **4**: 1928–1930

Potter S, Truett M, Phillips M, Maher A (1980) Eukaryotic transposable genetic elements with inverted terminal repeats. *Cell* **20**: 639–647

Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, et al. (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**: 336–341

Prost E, Deryckere F, Roos C, Haenlin M, Pantesco V, Mohier E (1988) Role of the oocyte nucleus in determination of the dorsoventral polarity of *Drosophila* as revealed by molecular analysis of the *K10* gene. *Genes Dev.* **2**: 891–900

Pultz MA, Baker BS (1995) The dual role of *hermaphrodite* in the *Drosophila* sex determination regulatory hierarchy. *Development* **121**: 99–111

Ross R, Hankeln T, Schmidt ER (1997) Complex evolution of tandem-repetitive DNA in the *Chironomus thummi* species group. *J. Mol. Evol.* **44**: 321–326

Rutledge BJ, Zhang K, Bier E, Jan YN, Perrimon N (1992) The *Drosophila spitz* gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes & Development* **6**: 1503–1517

Saccone G, Peluso I, Artiaco D, Giordano E, Bopp D, Polito LC (1998) The *Ceratitidis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated. *Development* **125**: 1595–1500

Saccone G, Salvemini M, Pane A, Polito LC (2008) Masculinization of XX *Drosophila* transgenic flies expressing the *Ceratitidis capitata* DoublesexM isoform. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 1051–1057

Saiki RK, Gyllenstein UB, Ehrlich HA (1988) The polymerase chain reaction. In K.E. Davies (Hg.) Genome analysis. A practical approach. *IRL Press, Oxford*

Salvemini M, Robertson M, Aronson B, Atkinson P, Polito LC, Saccone G

6. Literaturliste

(2009) *Ceratitis capitata transformer-2* gene is required to establish and maintain the autoregulation of *Cetra*, the master gene for female sex determination. *Int. J. Dev. Biol.* **53**: 109–120

Salz HK, Flickinger TW (1996) Both loss-of-function and gain-of-function mutations in *snf* define a role for snRNP proteins in regulating *Sex-lethal* pre-mRNA splicing in *Drosophila* development. *Genetics* **144**: 95–108

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

Samuels ME, Deshpande G, Schedl P (1998) Activities of the Sex-lethal protein in RNA binding and protein: protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2625–2637

Sánchez L (2008) Sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 837–856

Sánchez L, Perondini ALP (1999) Sex determination in sciarid flies: a model for the control of differential X-chromosome elimination. *J. Theor. Biol.* **197**: 247–259

Sanger F, Nickeln S, Coulsen AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463–5467

Scali C, Catteruccia F, Li Q, Crisanti A (2005) Identification of sex-specific transcripts of the *Anopheles gambiae doublesex* gene. *J. Exp. Biol.* **208**: 3701–3709

Sciabica KS, Hertel KJ (2006) The splicing regulators Tra and Tra2 are unusually potent activators of pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* **34**: 6612–6620

Schaefer J, Schmidt ER (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

Schmidt ER (1981) The development of a 120 basepair repetitive DNA sequence in *Chironomus thummi* is correlated to the duplication of defined chromosomal segments. *FEBS Letters* **129**: 21–24

Schmidt ER (1984) Clustered and interspersed repetitive DNA sequence family of *Chi-*

ronomus. The nucleotide sequence of the Cla-elements and of various flanking sequences. *J. Mol. Biol.* **178**: 1–15

Schmidt ER (1992) Nonradioactive labelling and detection of biomolecules, Kap. Mapping of polytene chromosomes S. 354–359. *C. Kessler Springer Verlag Berlin, Heidelberg*

Schmidt ER, Godwin EA (1983) The nucleotide sequence of an unusual nontranscribed spacer and its ancestor in the rDNA in *Chironomus thummi*. *EMBO J.* **2**: 1177–1183

Schmidt ER, Vistorin G, Keyl H-G (1980) An AT-rich DNA component in the genomes of *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. *Chromosoma* **76**: 35–45

Schmidt ER, Godwin EA, Keyl H-G, Israelewski N (1982) Cloning and analysis of ribosomal DNA of *Chironomus thummi piger* and *Chironomus thummi thummi*. *Chromosoma* **87**: 389–407

Schmidt R, Hediger M, Nöthiger R, Dübendorfer A (1997) The mutation *masculinizer* (*man*) defines a sex-determining gene with maternal and zygotic functions in *Musca domestica* L. *Genetics* **145**: 173–183

Schultz J, Ponting CP, Hoffmann K, Bork P (1997) SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Science* **6**: 249–253

Schütt C, Nöthiger R (2000) Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* **127**: 667–677

Serano TL, Karlin-McGinness M, Cohen RS (1995) The role of *fs(1)K10* in the localization of the mRNA of the TGF alpha homolog *gurken* within the *Drosophila* oocyte. *Mech Dev.* **51**: 183–192

Sharp PM, Li W-H (1989) On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* **28**: 398–402

Shen H, Kan JL, Green MR (2004) Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Mol. Cell* **13**: 367–376

6. Literaturliste

Shen H, Green MR (2004) A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly. *Mol. Cell* **16**: 363–373

Shizuya H, Birren B, Kim U-J, Mancino V, Slepak T, et al. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8794–8797

Sievert V, Kuhn S, Traut W (1997) Expression of the sex determining cascade genes *Sex-lethal* and *doublesex* in the phorid fly *Megaselia scalaris*. *Genome* **40**: 211–214

Sievert V, Kuhn S, Paululat A, Traut W (2000) Sequence conservation and expression of the *Sex-lethal* homologue in the fly *Megaselia scalaris*. *Genome* **43**: 382–390

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, et al. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**: 825–837

Slack JM, Darlington BG, Gillespie LL, Godsave SF, Isaacs HV, Paterno GD (1989) The role of fibroblast growth factor in early *Xenopus* development. *Development* **107 Suppl**: 141–148

Slack JM, Darlington BG, Gillespie LL, Godsave SF, Isaacs HV, Paterno GD (1990) Mesoderm induction by fibroblast growth factor in early *Xenopus* development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **327**: 75–84

Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 181–185

Sosnowski BA, Belote JM, McKeown M (1989) Sex-specific alternative splicing of RNA from the *transformer* gene results from sequence-dependent splice site blockage. *Cell* **58**: 449–459

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503–517

Springer R (1958) Die Koppelungsverhältnisse bei den beiden Geschlechtern von *Megaselia scalaris* Loew (= *Aphiochaeta xanthina* Speis) (Phoridae). *Z. Vererbungsl.* **89**: 373–376

Staknis D, Reed R (1994) SR proteins promote the first specific recognition of pre-mRNAs and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7670–7682

Steinemann M, Steinemann S (1992) Degenerating Y chromosomes of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7591–7595

Steinemann M, Steinemann S (1998) Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution. *Genetica* **102/103**: 409–420

Stevens L (1997) Sex chromosomes and sex determining mechanisms in birds. *Sci. Prog.* **80** (Pt 3): 197–216

Stiehl R (2009) Klonierung und Analyse der geschlechtsbestimmenden Region bei *Chironomus piger* und *Chironomus thummi*. *Diplomarbeit, Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz*

Taenzler V, Bruns E, Dorgerloh M, Pfeifle V, Weltje L (2007) Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology* **16**: 221–230

The International SNP Map Working Group (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**: 928–933

Tio M, Moses K (1997) The *Drosophila* TGF α homolog Spitz acts in photoreceptor recruitment in the developing retina. *Development* **124**: 343–351

Tranudji M, Shoemaker J, L'Italien L, Russell L, Chin G, Schebye XM (2004) Gene silencing of *CENP-E* by small interfering RNA in HeLa cells leads to missegregation of chromosomes after a mitotic delay. *Mol. Biol. Cell* **15**: 3771–3781

Traut W (1994) Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. *Genetics* **136**: 1097–1104

Traut W (2010) New Y chromosomes and early stages of sex chromosome differentiation: sex determination in *Megaselia*. *J. Genet.* **89**: 307–313

6. Literaturliste

Traut W, Willhoeft U (1990) A jumping sex determining factor in the fly *Megaselia scalaris*. *Chromosoma* **99**: 407-412

Traut W, Wollert B (1998) An X/Y DNA segment from an early stage of sex chromosome differentiation in the fly *Megaselia scalaris*. *Genome* **41**: 289-294

Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex Dev.* **1**: 332-346

Tufarelli C, Frischauf AM, Hardison R, Flint J, Higgs DR (2001) Characterization of a widely expressed gene (*LUC7-LIKE; LUC7L*) defining the centromeric boundary of the human alpha-globin domain. *Genomics* **71**: 307-314

Ullerich F-H (1975) Identifizierung der genetischen Geschlechtschromosomen bei der monogenen Schmeißfliege *Chrysomya rufifacies* (Calliphoridae, Diptera). *Chromosoma* **50**: 393-419

Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 1015-1068

Wagoner DE (1969) Presence of male determining factors found on three autosomes in the house fly, *Musca domestica*. *Nature* **223**: 187-188

Watts MM, Pascoe D (2000) A comparative study of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus tentans* Fabricius (Diptera: Chironomidae) in aquatic toxicity tests. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **39**: 299-306

Weaver BAA, Bonday ZQ, Putkey FR, Kops GJPL, Silk AD, Cleveland DW (2003) Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J. Cell Biol.* **162**: 551-563

Whiting PW, Whiting AR (1925) Diploid males from fertilized eggs in Hymenoptera. *Science* **62**: 437

Whiting PW (1933) Selective fertilization and sex determination in Hymenoptera. *Science* **78**: 537-538

Whiting PW (1943) Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*.

Genetics **28**: 365–382

Wieschaus E, Marsh JL, Gehring W (1978) *fs(1)K10*, a germline-dependent female sterile mutation causing abnormal chorion morphology in *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **184**: 75–82

Wieschaus E, Szabad J (1979) The development and function of the female germ line in *Drosophila melanogaster*: A cell lineage study. *Dev. Biol.* **68**: 29–46

Wilkins AS (1995) Moving up the hierarchy: A hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays* **17**: 71–77

Willhoeft U, Traut W (1990) Molecular differentiation of the homomorphic sex chromosomes in *Megaselia scalaris* (Diptera) detected by random DNA probes. *Chromosoma* **99**: 237–242

Willhoeft U, Franz G (1996) Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* **144**: 737–745

Wobus U, Bäumlein H, Bogachev SS, Borisevich IV, Panitz R, Kolesnikov NN (1990) A new transposable element in *Chironomus thummi*. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 311–316

Wu JY, Maniatis T (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**: 1061–1070

Wülker W, Götz P (1968) Die Verwendung der Imaginalscheiben zur Bestimmung des Entwicklungszustandes von *Chironomus*-Larven (Dipt.). *Z. Morph. Tiere* **62**: 363–388

Yang PZ, Fu H, Walker J, Papa CM, Smalle J, et al. (2004) Purification of the *Arabidopsis* 26 S proteasome - Biochemical and molecular analyses revealed the presence of multiple isoforms. *J. Biol. Chem.* **279**: 6401–6413

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103–119

Yen H-CS, Espiritu C, Chang EC (2003) Rpn5 is a conserved proteasome subunit

6. Literaturliste

and required for proper proteasome localization and assembly. *J. Biol. Chem.* **278**: 30669–30676

Younger-Shepherd S, Vaessin H, Bier E, Jan LY, Jan YN (1992) *deadpan*, an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator in *Drosophila* sex determination. *Cell* **70**: 911–922

Zahler AM, Neugebauer KM, Lane WS, Roth MB (1993) Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing. *Science* **260**: 219–222

Zahler AM, Roth MB (1995) Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2642–2646

Zissler D (1999) Lehrbuch der Entomologie, Kap. 13.1 Fortpflanzung. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena*

A. Anhang

A.1. Puffer und Lösungen

Denaturierungspuffer (Southern Blot)	50 mM NaOH 1,5 M NaCl
Dialyse-Puffer (10x)	3 M NaCl 0,25 mM Tris-HCl 1 M EDTA-Dinatriumsalz
E-Puffer (Elektrophoresepuffer) (10x)	0,36 M Tris 0,3 M NaOH 0,1 M EDTA-Dinatriumsalz
Ethidiumbromid-Färbelösung	5 µg Ethidiumbromid/ml in 1x E-Puffer
Ethidiumbromid-Stammlösung	5 mg Ethidiumbromid/ml
Homogenisierungspuffer	58 g Saccharose 10 ml 0,1 M Na ₂ EDTA pH 7,4 2,5 ml 0,1 M Na ₂ EGTA pH 7,4 50 ml Puffer A in 500 ml A. bidest.
Hybridisierungspuffer (Southern-Hybridisierung)	3x SSC 1x PM 0,5% SDS
DNA-Ladepuffer	4 M Harnstoff 0,1 M EDTA-Dinatriumsalz

A. Anhang

	50% (w/v) Saccharose 0,1% (w/v) Bromphenolblau in HPLC-H ₂ O
LB-Medium	0,005% (w/v) NaCl 0,005% (w/v) Hefe-Extrakt 0,01% (w/v) Trypton
L-Puffer	0,1 M EDTA 0,01 M Tris 0,02 M NaCl
Lösung I	10 mM EDTA-Dinatriumsalz pH 8; autoklaviert
Lösung I.1	7,5 mg RNase A/100 ml Lösung I
Lösung I.2	25 mM Tris 10 mM EDTA-Dinatriumsalz pH 8; autoklaviert
Lösung II	0,2 M Natriumhydroxid 1% (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)
Lösung II.1	0,2 M Natriumhydroxid 2% (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)
Lösung III	1,875 M Kaliumacetat, pH 5,2
Neutralisierungspuffer (Southern Blot)	0,5 M Tris-HCl, pH 7,4 1,5 M NaCl
PBS (Phosphate Buffered Saline) (10x)	3,4 M Natriumchlorid 70 mM Kaliumchlorid 40 mM Kaliumdihydrogenphosphat 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
PBS/BSA	10 mM MgCl 10 mg/ml BSA in 1x PBS

Präinkubationsmedium (PM) (Southern Hybridisierung)	0,02% (w/v) Ficoll 400 0,02% (w/v) Polyvinylpyrrolidon 0,02% (w/v) BSA in 3x SSC
Puffer A (10x)	0,6 M KCl 0,15 M NaCl 1,5 mM Spermin 5 mM Spermidin 0,15 M Tris-HCl pH 7,4
SSC (Standard-Saline-Citrate-Puffer) (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
TBE (Tris-Borat-Elektrophorese-Puffer) (1x)	90 mM Tris 90 mM Borsäure
Underlay-Lösung 1	235 g Saccharose 5 ml 0,1 M NaEDTA 1,5 ml 0,1 M NaEGTA 50 ml 10x Puffer A Auffüllen mit A. bidest. auf 500 ml
Underlay-Lösung 2	359,4 g Saccharose 0,5 ml 0,1 M NaEDTA 0,5 ml 0,1 M NaEGTA 50 ml 10x Puffer A Auffüllen mit A. bidest. auf 500 ml

Tabelle A.1.: Verwendete Puffer und Lösungen. Soweit nicht anders angegeben alle Lösungen in A. bidest.

A.2. Bezugsquellen

Agarosen	ROTI® GAROSE (Roth, Karlsruhe) Agarose Type II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Elektroporationsküvetten	Biozym (Hess. Oldendorf)
IPTG	Fermentas (St. Leon-Rot)
Nitrozellulosefilter	Whatman (Dassel)
Nitrozellulosefilter, rund	Whatman (Dassel)
$\alpha^{32}\text{P}$ dATP	Analytic Hartmann (Braunschweig)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
3MM-Papier	Whatman (Dassel)
Restriktionsendonukleasen	Roche (Mannheim), Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Röntgenfilm	Fuji (Tokyo, Japan)
Röntgenfilm-Entwickler	Adefo-Chemie GmbH (Dietzenbach)
Röntgenfilm-Fixierer	Adefo-Chemie GmbH (Dietzenbach)
Verstärkerfolie (Cronex Hi-Plus)	Dupont; Dr. Goos-Suprema (Heidelberg)
X-Gal	Fermentas (St. Leon-Rot)

Tabelle A.2.: Bezugsquellen

A.3. Screening-Sonden

Sonde	Position (Bp)	Art der Sonde	verwendete Primer	Länge
L99E2/2-5	92384–93249	PCR-Produkt	dk69for IMSB10rev(71/88)	866 Bp
L99B3/2-7	117859–119214	<i>EcoRI</i> -Restriktionsfragment aus Subklon F08 L99 F2 P5		1356 Bp
piYD5Z	10187–11115	PCR-Produkt	C.th.03piYD5Z For C.th.04piYD5Z Rev	930 Bp
L116I1/1-1	94930–95157	PCR-Produkt	C.th.L116I1/1-1Y For C.th.L116I1/1-1Y Rev	230 Bp
Sonden-Mix		3 PCR-Produkte aus <i>mi-er1</i> , <i>CG4587</i> , <i>polyhomeotic</i>		
	111491–112546		MIER Forward MIER Reverse	1056 Bp
	119142–119881		WD Forward WD Reverse	740 Bp
	136152–137198		PolyhomeoticFor1.2 PolyhomeoticRev1	1047 Bp
Luc7p	115084–115791	PCR-Produkt	AST Forward AST Reverse	708 Bp

Tabelle A.3.: Screening-Sonden

A.4. Genstrukturen in der SDR

Gen	Orientierung	ORFs (Bp)	Genstruktur (Bp)
<i>GJ16627-like</i>	+	3074-3406	S 3116-3406 A 3979–3984
<i>ACYPI006459-like</i>	+		P 17794–17833
		19291–19506	E1 19297–19494
		19560–19874	E2 19560–19772
		19828–20061	E3 19831–20061
			A 20220–20225
<i>spitz-like 1</i>	-		A 20690–20685
		26395–25295	E3 26310–25883
		26473–26378	E2 26450–26389

Fortsetzung auf der nächsten Seite

A. Anhang

Gen	Orientierung	ORFs (Bp)	Genstruktur (Bp)
<i>spitz-like 2</i>	-	28170–27871	E1 28079–27875 P 33015–32765 A 70150–70145
		74794–74606	E4 74790–74606
		74956–74858	E3 74930–74869
		75210–75001	E2 75185–75005
		76083–76009	E1 76083–76050 P 81050–80800
		101929–102179	P 101929–102179
<i>spitz-like 3</i>	+	105797–105853	E1 105797–105818
		106344–106538	E2 106360–106534
		106555–106749	E3 106575–106654
		106700–106960	E4 106716–106960 A 107214–107219
		108644–108639	A 108644–108639
<i>CENP-E-like</i>	-	109989–108760	E2 109965–108760
		111132–110095	E1 111082–110146
<i>mi-er1-like</i>	-	111221–111216	A 111221–111216
		111702–111343	E2 111702–111343
		112885–111758	E1 112885–111764 P 114160–113910
<i>LUC7-like</i>	+	114949–114987	P 114949–114987
		115052–115198	E1 115052–115171
		115256–115939	E2 115289–115935
		115946–116170	E3 115993–116162
		116187–116249	E4 116227–116249 A 116982–116987
<i>CG7845-like</i>	-	117105–117100	A 117105–117100
		119661–118807	E3 119559–118807
		120069–119817	E2 120062–119825
		120352–120089	E1 120211–120124 P 120143–120182
<i>fs(1)K10-like</i>	+	120630–121553	E1 120669–121517
		121584–121844	E2 121584–121844 A 122334–122339
		122334–122339	A 122334–122339
<i>bcn.92-like</i>	+	122645–122794	E1 122699–122790
		122987–123205	E2 123061–123181

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Gen	Orientierung	ORFs (Bp)	Genstruktur (Bp)
<i>D-Laktat-DH-like</i>	-	123235–123300	E3 123250–123300 A 123304–123309 A 122597–122592
		123666–123388	E3 123644–123388
		124216–123785	E2 124118–123796
		125108–124185	E1 125108–124189 P 128444–128405
			P 132545–132584
<i>polyhomeotic-like</i>	+	134100–134288	E1 134100–134131
		135387–136841	E2 135401–136815
		136861–137211	E3 136886–137207
		137484–137696	E4 137504–137684
		137751–139346	E5 137751–139346 A 139594–139599
<i>CG31635-like</i>	+	144342–146015	E 144342–145968
<i>CG15207-like</i>	+	146622–147497	E 146638–147473
<i>CG11203-like</i>	+	162124–162366	E1 162169–163328
		167558–167953	E2 167715–167941
		168083–168460	E3 168083–168290
		168373–168723	E4 168392–168656
		168741–169430	E5 168830–169383
		169448–169876	E6 169452–169771
		169771–170865	E7 169840–170865 A 171512–171517
<i>rpn5-like</i>	+		E1 173725–173731
		173840–174790	E2 173865–174786
		174813–175031	E3 174851–175007
		175038–175358	E4 175968–175358 A 175430–175435
			A 175467–175462
<i>HPS-like</i>	-	178100–176337	E3 178100–176337
		178270–178106	E2 178265–178163
		180205–178322	E3 180139–178326 P 180208–180169
<i>rpS5-like</i>	+	180776–180958	E1 180785–180813
		180985–182199	E2 180986–181237
		180985–182199	E3 181298–182199

Fortsetzung auf der nächsten Seite

A. Anhang

Gen	Orientierung	ORFs (Bp)	Genstruktur (Bp)
<i>CtY</i>	-		A 182237–182242
			A 182308–182303
		183636–183430	E15 183636–183430
		183782–183678	E14 183782–183699
		184023–183814	E13 184007–183874
		184153–184055	E12 184140–184066
		184316–184125	E11 184274–184205
		184498–184301	E10 184449–184337
		184668–184507	E9 184668–184512
		185001–184849	E8 184991–184908
		185505–185389	E7 185503–185404
		189937–185558	E6 189898–185562
		190152–190015	E5 190152–190033
		190599–190432	E4 190539–190450
		195643–191213	E3 195642–191327
196314–195652	E2 196314–195750		
196986–196864	E1 196977–196891		
<i>CG2841 (ptr) -like</i>	-		A 197098–197093
			E2 199636–198422
			E1 199998–199669

Tabelle A.4.: Genstrukturen in der SDR. Dargestellt sind die Strukturen der 20 in der Sequenz der SDR gefundenen Gene: ggf. Promotor (**P**), Exons (**E1**, **E2** etc.) bzw. Singletons (**S**) und PolyA-Sequenzen (**A**).