

**Epigenetische Einflüsse auf die Geschlechtsdetermination
von *Chironomus thummi* und *Chironomus piger* sowie
funktionelle Analyse von Genen aus der
geschlechtsbestimmenden Region**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz



Nicholas Bachtadse

Geboren am 29.11.1984 in Ann Arbor, Michigan (USA)

Dezember 2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung	1
1.1. Die Familie der Chironomiden	1
1.1.1. Das Chironomiden-Genom.....	2
1.2. Geschlechtsbestimmungsmechanismen der Eukaryoten	5
1.2.1. Geschlechtsbestimmungssysteme bei Insekten	6
1.2.1.1. Geschlechtsbestimmungskaskade bei <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.2.1.2. Komplementäre Geschlechtsbestimmung bei <i>Apis mellifera</i>	9
1.2.1.3. Geschlechtsbestimmungskaskaden bei Insekten und deren Evolution	11
1.2.1.4. Geschlechtsbestimmung bei <i>Chironomus</i>	13
1.3. Verschiedene Formen der Epigenetik	17
1.3.1. Histon-Modifikationen und ihre Einflüsse auf Chromatin	18
1.3.2. DNA-Modifikationen	19
1.3.2.1. DNA-Methylierung bei Invertebraten	20
2 Zielsetzung	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1. Verwendete Versuchstiere.....	23
3.2. Geschlechtsbestimmung bei Chironomiden	23
3.2.1. Geschlechtsbestimmung adulter Tiere	23
3.2.2. Geschlechtsbestimmung larvaler Tiere.....	23
3.3. Mikroinjektion.....	24
3.3.1. Sammeln und Vereinzeln der Gelege.....	25
3.3.2. Ziehen und Schleifen der Nadeln	25
3.3.3. Aufreihen der Embryonen.....	26

3.3.4.	Mikroinjektion mittels Mikromanipulator	26
3.3.5.	Behandlung der injizierten Tiere	27
3.3.6.	In vitro-Transkription dsRNAs	27
3.3.7.	Nachweis der Doppelsträngigkeit der RNAs	28
3.4.	Illumina Next-Generation Sequencing	28
3.4.1.	Auswertung der Illumina Next-Generation Sequencing Sequenzdaten	28
3.4.2.	Assemblierung der aufbereiteten Rohdaten.....	29
3.4.3.	Kartierung der aufbereiteten Rohdaten	29
3.5.	Molekularbiologische Standardmethoden	29
3.5.1.	RNA-Isolierung aus tierischem Gewebe.....	29
3.5.2.	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI).....	30
3.5.3.	Nuklease-Verdau	30
3.5.4.	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	30
3.5.5.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	31
3.5.6.	cDNA-Synthese	31
3.5.7.	Agarose-Gelelektrophorese	31
3.5.8.	Testgele	32
3.5.9.	Denaturierende Agarosegele zum Auftrennen von ssRNA	32
3.5.10.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
3.5.10.1.	Standard-PCR.....	33
3.5.11.	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	33
3.5.12.	Klonierung von PCR-Produkten	34
3.5.13.	Ligation	34
3.5.14.	Transformation mittels Elektroporation	35
3.5.15.	Restriktion genomischer DNA	35
3.5.16.	Southern Transfer	35
3.5.17.	Hybridisierung	36
3.5.18.	Random Primed Oligo Labeling	36
3.5.19.	Autoradiografie	37

3.5.20.	Plasmid-Präparation.....	37
3.5.21.	Sanger-Sequenzierung	38
3.5.22.	Auswertung von DNA-Sequenzen	38
3.6.	Standardlösungen und Materialien	38
4	Ergebnisse	41
4.1.	DNA- und Histon-Methylierungen bei <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i>	41
4.1.1.	DNA-Methylierungsnachweis mittels AP-Assay.....	41
4.1.2.	Nachweis von DNA- und Histon-Methylierungen mittels Antikörperfärbungen an Polytäanchromosomen.....	42
4.1.3.	DNA-Methyltransferasen bei <i>Chironomus</i>	45
4.1.4.	Mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede in den Methylierungsmustern.....	49
4.1.4.1.	MSRE und RAPD-PCR.....	49
4.1.4.2.	MSRE und radioaktive Southern-Hybridisierungen	52
4.2.	Erstellen eines Y-Chromosomen-spezifischen SDR-Contigs für <i>C. th.</i>	58
4.2.1.	Aufzucht von Kreuzungshybriden	58
4.2.2.	Sequenzierung der Hybriden und Analyse der Rohdaten.....	63
4.2.3.	Assemblierung Y-Chromosomen-spezifischer Sequenzen	64
4.2.4.	Sequenzinformationen der proximalen Verlängerung	68
4.3.	RNA-Interferenz an <i>Chironomus thummi</i>	73
4.3.1.	RNAi-Workflow.....	74
4.3.2.	Die Positivkontrollen <i>hunchback</i> und <i>orthodenticle/ocelliless</i>	75
4.3.3.	RNA-Interferenz in der SDR von <i>Chironomus thummi</i>	78
4.3.4.	Geschlechterverteilung nach RNAi.....	82
5	Diskussion.....	84
5.1.	Epigenetik bei <i>Chironomus</i>	84
5.1.1.	Histon-Metyhlierung bei <i>Chironomus</i>	84
5.1.2.	DNA-Methylierung bei <i>Chironomus</i>	86
5.1.3.	DNMT2-abhängige Methylome.....	88

5.1.	RNA-Interferenz bei <i>Chironomus</i>	92
5.1.1.	Wirksamkeit der Methode	93
5.1.2.	„Knock down“ der Gene <i>fs(1)K10-like</i> und <i>luc7(p)-like</i> bei <i>C. thummi</i>	93
5.1.3.	Umstände, die den Erfolg der RNAi-Versuchen verhindern können	95
5.2.	Erweiterung des Y-Chromosomen-spezifischen SDR-Haplotyps von <i>C. thummi</i>	98
5.2.1.	Kreuzung der Schwesternarten <i>thummi</i> und <i>piger</i>	98
5.2.2.	Hochdurchsatz-Sequenzierung der Kreuzungshybriden	101
6	Zusammenfassung	106
7	Ausblick	108
	Abbildungsverzeichnis.....	1
	Tabellenverzeichnis.....	3
	Literaturverzeichnis.....	4
	Anhang	24
	25
	Danksagung.....	29

1 Einleitung

1.1. Die Familie der Chironomiden

Die Zuckmücken (Chironomidae) gehören der Ordnung der Zweiflügler (Diptera) an, welche der Klasse der Insekten (Insecta) und dem Stamm der Gliederfüßer (Arthropoda) zugeordnet werden. Mit über 10.000 beschriebenen Arten bilden sie eine der erfolgreichsten Insektenfamilien, alleine in Deutschland sind über 700 Arten bekannt (Armitage 1997). Sie haben sowohl aquatische als auch terrestrische Lebensräume erschlossen, welche sie entlang einer breiten geographischen Skala besiedeln.

Als Mitglieder der holometabolen Insekten durchlaufen Chironomiden während ihres Lebenszyklus' eine vollständige Metamorphose, welche die drei aquatischen Stadien – Ei, Larve und Puppe – sowie das terrestrische Stadium der Imago umfasst. Das Eistadium dauert je nach Art für wenige Tage bis einige Wochen an. In der Regel produzieren Chironomidenweibchen bei einer Eiablage zwischen 100 und 1000 Eiern, in seltenen Fällen können es allerdings bis zu 3000 Eier pro Ablage werden (Hägele 1977). Wie bei den Eiern der meisten Tiere ist auch hier ein Chorion als äußerste Eihülle vorhanden. Zusätzlich werden die Eier als Gelege von einer gallertartigen Masse in einem Verbund zusammengehalten, der an einem Substrat nahe der Wasseroberfläche angeheftet vorliegt.

Aus den Eiern schlüpfen die fertig entwickelten Larven, wobei zunächst die Gallerte des Geleges, später sedimentierter und im Wasser treibender pflanzlicher Detritus als Nahrung dienen (Rasmussen 1984). Bei vielen Spezies, wie zum Beispiel bei den in dieser Arbeit verwendeten Arten *Chironomus (C.) thummi* und *C. piger*, weisen die Larven eine deutliche Rotfärbung auf. Die Rotfärbung ist auf eine Anwesenheit des Blutfarbstoffs Hämoglobin in der Hämolymphe zurückzuführen, was als eine Anpassung der Tiere an die sauerstoffarme Umgebung in den Sedimenten vieler Seen oder stehender Gewässer gedeutet wird (Weber 1980). Das

Larvenstadium umfasst vier Teilstadien (L1 - L4), unter denen das L4-Stadium eine Hauptrolle einnimmt. Es macht mit ca. 10 - 20 Tagen den größten Anteil des Lebenszyklus' aus – oftmals weit mehr als die Hälfte – und ist das Stadium, in dem die Entwicklung pupaler und imaginaler Organe (Imaginalscheiben) einsetzt. So ist in diesem Entwicklungszustand bereits eine Unterscheidung der Geschlechter anhand der Genitalimaginalscheiben möglich (Weber 1980; Wülker und Götz 1968).

Verglichen mit dem Larvalstadium ist das Puppenstadium von kurzer Dauer und kann bereits nach wenigen Stunden abgeschlossen sein. Während dieses Stadiums durchläuft die Larve die Metamorphose zur Imago. Die Puppe kann wie bei anderen aquatischen Insektenfamilien im Wasser frei beweglich oder an der Wasseroberfläche treibend vorkommen.

Die Imagines leben zwei bis fünf Tage, dieses Stadium ist also von sehr kurzer Dauer. Die Aufgabe der adulten Mücken besteht in der sexuellen Reproduktion. Sie nehmen daher in dieser Zeit keine Nahrung mehr auf. Bei der Paarung bilden die Männchen sogenannte Hochzeitsschwärme, welche meistens zur Abenddämmerung stattfinden und der Anlockung der Weibchen dienen (Neems et al. 1992). Unmittelbar nach der Kopulation fliegen die Weibchen zu einer geeigneten Stelle und beginnen mit der Eiablage. Auch wenn räumliche und zeitliche Trennung der Hochzeitsschwärme sowie unterschiedliche interspezifische Geschlechtsorgane Artenmischungen meist verhindern, kommt es doch hin und wieder zu Hybridbildungen zwischen zwei nahverwandten Arten, wie im Falle von *C. thummi* und *C. piger*.

1.1.1. Das Chironomiden-Genom

Obwohl Chironomidenlarven seit langem für die Bestimmung der Wasserqualität von Sedimenten genutzt werden und sich die polytären Riesenchromosomen vieler Chironomiden gut für *in situ*-Experimente eignen, war lange Zeit kein großes Interesse an „Whole Genome Sequencing“-Projekten innerhalb dieser Familie zu beobachten. Im Zuge der seit 2005 anhaltenden Weiterentwicklung der

Sequenziertechnologien der sogenannten nächsten Generation („Next Generation Sequencing“, NGS) ergaben sich jedoch neue Möglichkeiten, ganze Genome in kurzer Zeit und zu verhältnismäßig niedrigen Kosten zu sequenzieren, was schließlich 2014 zur Publikation des ersten Genoms einer Chironomiden-Art führte (Kutsenko et al. 2014). Noch im selben Jahr wurde ein weiteres Genom aus der Familie der Chironomiden publiziert (*Belgica antarctica*, Kelley et al. 2014).

In beiden Arbeiten wurden zur Assemblierung der Genome NGS-Daten genutzt. Solche Hochdurchsatzsequenzierungen werden üblicherweise auf einer von drei Plattformen hergestellt, die als SOLiD™-, 454- oder Illumina-Verfahren bekannt sind. Verglichen mit dem auf Ligation von Oligonukleotiden basierenden SOLiD™-System und der Pyrosequenzierung der 454-Roche-Plattform dürften die „NextSeq“- und „HiSeq“-Systeme der Firma Illumina weltweit den größten Anteil an Projekten haben (van Dijk et al. 2014). Derzeit sind mit Illumina Leseweiten von bis zu 300 nt pro „read“ und mehrere 100 Mio. „reads“ pro Sequenzierung möglich (engl. „read“ = ein sequenziertes DNA-Fragment), was bis zu 1.8 Tb an Daten pro Lauf liefern kann (Illumina 2015). Diese neuen Technologien revolutionieren viele Bereiche der Molekulargenetik, gleichzeitig erhöhen aber Sequenzinformationen dieser Größenordnung die (bio)informatischen Anforderungen (Koboldt et al. 2013; van Dijk et al. 2014). Durch die rasante Entwicklung müssen Computersysteme mittlerweile mehrere Terabyte an Daten verarbeiten. Außerdem sind bei Hochdurchsatzsequenzierungen die Qualitätswerte („quality scores“) einzelner Basenpositionen oder ganzer „reads“ selbst ein integraler Bestandteil der Sequenzdaten. Das trägt neben der ohnehin schon großen Menge an Sequenzen weiter zur Datenmasse bei, wodurch bereits das Aufbereiten dieser Sequenzen mit großem bioinformatischen Aufwand verknüpft ist (McCormack et al. 2013). Eine weitere Herausforderung stellt die Kürze von NGS-„reads“ dar, welche ihre Assemblierung zu Contigs (Zusammenfügung überlappender „reads“, die von derselben genetischen Quelle stammen) und die Verknüpfung letzterer zu sogenannten „Metacontigs“ erschwert (Gregory 2005). Hier kommt die Stärke einer weiteren Sequenziertechnologie zur Geltung, die als „single molecule real time“-

Sequenzierung (SMRT) bekannt ist und 2011 von der Fa. Pacific Biosciences kommerziell angeboten wurde. Bei dieser Methode können „reads“ von bis zu 40 kb Länge erzeugt werden (Pacific Biosciences 2015). *De novo*-Assemblierungen ganzer Genome erfordern in der Regel eine Kombination mehrerer dieser Systeme. Zusätzlich ist für eine bessere Aussage über die tatsächliche genomische Struktur eine Überprüfung der Bioinformatik mittels klassischer molekulargenetischer Methoden notwendig (Shearer et al.). Häufig wird darauf aber bei „whole genome“-Projekten verzichtet, was zur Folge hat, dass ein Großteil der in den letzten Jahren erschienenen Publikationen lediglich sogenannte „draft“-Genome enthält, also Genom-Assemblierungen, die auf DNA-Sequenzen mit geringer Abdeckung, lückenhaften Bereichen oder unklarer Reihenfolge oder Orientierung basieren (GOLD - Genomes Online Database 2015).

Auch bei den 2014 veröffentlichten Chironomiden-Genomen handelt es sich um „draft“-Genome. Mit 99 Mbp ist das Genom von *B. antarctica* dabei das kleinste bisher sequenzierte Insektengenom (Kelley et al. 2014). Erklärt wird die geringe Genomgröße durch eine Reduktion repetitiver Elemente. So finden sich im Genom der untersuchten Spezies nur sehr wenige transposable Elemente (ca. 0,12% des assemblierten Genoms). Der GC-Gehalt des Genoms liegt bei 37%, wobei Abschnitte kodierender Regionen einen Gehalt von ca. 47% besitzen und damit weniger als andere Dipteren wie *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* und *Drosophila melanogaster* (Kelley et al. 2014). Das Genom von *C. tentans* ist mit 200 Mbp deutlich größer als das von *B. antarctica*. In dieser Spezies machen repetitive Sequenzen ca. 10% des Genoms aus. Ein Drittel dieser repetitiven DNA setzt sich aus Minisatelliten und sogenannten „low complexity repeats“ zusammen, die restlichen zwei Drittel aus DNA-Elementen wie LINEs, SINEs und LTR-Elementen sowie einigen Elementen, die keiner bekannten Familie zugeschrieben werden können (Kutsenko et al. 2014). Cla-Elemente konnten in dem „draft“-Genom nicht gefunden werden, was in Übereinstimmung mit Southern-Blot Analysen steht (Ross et al. 1997). Der GC-Gehalt ist mit 31% sehr niedrig, deckt sich aber mit Befunden zu den Arten *C. thummi* und *C. piger* (Schmidt et al. 1980).

1.2. Geschlechtsbestimmungsmechanismen der Eukaryoten

Sexuelle Reproduktion ist ein vorherrschendes und facettenreiches Charakteristikum der Eukaryoten. Ihr zugrunde liegt die Produktion zweier unterschiedlicher Gameten: männlicher Spermien und weiblicher Eizellen. Ihre Entstehung während der Meiose sowie ihre spätere Verschmelzung zur Zygote gewährleisten eine Neukombination des Erbguts (Lloyd 1980; Bull 1983a; Kondrashov 1988; Hurst und Peck 1996). Voraussetzung für die Entstehung unterschiedlicher Gameten ist die Geschlechtsdetermination eines Individuums sowie seine darauffolgende geschlechtsspezifische Entwicklung. Obwohl das Prinzip der sexuellen Differenzierung nahezu allen Eukaryoten gemein ist, gibt es – insbesondere bei Tieren – eine Vielzahl verschiedener Mechanismen der Geschlechtsbestimmung, welche sich teilweise stark voneinander unterscheiden und selbst bei Individuen innerhalb einzelner Arten variieren können. Sie lassen sich aufgrund ihres primären Signals in zwei Hauptgruppen einteilen, nämlich nach Mechanismen, die auf ein genetisches beziehungsweise chromosomales Primärsignal zurückzuführen sind (GSD, „genetic sex determination“) und nach solchen, deren primäre Signale äußere Faktoren wie zum Beispiel Temperatur oder Populationsdichte sind (ESD, „environmental sex determination“). Eine klare Trennung dieser beiden Mechanismen ist jedoch nicht immer der Fall (Bull 1983b; Haag und Doty 2005; Marshall Graves 2008; Gempe und Beye 2011).

Im Gegensatz zu den molekularen Abläufen der ESD, über die wenig bekannt ist, sind innerhalb des GSD-Systems bereits viele unterschiedliche Mechanismen beschrieben worden (Haag und Doty 2005; Kato et al. 2011). Diese lassen sich wiederum zwei Gruppen zuordnen, die als Heterogametie und Haplodiploidie bezeichnet werden. Von Heterogametie spricht man, wenn eines der beiden Geschlechter unterschiedliche Geschlechtschromosomen besitzt, während sie beim jeweils anderen Geschlecht stets gleich sind. Das heterogametische Geschlecht bildet dann in gleichen Mengen unterschiedliche Gameten aus, die jeweils ein anderes Geschlechtsallel aufweisen, während das homogametische Geschlecht nur Gameten mit demselben Geschlechtsallel produziert. Bei der männlichen

Heterogametie bilden die Männchen unterschiedliche Gameten, während die Weibchen homogametisch sind. Entsprechend besitzen die Männchen zwei unterschiedliche Geschlechtschromosomen (XY) und die Weibchen zwei gleiche (XX). Hierbei ist das Y-Chromosom in der Regel Träger des Geschlechtsbestimmers, der dann auch häufig Faktor M genannt wird. Männliche Heterogametie tritt bei Säugetieren sowie bei einigen Amphibien, Fischen, Reptilien und Insekten auf. Weibliche Heterogametie ist zum Beispiel durch ihr Auftreten bei Vögeln und einigen Schmetterlingen bekannt. Hier ist das männliche Geschlecht das homogametische (ZZ), wohingegen das heterogametische weibliche Geschlecht (ZW) die unterschiedlichen Keimzellen bildet. Analog zum XY-System ist hierbei das W-Chromosom Träger des Geschlechtsbestimmers, der dann als Faktor F bezeichnet wird und eine weibliche Entwicklung der Embryonen einleitet. Es gibt weitere heterogametische Systeme, wie zum Beispiel das X0(Z0)-System, bei dem das heterogametische Geschlecht nur ein Geschlechtschromosom besitzt. Hier ist vor allem die Ordnung der Lepidoptera zu nennen, innerhalb derer einige Arten das Z/ZZ-System aufweisen (Charlesworth 1991; Traut et al. 2007; Bachtrog et al. 2014).

Der als Haplodiploidie bezeichnete Geschlechtsmechanismus wird von ca. 20% aller Tierspezies genutzt und beschreibt eine Form der genetischen Geschlechtsbestimmung, bei der aus unbefruchteten Eiern fertile Männchen mit haploidem Chromosomensatz entstehen, aus befruchteten Eiern hingegen diploide Weibchen (Beye et al. 1999; Cho et al. 2006). Eines der bekanntesten Beispiele der Haplodiploidie ist der bei vielen Arten der Hymenoptera vorkommende, komplementäre Geschlechtsbestimmungsmechanismus oder CSD („complementary sex determination“), worauf in Abschnitt 1.2.1.2 näher eingegangen wird.

1.2.1. Geschlechtsbestimmungssysteme bei Insekten

Alle bei den Tieren bekannten Mechanismen der Geschlechtsbestimmung treten in irgendeiner Form auch in der Klasse der Insekten auf (Sánchez 2008). Einige dieser

Mechanismen sind weitreichend an Modellorganismen oder an Organismen von ökologischem oder wirtschaftlichem Interesse beschrieben worden. Zwei dieser Organismen, nämlich *Apis mellifera* aus der Ordnung der Hymenoptera, sowie *Drosophila melanogaster* aus der Ordnung der Dipteren, sollen im Folgenden in Bezug auf ihr Geschlechtsbestimmungssystem näher beleuchtet werden. Abschließend wird in Kapitel 1.2.1.4 auf die Geschlechtsbestimmung der Chironomiden eingegangen.

1.2.1.1. Geschlechtsbestimmungskaskade bei *Drosophila melanogaster*

Sexuelle Differenzierung umfasst bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) geschlechtsspezifische Morphologien, geschlechtsspezifisches Verhalten, Dosiskompensation und eine geschlechtsspezifische Entwicklung der Keimzellen. Das alles ist auf ein einzelnes chromosomales Signal zurückzuführen, das sich zwischen Männchen (XY) und Weibchen (XX) unterscheidet und in der (In)Aktivierung des binären Schaltergens *Sex-lethal* (*Sxl*) resultiert. Auf *Sxl* folgt eine Kaskade regulatorischer Gene, die sich in drei Wirkungswege aufspaltet, welche jeweils die sexuelle Differenzierung des Somas, die Dosiskompensation und schließlich die Entwicklung der männlichen beziehungsweise weiblichen Keimbahn kontrollieren. Aktives *Sxl* induziert hierbei die weibliche Entwicklung in allen drei Wirkungswegen, wohingegen inaktives *Sxl* eine männliche Entwicklung bewirkt (Schuett und Noethiger 2000; Sánchez 2008).

Das primäre Signal, das die Weichen für die anschließende Entwicklung stellt, ist das Verhältnis der X-Chromosomen zum Autosomensatz (X:A). Ein Verhältnis von 1,0 (2X:2A) leitet die weibliche Entwicklung ein, ein Verhältnis von 0,5 (1X:2A) die männliche. Anders als bei männlicher Heterogameteie üblich, hat das Y-Chromosom hierbei keinen direkten Einfluss auf die Geschlechtsbestimmung, ist aber nötig für die männliche Fertilität (Bopp et al. 1991). Die Zählung der X-Chromosomen wird noch vor dem Blastodermstadium und somit in der frühen Embryogenese durch eine Balance zwischen den weibchenbestimmenden Genen auf dem X-Chromosom

und den männchenbestimmenden Genen auf den Autosomen verwirklicht (Bridges 1925; Cline 1993). Zu diesem Zeitpunkt wird in jeder somatischen Zelle das X:A-Verhältnis autonom festgestellt, was sich zum Beispiel in Form sexueller Mosaik beobachten lässt. (Sánchez und Nöthiger 1983; Steinmann-Zwicky et al. 1989).

Die molekulare Umsetzung des X:A-Verhältnisses erfolgt durch Gene, die sich einer der drei folgenden Gruppen zuordnen lassen: Numeratoren, Denominatoren und maternale Gene. Die Numeratorgene sind auf dem X-Chromosom lokalisiert und liegen dementsprechend bei Weibchen (XX) in jeweils zwei Kopien vor. Zu den Numeratoren gehören die drei *sisterless*-Gene *sisA*, *sisB* und *sisC* sowie *runt* (Cline 1988; Kania et al. 1990). Der einzige bekannte Denominator, das Gen *deadpan* (*dpn*), liegt auf einem Autosom und ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von *Sxl* herunterreguliert. Zu den maternalen Genen gehören, neben möglichen anderen, *daughterless* (*da*), *extrachmacrochaetae* (*emc*) und *groucho* (*gro*) (Cronmiller et al. 1988; Pultz und Baker 1995). Das Zusammenspiel der Produkte dieser Gene (Numeratoren, Denominatoren und maternale Gene) und ihr Wirken auf *Sxl* wird häufig vereinfacht durch ein Titrationsmodell beschrieben (Estes et al. 1995; Schuett und Noethiger 2000): Entscheidend ist das Mengenverhältnis der Numeratorproteine. Bei einem Verhältnis von 0,5 (X:AA) werden SISA und SISB vom autosomalen Denominatormolekül DPN gebunden. Ein Verhältnis von 1,0 (XX:AA) hat zur Folge, dass nicht alle SISA/B-Moleküle abgefangen werden und demzufolge mit dem maternalen DA Heterodimere bilden können, welche dann die Transkription von *Sxl* aktivieren. Diese frühe Transkription von *Sxl* erfolgt über den *establishment*-Promotor (P_E), findet nur in XX-Embryonen statt und hat dort dementsprechend frühes SXL-Protein zur Folge. Das SXL-Protein ist ein Spleißfaktor und wird später benötigt, um die autokatalytische Schleife der SXL-Produktion aufrecht zu erhalten. Die Transkription über den P_E wird nämlich im weiteren Verlauf der Embryogenese eingestellt und durch Transkription über den *maintenance*-Promotor (P_M) ersetzt, welcher jedoch in beiden Geschlechtern aktiv ist und für ein SXL-Protein kodiert, das im dritten Exon ein Stopp-Kodon enthält und somit inaktiv ist. Da in XX-Embryonen noch aktives SXL vorhanden ist, kann

dort das dritte Exon aus dem späten *Sxl*-Transkript herausgespleißt und die autoregulatorische Schleife von SXL in Gang gesetzt werden (Cline 1984; Bell et al. 1991). In Embryonen mit nur einem X-Chromosom kann das Stopp-Kodon nicht herausgespleißt werden und es entsteht somit kein funktionales SXL-Protein. Der Grund für den Promotorwechsel von *Sxl* ist die Dosiskompensation: Wäre *Sxl* noch sensitiv gegenüber der transkriptionalen Regulation durch die Numeratoren, nachdem die Dosiskompensation etabliert worden ist (Überexpression des X-Chromosoms bei Männchen im späteren Verlauf der Embryogenese), würde es jetzt bei Männchen aktiv transkribiert werden, mit letalen Folgen (Schuett und Noethiger 2000).

SXL katalysiert nicht nur sein eigenes Spleißen sondern auch die Regulation dreier weiterer Gene, die am Anfang ihrer jeweiligen Wirkungskaskaden stehen. Im Fall der somatischen Geschlechtsbestimmung ist das das Gen *transformer (tra)*. Aktives SXL führt in XX-Embryonen zur Bildung von aktivem TRA, welches zusammen mit dem konstitutiv vorhandenen TRA2 einen weiteren Spleißkomplex bildet, der wiederum das Weibchen-spezifische Spleißen des in beiden Geschlechtern vorhandenen bifunktionalen Gens *doublesex (dsx)* diktiert (Hoshijima et al. 1991; Hedley und Maniatis 1991; Burtis und Baker 1989). *Doublesex* ist ein stark konserviertes Schaltergen, das in den Dimorphismus-Kaskaden vieler Insekten nachweisbar ist und damit in der Evolution der Geschlechtsbestimmung eine Schlüsselrolle einnimmt (Verhulst und van de Zande 2015; Wilkins 1995).

1.2.1.2. Komplementäre Geschlechtsbestimmung bei *Apis mellifera*

Das Prinzip der Geschlechtsbestimmung innerhalb der Gattung der Hautflügler (Hymenoptera), zu der die Honigbiene *Apis mellifera* gehört, wird als Haplodiploidie bezeichnet. Hierunter versteht man das Phänomen, dass das eine Geschlecht durch einen haploiden Chromosomensatz erzeugt wird, das andere Geschlecht durch einen diploiden Chromosomensatz, wobei üblicherweise das männliche Geschlecht das haploide ist. Diese Form der Geschlechtsdetermination

wurde bereits im 19. Jahrhundert beschrieben (Dzierzon 1845; Haarlander et al. 1857; Buttel-Reepen 1915) und gilt als das erste bekannte Konzept der Geschlechtsbestimmung bei Insekten (Bull 1983b; Beye 2004). Die Entdeckung diploider Männchen innerhalb der Hymenoptera sowie unterschiedlicher geschlechtslokusspezifischer Allele führte anschließend zur Hypothese der komplementären Geschlechtsbestimmung („complementary sex determination“): Nach Rückkreuzungen zwischen haploiden Männchen und ihren diploiden Müttern entstanden auch diploide Männchen, woraus geschlossen wurde, dass eine Heterozygotie im Geschlechtsloкус Voraussetzung für die weibliche Entwicklung ist und dementsprechend Männchen nur entstehen können, wenn der Geschlechtsloкус für das entsprechende Allel hemi- beziehungsweise homozygot vorliegt (Whiting 1943). Innerhalb dieses Lokus‘ konnten Beye und Hasselmann durch Klonierungs- und „knock down“-Versuche das Gen *complementary sex determiner (csd)* als Primärsignal identifizieren (Beye et al. 2003). Das Gen existiert in bis zu 19 unterschiedlichen Allelen innerhalb einer einzelnen Population (Adams et al. 1977; Yokoyama und Nei 1979), die sich jeweils um mindestens einen einzelnen nicht-synonymen Austausch unterscheiden (Hasselmann et al. 2008b; Gempe et al. 2009). Die AS-Sequenzen besitzen jedoch immer die gleichen drei Domänen: eine Arginin(R)/Serin(S)-reiche Domäne, eine terminale Prolin-reiche Domäne und dazwischen eine hypervariable Region, in der bis zu 60% der Aminosäuren ausgetauscht sein können (Beye et al. 2003). Die SR-Domäne deutet darauf hin, dass das Polypeptid über Protein-Protein Interaktion eine Rolle als Spleißfaktor spielen könnte (Hastings und Krainer 2001). Weiterhin zeigt CSD im C-terminalen Bereich eine hohe Ähnlichkeit zu TRA, was diese Vermutung bestärkt (Beye et al. 2003).

Innerhalb des geschlechtsbestimmenden Lokus‘ von *Apis mellifera*, ca. 12 kb strangaufwärts von *csd*, liegt das Gen *feminizer (fem)*, welches als homologer Vorläufer von *csd* identifiziert wurde. Darüber hinaus wird FEM als Ortholog von TRA betrachtet (Gempe et al. 2009). Das Genprodukt von *fem* wird von CSD Weibchen-spezifisch gespleißt und FEM^F vermittelt seinerseits das Weibchen-

spezifische Spleißen des Doppelschaltergens *dsx* sowie sein eigenes Spleißen durch eine autoregulatorische Schleife (Gempe und Beye 2011; Schurko 2012).

1.2.1.3. Geschlechtsbestimmungskaskaden bei Insekten und deren Evolution

Die Beobachtung, dass zwischen phylogenetisch nahe verwandten Arten beziehungsweise selbst innerhalb von Arten verschiedene Mechanismen der Geschlechtsbestimmung auftreten können (G. Franco et al. 1982; Bull 1983b; Traut 1994) und dass ein Mechanismus wiederum durch unterschiedliche Gene reguliert werden kann (Hasselmann et al. 2008a), impliziert, dass die Geschlechtsbestimmungsmechanismen sehr schnell evolvieren (Bachtrog et al. 2014). Hierbei ist zu beachten, dass die Gene der regulatorischen Kaskaden unterschiedlich stark konserviert sind (Bopp et al. 2014; Eirin-Lopez und Sanchez 2015). So lässt sich feststellen, dass sich zwar die Primärsignale häufig unterscheiden, die darauffolgenden Kaskaden jedoch vergleichsweise gut konserviert sind (Bopp et al. 2014). Im Speziellen sind es die beiden Schaltergene *transformer (tra)* und *doublesex (dsx)*, die in fast allen untersuchten holometabolen Insekten vorkommen und deren Funktionen zum Teil stark konserviert sind (Hediger et al. 2010; Verhulst et al. 2010). Die zentrale Rolle von *tra* („On“: Weibchen-spez. Entwicklung, „Off“: Männchen-spez. Entwicklung) konnte dabei in einigen Zwei- und Hautflüglern bestätigt werden: es leitet das Primärsignal an nachfolgende Effektoren weiter (O'Neil und Belote 1992; Concha und Scott 2009; Shukla und Palli 2012; Hall et al. 2015; Gempe et al. 2009). Der für die Geschlechtsbestimmung wichtigste Effektor ist *dsx*, wiewohl einige weitere bekannt sind, wie zum Beispiel *fruitless (fru)* (Sciabica und Hertel 2006; Burtis und Baker 1989; Hediger et al. 2004).

Das konservierte Grundprinzip beruht auf der Aktivierung von zygotischem *tra* (tra^{ZYG}), was das Weibchen-spezifische Spleißen seines Effektors *dsx* zur Folge hat. Es entsteht DSX^F . Ist kein aktives tra^{ZYG} vorhanden, entsteht die Isoform DSX^M und es folgt eine männliche Entwicklung des Embryos. Die An/Aus-Regulation von

tra^{ZYG} wird durch eine positive Feedbackschleife gewährleistet, in der einmal aktiviertes *tra*^{ZYG} sein eigenes Spleißen aufrechterhält. Die initiale Aktivierung von *tra*^{ZYG} wiederum kann über maternales *tra* (*tra*^{MAT}), die Anwesenheit einer heterozygoten Kombination von *csd*-Allelen oder, wie im Falle *D. melanogaster*, durch das Vorhandensein von aktivem SXL erfolgen (ABBILDUNG 1).

Es ist bemerkenswert, dass es trotz der hohen Evolutionsrate der primären Geschlechtsbestimmer einen konservierten Bereich innerhalb der Geschlechtsbestimmungskaskaden der Insekten zu geben scheint (Bopp 2010; Clynen et al. 2011; Geuverink und Beukeboom 2013; Verhulst und van de Zande 2015). Bopp et al. (2014) schlagen hierzu ein „Sanduhren-Modell“ vor, welches veranschaulichen soll, wie die Gene, welche *tra* und *dsx* in der Geschlechtskaskade vor- beziehungsweise nachgeschaltet sind, stark divergieren, während *tra* und *dsx* entweder konserviert wurden oder aber konvergent rekrutiert worden sind.

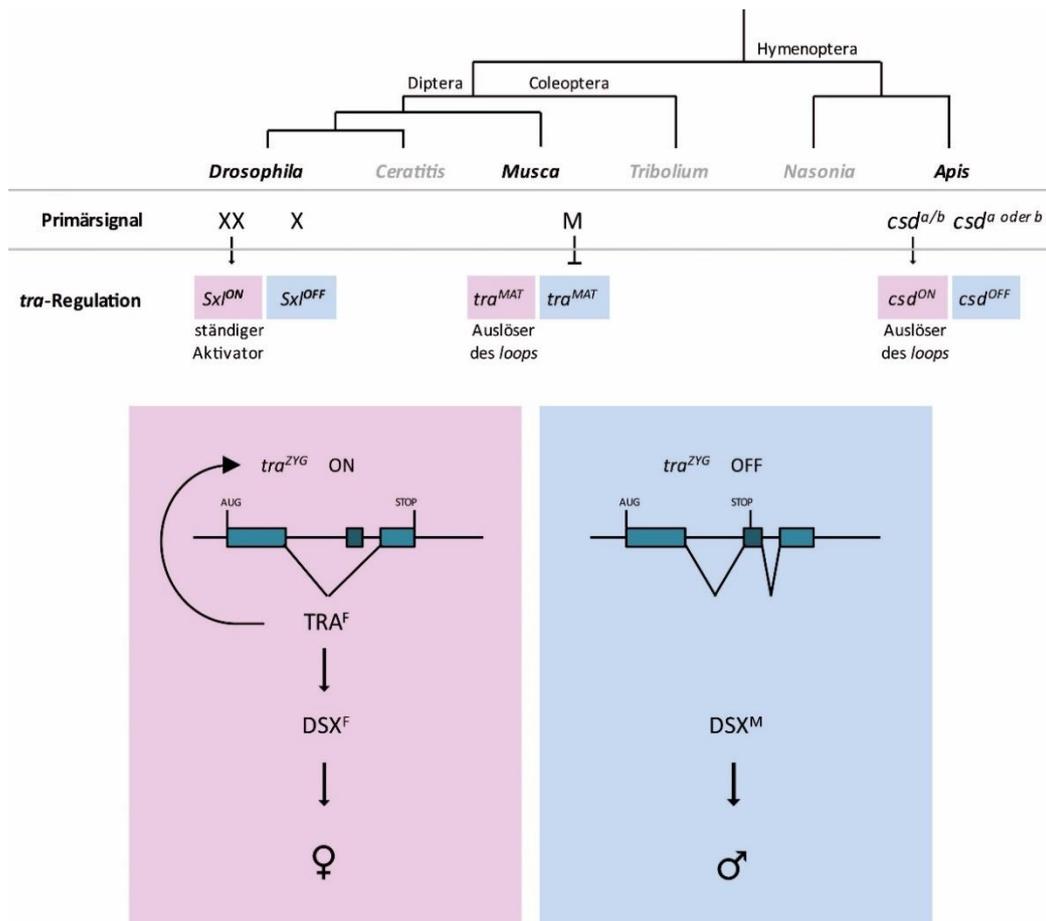


ABBILDUNG 1 | EIN KONSERVIERTES PRINZIP DER GESCHLECHTSBESTIMMUNG INNERHALB DER HOLOMETABOLEN INSEKTEN
 Dieses Schema hebt die Bedeutung des binären Schalters *tra* hervor. Durch verschiedene Arten ausgelöst, sorgt aktives zygotisches *tra* (*tra*^{ZYG}) für eine Weibchen-spezifisches Entwicklung des Embryos, indem *dsx*, der Effektor des Genproduktes von *tra*^{ZYG}, TRA^F, in seine Weibchen-spez. Isoform DSX^F gespleißt wird. TRA^F sorgt außerdem über eine autoregulatorische Feedbackschleife für Weibchen-spez. Spleißen von *tra*^{ZYG} und somit für die Aufrechterhaltung des Zyklus' (Bopp et al. 2014)

1.2.1.4. Geschlechtsbestimmung bei *Chironomus*

Bei allen *Chironomus*-Arten sind die Männchen das heterogametische Geschlecht. Morphologisch eindeutig unterscheidbare Geschlechtschromosomen sind in dieser Gattung jedoch bis auf wenige Ausnahmen nicht vorhanden und die im Regelfall vier Chromosomen können verschiedene, durch reziproke Translokationen entstandene Kombinationen der Chromosomenarme aufweisen (Beermann 1955a; Keyl 1962; Hägele 1985b). Chromosomen, die den männlichen Geschlechtsbestimmer tragen und aufgrund ihrer großen Übereinstimmung zum

genetischen X als Proto-Y-Chromosom bezeichnet werden, konnten erstmals in den Arten *C. tentans* und *C. pallidivittatus* anhand Männchen-spezifischer Inversionen identifiziert werden (Beermann 1955b; Keyl 1962; Thompson 1971). Da viele *Chironomus*-Arten jedoch keine geschlechtsspezifischen Chromosomeninversionen besitzen, wurde die jeweilige Lage der geschlechtsbestimmenden Region („sex determining region“ oder SDR) dort entweder über das Auftreten geschlechtsgekoppelter heterochromatischer Banden, über die geschlechtsgekoppelte Vererbung chromosomaler Umlagerungen nach radioaktiver Bestrahlung oder über Besonderheiten bei der Chromosomenpaarung von männlichen Spezieshybriden bestimmt. Auf diese Weise konnten die geschlechtsbestimmenden Regionen von 24 *Chironomus*-Arten lokalisiert werden (Rempel et al. 1962; Martin et al. 1980; Martin 2010). Bemerkenswert ist hierbei, dass die SDR auf allen Chromosomenarmen lokalisiert sein kann, mit Ausnahme von Arm E (Martin und Lee 2000; Martin und Lee 1988). Hierfür kommen zwei Erklärungen in Betracht: Zum einen kann es sich bei dem Geschlechtsbestimmer um ein transposables Element handeln, welches an verschiedene Stellen des Genoms gesprungen ist (Mainx 1964; Green 1980; Traut und Willhoeft 1990). Zum anderen können verschiedene Mutationen innerhalb der Geschlechtsbestimmungskaskade zu unterschiedlichen Primärsignalen geführt haben, welche durch die jeweiligen SDR-Loci reflektiert werden (Martin und Lee 1984).

Die Chromosomen von *C. thummi* und *C. piger* zeigen keine geschlechtsgebundenen Inversionen. Hier konnte die SDR nach Kreuzungsversuchen der beiden Schwesternarten (*C. thummi* ♂♂ x *C. piger* ♀♀) lokalisiert werden (Hägele 1985a). Nach Rückkreuzung männlicher FI-Individuen mit weiblichen *C. piger* ist bei Männchen der Folgegeneration eine Asynapsis auf dem Chromosom III, Arm F in der Region D₃d-g (nahe dem Telomer) zu beobachten. Analysen des chromosomalen Bandenmusters nach RB- und Quinacrinfärbung zeigen in dieser Region bei Männchen eine hemizygoten, heterochromatische Bande. Bei der reziproken Kreuzung (*C. piger* ♂♂ x *C. thummi* ♀♀) kann diese Bande nicht

beobachtet werden. Es ist dennoch sehr wahrscheinlich, dass der männliche Geschlechtsbestimmer auch bei *C. piger* in dieser Region liegt und lediglich nicht nachgewiesen werden kann, da *C. thummi* und *C. piger* zu einer nahe verwandten (Schwester-)Spezies sind. Das lässt die Vermutung zu, dass der Grad der Syntänie sehr hoch ist. Zudem zeigen die Chromosomen von *C. thummi* eine Reihe anfärbarer, heterochromatischer Banden, die bei *C. piger* nicht als heterochromatisch auftreten (Keyl 1965). Es könnte sich also bei der hemizygoten Bande, die sich in der SDR von *C. thummi* befindet, ebenfalls um eine solche Bande handeln (Hägele 1985a). Dies erlaubt außerdem die Schlussfolgerung, dass es sich bei der hemizygoten Bande, welche nur bei *thummi*-Männchen auftritt, nicht um den Faktor M selbst handeln kann, sondern eher um einen eng mit dem Faktor gekoppelten Locus. Es ist also naheliegend, die Heterochromatisierung als Auslöser oder Folge von Crossover-Suppression zu betrachten (Kraemer und Schmidt 1993). Die Unterschiede zwischen *C. thummi* und *C. piger* in Menge und Verteilung der heterochromatischen Regionen haben zur Folge, dass *C. thummi* mit einer Genomgröße von ca. $2,7 \times 10^8$ bp circa 30% mehr DNA besitzt als *C. piger*. Daraus ergibt sich auch die Annahme, dass *C. thummi* die abgeleitete Art ist und sich dort im Laufe der Evolution DNA angehäuft hat (Keyl 1962; Keyl 1965). Ein Großteil dieser zusätzlichen DNA bei *C. thummi* besteht aus *Cla*-Elementen. *Cla*-Elemente sind DNA-Abschnitte von ca. 120 bp Länge, die tandem-repetitiv angeordnet und in genomweit interspergierten Clustern vorliegen. Diese Elemente sind sehr A/T-reich (>80%) und zeichnen sich durch eine namensgebende *Cla*I-Schnittstelle aus. Bei *C. thummi* wurden ca. 70.000 Kopien bestimmt, bei *C. piger* hingegen nur 10.000 (Schaefer und Schmidt 1981; Ross et al. 1997). Des Weiteren ist auffällig, dass die *Cla*-Elemente in *C. thummi* an über 200 Loci auftreten, unter anderem auch im „non-transcribed-spacer“ (NTS) der rDNA. Bei *C. piger* beschränkt sich ihr Vorkommen mit wenigen Ausnahmen auf die Zentromerregionen. Sequenzierungen der *Cla*-Elemente und ihrer benachbarten Bereiche ergaben, dass sie von „target site duplications“ flankiert werden. Daraus lässt sich die Vermutung ableiten, dass diese Elemente transponierbar sind und an Artbildungsprozessen beteiligt sein könnten (Schmidt 1984). Über FISH an Polytänychromosomen von *C. thummi* ist im

Bereich der SDR ein Cla-Element-Cluster identifiziert worden, das ausschließlich in männlichen Präparaten auftritt. Dieses hemizygot, mit M gekoppelte Cluster wurde als Sonde für das Screening einer genomischen λ -DNA-Bibliothek verwendet (Kurreck 2009; Kraemer und Schmidt 1993). Die erhaltenen Klone wurden mittels Fluoreszenzhybridisierungen *in situ* lokalisiert. Es wurden zwei Klone identifiziert, welche die SDR flankieren und von denen aus ein „chromosomal walk“ gestartet wurde. Auf diese Weise konnten ca. 200 kb der SDR von *C. thummi*, kloniert und sequenziert werden (und ca. 120 kb der SDR von *C. piger*). In diesem Abschnitt wurden insgesamt 14 Gene identifiziert (Abbildung 2).

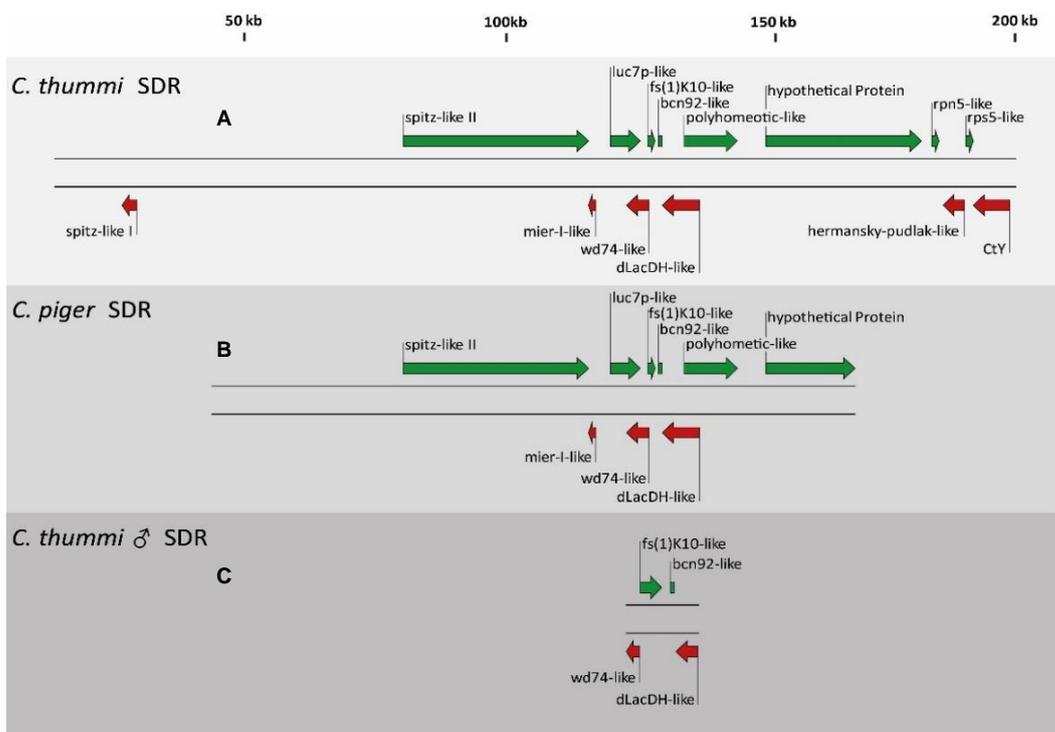


ABBILDUNG 2 | SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GESCHLECHTSBESTIMMENDEN REGIONEN VON *C. THUMMI* UND *C. PIGER*

Zu sehen sind die SDRs von *C. thummi* und *C. piger* mit ihren identifizierten Genen. **A** und **B** zeigen die SDRs ohne klare Zuordnung zu den jeweiligen Proto-X- oder Proto-Y-Chromosomen. In **C** ist der Bereich der SDR von *C. thummi* abgebildet, der eindeutig dem Proto-Y-Chromosom entstammt.

Die Sequenzen ließen sich zunächst nicht eindeutig den Proto-Y- und Proto-Y-Chromosomen von *C. thummi* beziehungsweise *C. piger* zuordnen. Auch der Übergang zum hemizygoten Cla-Element-Cluster auf dem Proto-Y-Chromosom

konnte nicht bestimmt werden. Genomische Southern Analysen zeigten jedoch mit Hilfe der zugrundeliegenden Sequenzinformationen geschlechtsspezifische Unterschiede innerhalb der SDRs von *C. thummi* und *C. piger* (Stiehl 2016). Neben wenigen kleineren Polymorphismen ist vor allem eine Duplikation im Bereich des Gens *fs(1)K10-like* interessant, welche ausschließlich bei Männchen auftritt (Abbildung 2, c). Diese Genduplikation hat zur Folge, dass man bei *fs(1)K10-like* drei unterschiedliche funktionsfähige Transkripte erhält: das Genprodukt der X-chromosomalen Variante sowie die zwei verschiedenen Genprodukte der Y-Varianten (Y1 und Y2). Zu allen drei Varianten sind spezifische Transkripte nachgewiesen worden. Bemerkenswert ist zudem, dass es ein viertes Transkript gibt, das nur bei Männchen auftreten kann, beide Y-Varianten überspannt und als Y3 oder „read through“-Transkript bezeichnet wird (Stiehl 2016). Es konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden, welcher Strang in diesem Bereich transkribiert wird (sense/antisense). Die Funktion von *fs(1)K10-like* ist zwar bisher unbekannt, aber durch die Männchen-spezifische Duplikation ist eine entscheidende Rolle bei der Geschlechtsbestimmung denkbar und das Gen somit grundsätzlich von besonderem Interesse.

1.3. Verschiedene Formen der Epigenetik

Der Begriff Epigenetik entstand Mitte des 20. Jahrhunderts und wurde seitdem mit unterschiedlichen Bedeutungen benutzt. Zunächst stand Epigenetik für die Wechselwirkung zwischen Genen und ihren Genprodukten, beschrieb also, wie ein gegebener Genotyp einen bestimmten Phänotypen zur Folge haben kann (Waddington 1942, 1957). In der heute gebräuchlichen Definition beschreibt Epigenetik erbliche Veränderungen von Genfunktionen, die sich nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz erklären lassen (Russo et al. 1997). Adrian Bird schlug 2007 eine weitere, allgemeinere Definition vor. Hiernach versteht man unter Epigenetik die strukturelle Anpassung chromosomaler Regionen zur Registrierung, Auslösung oder Aufrechterhaltung veränderter Aktivitätszustände (Bird 2007).

Da bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Immunzellen) jede Zelle eines eukaryotischen Organismus' dieselbe genetische Information besitzt, gegebenenfalls aber andere Expressionsanforderungen erfüllen muss, ist es notwendig, zu bestimmten Zeitpunkten oder in bestimmten Geweben lediglich die Expression spezieller Gene zu gewährleisten und gleichzeitig andere Bereiche der DNA inaktiv zu halten. Eine solche (zeitliche) Differenzierung von Zelltypen mit spezifischen Funktionen erfordert die dynamische Anpassung der Genaktivität, was durch Faktoren wie nicht-kodierende RNAs sowie vor allem die Modifikation von DNA und Histonen erreicht wird.

1.3.1. Histon-Modifikationen und ihre Einflüsse auf Chromatin

Chromatin ist ein Komplex aus DNA, RNA, Histonen sowie nicht-Histon-Proteinen und ist Grundlage für die Regulation der transkriptionellen Maschinerie von Eukaryoten (Turner 2009). Man unterscheidet dabei dicht gepacktes, stark kondensiertes Heterochromatin von entspiralisiertem, decondensiertem Euchromatin. Die kleinste funktionale Einheit des Chromatins wird als Nukleosom bezeichnet und umfasst ein Histon-Oktamer (je zwei Untereinheiten H2A, H2B, H3 und H4) mitsamt korrespondierender DNA (Luger et al. 1997; Luger und Richmond 1998). Nukleosomen spielen bei der Regulation der Transkription umliegender Gene eine Rolle. Gene, die in einem Bereich dicht gepackter DNA liegen (Heterochromatin), werden demnach nicht oder nur schwach exprimiert, wohingegen Gene aus locker oder unverpackten Regionen (Euchromatin) Ziel von Transkriptionsfaktoren sein können. Die Histon-Untereinheiten variieren die Verpackungsdichte der gebundenen DNA dabei über chemische Modifikationen ihrer N-terminalen Aminosäuren (Turner 2009). In diese Modifikationen sind vor allem Enzyme der folgenden Familien involviert: Histon-Acetyltransferasen und -Deacetylasen sowie Histon-Methyltransferasen und -Demethylasen (Allis et al. 2007). Andere auftretende Modifikationen, wie etwa Phosphorylierungen oder Ubiquitylierungen, spielen ebenfalls eine wichtige Rolle, werden aber im Folgenden nicht behandelt. Die Aminosäuren der Histonseitenketten (engl.

„histone tails“), an denen Acetyl- beziehungsweise Methylgruppen hinzugefügt oder entfernt werden, sind hochkonserviert (Jenuwein und Allis 2001). Besondere Bedeutung kommt dabei neben anderen Aminosäuren dem Lysin (K) 9 des Histons H3 zu (H3K9), da es bereits eingehend charakterisiert worden ist (Fuks 2005). Es kann mono-, di-, tri- aber auch unmethyliert vorliegen. Ist H3K9 methyliert, wird das Heterochromatin Protein 1 (HP1) rekrutiert, welches die lokale Bildung von Heterochromatin initiiert (Fuks 2005; Cedar und Bergman 2009). Man geht außerdem davon aus, dass methyliertes H3K9 die Methylierung nahe gelegener Cytosine einleitet (siehe 1.3.2), was eine zusätzliche Inaktivierung der Transkription auf DNA-Ebene zur Folge hätte (Fuks 2005; Cedar und Bergman 2009).

1.3.2. DNA-Modifikationen

Eine weitere Möglichkeit, die dynamische Expression spezifischer Gene bei Eukaryoten umzusetzen, ist die Methylierung der Nukleobase Cytosin zu 5-Methylcytosin (5-mC). 5-mC tritt hauptsächlich im Dinukleotid CpG auf, welches bei Vertebraten oft in Promotornähe und zu sogenannten CpG-Inseln angehäuft vorliegt (Cooper 1983; Doerfler 1983). Bei Vertebraten sind 60-90% der CpG's methyliert, bei Invertebraten lediglich 0-20% (Meehan et al. 1992; Salzberg et al. 2004; Field et al. 2004). Man geht davon aus, dass CpG-Methylierungen an der Regulation von Chromatinstrukturen, der Stilllegung von Genen, genomischer Prägung („imprinting“), der X-Inaktivierung sowie am Schutz vor transposablen Elementen beteiligt sind (Goto und Monk 1998; Robertson 2002; Salzberg et al. 2004).

Die Methylierung von DNA wird von verschiedenen Enzymen aus der Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT) übernommen, welche in drei Subfamilien unterteilt werden: DNMT1, das für die Erhaltung der Methylierungsmarker auf der DNA nach der Replikation verantwortlich ist; DNMT3, welches *de novo* methylieren kann (hauptsächlich während der frühen Embryonalentwicklung); und das am stärksten konservierte Enzym dieser Familie, DNMT2, dessen Rolle allerdings noch nicht eindeutig identifiziert wurde (Lyko und Maleszka 2011). Es wird vermutet,

dass DNMT2 zumindest bei Vertebraten keine DNA-Methyltransferase-Funktion einnimmt, sondern an der Methylierung spezifischer Cytosine der tRNA beteiligt ist – die Rolle dieser RNA-Methylierung ist wiederum nicht bekannt (Goll et al. 2006; Shanmugam et al. 2015).

1.3.2.1. DNA-Methylierung bei Invertebraten

Es wurde lange Zeit vermutet, dass funktionale DNA-Methylierungen bei Invertebraten nicht existieren. Zwar war bekannt, dass vereinzelt Methylierungen auftreten können (Achwal et al. 1983), Nachweise für deren Funktion blieben jedoch aus. Ende des 20. und Anfang des 21. Jahrhunderts konnten allerdings durch die Entdeckung verschiedenster Orthologen zu allen drei DNMT-Enzymfamilien aktive Methylierungssysteme bei einigen Invertebraten nachgewiesen werden (Hung et al. 1999; Tweedie et al. 1999; Lyko et al. 2000; Wang et al. 2006; Weinstock et al. 2006) (Abbildung 3).

Die besondere Verteilung der DNMT in Invertebraten, vor allem innerhalb der Insekten, wirft dabei einige Fragen auf. Zum einen enthält keines der bisher untersuchten Invertebratengenome den „Standardsatz“ an DNMT, der bei Säugetieren beobachtet werden kann (nämlich jeweils ein DNMT1 und DNMT2 sowie drei Paraloge des DNMT3). Darüber hinaus kann aber auch kein „Standardsatz“ an DNMT identifiziert werden, der als repräsentativ für ein allgemeingültiges Invertebratenmodell betrachtet werden könnte. Schließlich lässt sich beobachten, dass es keinen Zusammenhang zu geben scheint zwischen der evolutiven Verwandtschaft zweier Spezies und der Anzahl der Gene, die für die verschiedenen DNMT kodieren (Lyko und Maleszka 2011).

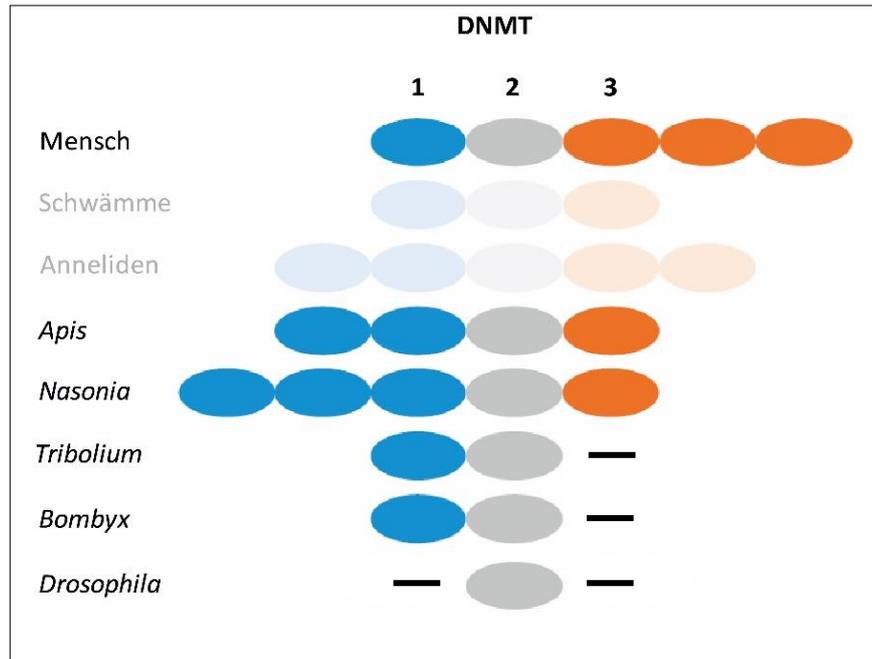


ABBILDUNG 3 | UNTERSCHIEDE BEI DER DNMT-VERTEILUNG

Schematische Darstellung der Verteilung der DNMT beim Menschen und einigen Invertebraten. Die farbigen Ellipsen repräsentieren die Genkopien, die in den Genomen der jeweiligen Spezies' gefunden wurden. Honigbiene, *Apis Mellifera* (Wang et al. 2006) (Weinstock et al.) ; Wespe, *Nasonia vitripennis* (Werren et al. 2010); Käfer, *Tribolium castaneum* (Richards et al. 2008); Seidenspinner, *Bomby mori* (Werren et al. 2010); Taufliede, *Drosophila melanogaster* (Gabor Miklos und Maleszka 2011). (Verändert nach Lyko und Maleszka 2011)

Die genauen Aufgaben der DNA-Methylierung bei Invertebraten konnten bisher nicht geklärt werden, scheinen aber von denen der Vertebraten abzuweichen (Regev et al. 1998b; Mandrioli 2007). Bei Insekten wird die DNA-Methylierung, wenn vorhanden, von DNMT2 übernommen und scheint darüber hinaus nicht auf CpG-Dinukleotide beschränkt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von DNMT2 zur Methylierung von CpT und CpA führen kann (Kunert et al. 2003; Flintoft 2007). Das führt zu der Annahme, dass die Funktionen der DNA-Methylierung nicht konserviert sind, sondern im Laufe der Evolution einen Wechsel zwischen Insekten und Vertebraten erfahren haben (Field et al. 2004; Mandrioli 2007; Flintoft 2007; Yan et al. 2015).

2 Zielsetzung

Bei *Chironomus* wird das Geschlecht über männliche Heterogamete determiniert. Dabei sorgt ein dominanter männchenbestimmender Faktor M für die Ausprägung des männlichen Geschlechts. Die ungefähre chromosomale Lage des Faktors M ist bekannt und wird als SDR („sex determining region“) bezeichnet. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, Näheres über den Faktor M oder über die Art und Weise der Geschlechtsdetermination bei *Chironomus* in Erfahrung zu bringen. Insbesondere sollen die Arten *C. thummi* und *C. piger* dazu auf mögliche DNA- und/oder Histon-Methylierungen untersucht werden. Bei positivem Befund soll das Auftreten geschlechtsgekoppelter epigenetischer Unterschiede identifiziert werden.

Weiterhin soll der bestehende Proto-Y-Chromosomen-spezifische SDR-Haplotyp von *C. thummi* erweitert werden. Hierzu soll ein Stamm aus Kreuzungshybriden von *C. thummi* und *C. piger* gezüchtet und regelmäßig mit Weibchen von *C. piger* rückgekreuzt werden. Sobald ein Zustand erreicht ist, in dem die Chromosomen der Hybridenmännchen mit Ausnahme der Proto-Y-chromosomalen SDR hauptsächlich von *C. piger* abstammen, soll das Genom eines entsprechenden männlichen Individuums mittels NGS-Techniken sequenziert werden.

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit liegt auf der Funktionsanalyse der Gene *fs1(K10)-like* und *luc7(p)-like* durch „knock down“-Experimente mit Hilfe von RNA-Interferenz. Beide Gene befinden sich in der SDR von *Chironomus*, in unmittelbarer proximaler Nähe zum Proto-Y-Chromosomen-spezifischen Cla-Element-Cluster von *C. thummi*, beziehungsweise beim *thummi*-Proto-X-Chromosom sowie bei *C. piger* an analoger Stelle. Das Gen *fs1(K10)-like* ist außerdem aufgrund seiner Duplikation auf dem Proto-Y-Chromosom besonders interessant im Hinblick auf seine Rolle bei der Geschlechtsdetermination.

3 Material und Methoden

3.1. Verwendete Versuchstiere

Alle Versuchstiere, die während dieser Arbeit verwendet wurden, sind der dauerhaften Laborzucht des Instituts für Molekulargenetik (Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz) entnommen worden. Die Tiere wurden bei Raumtemperatur in belüfteten Schalen (Larven) beziehungsweise in Käfigen (Adulttiere) gehalten. Als Futter diente Brennnesselpulver.

3.2. Geschlechtsbestimmung bei Chironomiden

Eine eindeutige Geschlechtsbestimmung der Tiere, vor allem im Larvenstadium, war für diese Arbeit von großer Bedeutung. In Kapitel 3.2.2 wird daher detailliert auf die hierfür angewendete Methode nach Wülker und Götz (1968) eingegangen.

3.2.1. Geschlechtsbestimmung adulter Tiere

Eine Unterscheidung der Geschlechter bei den Imagines erfolgte über den Vergleich der Antennenpaare: Männchen besitzen wirtelig behaarte Antennen, während die Antennen der Weibchen schwach oder gar nicht behaart sind.

3.2.2. Geschlechtsbestimmung larvaler Tiere

Die Geschlechtsbestimmung larvaler Chironomiden erfolgte über die mikroskopische Analyse der Genitalimaginalscheiben (Wülker und Götz 1968). Hierzu wurden lebende Tiere mit einem Tuch abgetrocknet und anschließend zwischen zwei über Knete verbundene Objektträger eingeklemmt. Dann wurden die beiden Objektträger unter leichtem Druck so zueinander verschoben, dass die

Ventralseite der Larve frei erkennbar war. Dadurch wurden die Genitalimaginalscheiben unter dem Mikroskop sichtbar.

Bei korrekter Fixierung der *Chironomus*-Larve sollten im 9. Abdominalsegment der Männchen der *Ductus ejaculatoris*, im 9. Segment der Weibchen die Schleimdrüse und im 8. Segment des Weibchens die Spermatheken zu erkennen sein. Diese Strukturen lassen sich jedoch erst ab dem L4-Stadium eindeutig zuordnen. Somit ist eine Unterscheidung der Geschlechter nach Wülker in den ersten drei Larvenstadien nicht beziehungsweise nur eingeschränkt möglich.

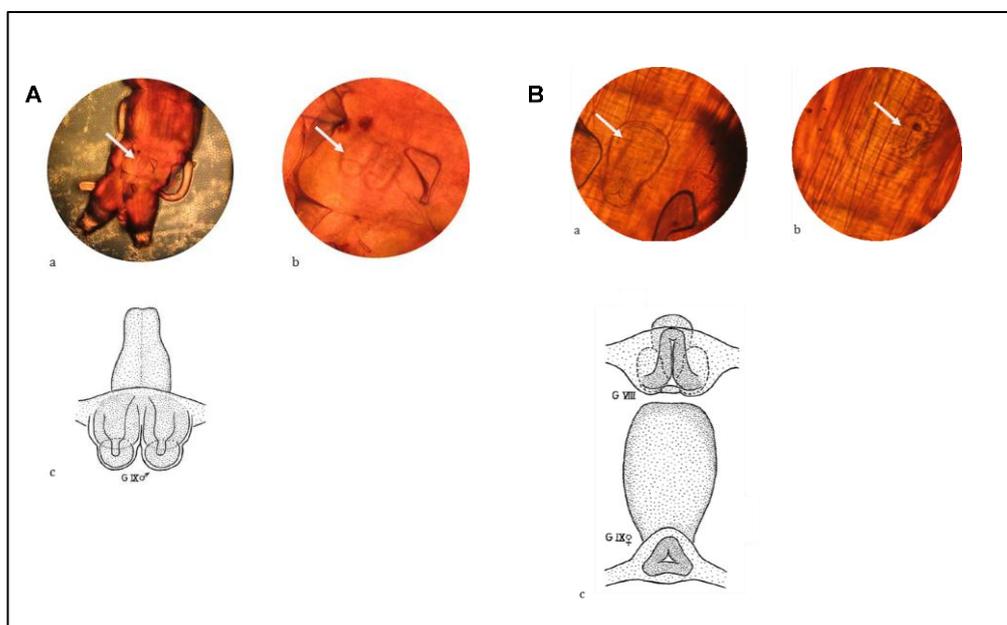


ABBILDUNG 4 | GENITALIMAGINALSCHEIBEN

A Männliche Genitalimaginalscheiben. **B** Weibliche Genitalimaginalscheiben. In beiden Abbildungen sind jeweils mikroskopische Aufnahmen zu sehen (a,b) sowie je eine Skizze (c). Die Skizzen wurden aus der Veröffentlichung „Die Verwendung der Imaginalscheiben zur Bestimmung des Entwicklungszustandes von Chironomuslarven“ entnommen (Wülker und Götz 1968).

3.3. Mikroinjektion

Die Injektion der Embryonen wurde mithilfe eines Mikromanipulators (Epijet® der Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurden Gelege gesammelt und auf Befruchtung überprüft. Diese wurden dann vereinzelt, aufgereiht und getrocknet. Parallel wurden die Injektionsnadeln unter Hitze „gezogen“ und anschließend geschliffen.

Zusätzlich wurde eine Injektionslösung bestehend aus siRNA, Injektionspuffer und Färbemittel hergestellt. Im Anschluss wurde mit der Injektion begonnen.

3.3.1. Sammeln und Vereinzeln der Gelege

Die Gelege wurden entweder am Vortag oder am Tag der Injektion aus der institutseigenen Tierzucht gesammelt. Für die Mikroinjektion wurden immer Gelege von *C. thummi* oder *C. piger* verwendet. Der Kontakt der Gelege mit Chlorwasser wurde minimal gehalten die Gallerte und schließlich das Chorion der Eier hätte auflösen können. Stattdessen wurden die Gelege in abgestandenem Wasser gelagert und transportiert. Erst am Tag der Injektion wurden die Embryonen vereinzelt und zugleich dechorionisiert. Hierzu wurde das Gelege in eine kleine Petrischale überführt und mit Chlorbleiche (Handelsmarke *Dan Chlorix*) und abgestandenem Wasser im Verhältnis 1:1 überschichtet. Danach wurden die Petrischalen kurz geschüttelt und das Chlorbleiche/Wasser-Gemisch wurde mit einer Pipette abgenommen. Die vereinzelt Embryonen wurden anschließend drei- bis fünfmal mit abgestandenem Wasser gewaschen.

3.3.2. Ziehen und Schleifen der Nadeln

Das Mikroinjizieren stellt besondere Anforderungen an die verwendeten Nadeln. Sie müssen im Bereich ihrer Spitze von besonders kleinem Durchmesser und angeschrägt sein, um eine saubere Injektion zu gewährleisten. Die verwendeten Nadeln (GB100TF-8P von *Science Products*) wurden mithilfe eines Pullers (P-97 Micropipette Puller – Sutter Instruments, USA) auf ca. 6-7 cm gezogen.

Das Schleifen der Nadel dient zum einen dazu, die Bruchstelle zu glätten, die durch das Ziehen entsteht; zum anderen schrägt es die Nadelspitze ab, was ein Eindringen durch die Eihülle und in den Embryo erheblich erleichtert. Das Schleifen erfolgte an einem Drehschleifstein. Die gezogenen Nadeln wurden dazu nacheinander in eine Halterungsvorrichtung eingespannt. Als nächstes wurde der Schleifstein gestartet. Anschließend wurde die Nadel mittels Feintriebs der Halterung auf den

mit Wasser befeuchteten Schleifstein abgesenkt. Schon während des Schleifprozesses sorgte die Kapillarkraft der Nadel für ein Ansaugen des Wassers. Dieser Effekt gab Aufschluss über die Feinheit der Öffnung. Je nach Höhe des Meniskus' wurden die Nadeln als „fein“, „mittel“ oder „grob“ deklariert. Es zeigte sich im Laufe der Versuche, dass die besten Injektionen mit den feinen und mittleren Nadeln erzielt wurden.

3.3.3. Aufreihen der Embryonen

Zum Injizieren der Embryonen mussten diese zunächst aufgereiht werden. Dazu wurden feine Glaskapillaren (DM = 0,25 mm) auf einen befeuchteten Objektträger gelegt, wobei die die Kapillaren entlang der Querrichtung der Objektträger ausgerichtet wurden. Anschließend wurden die einzelnen Embryonen mithilfe eines feinen Pinsels aus einer mit Wasser gefüllten Petrischale auf den Objektträger übertragen und entlang der Kapillaren aufgereiht. Während des Aufreihens war darauf zu achten, dass die Embryonen nicht austrocknen. Gleichzeitig konnte zu viel Feuchtigkeit dafür sorgen, dass die Embryonen wegschwimmen. Anschließend wurden die aufgereihten Embryonen mit 10 s Öl (Voltalef) überschichtet.

3.3.4. Mikroinjektion mittels Mikromanipulator

Die Injektionen wurden mit dem „FemtoJet express“ der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Für jede Injektion mussten drei Parameter eingestellt werden:

P_i = Injektionsdruck

P_c = Kompensationsdruck

T_i = Injektionsdauer

Kritisch bei der Einstellung dieser drei Parameter ist der Kompensationsdruck. Mit ihm wird der ständige Druck beschrieben, der einem Einströmen des Mediums in die Nadel entgegenwirkt. Der Ausgangswert, an dem sich stets orientiert wurde, lag bei 2,6 psi („pressure per square inch“). Je nach dem auf die Nadel wirkenden Gegendruck musste er nach oben beziehungsweise nach unten korrigiert werden.

Als nächstes wurde der Injektionsdruck so gewählt, dass die gewünschte Menge an Injektionslösung injiziert werden konnte. Dies war in erster Linie von Trockenheit und Größe und somit vom Innendruck des jeweiligen Embryos abhängig. Der P_i wurde in der Regel zwischen 2,6 und 4,5 psi eingestellt. Die Injektionsdauer wurde konstant bei 2,0 Sekunden gehalten. Nach einigen Testinjektionen an meistens zwei bis drei Embryonen wurde mit den eingestellten Parametern injiziert, wobei in manchen Fällen im Laufe eines Durchganges der Injektionsdruck verändert werden musste.

3.3.5. Behandlung der injizierten Tiere

Die Tiere wurden nach Injektion in Petrischalen überführt und kurz darauf mit Brennesselpaste (feines Brennesselpulver mit abgestandenem Wasser zu zäher Paste angerührt) angefüttert. Daraufhin wurden die Schalen zum Schlüpfen der Larven in den Tierstall gestellt.

3.3.6. In vitro-Transkription dsRNAs

Ausgehend von RT-PCR-Produkten zu bestimmten Genabschnitten wurden die *in vitro*-Transkriptionen mit dem T7-Megascript-Kit von Ambion (life technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden eigens Primer erstellt, die einen genspezifischen Abschnitt und an ihrem 5'-Ende den konservierten Promotor T7-Polymerase enthielten. Somit hatten alle PCR-Produkte flankierende Promotoren, anhand derer im Folgeschritt mit Hilfe der T7-Polymerase beide Stränge transkribiert werden konnten. Die Transkription wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die abschließende Hybridisierung der Einzelstränge erfolgte nach Erhitzen auf 55°C und anschließendem Abkühlen auf RT. Die dsRNAs wurden auf -20°C gelagert. Zur Überprüfung der Transkripte wurde je ein Vierhundertstel der Ansätze auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Hierzu wurden jeweils 5 µl einer 1/1000-Verdünnung auf das Gel gegeben.

3.3.7. Nachweis der Doppelsträngigkeit der RNAs

Eine der definierenden Eigenschaften von dsRNAs und siRNAs ist ihre sonst für RNA untypische Doppelsträngigkeit. Bei der Herstellung eigener dsRNAs und siRNAs im Labor ist eine Überprüfung der Doppelsträngigkeit entsprechend wichtig.

Zwei komplementäre Stränge sollten sich bei Raumtemperatur zu einem doppelsträngigen Molekül aneinanderlagern. Um dies zu prüfen, wurden sowohl die Konzentrationen der Einzelstränge als auch der Hybridmoleküle mit dem Bioanalyser 2100 von Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) ermittelt. Hierbei wurde die Tatsache genutzt, dass der Farbstoff, mithilfe dessen das Gerät die Nukleinsäurekonzentrationen in einer Lösung bestimmt, eine ca. 100-fach höhere Spezifität gegenüber Einzelsträngen besitzt als gegenüber Doppelsträngen. Der Nachweis wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.4. Illumina Next-Generation Sequencing

Die Erstellung der „paired end“-Bibliotheken wurde von der Fa. GENterprise (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mittels eines 100 bp „paired end“- und eines 150 bp „paired end“-Laufs auf dem Illumina HiSeq 2000 durch das Nukleinsäure-Analysezentrum (IMSB, Mainz, Deutschland).

3.4.1. Auswertung der Illumina Next-Generation Sequencing Sequenzdaten

Die Aufbereitung der Rohdaten wurde mit zahlreichen Perl-Skripten umgesetzt. Diese wurden von Benjamin Rieger (IMSB) in Zusammenarbeit mit Dr. Steffen Rapp (IMSB) geschrieben. Die aufbereiteten Rohdaten wurden in die CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark) als „paired end“-Sequenzen eingeladen und mittels der Funktion „Trim Sequences“ gefiltert. Sequenzen mit schlechter Qualität ($\leq 0,005$) und nicht eindeutigen Basen (N) wurden aussortiert.

Zudem wurden am 5'-Ende jeder Sequenz 5 Basen, am 3'-Ende jeder Sequenz 20 Basen entfernt.

3.4.2. Assemblierung der aufbereiteten Rohdaten

Mit der Funktion „de novo assembly“ der CLC Genomics Workbench wurden die aufbereiteten und getrimmten Datenpakete unter Standardparametern assembliert.

3.4.3. Kartierung der aufbereiteten Rohdaten

Zunächst wurden die aufbereiteten Rohdaten mit der „Map Reads to Reference“-Funktion der CLC Genomics Workbench gegen die zusammengesetzte erhaltene Contigs kartiert. Signifikant stärker und schwächer abgedeckte Bereiche wurden gegebenenfalls mit Primern flankiert, um sie anschließend mittels Sanger-Sequenzierung zu überprüfen.

3.5. Molekularbiologische Standardmethoden

3.5.1. RNA-Isolierung aus tierischem Gewebe

Um cDNA von *Chironomus thummi* zu erhalten, wurden Gelege aus dem Tierstall gesammelt und nach dem Schlüpfen zunächst in einer Petrischale mit abgestandenem Wasser und feinem Brennesselpulver gehalten. Die L4-Larven wurden anschließend nach Geschlecht getrennt und in 1,5-ml-Eppendorfgefäßen bei -20°C weggefroren. Die RNA-Extraktion wurden mit dem NucleoSpin RNA XS Kit (Macherey-Nagel – Düren, Deutschland) und dem peqGOLD Total RNA Kit (peqlab – Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die erhaltenen gesamt-RNAs wurden daraufhin mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies – Waldbronn, Deutschland) hinsichtlich Konzentration und Qualität untersucht. Die Proben wurden bei -80°C aufbewahrt.

3.5.2. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Exktraktion (PCI)

Zur Extraktion der RNA aus den Präparationen wurde Tris-gesättigtes PCI (pH 4,5) angesetzt. Die Präparationen wurden mit 2 Vol. PCI überschichtet und mehrmals invertiert. Nach zehnminütigem Zentrifugieren wurde die untere, phenolische Phase abgenommen und es wurde eine erneute PCI vorgenommen. Dieser Schritt wurde gegebenenfalls ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und mit 1 Vol. CI überschichtet und invertiert. Nach erneuter zehnminütiger Zentrifugation wurde die wässrige Phase in neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt.

3.5.3. Nuklease-Verdau

RNA wurde zum Entfernen von DNA-Resten mit DNase I behandelt. Dazu wurde die RNA-Probe gegebenenfalls mit DEPC-H₂O auf 43 µl aufgefüllt und mit 5 µl 10x Puffer und 2 µl DNase versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde das Enzym durch Zugabe von 0,1 Vol. 50 mM EDTA und einer Inkubation für 15 min bei 65°C inaktiviert.

Im Falle von *in vitro*-transkribierter dsRNA wurde zusätzlich zum DNase-Verdau ein RNase-Verdau zum Abbau einzelsträngiger RNA-Moleküle durchgeführt. Dazu wurde die RNA-Lösung mit 0,1 Vol. 10x Puffer und 1 µl DNase I (2 U/µl, beides NEB, Ipswich, USA) versetzt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Inaktivierung des Enzyms erfolgte unter Zusatz von 0,1 Vol. 50 mM EDTA für 15 min bei 65°C.

3.5.4. Ethanolfällung von Nukleinsäuren

1 Vol. Probe wurde mit 1/10 Vol. Dialysepuffer und 2,5 Vol. kaltem Ethanol abversetzt. Nach ausgiebigem Invertieren wurden die Proben entweder für eine Stunde bei -80°C oder ü.N. bei 20°C gefällt. Danach wurden die Proben für 45 min

bei 4°C und 13.000 g zentrifugiert, sodass sich ein Pellet am unteren Rand der Eppendorfgefäße ausbildete. Um Salze und restliches Ethanol zu entfernen wurde das Pellet nach Abnahme des Überstandes mit 400 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei RT und 13.000 g wurde der Überstand abgenommen und das Pellet wurde zum Trocken für 5 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde das Pellet in 30 µl DEPC-H₂O (RNA) oder HPLC (cDNA) resuspendiert.

3.5.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen sämtlicher Nukleinsäuren wurden in dieser Arbeit entweder mit dem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific - Wilmington, USA) oder dem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies - Waldbronn, Deutschland) bestimmt. Wenn möglich, wurde die Konzentration über den Vergleich mit Fluoreszenzstärken von Fragmenten bekannter Größen und Konzentrationen nach vorangegangener gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben abgeschätzt.

3.5.6. cDNA-Synthese

Für die *in vitro*-Transkription wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Für alle Synthesen wurde ausschließlich SuperScript III Reverse Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach dem Standardprotokoll des Herstellers eingesetzt.

3.5.7. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte je nach Anwendung in unterschiedlichen Agarosegelelektrophorese-Systemen. Die verwendeten Protokolle wurden in Anlehnung an das Protokoll von Sambrook et al. (1989) erstellt. Als Marker dienten die in Abbildung 2.1 dargestellten Molekulargewichtsstandards der Fa. Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Die Proben wurden mit ca. 1/6 Volumen Bromphenolblau-DNA-Ladepuffer versetzt, um diese zu beschweren und um die Lauffront sichtbar zu machen. Lagen die zu

erwartenden Banden in der Lauffront von Bromphenolblau, wurde als Ladepuffer Orange Dye oder 30 %-ige Saccharose-Lösung verwendet.

3.5.8. Testgele

Zur qualitativen Überprüfung von DNA-Proben wurde die vertikale GENTERphorese™-Kammer der Fa. GENTERprise (Mainz, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in Gelen (7 cm x 6,5 cm x 0,1 cm) mit Agarosekonzentrationen von 0,8 % bis 2 % in 1x TBE-Puffer im TBE-Puffer-System bei 100 bis 150 mA für 30 bis 45 min. Als Molekulargewichtsstandards wurden 2 µl der oben genannten Marker verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele für 3 min in einer Ethidiumbromid-(EtBr)-Färbelösung (5 µg/ml in 1x E-Puffer) inkubiert, kurz gewässert und auf einem Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation der Gele erfolgte über das Carestream Gel Logic 112 System (Carestream Health, Rochester, USA). Alle in dieser Arbeit gezeigten Gelbilder sind invertiert dargestellt.

3.5.9. Denaturierende Agarosegele zum Auftrennen von ssRNA

Sämtliche denaturierenden Gele wurden nach dem Standardprotokoll hergestellt. Als Laufpuffer wurde 1X MOPS verwendet. Spannung und Strom unterschieden sich nicht von Standardgelelektrophoresen.

3.5.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Das Verfahren wurde von Saiki et al. (1985) entwickelt und ist seitdem zu einer der grundlegendsten Methoden gediehen. Benötigt werden für eine PCR neben der DNA-Vorlage (template) im Grunde bloß zwei flankierende Primer von etwa 18 bis 22 nt Länge, dNTPs und eine hitzestabile DNA-Polymerase. Je nach Polymerase werden noch unterschiedliche Puffersysteme und Kofaktoren wie zum Beispiel MgCl₂ verwendet.

3.5.10.1. Standard-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Methode zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnittes (Mullis et al. 1992). Die PCRs wurden mit der GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, USA) in einem TProfessional Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Ein beispielhafter PCR-Ansatz sowie das entsprechende Programm sind Tabelle 1 und Tabelle 2 zu entnehmen.

TABELLE 1 | STANDARD-PCR-ANSATZ

5x GoTaq® Flexi Puffer	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
dNTPs (10 mM each)	1 µl
Forward Primer (0,01 mM)	2 µl
Reverse Primer (0,01 mM)	2 µl
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Template DNA (20 ng/µl)	1 µl
HPLC-H ₂ O	29,8 µl
Gesamt	50 µl

TABELLE 2 | STANDARD-PCR-PROGRAMM

Initiale Denaturierung	94 °C	4:00 min	
Denaturierung	94 °C	0:30 min	40
Annealing	56 - 66 °C	0:30 min	x
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

3.5.11. Aufreinigung von PCR-Produkten

Das Aufreinigen von PCR-Produkten kann für Folgeanwendungen von Bedeutung sein, etwa um überschüssige Primer, Nukleotide und Einzelstränge zu entfernen. Hierzu wurden die PCR-Ansätze entweder mit dem NucleoSpin Extract II Kit der

Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) aufgereinigt oder mit 10 U Exonuklease I und 0,9 U Shrimp Alkalischer Phosphatase (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) verdaut.

3.5.12. Klonierung von PCR-Produkten

Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde das „pGEM®-T (Easy) Vector System“ der Fa. Promega (Madison, USA) verwendet (Vektorkarte siehe Anhang A1). Die Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Prüfung der Integratgröße erfolgte durch einen Verdau mit den Enzymen EcoRI (pGEM®-T Easy Vector) oder SacI und SacII (pGEM®-T Vector) und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung. Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern Sp6 und T7. Eine Vektorkarte ist dieser Arbeit angehängt.

3.5.13. Ligation

Für die Ligation wurde das Enzym T4 DNA Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Als Vektor diente mit dem Restriktionsenzym BamHI geschnittener und AP-behandelter pBeloBAC11 (Shizuya et al. (1992), Vektorkarte siehe Anhang A1). Der fertig behandelte Vektor wurde von Thomas Herold (2012) bereitgestellt. Die Ligation erfolgte mindestens ü.N. bei RT. Ein Ligationsansatz ist Tabelle 3 zu entnehmen.

TABELLE 3 LIGATIONSANSATZ	
DNA-Lösung	15 µl
Vektor	1 µl
10 x DNA Ligase Puffer	2 µl
T4 DNA Ligase	2 µl
Gesamt	20 µl

Im Anschluss daran wurde der Ligationsansatz mit Ethanol gefällt und das Pellet in 20 µl HPLC-H₂O gelöst.

3.5.14. Transformation mittels Elektroporation

Für die Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu 40 µl der elektrokompenten Zellen gegeben und in eine gekühlte Kuvette (Gene Pulser® Cuvette) mit einer Spaltbreite von 0,1 cm der Fa. Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) überführt. Die Transformation erfolgte bei 1,8 kV im Elektroporator Micro Pulser™ der Fa. Bio-Rad (München, Deutschland) für 3-5 ms. Nach der Transformation wurde umgehend 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium (Sambrook et al. 1989) zu den Zellen gegeben und diese darin resuspendiert. Es folgte eine Inkubation unter Schütteln in einem 15 ml-Reaktionsgefäß bei 37 °C für 1 h. Im Anschluss wurden pro Agarplatte 250 µl des Transformationsansatzes ausplattiert und für 16 bis 20 h bei 37 °C bebrütet. Die bewachsenen Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

3.5.15. Restriktion genomischer DNA

Die enzymatischen Reaktionen wurden in einem Volumen von 200 µl für insgesamt 20 h bei 37 °C durchgeführt. Mittels Testgel wurden die Reaktionen auf Vollständigkeit überprüft. Abschließend erfolgte eine Ethanol-Fällung.

3.5.16. Southern Transfer

Die gefällten Restriktionsansätze wurden elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit EtBr angefärbt und fotodokumentiert. Die Markerbanden wurden mit einem Spatel durchgestochen. Danach wurde das Gel in Denaturierungslösung für 15 min bei RT inkubiert und anschließend kurz gewässert. Dann wurde es in Neutralisierungslösung überführt und dort für 20 min bei RT inkubiert. Der Transfer der DNA auf Nitrozellulosemembranen (Protran® BA85 der Fa. Whatman®, New Jersey, USA) erfolgte ü.N. bidirektional. Beim sogenannten „Sandwichblot“ ist das Gel umgeben von Nitrozellulosemembranen, welche zuvor in 2x SSC angefeuchtet wurden, gefolgt von drei Lagen Whatman 3MM-Papier, ebenfalls in 2x SSC angefeuchtet. Umschlossen werden diese von Stapeln an Papierhandtüchern (ca. 5 cm). Eine Plexiglasplatte und ein weiteres Gewicht beschweren die komplette Konstruktion. Beim unidirektionalen Blot liegt das Gel auf Whatman 3MM-Papier, dessen Enden

in ein Reservoir an 20x SSC reichen. Auf dem Gel liegt die Nitrozellulosemembran, gefolgt von vier Lagen in 2x SSC angefeuchtetem Whatman 3MM-Papier und einem etwa 5 cm hohem Stapel an Papierhandtüchern. Nach erfolgtem Transfer wurden die Nitrozellulosemembranen kurz in 2x SSC gewaschen. Mit einem Fettstift konnten unter UV-Licht die Probestaschen, die Gelumrisse sowie die Banden des Markers auf der Nitrozellulosemembran markiert werden, ehe diese zum Fixieren der DNA bei 80 °C für 2 h inkubiert wurden

3.5.17. Hybridisierung

Die Hybridisierung des Southern Blots (Meinkoth und Wahl 1984) erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde (siehe 2.3.1.1). Die Blot-Filter wurden in Präinkubationsmedium für 3 h bei 60 °C inkubiert. Die Hybridisierungslösung aus radioaktiv markierter Sonde, „Carrier“-DNA und Hybridisierungspuffer wurde durch Erhitzen denaturiert (10 min, 95 °C) und anschließend rasch in Eiswasser abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte in Glas-Hybridisierungsröhren ü.N. bei 60 °C im Hybridisierungsöfen. Nach Abgießen der Hybridisierungslösung wurden die Membranen mit 2 x SSC bei 60 °C für 30 min gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Abschließend wurden die Filter kurz in 2 x SSC bei RT gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und auf 3MM-Filterpapier fixiert mit Haushaltsfolie glatt abgedeckt.

3.5.18. Random Primed Oligo Labeling

Dieses Verfahren beschreibt die Hybridisierung von Oligonukleotiden zufälliger Sequenz an eine einzelsträngige Matrizen-DNA und die anschließende Elongation durch das Klenow-Fragment unter Einbau radioaktiv markierter Nukleotide. Zur radioaktiven Markierung mit α -³²P-dATP (10 μ Ci/ μ l) wurde das Random Primed DNA Labeling Kit der Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Labeling erfolgte mit 7 μ l α -³²P-dATP bei 37 °C für 1,5 h. Abschließend wurde die DNA gefällt, der Einbau des radioaktiv markierten Nukleotids mittels Flächendosimeters überprüft und das Pellet in 100 μ l HPLC-H₂O gelöst.

3.5.19. Autoradiografie

Das radioaktive Isotop ^{32}P emittiert β -Teilchen. Diese bewirken eine Schwärzung eines Röntgenfilms. Die Verwendung einer Verstärkerfolie verkürzt die Expositionszeit bei einer Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Expositionszeit liegt je nach Strahlungsintensität zwischen 2 h und einer Woche. Der Röntgenfilm wurde für die Entwicklung für 4 min in Entwicklerlösung inkubiert, anschließend kurz gewässert und dann für 4 min in Fixierlösung getaucht. Abschließend wurde der Film gewässert und getrocknet.

3.5.20. Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation erfolgte entweder mittels des peqGOLD Plasmid Miniprep Kits I (PeqLab, Erlangen, Deutschland), basierend auf der Whitehead-Methode.

Die Whitehead-Methode zur Plasmidpräparation wurde am Whitehead Institute in Massachusetts entwickelt. Zunächst wurde eine 5 ml Über-Tag-Kultur angelegt. Die Über-Tag-Kultur wurde in 500 ml antibiotikahaltiges L-Medium überführt und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln für 16 bis 18 h inkubiert (ü.N.-Kultur). Die ü.N.-Kultur wurde in ein 500 ml Zentrifugengefäß überführt und in der Kühlzentrifuge 4K15C der Fa. Sigma (Osterode am Harz, Deutschland) zentrifugiert ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5000 Upm, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Lösung I resuspendiert und in einen 100 ml-Zentrifugenbecher überführt. Nach Inkubation für 5 min bei RT erfolgte die Zugabe von 20 ml Lösung II. Nach gründlichem Invertieren wurde für 10 min bei RT inkubiert. Schließlich wurden 15 ml kalte Lösung III hinzugegeben, invertiert und die Probe für 10 min auf Eis gestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Kühlzentrifuge 3K30 der Fa. Sigma (Osterode am Harz, Deutschland) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 14000 Upm für 20 min, welcher mit dem Überstand direkt im Anschluss wiederholt wurde. Für die Isopropanol-Fällung wurde die Probe auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und jeweils mit 15 ml Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation in der Kühlzentrifuge 4K15C der Fa. Sigma (Osterode am Harz, Deutschland) bei RT mit 5000 Upm für 20 min wurden die Überstände

verworfen und die Pellets in jeweils 3 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von jeweils 1,5 ml 7,5 M Kaliumacetat wurden die Proben vereint und bei -80 °C für mindestens 45 min inkubiert. Die aufgetaute Probe wurde erneut zentrifugiert (s. o.), ehe der Überstand einer Ethanol-fällung unterzogen wurde. Das Pellet wurde in 700 µl 50T/50E-Puffer resuspendiert. Für den anschließenden RNase-Verdau wurde 1 µl RNaseH (Peqlab, Erlangen, Deutschland) hinzugegeben und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine PCI- und eine CI-Extraktion (siehe 2.1.3). Die obere Phase wurde mit 700 µl Isopropanol gefällt und in 200 µl HPLC-H₂O aufgenommen. Zur Bestimmung der Integratgröße wurden die Plasmide mit EcoRI restringiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.5.21. Sanger-Sequenzierung

Sämtliche Sanger Sequenzierungen dieser Arbeit wurden von der Fa. GENterprise (Mainz, Deutschland) durchgeführt.

3.5.22. Auswertung von DNA-Sequenzen

Die Editierung der Sequenzdaten (EditSeq™) und die Erstellung eines Sequenz-Alignments (SeqMan™) wurden mithilfe des Software-Pakets Lasergene® der Fa. DNASTAR Inc. (Madison, USA) durchgeführt. Einzelne Chromatogramme wurden mit dem Programm FinchTV v1.4.0 der Fa. Geospiza Inc. (Seattle, USA) visuell kontrolliert. Traten bei den Alignments Lücken oder schlecht abgedeckte Bereiche auf, so wurden diese mit speziell entworfenen Primern nochmals sequenziert.

3.6. Standardlösungen und Materialien

Agarosegel (1 %)	1 % (w/v) Agarose in 1x TBE-Puffer
Ampicillin-Stammlösung (100x)	10 mg/ml Ampicillin in HPLC-H ₂ O
DNA-Ladepuffer	4 M Harnstoff 0,1 M Na ₂ EDTA 50 % (w/v) Saccharose

	0,1% (w/v) BPB
Denaturierungspuffer (Southern)	50 mM NaOH 1,5 M NaCl
Dialyse-Puffer (10x)	3 M Natriumchlorid 0,25 mM Tris-HCl 1 M EDTA-Dinatriumsalz in VE-H ₂ O
Elektrophoresepuffer (10x) (E-Puffer)	0,36 M Tris 0,3 M NaOH 0,1 M EDTA-Dinatriumsalz in VE-H ₂ O
Ethidiumbromid-Färbelösung	0,001 % (v/v) Ethidiumbromid- Stammlösung in 1x E-Puffer
Glycerintöpfchen (pro Töpfchen)	500 µl 2x L-Medium 500 µl Glycerin
Hybridisierungspuffer	1x PM (in 3x SSC) 0,5 % SDS
IPTG-Lösung	0,0476 g/ml IPTG in DMF
LB-Medium	0,005 % (w/v) Natriumchlorid 0,005 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,01 % (w/v) Trypton in VE-H ₂ O
Neutralisierungslösung (Southern)	0,5 M Tris/HCl, pH 7,4 (Southern Blot) 3 M NaCl
10x PBS	200 g NaCl 5 g KCl 5 g KH ₂ PO ₄ 27,8 g Na ₂ HPO ₄

	ad 1 l VE-H ₂ O
Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)	50 % 50 mM Phenol 48 % Chloroform 2 % Isoamylalkohol
20x SSC	3 M NaCl
Tris-Borat-EDTA-Puffer (1x TBE)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 25 mM EDTA-Dinatriumsalz in VE-H ₂ O

4 Ergebnisse

4.1. DNA- und Histon-Methylierungen bei *C. thummi* und *C. piger*

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Klärung der Frage, ob bei Chironomiden funktionale DNA- und/oder Histon-Methylierungsmuster vorkommen, da dies bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (Regev et al. 1998a; Marhold et al. 2004). Im Falle vorhandener Methylierung sollte der Organismus dann auf geschlechtsspezifische Methylierungsunterschiede untersucht werden. Dieses Kapitel befasst sich mit den verschiedenen Methoden, die im Zusammenhang mit dieser Fragestellung angewandt wurden.

4.1.1. DNA-Methylierungsnachweis mittels AP-Assay

Um erste Erkenntnisse über den Methylierungszustand der genomischen DNA von *C. thummi* und *C. piger* zu erhalten, wurden DotBlots der Genom-DNAs mit Antikörpern (AK) gegen 5-Methylcytosin (5mC) inkubiert und einer anschließenden, sekundären AK-Reaktion mit alkalischer Phosphatase (AP) ausgesetzt. Ein exemplarisches Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt.

Bei diesem AK-Assay werden gleiche Mengen verschiedener DNAs auf Nitrocellulose aufgetragen und anschließend mit dem Anti-5mC-Antikörper inkubiert. Eine sekundäre Reaktion mit alkalischer Phosphatase zeigt, dass 5-Methylcytosin im Falle der vier eingesetzten *Chironomus*-DNAs und der Positivkontrolle nachgewiesen werden konnte. Die drei Negativkontrollen (zwei unterschiedliche PCR-Produkte und HPLC-H₂O) erzeugten dagegen keine Signale.

Durch diesen AK-Nachweis ergibt sich ein erster Hinweis darauf, dass die genomische DNA von *Chironomus* methylierte Cytosin-Reste enthält.

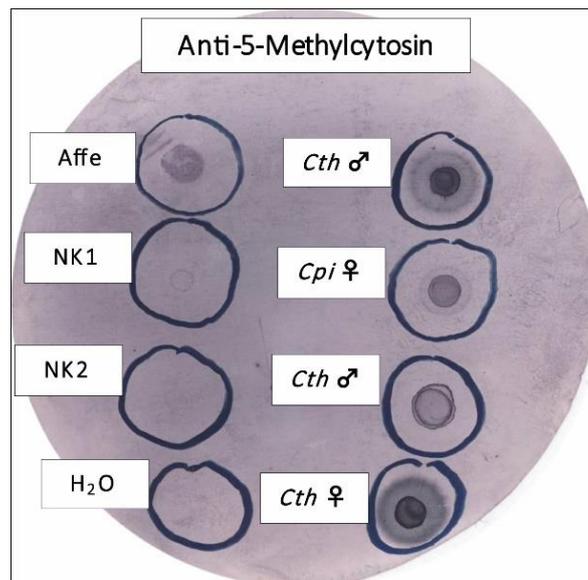


ABBILDUNG 5 | DOTBLLOT ZUM NACHWEIS VON 5mC IN VERSCHIEDENEN DNA-PROBEN MITTELS ANTIKÖRPERN
 Verschiedene DNA-Proben wurden in gleichen Mengen auf Nitrocellulose aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht zeigt sich, dass sowohl die als Positivkontrolle verwendete Affen-DNA, als auch alle vier DNAs von *Chironomus thummi* und *piger* deutliche Farbsignale abgeben. Bei den drei Negativkontrollen (zwei PCR-Produkte (NK1 und NK2) sowie HPLC-Wasser (H₂O)) bleiben solche Signale aus. Die Affen-DNA wurde aus der grünen Meerkatze gewonnen (*Chlorocebus sp.*).

4.1.2. Nachweis von DNA- und Histon-Methylierungen mittels Antikörperfärbungen an Polytänchromosomen

Um einen besseren Einblick in die möglichen Einflüsse epigenetischer Faktoren auf die Geschlechtsbestimmung von Chironomiden zu erhalten, wurden AK-Färbungen an Polytänchromosomen von *C. thummi* und *C. piger* beiderlei Geschlechts durchgeführt. Es sollten dabei sowohl Methylierungen der DNA (5mC) als auch der Histone (H3K9) untersucht werden. Das Ziel bestand darin, über Immunnachweise distinkte und eventuell geschlechtsspezifische Muster innerhalb der Polytänchromosomen zu finden. Da Vergleichbares noch nicht an Polytänchromosomen anderer Spezies' durchgeführt wurde, musste zunächst ein geeignetes Protokoll etabliert werden. Die Ergebnisse, die dabei im Laufe dieser Arbeit erhalten wurden, sind nicht aussagekräftig, da zum einen eine geeignete Positivkontrolle fehlte und da sie zum anderen nicht gut reproduzierbar waren. Abbildung 6 fasst beispielhaft die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Die Bilder A

und B zeigen Aufnahmen von Polytänchromosomen von Weibchen (A) und Männchen (B) von *C. thummi* nach Behandlung mit dem primären Antikörper gegen 5mC, Bild C zeigt die korrespondierende Negativkontrolle ohne primären AK. Die Chromosomen aus A und B fluoreszieren nach Anregung des FITC, jedoch lassen sich diese Fluoreszenzen nicht auf einzelne Bereiche oder Banden der Polytänchromosomen eingrenzen, sondern erstrecken sich vielmehr über die Gesamtheit der Chromosomen und lassen sich kaum von Hintergrundsignalen unterscheiden. Vergleicht man dazu die Negativkontrolle, so fällt auf, dass diese deutlich schwächer fluoresziert und bis auf ein paar unregelmäßige Punkte kaum von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden kann. Bilder D, E und F zeigen Polytänchromosomen nach Inkubation mit dem H3K9-Antikörper. Analog zur anderen Versuchsreihe sind hier ein männliches (D) und ein weibliches Präparat (E) sowie ebenfalls eine Negativkontrolle (F) abgebildet. Auch die Ergebnisse nach H3K9_{AK}-Behandlung lassen keine eindeutige Zuordnung von Signalen zu. Die Signalstärke ist insgesamt schwächer als in der 5mC-Versuchsreihe (A und B), sodass sich die Fluoreszenzen der Polytänchromosomen in D und E kaum von der Negativkontrolle (F) unterscheiden.

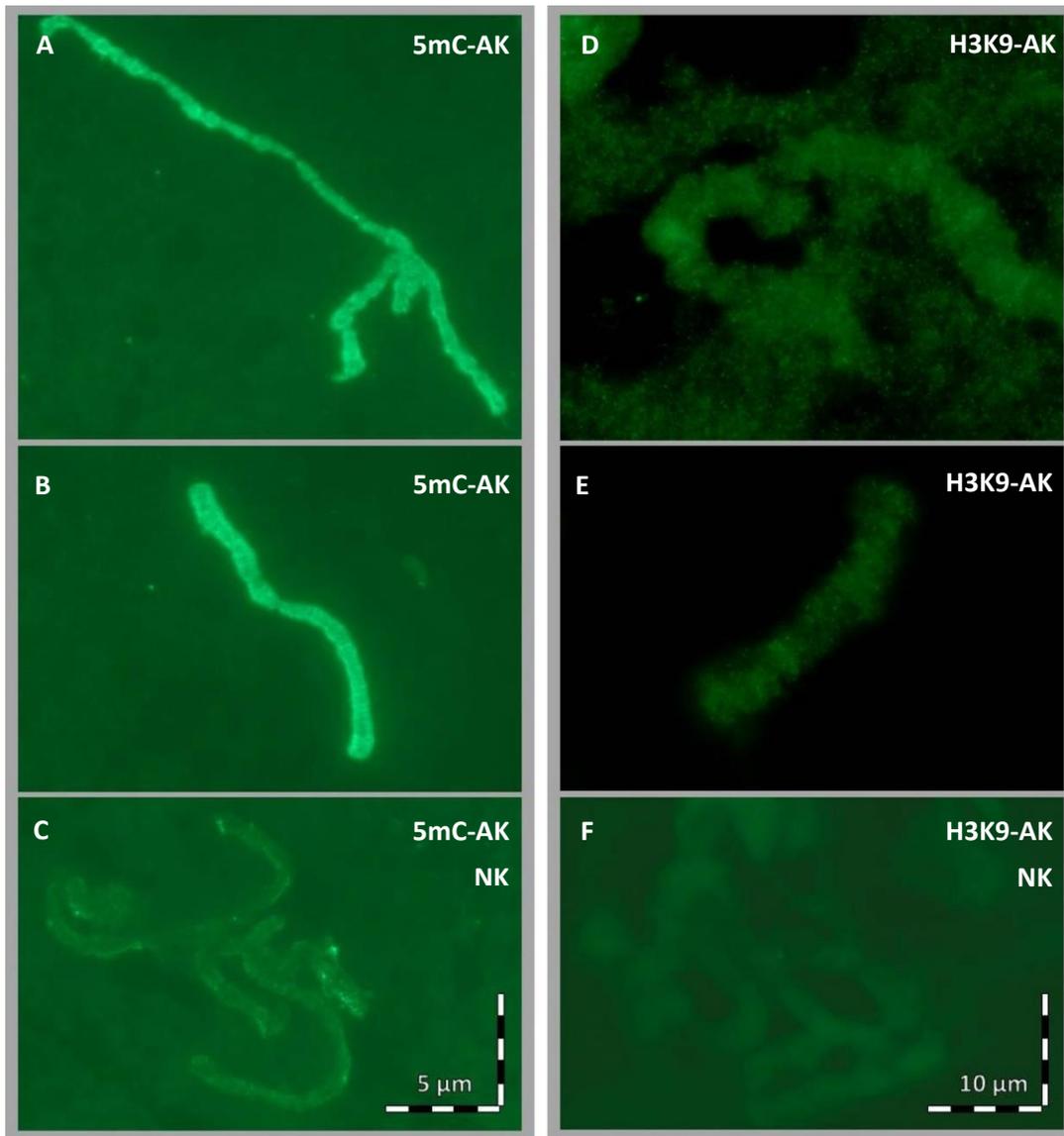


ABBILDUNG 6 | ANTIKÖRPER-NACHWEIS METHYLIERTER DNA UND METHYLIERTER HISTONE

Aufnahmen von Polytänchromosomen nach 5mC-Antikörper-Assay (**A**, **B**) und Nachweis mit FITC-gekoppelten, sekundären Antikörpern. In der Negativkontrolle (**C**) wurden keine 5mC-AK verwendet. Durch den Vergleich der Ergebnisse aus **A** und **B** mit der Negativkontrolle fällt auf, dass das Chromosom der Negativkontrolle nur an wenigen Stellen und dort auch nur sehr schwach fluoresziert. Die Chromosomen (**A** und **B**) zeigen eine deutliche Fluoreszenz, welche allerdings nicht auf bestimmte Chromosomenbereiche beschränkt ist und nicht von Hintergrundsignalen zu unterschieden werden können. Die hier zu beobachtenden Ergebnisse waren auch nicht uneingeschränkt reproduzierbar. Die Teilbilder **D** und **E** zeigen Polytänchromosomen nach Inkubation mit AK gegen die Histonmethylierung H3K9. Deutlich fluoreszierende Signale oder Muster sind nicht erkennbar. In Teilbild **F** ist die korrespondierende Negativkontrolle gezeigt, bei der der primäre AK weggelassen wurde.

4.1.3. DNA-Methyltransferasen bei *Chironomus*

Essentiell für die Methylierung von DNA ist das Vorhandensein von DNA-Methyltransferasen (DNMT) (Tweedie et al. 1999). Aus diesem Grund wurde mithilfe bioinformatischer Methoden ermittelt, ob sich in den vorliegenden genomischen Sequenzdaten von *Chironomus* Gene finden lassen, die für DNMT kodieren und – unter Zuhilfenahme von RNASeq-Daten – ob diese gegebenenfalls transkribiert werden. Mittels klassischer molekularbiologischer Versuche wurden die Ergebnisse anschließend überprüft. Um herauszufinden, ob in *Chironomus* Gene existieren, die für eine Variante der DNMT 1, 2 oder 3 kodieren, wurden zunächst tBLASTn-Suchen durchgeführt. Als Suchanfrage dienten dabei die AS-Sequenzen bekannter DNMT-Orthologen verwandter Spezies' (*Bractocera oleae*, *Culex pipiens*, *Drosophila melanogaster*, *Musca domestica*, *Tribolium castaneum*, *Aedes aegypti* und *Bombyx mori*). Durchsucht wurde eine eigens erstellte Datenbank assemblierter genomischer DNA von *C. thummi* und *piger*. Auf diese Weise konnte ein mögliches DNMT2-Ortholog gefunden werden. Die BLAST-Suchen nach Varianten von DNMT1 und DNMT3 ergaben keine signifikanten Treffer.

Alle tBLASTn-Suchen lieferten denselben, ca. 8 kb großen Contig als Treffer (Contig_8595), welcher nach BLASTx-Suche gegen die Datenbanken „nr“ und „swiss-prot“ bei NCBI wieder auf DNMT2 zurückführte (zusammen mit anderen Treffern strangauf- und abwärts der vermuteten Genregion). Ein „Large Gap Read Mapping“ (CLC Genomics Workbench) gegen den auf die relevante Region gekürzten Contig_8595 offenbarte, dass es sich scheinbar um einen transkribierten Bereich handelt.

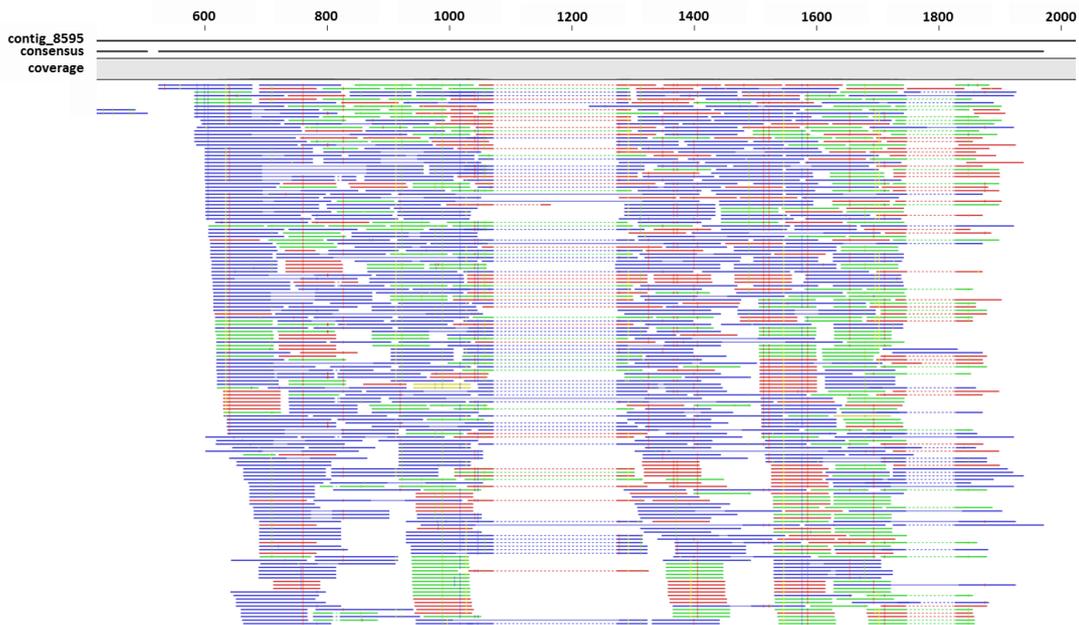


ABBILDUNG 7 | LARGE GAP READ MAPPING GEGEN DEN POTENTIELLEN GENBEREICH VON DNMT2

Zu sehen ist ein „Mapping“ von RNA-Daten männlicher und weiblicher Larven sowie ungesexter Embryonen gegen einen Contig, der durch BLASTx von DNMT2-Orthologen gegen eine Datenbank assemblierter, genomischer DNA ermittelt wurde. In **blau** dargestellt sind dabei „paired reads“, deren Partner in passendem Abstand gemappt werden konnte (dünne durchgezogene Linie). **Grüne** „reads“ (forward) und **rote** „reads“ (reverse) repräsentieren Sequenzen, deren Partner entweder nicht in passendem Abstand, in korrekter Orientierung oder gar nicht gemappt werden konnten. Gestrichelte Linien zeigen an, dass verschiedene Teile des jeweiligen „reads“ an verschiedene Stellen der Referenz gemappt werden können, wodurch sie gespalten werden (sog. „split reads“). Diese „split reads“ weisen oftmals auf Intron/Exon-Grenzen hin. Auch in diesem Fall handelt es sich bei den gestrichelten Abschnitten vermutlich um Introns, da an den Übergängen von Intron zu Exon jeweils sogenannte Konsensus-„splice sites“ zu finden sind.

Parameter: Length Fraction = 0,98; Similarity Fraction = 0.98.

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis des „Large Gap Read Mappings“ mit einem Abschnitt von Contig_8595, der durch die Transkriptomdaten abgedeckt ist. Es lassen sich in dem „Mapping“ zwei mögliche Intronbereiche und somit drei potentielle Exons ausmachen. Da sich an den Intron-/Exongrenzen Konsensus-„splice sites“ befinden, handelt es sich hierbei vermutlich um echte Exonstrukturen. Eine Überprüfung der möglichen offenen Leserahmen („Open Reading Frames“, ORFs) des Transkripts ergab, dass dieser DNA-Abschnitt offensichtlich für ein Polypeptid von 315 AS Länge kodiert (ORF +2), welches als Ergebnis einer BLASTp-Suche die Superfamilie der DNA-Methyltransferasen liefert. Abbildung 9 zeigt das multiple „Alignment“ einiger orthologer Proteinsequenzen von DNMT2 aus der Klasse der Insekten zusammen mit der bei *Chironomus* gefundenen Sequenz. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Sequenzen über weite Strecken und mit der

Ausnahme dreier variabler Bereiche (AS 2 - 15, 182 - 220 und 290 - 321) zueinander sehr ähnlich sind. Das gefundene, abgeleitete Protein aus *Chironomus* kann daher ebenfalls als Ortholog von DNMT2 betrachtet werden.

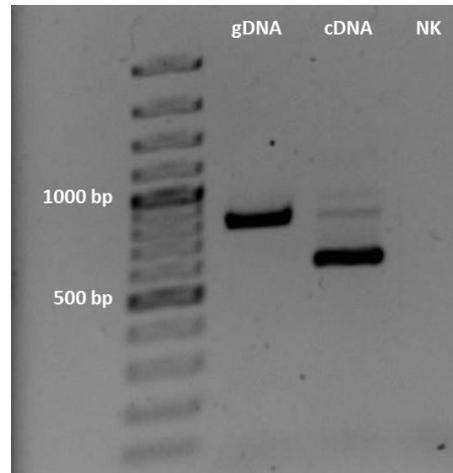


ABBILDUNG 8 | ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER PRODUKTE NACH PCR AUF GENOMISCHE DNA UND RT-PCR AUF *DNMT2*
Zu sehen ist ein 1%-iges Agarosegel, auf das die Produkte der PCR für *DNMT2* auf genomische (g) und komplementäre (c) DNA aufgetragen wurden. In der Spur der gDNA erkennt man eine deutliche Bande auf der Höhe von ca. 800 bp. Die PCR mit cDNA als Template ergibt eine Bande bei ca. 610 bp sowie eine weitere, sehr schwache Bande auf Höhe des genomischen Produkts. Die Größe der erhaltenen (RT-) PCR-Produkte entspricht den Erwartungen. Die Negativkontrolle (NK), bei der die PCR ohne DNA-Matrize erfolgte, zeigt keine amplifizierten DNA-Fragmente.

Zur experimentellen Überprüfung der bioinformatischen Ergebnisse wurden PCRs auf genomische DNA von *Chironomus* und RT-PCRs durchgeführt. Abbildung 8 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung dieser Produkte. In der Spur mit dem Produkt der PCR mit genomischer DNA von *Chironomus* als Template trat in dem Gel eine saubere Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht von 783 bp auf. In der Spur, in der das RT-PCR-Produkt aufgetragen wurde, war ebenfalls das erwartete Produkt von 582 bp zu erkennen, da hier das durch die Primer überspannte Intron herausgespleißt ist. Die zweite, schwache Bande in der Spur des RT-PCR-Produkts lässt sich durch eine Verunreinigung der RNA-Matrize mit genomischer DNA erklären, da sie in ihrer Größe den Banden des genomischen Ansatzes entspricht.

	20	40	60	80	100	120
Ceratitis capitata	---EFRVLE	AFNASSITGT	ANAVYAHNYP	SLTPRKIDRM	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Bractocera dorsalis	---ELNILE	AFYSQKLGQ	ANAVYAHNYS	KLSPKIEKM	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Musca domestica	---VFRVLE	AFYQALDGO	ANAVYAHNYS	SLSVKVTKL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Drosophila melanogaster	---MRVLE	AFYQALDGO	ANAVYAHNYS	SLSVKVTKL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Nasonia vitripennis	---EILE	ALGSSVTGK	ANKVYRNHP	SVTVEIAL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Tribolium castaneum	---EILE	ALGSSVTGK	ANKVYRNHP	SVTVEIAL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Musca domestica	---EILE	ALGSSVTGK	ANKVYRNHP	SVTVEIAL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Aedes aegypti	HLP-EYQVLE	ALVSGVEGT	ANKVYRNHP	SLTPDRINKL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Culex quinquefasciatus	---EHRVLE	ALVSGVEGT	ANKVYRNHP	SLTPDRINKL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Bombus morio	---EHRVLE	ALVSGVEGT	ANKVYRNHP	SLTPDRINKL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Chironomus thummi	---EHRVLE	ALVSGVEGT	ANKVYRNHP	SLTPDRINKL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
Consensus M	---EHRVLE	ALVSGVEGT	ANKVYRNHP	SLTPDRINKL	COPHTRVGNR	LOHICDILPO
	140	160	180	200	220	240
Ceratitis capitata	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Bractocera dorsalis	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Musca domestica	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Drosophila melanogaster	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Nasonia vitripennis	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Tribolium castaneum	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Musca domestica	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Aedes aegypti	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Culex quinquefasciatus	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Bombus morio	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Chironomus thummi	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Consensus M	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
	260	280	300	320	340	360
Ceratitis capitata	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Bractocera dorsalis	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Musca domestica	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Drosophila melanogaster	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Nasonia vitripennis	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Tribolium castaneum	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Musca domestica	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Aedes aegypti	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Culex quinquefasciatus	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Bombus morio	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Chironomus thummi	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Consensus M	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
	380	400	420	440	460	480
Ceratitis capitata	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Bractocera dorsalis	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Musca domestica	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Drosophila melanogaster	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Nasonia vitripennis	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Tribolium castaneum	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Musca domestica	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Aedes aegypti	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Culex quinquefasciatus	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Bombus morio	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Chironomus thummi	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI
Consensus M	EAHQPIEAL	GAAGYQWREF	ILSPTQFGIP	GEQILLELPO	DC-----DV	PKNEFNEIKI

ABBILDUNG 9 | MULTIPLES ALIGNMENT DER DNMT2-PROTEINSEQUENZEN EINIGER INSEKTEN

Das in dieser Abbildung gezeigte *alignment* wurde mit dem Programm „CLC Main Workbench v.7.6.1“ erstellt. Es wurden die Standardparameter verwendet. Den Grad der Konservierung zwischen den verschiedenen AS der einzelnen Proteinsequenzen wird farblich dargestellt. **Grüne** AS sind auf einen hohen Konservierungsgrad zurückzuführen; **rote** AS zeigen an, dass an dieser Stelle kein oder nur ein sehr geringer Grad der Konservierung vorliegt. Mit Ausnahme der neuen Sequenz von *C. thummi* (**gelb** hinterlegt) wurden alle Sequenzen der online-Datenbank von NCBI entnommen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die in *C. thummi* gefundene Sequenz bis auf drei variable Bereiche (2-15, 182-220 und 290-321) über große Teile des multiplen *alignments* mit den übrigen Proteinsequenzen übereinstimmt.

4.1.4. Mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede in den Methylierungsmustern

4.1.4.1. MSRE und RAPD-PCR

Um mögliche geschlechtsspezifische Methylierungsunterschiede zu untersuchen, wurden Isoschizomere von Restriktionsenzymen zum Verdau genomischer DNA genutzt, welche dieselbe Restriktionsschnittstelle erkennen, aber abhängig vom Methylierungsstatus der DNA diese schneiden oder nicht (MSRE = „Methylation Sensitive Restriction Enzymes“). Bei dieser Methode wird die zu untersuchende DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen verdaut. Liegt dabei innerhalb einer Schnittstelle eine DNA-Methylierung vor, so wird die DNA an dieser Stelle nicht geschnitten. Verdaut man die DNA allerdings mit einem methylierungs-unsensitiven Isoschizomer, entstehen – verglichen mit dem methylierungssensitiven Verdau – andere Fragmente. Über den direkten Vergleich beider Verdauungsmuster lässt sich dann auf den Methylierungszustand der DNA rückschließen. Da sich zwei DNA-Verdaue in der Regel selbst nach elektrophoretischer Auftrennung nicht ausreichend unterscheiden lassen, sind dabei Folgeexperimente nötig. Im Falle der RAPD-PCR (RAPD = „Randomly amplified polymorphic DNA“) werden kurze, degenerierte Primer zur zufälligen Amplifikation der geschnittenen Matrizen-DNA verwendet, um Unterschiede der Fragmentierung via PCR „sichtbar“ zu machen.

In Abbildung 10 ist beispielhaft das Ergebnis einer RAPD-PCR gezeigt. Dabei ist in der linken Spur das Ergebnis einer RAPD-PCR zu sehen, bei der als Template MspI-geschnittene genomische DNA von *C. thummi* eingesetzt worden ist. Die rechte Spur zeigt das einer RAPD-PCR, deren Template ebenfalls genomische DNA von *C. thummi* war, welche jedoch im Vorfeld der PCR mit HpaII behandelt worden ist.

Man erkennt deutlich die unterschiedlichen Bandenmuster nach Auftrennung der jeweiligen PCR-Produkte.

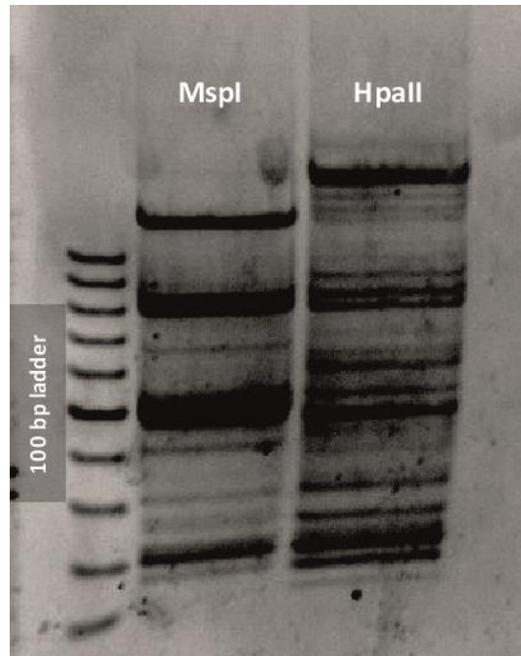


ABBILDUNG 10 | RAPD-PCR AUF UNGESEXT E DNA VON *C. THUMMI*

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte einer RAPD-PCR auf ungesexte, mit MspI beziehungsweise HpaII verdaute DNA von *Chironomus thummi* resultiert in distinkten Bandenmustern. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden hier aufgetrennten Proben zu erkennen, was auf verschiedene Fragmentlängen und somit auf Unterschiede bei den Enzymreaktionen zurückzuführen ist, was auf Methylierung der DNA schließen lässt. Die Muster der aufgetrennten PCR-Produkte waren reproduzierbar.

Um nun zu überprüfen, ob die DNA-Methylierung möglicherweise geschlechtsspezifische Unterschiede in *Chironomus* zeigt, wurden die Versuche mit DNA-Proben aus Männchen- bzw. Weibchen-spezifischen Proben wiederholt. Abbildung 11 zeigt exemplarisch zwei gelelektrophoretische Auftrennungen, die die Ergebnisse einer solchen RAPD-PCR-Versuchsreihe repräsentieren. Die RAPD-PCR-Ansätze wurden mit verschiedenen Primern auf gepoolte DNA von gesexten *C. thummi*- und *C. piger*-Larven durchgeführt. Dabei ließ sich in den beiden hier gezeigten Fällen beobachten, dass es zu unterschiedlichen Bandenmustern kam. Abbildung 11-A zeigt das Ergebnis einer PCR auf MspI-/HpaII-behandelte, geschlechtsspezifische DNA von *C. thummi*. Die gelelektrophoretische Auftrennung offenbarte dabei, dass das Bandenmuster der PCR auf männliche, HpaII-behandelte

DNA anders war als bei der DNA aus weiblichen Tieren und der MspI- behandelten DNA. In Abbildung 11-B ist das Ergebnis einer RAPD-PCR zu sehen, die ebenfalls mit DNAs von *C. thummi* durchgeführt wurde, die mit MspI beziehungsweise HpaII geschnitten worden sind. Hier sind Replikate angefertigt worden, da sowohl die männliche als auch die weibliche DNA im Vorfeld pro Enzym (MspI/HpaII) in jeweils zwei parallelen Ansätzen verdaut wurde. Die so entstandenen acht Proben dienten als Matrizen für die RAPD-PCRs. Es ist zu erwähnen, dass es sich hierbei um *technische* Replikate handelt, da zwar die Enzymreaktionen zweifach und unabhängig voneinander durchgeführt worden sind, die dafür eingesetzten DNAs jedoch von derselben Isolierung stammten. Auf dem Gelbild sind zwei Dinge zu sehen: Zum einen erkennt man einen Unterschied zwischen den Bandenstärken der HpaII-Reaktionen auf der einen und der MspI-Reaktionen auf der anderen Seite. Zum anderen ließ sich bei allen vier HpaII-Ansätzen ein Unterschied zwischen Weibchen- und Männchen-DNA ausmachen (rote Pfeile), was mit großer Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen ist, dass das methylierungssensitive Enzym HpaII die weibliche DNA an manchen Positionen anders geschnitten hat als die männliche. Zwar waren die Muster reproduzierbar, allerdings muss bei RAPD-Experimenten stets bedacht werden, dass es sich um *zufällige* Amplifikationen handelt. Darüber hinaus sind PCRs mit degenerierten Primern, wie sie in dieser Versuchsreihe verwendet wurden, anfällig für Amplifikationsartefakte, wie man anhand der auftretenden Banden in der Negativkontrolle (NK) aus Abbildung 11-B entnehmen kann.

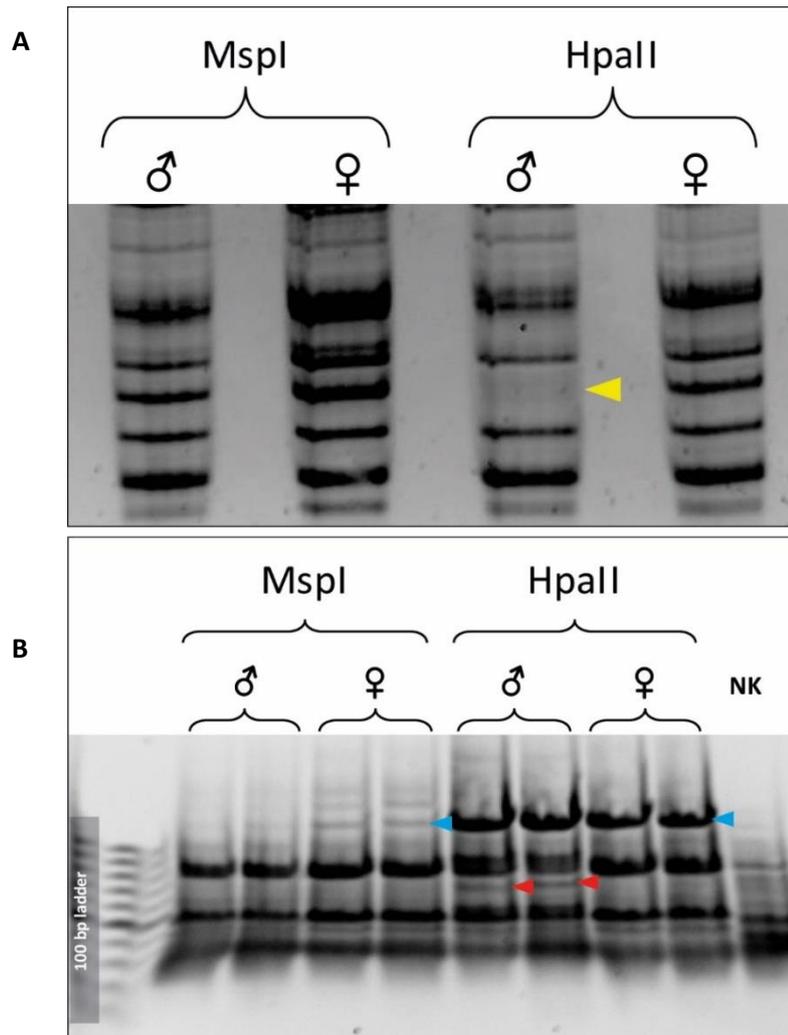


ABBILDUNG 11 | RAPD-PCR AN GESEXTER UND MspI/HpaII-VERDAUTER DNA VON *C. THUMMI*

Gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte verschiedener RAPD-PCRs. **A** Männliche und weibliche DNAs von *C. thummi* wurden mit den Restriktionsenzymen MspI bzw. HpaII verdaut und anschließend für RAPD-PCRs eingesetzt. Die Bandenmuster der Verdaue gleichen sich größtenteils in allen vier Spuren, mit Ausnahme einer fehlenden Bande in der 3. Spur (**gelber Pfeil**). Bei der Probe aus „Spur 3“ wurde die PCR auf HpaII-verdaute, männliche DNA durchgeführt. **B** RAPD-PCR mit einem weiteren Primerpaar. Hier wurden technische Replikate der Enzymreaktionen erstellt. Die **blauen Pfeile** deuten auf Unterschiede zwischen den HpaII-Reaktionen einerseits und den MspI-Reaktionen andererseits hin. Mit **rot** ist eine Bande innerhalb der HpaII-Verdaue gekennzeichnet, die in den Spuren der Weibchen-DNA nicht auftaucht. NK = Negativkontrolle

4.1.4.2. MSRE und radioaktive Southern-Hybridisierungen

Die in Kapitel 4.1.4.1 verwendete Methode der MSRE-Analysen gibt in Verbindung mit einer nachfolgenden, unspezifischen Amplifikation zwar Aufschlüsse über vorhandene Methylierungen, lässt aber keine Interpretationen hinsichtlich deren Lokalisierung zu. Möchte man Methylierungen in spezifischen Regionen

nachweisen, ist dieses Verfahren also ungeeignet. Im Gegensatz zur RAPD-PCR werden für Southern-Analysen radioaktive Sonden hergestellt, die im Bereich einer potentiell methylierten Schnittstelle für MspI/HpaII (CCGG) liegen (die Sonden müssen eine Schnittstelle nicht notwendigerweise überspannen).

Anhand der Fragmentgrößen, die auf dem Autoradiogramm nach der Southern-Hybridisierung zu sehen sind, sollte man daher Rückschlüsse auf das spezifische Schneideverhalten der eingesetzten Enzyme und somit auf den Methylierungszustand der jeweiligen Schnittstelle machen können. Interessant sind hierbei vor allem – aber nicht ausschließlich – Schnittstellen, die in der Nähe des 5'-Bereichs eines Gens liegen, da diese im Falle einer Methylierung auf eine mögliche epigenetische Regulation des entsprechen Gens deuten. Zu einigen dieser Schnittstellen innerhalb der SDR von *Chironomus* wurden radioaktive Southern-Hybridisierungen durchgeführt, ein Großteil davon im Zuge der Bachelorarbeit von Jens Rödiger (Rödiger 2013).

Abbildung 12 und 13 zeigen exemplarisch die Ergebnisse zweier Versuchsreihen, in denen die Verdauung männlicher und weiblicher DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran übertragen und anschließend mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert wurden. Die Sonde, die dem Autoradiogramm aus Abbildung 12 zugrunde liegt, überspannte eine MspI/HpaII-Schnittstelle, welche im dritten Exon des Gens *mier-1-like* liegt (Abbildung 12-A). Basierend auf der Sequenz des vorliegenden SDR-Contigs des postulierten Proto-X-Chromosoms von *C. thummi* ließen sich die Fragmentgrößen ableiten, die bei vollständigem Verdau zu erwarten waren. Es ist hierbei allerdings zu beachten, dass zu diesem Bereich keine Sequenzinformationen vorlagen, die eindeutig dem Proto-X- oder dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* zugeordnet werden konnten. Ausgehend von dem zugrundeliegenden Contig waren somit sowohl nach Verdau der Weibchen- als auch nach Verdau der Männchen-DNA zunächst je zwei Fragmente zu erwarten: eines mit einer Größe von 837 bp und ein weiteres mit einer Größe von 3151 bp.

Für die entstehenden Fragmente ist nicht nur die überspannte Schnittstelle von Bedeutung. Auch ein Schneiden beziehungsweise ein Nicht-Schneiden an einer Schnittstelle in der Nähe der Sonde würde zu unterschiedlichen Fragmentgrößen führen. Eine Übersicht über die möglichen Fragmente kann Abbildung 12 entnommen werden. Es sind hierbei nur die zwei benachbarten Schnittstellen mitabgebildet, die jeweils strangauf- bzw. strangabwärts liegen.

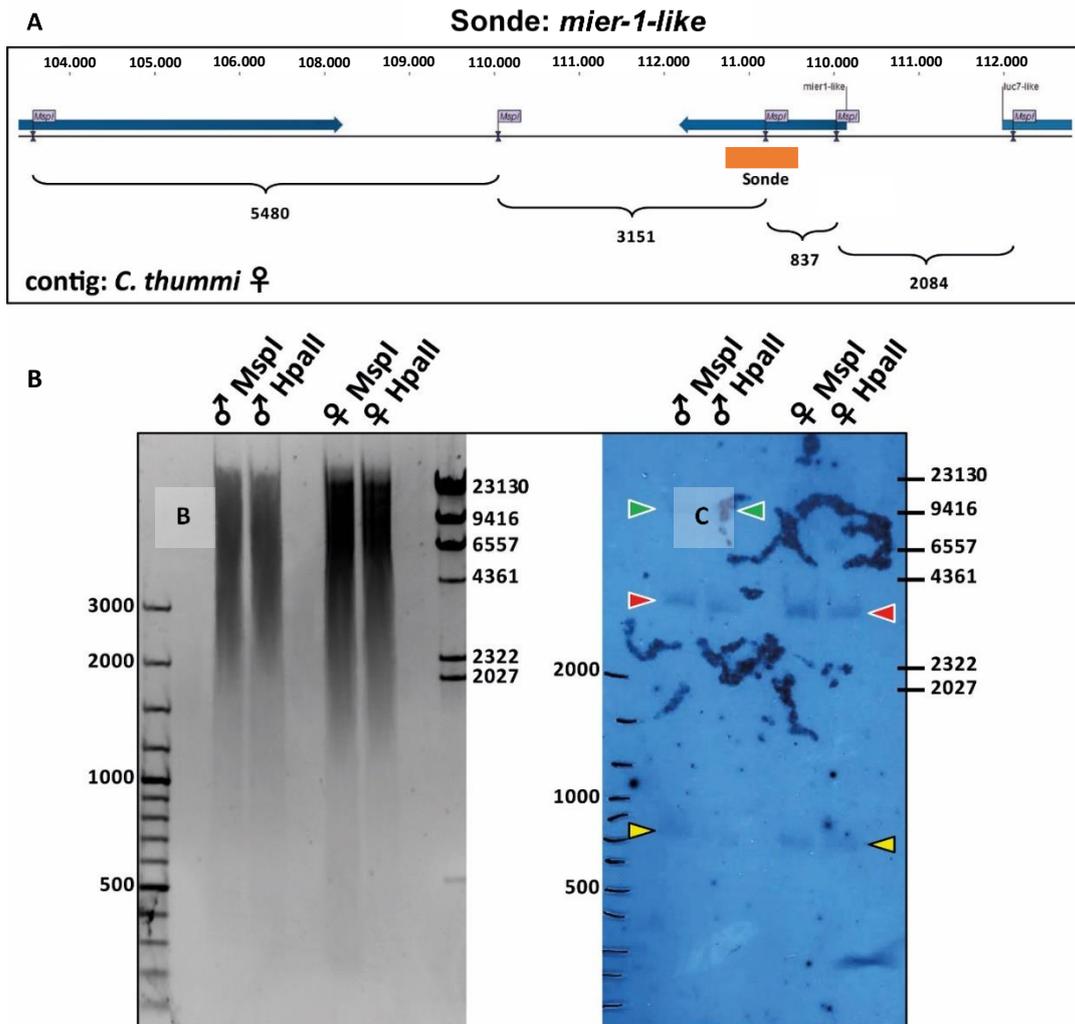


ABBILDUNG 12 | GELBILD UND AUTORADIOGRAMM GESCHLECHTSSPEZIFISCHER UND MspI/HpaII-VERDAUTER DNA VON *C. THUMMI* – SONDE *MIER-1-LIKE*

Die Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von MspI/HpaII-verdauter Männchen- und Weibchen DNA (links) mit ihrem korrespondierenden Autoradiogramm (rechts) nach Hybridisierung mit der Sonde „mier1-like“. Über dem Gelbild und dem Autoradiogramm ist die Restriktionskarte des mit der verwendeten Sonde analysierten Bereichs abgebildet. Die eingesetzte radioaktive Sonde (orange) überspannt eine MspI/HpaII-Schnittstelle, die im 3. Exon des Gens *mier1-like* liegt. Durch die benachbarten Schnittstellen besitzen die Fragmente, die nach Verdau und radioaktiver Southern-Hybridisierung zu erwarten sind, Größen von ca. 3,2 kb und 837 bp. Die auftretenden Banden (rote und gelbe Pfeile) entsprechen diesen Erwartungen. Zusätzlich treten noch weitere Banden in einer Höhe von ca. 8,5 kb auf (grüne Pfeile), wobei deren Signale sehr schwach sind.

Auf dem Autoradiogramm waren verschiedene, teilweise schwache Signale zu erkennen (Abbildung 12, Pfeile). Die Fragmente mit dem niedrigsten Molekulargewicht (gelbe Pfeile) besaßen eine Größe von ca. 850 bp und traten in allen vier Enzymreaktionen auf. Die roten Pfeile weisen auf Signale hin, die ebenfalls in allen vier Spuren zu beobachten waren und auf ein Fragment hindeuteten, das eine Größe von ungefähr 3 kb besaß. Bei den beiden Enzymreaktionen der Männchen-DNA trat auf dem Autoradiogramm noch ein weiteres, sehr schwaches Signal auf, das sich in einer Größenordnung von ca. 10 kb bewegte (grüne Pfeile). Dieses Signal ließ sich bei den Enzymreaktionen der Weibchen-DNA nicht beobachten. Enzymspezifische Signale, also Signale, die nach MspI-Reaktion auftreten, nicht aber nach einem Verdau mit HpaII (oder umgekehrt) und somit Hinweise auf methylierte Schnittstellen im untersuchten Bereich geben könnten, waren auf diesem Autoradiogramm nicht zu sehen.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis einer weiteren Southern-Analyse. Die Schnittstellen, die hierbei auf eventuelle Methylierungen untersucht wurden, befanden sich in der Umgebung des Gens *fs(1)K10-like*. Die Positionen der radioaktiv markierten Sonde sind in Abbildung 13-A dargestellt (grün). Hier muss beachtet werden, dass *fs(1)K10-like* auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* dupliziert vorliegt (s. Abbildung 13-A, untere Box). Hierdurch kann eine Sonde, die zu einer Sequenz innerhalb dieses Gens erstellt worden ist, auf dem Proto-Y-Chromosom unter Umständen an zwei Stellen binden. Als Grundlage für die Ermittlung der erwarteten Fragmentgrößen diente hier die Sequenz des X-Chromosoms des SDR-Contigs von *C. thummi*, da der Y-Haplotyp im Bereich der Sonde zwar bekannt ist, nicht aber die flankierenden Bereiche strangauf- und abwärts dieses Bereichs und somit auch nicht die benachbarten Schnittstellen.

Das Autoradiogramm zeigt eine Vielzahl an Banden, aufgrund derer die erwarteten Fragmente nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Darüber hinaus ließ sich ein Großteil dieser Fragmente nicht aus der vorliegenden Sequenz des *thummi*-Contigs ableiten. Die Bandenmuster dieses Restriktionsversuches waren bis auf zwei Ausnahmen in allen vier Enzymreaktionen identisch. Die beiden Ausnahmen

(Abbildung 13-B, rote und gelbe Pfeile) schienen dabei geschlechtsspezifisch und unabhängig vom jeweils verwendeten Enzym zu sein.

Innerhalb der SDR von *C. thummi* und *C. piger* liegen einige Schnittstellen in der Nähe des 5'-Bereichs eines Gens und sind somit aus epigenetischer Sicht von Interesse. Zu allen wurden Southern-Analysen durchgeführt (Rödig 2013). Bei keiner der untersuchten Schnittstellen konnten enzyspezifische Banden und somit methylierte DNA-Abschnitte beobachtet werden.

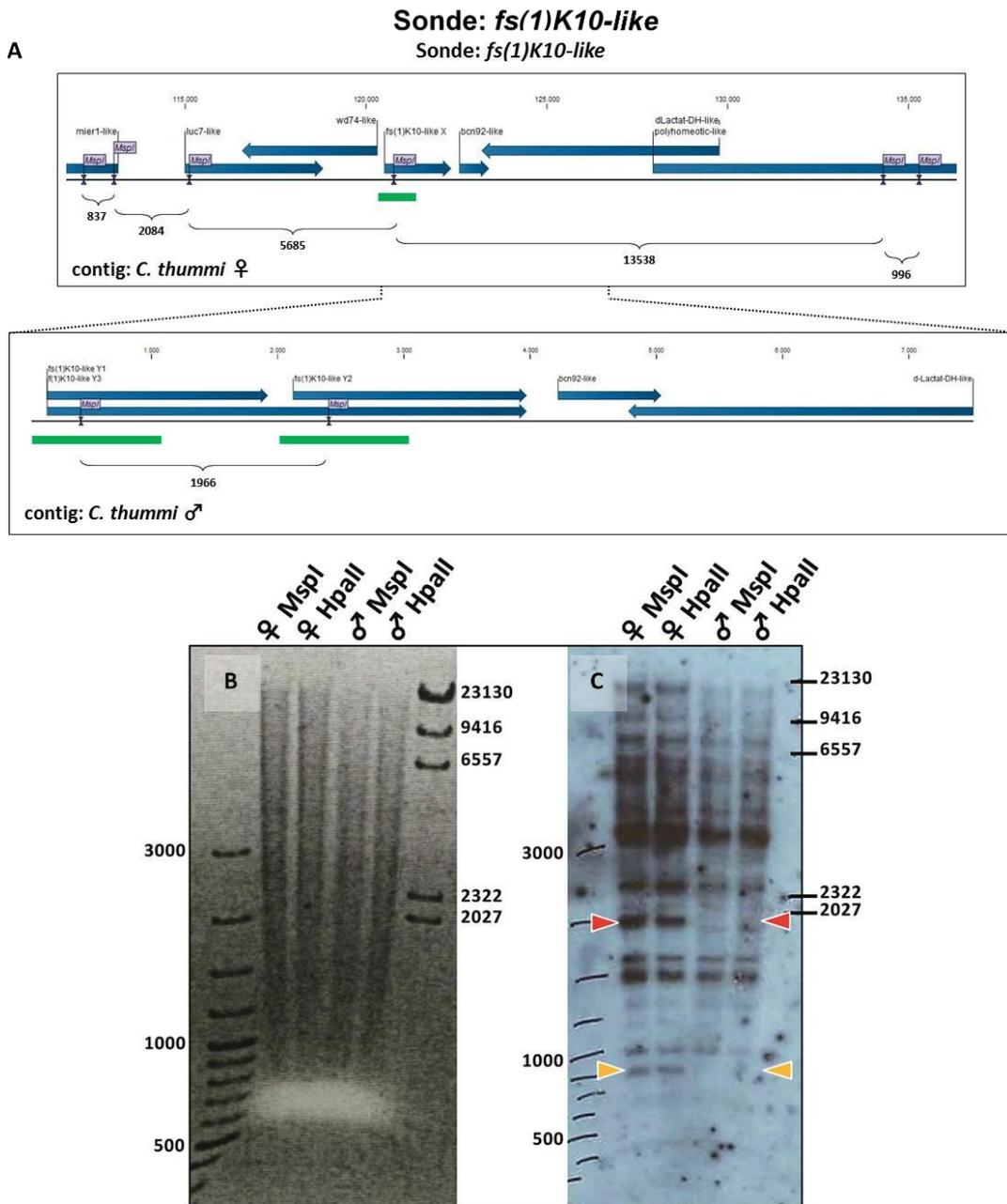


ABBILDUNG 13 | GELBILD UND AUTORADIOGRAMM GESEXTER UND MspI/HpaII-VERDAUTER DNA VON *C. THUMMI* – SONDE *fs(1)K10-LIKE*

Die Abbildung zeigt eine gelelektrophoretische Auftrennung mit ihrem korrespondierenden Autoradiogramm. Die eingesetzte, radioaktive Sonde (grün) überspannte eine MspI/HpaII-Schnittstelle, die im 1. Exon des Gens *fs(1)K10-like* liegt. Durch die benachbarten Schnittstellen besaßen die Fragmente, die nach Verdau und radioaktiver Southern-Hybridisierung zu erwarten waren, Größen von ca. 5,7 und 13,5 kb. Das Autoradiogramm ergab allerdings eine Vielzahl von Banden. Die gelben und roten Pfeile zeigen auf Unterschiede in den Fragmentmustern. Diese Unterschiede traten aber geschlechtsgekoppelt auf und nicht enzymgekoppelt.

4.2. Erstellen eines Y-Chromosomen-spezifischen SDR-Contigs für *C. thummi*

4.2.1. Aufzucht von Kreuzungshybriden

Dass *Chironomus*-Männchen heterogametisch sind und somit zwei verschiedene Geschlechtschromosomen (Proto-X und Proto-Y) besitzen, stellt ein großes Problem für die Assemblierung Y-Chromosomen-spezifischer Contigs dar. Dies liegt daran, dass bei einer Präparation männlicher DNA stets auch Proto-X-chromosomale DNA vorhanden ist und eine eindeutige Zuordnung der anschließend erhaltenen Sequenzinformationen zu den jeweiligen Geschlechtschromosomen nur eingeschränkt möglich ist. Basierend auf der Annahme, dass sich die Genome von *C. thummi* und *C. piger* voneinander in höherem Maße unterscheiden, als es die jeweiligen Geschlechtschromosomen innerhalb einer Spezies' tun, sollte ein Kreuzungsstamm aus *C. thummi*-♂♂ x *C. piger* ♀♀ erzeugt werden. Die Folgegenerationen sollten jeweils mit *piger*-Weibchen rückgekreuzt werden. Durch „crossing over“ sollten dann sukzessive *thummi*-spezifische Chromosomenabschnitte aus dem Hybridgenom entfernt werden. Durch das Verkreuzen von *piger*-Weibchen mit den männlichen Hybriden einer jeden Folgegeneration, konnte nach einigen Generationen ein Zustand erhalten werden, bei dem das Genom der Hybriden zu einem überwiegenden Anteil aus *piger*-Sequenzen bestand. Da aber derjenige Bereich der SDR, der den Faktor M enthält, bei männlichen Individuen stets nur von dem *thummi*-Männchen der ursprünglichen Parentalgeneration abstammen konnte, war die SDR von Männchen jeder Folgegeneration ebenfalls immer *thummi*-spezifisch.

Ziel der Kreuzungsversuche war, Individuen zu erhalten, die auf Chromosom III, Arm F - dem Chromosomenarm, auf dem die SDR lokalisiert ist - weitgehend frei von *thummi*-abgeleiteten Sequenzen sein sollten. Als Indikator für das *thummi/piger*-DNA-Verhältnis des Genoms eines gegebenen Individuums dienten die Cla-Element-Cluster, die im *thummi*-Genom an mehr als 300 chromosomalen Loci

interspergiert vorkommen. Zur Überprüfung, wie weit der Anteil an *thummi*-Sequenzen in den Nachkommen der Rückkreuzungen durch Crossingover-Ereignisse vermindert wurde, wurden FISH-Experimente mit Cla-Elementen als Sonde durchgeführt.

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen, dass die Kreuzung der beiden Schwesternarten erfolgreich verlief. Das lässt sich bereits aus den Orcein-Essigsäure-Färbungen aus 14 ableiten, in denen innerhalb der einzelnen Polytänchromosomen große ungepaarte Abschnitte zu erkennen waren. Die in der Abbildung erkennbaren Bandenmuster sind eine Folge der unterschiedlich stark kondensierten DNA, wobei dunkelrote Banden mehr Orcein binden und somit auf Abschnitte hoher Kondensierung zurückzuführen sind. Wenngleich sich die Bandenmuster zweier Homologen eines Polytänchromosoms in diesem Experiment auf den ersten Blick nicht immer unterschieden, ließ sich dennoch deutlich erkennen, dass es große Bereiche gibt, in denen die Homologenpaarung ausbleibt. Dies ist ein deutliches Indiz für ausgeprägte Heterozygotie als Folge einer erfolgreichen Verkreuzung der beiden Schwesternarten.

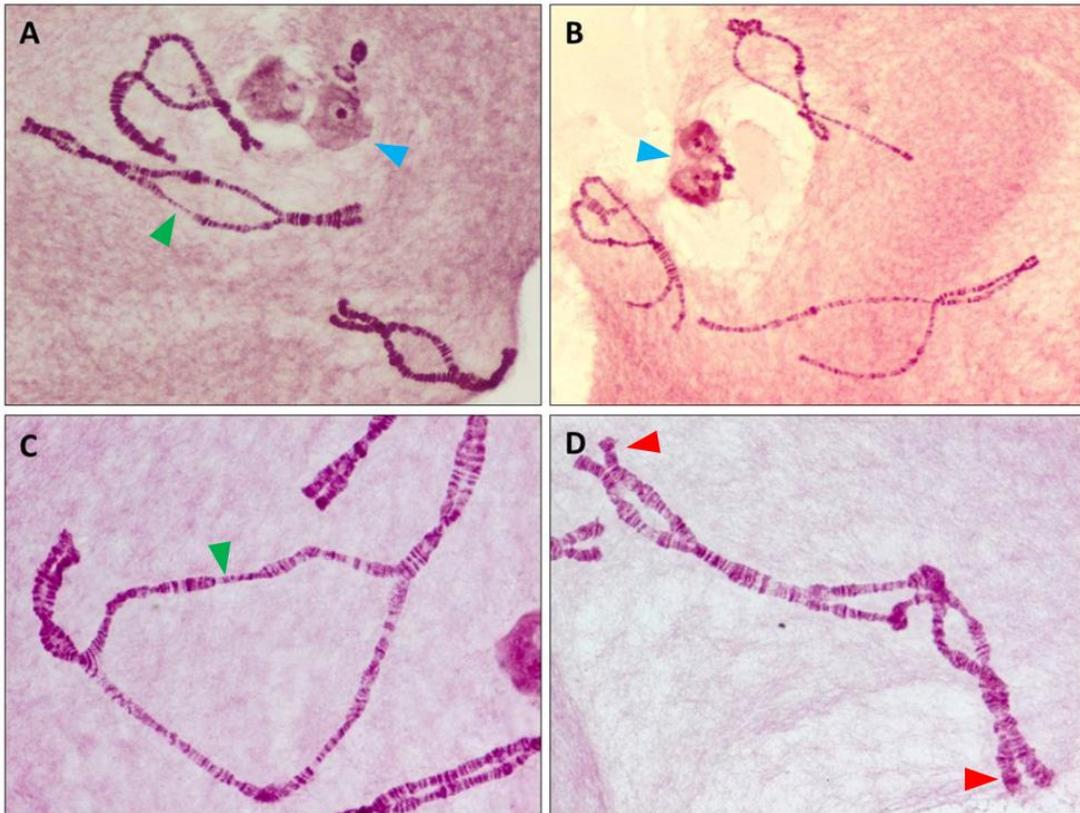


ABBILDUNG 14 | POLYTÄNCHROMOSOMEN DER FI-GENERATION DER HYBRIDEN NACH ORCEIN-ESSIGSÄURE-FÄRBUNG

Deutlich zu erkennen sind in allen Teilbildern Bereiche innerhalb der Polyänchromosomen, in denen keine somatische Homologenpaarung stattfand. In diesen Abschnitten bildeten sich Schlaufen (exemplarisch: **grüne Pfeile**) oder, wenn sie sich an den Chromosomenenden befinden, offene Spalten (exemplarisch: **rote Pfeile**). Eine Zuordnung der Chromosomenabschnitte zu *C. thummi* oder *piger* war nicht beziehungsweise nur schwer möglich. Darüber hinaus waren nach Orcein-Essigsäure-Färbung in **A** und **B** die Nukleoli deutlich sichtbar, also die Bereiche, die hauptsächlich rDNA enthalten und daher einer erhöhten Transkriptionsrate unterliegen (**blaue Pfeile**).

Um jedoch nachzuvollziehen, inwieweit sich das Gleichgewicht zwischen den *thummi*- und *piger*-Anteilen der Hybridgenome zugunsten *piger*-spezifischer Sequenzen verschoben hat, wurden zusätzlich Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen mit Cla-Element-spezifischen Sonden durchgeführt. Die in Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse der FISH gaben Aufschluss über das tatsächliche *thummi/piger*-Verhältnis der Kreuzungshybriden, was mit Hilfe der Orcein-Essigsäure-Färbungen nur eingeschränkt möglich war, da sich die Chromosomen von *C. thummi* und *C. piger* in ihren Bandenmustern nur wenig unterscheiden ließen. Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, zeichnet sich das Genom von *C. thummi* jedoch durch einen hohen Anteil an genomweit interspergierten Cla-

Element-Clustern aus, welche sich leicht über *in situ*-Hybridisierungen nachweisen lassen.

Anders als bei *C. thummi* treten Cla-Element-Cluster bei *C. piger* fast ausschließlich in den Zentromerregionen auf und sind somit in deren Chromosomenarmen nahezu nicht vorhanden. Dieser stark ausgeprägte Unterschied ermöglicht eine gute Chromosomenanalyse der Hybriden. Die *in situ*-Hybridisierungen zeigen, dass auch innerhalb scheinbar gepaarter Abschnitte eindeutige Heterozygotien zwischen den beiden Homologen eines Polytänchromosoms bestehen. Das kennzeichnende Bandenmuster, welches Chromosomenpräparate männlicher *C. thummi* nach Hybridisierung mit Cla-spezifischen Sonden im Bereich ihrer SDR zeigen und zu welchem auch das hemizygote, Männchen-spezifische Cla-Cluster zählt (Kraemer und Schmidt 1993), war bei fast allen Präparaten erkennbar (Abbildung 15-B und -C, blaue Pfeile). Zusätzlich wurde bei einigen FISH eine Doppelhybridisierung mit einem Klon aus der SDR von *C. luridus* durchgeführt, der ebenfalls in der *thummi*-SDR hybridisiert und somit bei der Analyse als Referenzklon diente (Abbildung 15-B, roter Pfeil). Die für die anschließende Sequenzierung eingesetzte DNA wurde aus der Karkasse des Individuums gewonnen, dessen Speicheldrüsenpräparat in Abbildung 15-B zu sehen ist.

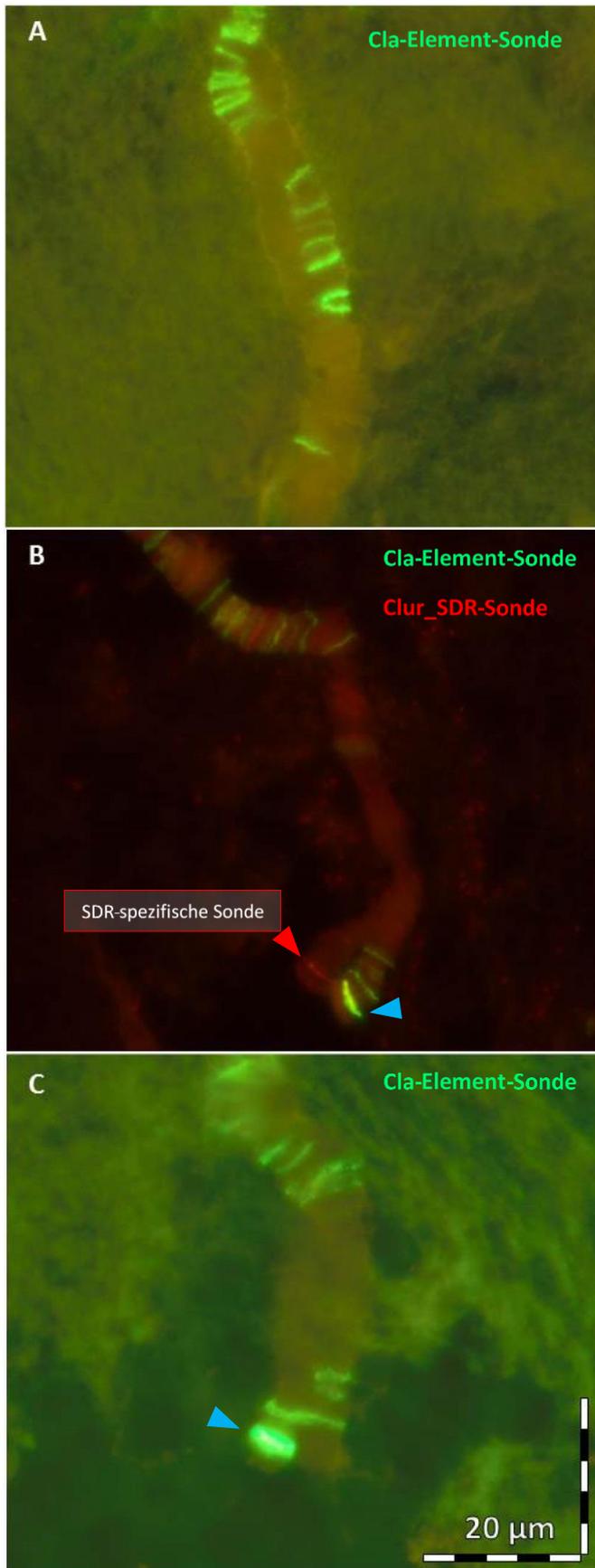


ABBILDUNG 15 | FISH AN POLYTÄNCHROMOSOMEN VON MÄNNLICHEN KREUZUNGSHYBRIDEN

Zu sehen sind die Ergebnisse einer Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung von Cla-Elementen (FITC, grün) an Chromosomen männlicher Kreuzungshybriden der F3-Generation. In Teilbild **B** wurde eine zusätzliche Hybridisierung mit einer Sonde durchgeführt, die zur leichteren Identifizierung der geschlechtsbestimmenden Region einen bekannten Genabschnitt aus der SDR von *C. luridus* enthielt (TRITC, rot). Deutlich zu erkennen sind Bereiche innerhalb der Polytänchromosomen, in denen gepaarte Abschnitte unterschiedliche Hybridisierungsmuster aufwiesen. Das ist einerseits auf „crossing over“-Ereignisse zurückzuführen, die während der Homologenpaarung der Meiose stattfinden; zum anderen bedingt die Rückkreuzung mit *piger*-Weibchen, dass sich heterologe Bereiche innerhalb der Polytänchromosomen der Kreuzungshybriden ausbilden. Die blauen Pfeile zeigen das in der SDR von *thummi*-Männchen enthaltene, hemizygote Cla-Cluster.

4.2.2. Sequenzierung der Hybriden und Analyse der Rohdaten

Im Anschluss an die Aufzucht des Kreuzungsstammes (Kapitel 4.2.1) wurde daraus ein männliches Individuum sequenziert (Abbildung 15-B). Die Sequenzierungen wurden mit dem Gerät HiSeq 2500™ von Illumina durchgeführt. Die Isolierung der DNA wurde selbst durchgeführt, die Bibliothekherstellung wurde vom Sequenzieranbieter GENterprise Genomics™ (Mainz, Deutschland) übernommen. Es wurden dabei zwei Größenfraktionierungen durchgeführt, um „paired end reads“ unterschiedlichen Abstands zu generieren. Zusätzlich wurden bei den beiden Sequenzierungen zwei unterschiedliche „read“-Längen erzeugt. Tabelle 4 zeigt die beiden Sequenzierungen im Vergleich.

Tabelle 4 | Übersicht der Genomsequenzierung des männlichen Kreuzungshybriden

Diese Tabelle zeigt die Unterschiede der beiden Sequenzierungen, die ausgehend von derselben DNA durchgeführt wurden. Getrimmt wurden die „reads“ nach einem Protokoll von Dipl.-Bio-Inf. Benjamin Rieger.

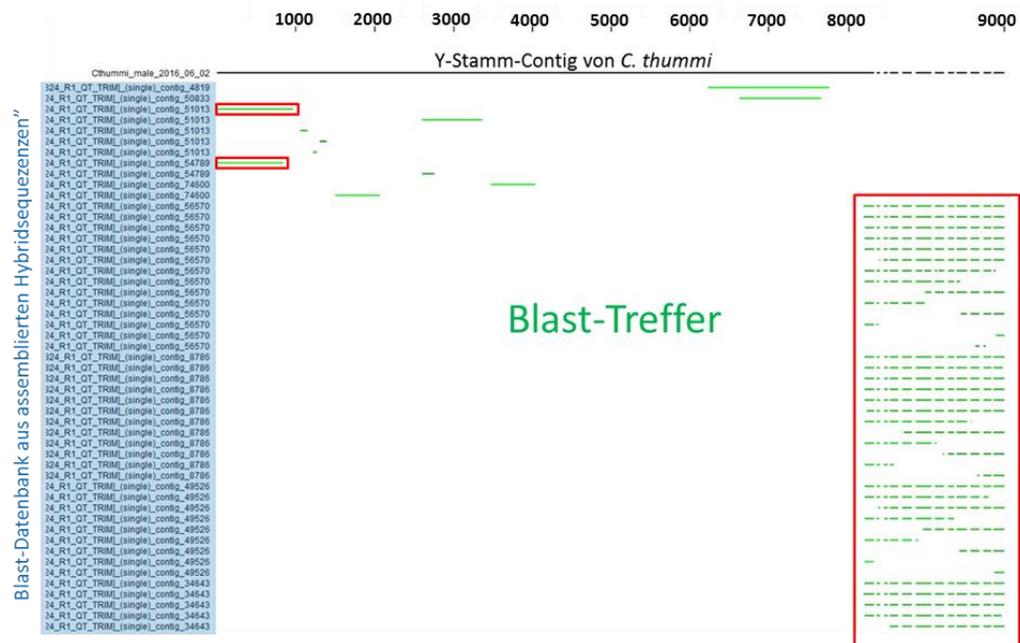
Zeitpunkt der DNA-Isolierung	Art der Sequenzierung	Sequenzen (roh)	Sequenzen (getrimmt)
14. April 2015	150 nt PE	75.790.842	72.516.044
	100 nt PE	70.163.212	63.774.770
		145.954.054	128.423.768

Bei einer Länge von 100 beziehungsweise 150 nt pro „read“ ergeben sich zusammen aus beiden Sequenzierungen insgesamt rund 18,5 Gigabasen an Rohdaten. Nach dem „trimming“ sind es noch 15,6 Gigabasen. Der GC-Gehalt der getrimmten Sequenzierung beträgt 31,1%, was leicht unter den Werten aus der Literatur liegt - *C. thummi*: 34% und *C. piger*: 35% (Schmidt et al. 1980). In einem vergleichbaren Versuch an *C. tentans* wurde ein ähnlicher GC-Gehalt von 31% ermittelt (Kutsenko et al. 2014). Aufbauend auf diesen Datensatz wurden alle bioinformatischen Folgeexperimente durchgeführt.

4.2.3. Assemblierung Y-Chromosomen-spezifischer Sequenzen

Die Assemblierung der kurzen „reads“ zu längeren Contigs sollte mit Y-Chromosomen-spezifischen Sequenzen durchgeführt werden. Weil jedoch eine eindeutige Zuordnung der „reads“ zum Proto-X- oder Proto-Y-Chromosom nicht ohne weiteres möglich ist, mussten sie zunächst gefiltert werden. Bei erfolgreicher Filterung sollte anschließend ein deutliches Übergewicht an Y-Chromosomen-spezifischen Sequenzen übrigbleiben.

Hierzu wurden die „reads“ unter hoher Stringenz („length fraction“ = 0,95; „similarity fraction“ = 0,95) mit einem Proto-X-spezifischen Contig von *C. piger* verglichen. Die SNPs (SNP = „Single Nuclear Polymorphism“) der kartierten „reads“ wurden anschließend mit intraspezifischen SNPs von *C. piger* verglichen. Sequenzen, deren SNPs bei der Kartierung gegen den Proto-X-spezifischen *piger*-Contig auftraten und nicht *piger*-spezifisch waren, wurden herausgefiltert und zusammen mit denjenigen Hybrid-Sequenzen, die unter der gewählten Stringenz nicht kartiert werden konnten, für eine nachfolgende Assemblierung verwendet. Die daraus erhaltenen Contigs wurden anschließend genutzt, um aus ihnen eine BLAST-Datenbank zu erstellen. Gegen diese Datenbank wurde der bestehende Proto-Y-Chromosomen-spezifische Stamm-Contig von *C. thummi* geblastet (BLASTn). Dieser BLAST ergab eine Vielzahl an Treffern, wobei vor allem die Treffer interessant waren, die den Stamm-Contig proximal (Richtung Zentromer) oder distal (Richtung Telomer) verlängern konnten. In Abbildung 16 ist ein solches BLAST-Ergebnis exemplarisch dargestellt.



ABILDUNG 16] EXEMPLARISCHES ERGEBNIS EINES BLASTn GEGEN DIE DATENBANK AUS ASSEMBLIERTEN „READS“ DER HYBRIDSEQUENZIERUNG

Die Abbildung zeigt das Ergebnis eines BLASTn des Proto-Y-Contigs gegen die Datenbank der gefilterten und assemblierten „reads“ aus der Hybridsequenzierung. In **hellblau** sind die geladenen Contigs aufgelistet. In **grün** sind die Hit-Regionen dargestellt. **Rot** umrandet sind diejenigen Treffer, die den Stamm-Contig womöglich in eine Richtung erweitern.

Es wurden auf diese Weise einige Contigs gefunden, die im proximalen Bereich des Stamm-Contigs liegen. Diese Contigs waren zueinander homolog, jedoch unterschiedlich lang. Der größte Contig (contig_3_asm_K31_B150) besaß eine Länge von 3594 bp, von denen 2447 bp mit dem Stamm-Contig überlappten. Proximal wurde der Proto-Y-Contig somit um 1147 bp verlängert (vgl. dazu Abbildung 17).

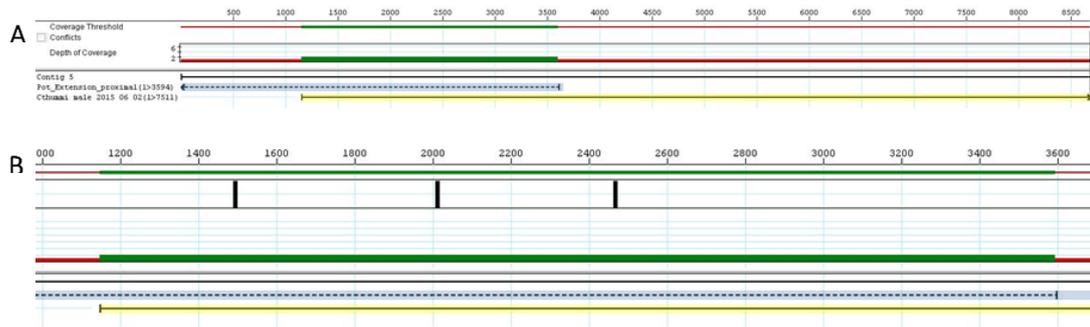


ABBILDUNG 17 | VERGLEICH VON "CONTIG_3_ASM_K31_B150" MIT DEM STAMM-CONTIG "CTHUMMI_MALE_2015_06_02"
A Der Contig „Pot_Extension_proximal“ (hellblau) verlängert den Y-Chromosomen-spezifischen Stamm-Contig (gelb) in proximaler Richtung. **B** Der grüne Bereich stellt den Überlappungsabschnitt dar (2447 bp). Die schwarzen Striche markieren Konflikte, also nicht-homologe Bereiche. Bei den drei vorliegenden Konflikten handelt es sich jeweils um einzelne SNPs.

Dieser Vorgang wurde anschließend wiederholt, wobei die BLAST-Suche nun mit dem verlängerten Stamm-Contig durchgeführt wurde (erneut gegen dasselbe Assembly bestehend aus den gefilterten Hybrid-Sequenzen). Dadurch wurden wieder Contigs gefunden, welche den Stamm-Contig weiter in proximaler Richtung verlängern konnten und zueinander homolog waren. Der längste gefundene Contig („pot-ext-prox_contig_54789“) umfasste 3907 bp und überlappte über 846 bp mit dem neuen Stamm-Contig. In Abbildung 18 ist die entsprechende Assemblierung dargestellt.

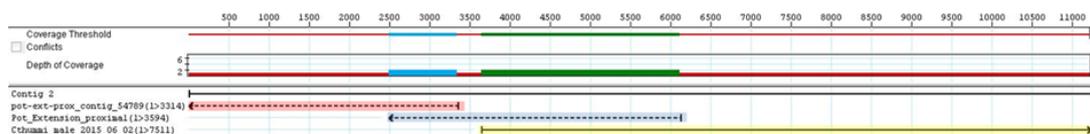


ABBILDUNG 18 | ASSEMBLIERUNG DER GEBLASTETEN CONTIGS MIT DEM STAMM-CONTIG
 Hier ist Verlängerung des Proto-Y-Chromosomen-spezifischen Stamm-Contigs (gelb) in proximaler Richtung durch den Contig „Pot_Extension_proximal“ (hellblau) dargestellt. Zusätzlich wurde der Contig „Pot_Extension_proximal“ durch „pot-ext-prox_contig_54789“ verlängert, ebenfalls in proximaler Richtung. Somit ergab sich eine neue Consensussequenz mit einer Gesamtlänge von 11126 bp. Der grüne Überlappungsbereich enthielt 3 Konflikte (SNPs), der blaue keinen.

Auf diese Weise wurde der Y-Contig in proximaler Richtung um insgesamt 3,6 kb erweitert (auf eine neue Gesamtlänge von 11,1 kb). Eine weitere Wiederholung dieses Prozesses lieferte keine neuen Erkenntnisse, weil zusätzliche BLASTs nur

noch Contigs hervorbrachten, die komplett innerhalb des Stamm-Contigs lagen und somit keine neuen Sequenzinformationen enthielten.

Abbildung 16 ist außerdem zu entnehmen, dass durch die BLAST-Suche auch in Telomerrichtung neue Contigs gefunden werden konnten. Diese Sequenzen konnten den Stamm-Contig allerdings nicht sinnvoll verlängern, weil das distale Ende des Stamm-Contigs in den Randbereich des hemizygoten Cla-Element-Clusters reicht. In Abbildung 19 ist ein entsprechender DotPlot eines Cla-Elements gegen den Stamm-Contig zu sehen. Der Plot zeigt, dass die letzten ca. 500 bp des vorliegenden Proto-Y-Stamm-Contigs repetitive Elemente aufweisen.

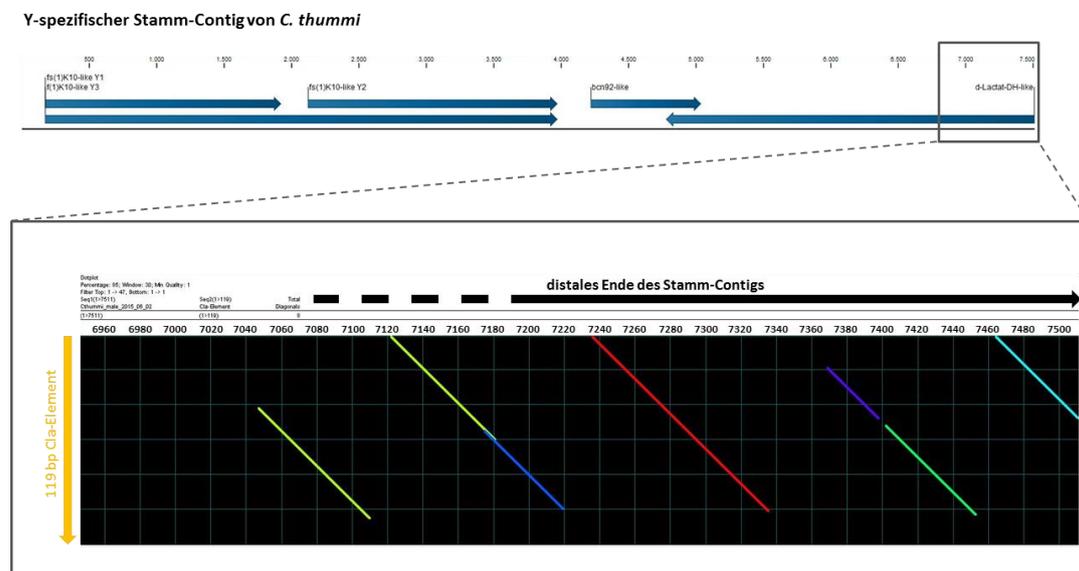


ABBILDUNG 19 | DOTPLOT EINES CLA-ELEMENTS GEGEN DEN STAMM-CONTIG "Cthummi_MALE_2015_06_02"

Es wurde die Sequenz eines Cla-Elements (gelb) gegen den Stamm-Contig (schwarz) geplottet. Zur besseren Übersicht ist nur das distale Ende des Plots gezeigt. Die diagonalen Linien deuten auf repetitive Sequenzabschnitte hin. Die verschiedenen Farben spiegeln die unterschiedlichen Grade der Übereinstimmung wider, wobei als Schwellenwert mindestens 85% Sequenzübereinstimmung gewählt wurden.

Eine alternative Methode zur Überspannung des Clusters sah vor, sich dem Cluster von seiner distalen Seite zu nähern. Weil von diesem Bereich noch keine Proto-Y-Chromosomen-spezifischen Sequenzen bekannt waren, wurden die „reads“, die nach dem eingangs beschriebenen Prinzip gefiltert wurden, gegen einen Bereich des Proto-X-spezifischen Contig von *C. thummi* kartiert, dessen homologe Sequenz auf dem Proto-Y-Chromosom Richtung Telomer („rechts“) vom Cla-Element-

Cluster vermutet wurde. Im Anschluss daran wurden die „Partner“ derjenigen „reads“ gesucht, die mit dem proximalen Rand der verwendeten Proto-X-Referenz übereinstimmten. Aus den gefundenen Partnerreads wurden Contigs assembliert. Eine BLAST-Suche nach Contigs, die Cla-Elemente enthielten, brachte jedoch keine Treffer hervor. Somit konnte keiner der auf diese Weise assemblierten Contigs dem distalen Ende des Cla-Elements zugeordnet werden.

4.2.4. Sequenzinformationen der proximalen Verlängerung

Ein „BLASTx“-Vergleich des neu verlängerten Proto-Y-Contigs gegen die „non-redundant protein sequences“-Datenbank von NCBI ergab als besten Treffer „*Dufourea novaeangliae* WD repeat-containing protein 74“. Abbildung 20 zeigt das entsprechende „BLAST“-Ergebnis.

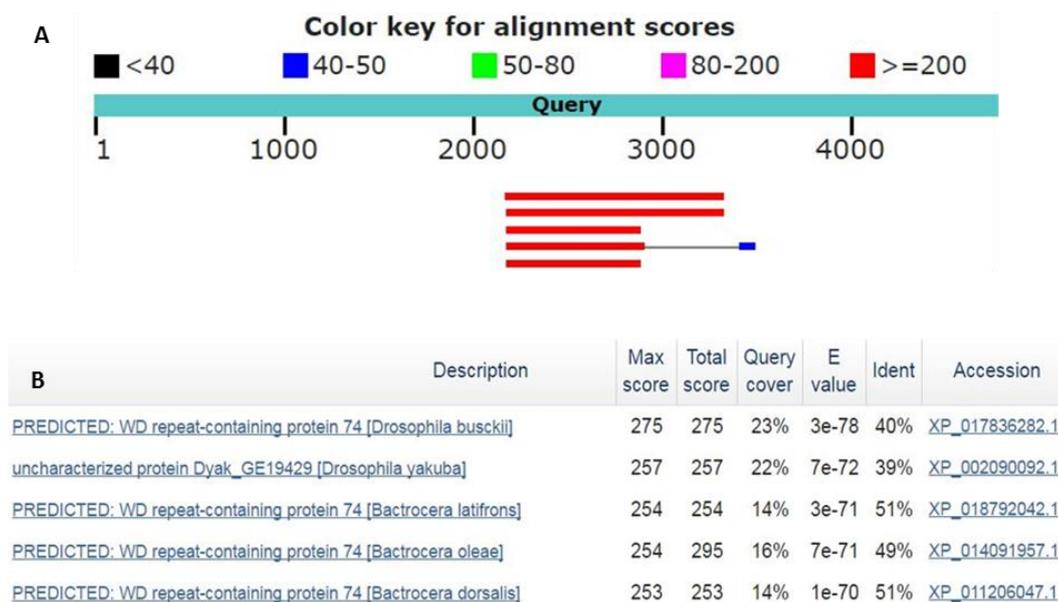


ABBILDUNG 20 | BLASTX DES VERLÄNGERTEN PROTO-Y-CONTIGS

A Verteilung der besten 168 blast-Treffer. Dargestellt sind die besten 5 (rot). In türkisfarben ist der proximale Randbereich des „Y-Contig_neu“ abgebildet. Teilbild **B** listet die korrespondierenden Bezeichnungen dieser 5 Treffer auf, zusammen mit ihren entsprechenden Qualitätswerten.

Daraufhin wurden innerhalb der verlängernden Sequenz über ein „Large Gap Read Mapping“ mit larvalen RNA-Daten von *C. thummi* Intron-Exon-Strukturen gesucht. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der zugehörigen Kartierung. Man erkennt einige „split reads“, also RNA-Sequenzen, die bei der Kartierung gegen eine genomische Referenz getrennt wurden. Solche Kartierungs-Ergebnisse deuten auf Spleißstellen hin. Es zeigten sich jedoch keine Bereiche, die lediglich von „split reads“ überspannt wurden. Um eine möglichst genaue Aussage über die Transkripte des Bereichs zu treffen, wurden daraufhin „Large Gap Read Mappings“ mit strangspezifischen RNA-Sequenzen durchgeführt – dadurch konnten Transkripte des sense- und antisense-Stranges voneinander unterschieden werden.

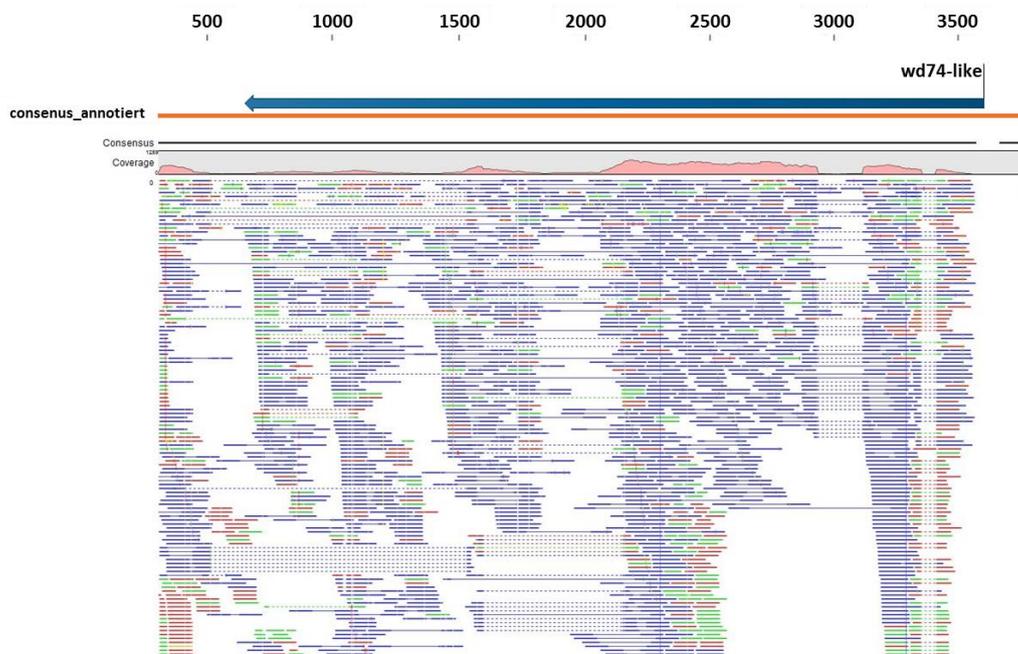


ABBILDUNG 21 | „LARGE GAP READ MAPPING“ DER MÖGLICHEN VERLÄNGERUNG DES PROTO-Y-CONTIGS

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer Kartierung der *piger*_♀-herausgefilterten Hybrid-RNA gegen den potentiellen verlängerten Contig (**organe**). Dargestellt sind die ersten 3,6 kb. Man erkennt Bereiche, die von „split reads“ überspannt wurden (gestrichelt). Diese Bereiche können auf mögliche Spleißstellen hinweisen. (Es wurde mit einer Stringenz von „length fraction“ = 0,99 und „similarity fraction“ = 0,99 gemappt)

Das Ergebnis der strangspezifischen Kartierungen zeigt Abbildung 22. Zur besseren Übersicht sind nur die „split reads“ dargestellt. Die „split reads“ aus Abbildung 22 ließen sich so den beiden einzelnen Strängen zuordnen. Es zeigte sich, dass es sich

jeweils um mögliche „splice sites“ des sense- sowie des antisense-Stranges handelte. Somit ließ sich der strangspezifischen Kartierung entnehmen, dass auf dem Gegenstrang zu *WD74-like* weitere Transkripte zu existieren schienen. Ein BLASTx dieses speziellen Bereichs ergab neben Treffern zu dem Protein „WD repeat-containing protein 74“, dass es sich vermutlich um das 3'-Ende des Gens *luc7(p)-like* handelt, welches auf dem Proto-X-Chromosom von *C. thummi* an ähnlicher Stelle lokalisiert ist.

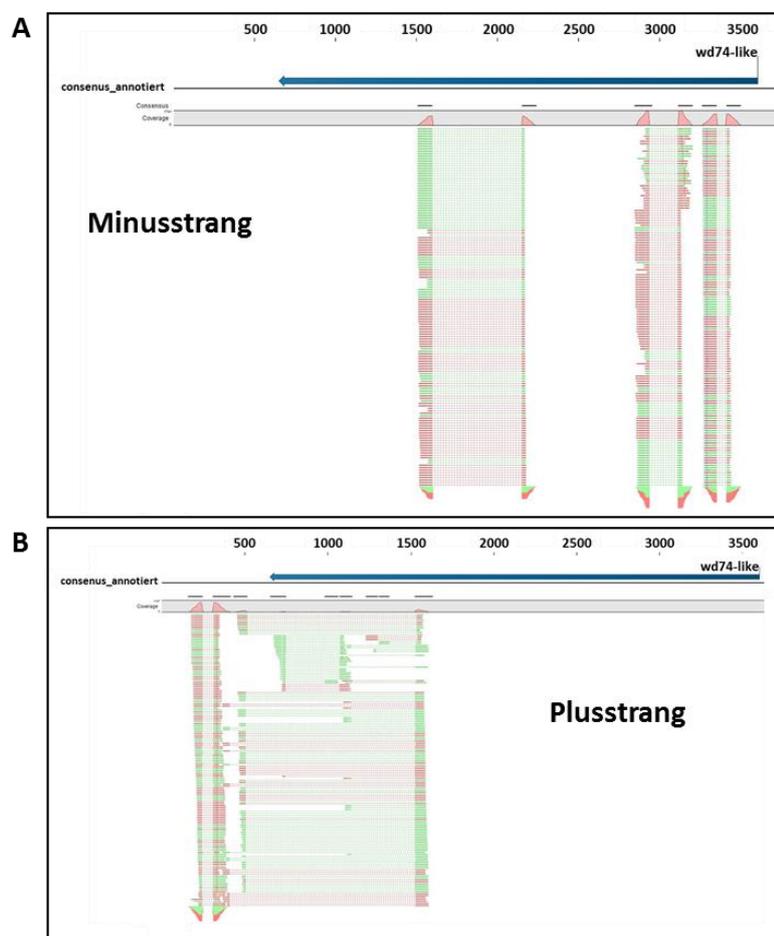


ABBILDUNG 22 | „LARGE GAP READ MAPPINGS“ DER MÖGLICHEN VERLÄNGERUNG MIT STRANGSPEZIFISCHEN RNA-SEQUENZEN
A zeigt die Kartierung der RNA-“reads“ des Minusstranges. Man kann aus den entstandenen „split reads“ drei Intronbereiche des Gens *WD74-like* ableiten. In **B** ist die analoge Kartierung der RNA-“reads“ des Plusstranges zu sehen. Hier wird die Existenz weiterer Transkripte auf dem Gegenstrang zu *WD74-like* erkennbar.

Entsprechend dem Ergebnis des BLASTs und der Kartierungen konnten das Gen *WD74-like* und das 3'-Ende des Gens *luc7(p)like* annotiert werden. Die neu

annotierte Version des möglichen Proto-Y-Chromosomen-spezifischen Contigs ist in Abbildung 23 zu sehen. Zum Vergleich ist der alte Proto-Y-Contig gezeigt. Das Gen WD74-like hatte entsprechend auf dem neuen Contig eine Länge von 2956 bp. Es wies vier Exons auf und der vorhergesagte ORF war 1125 bp lang.

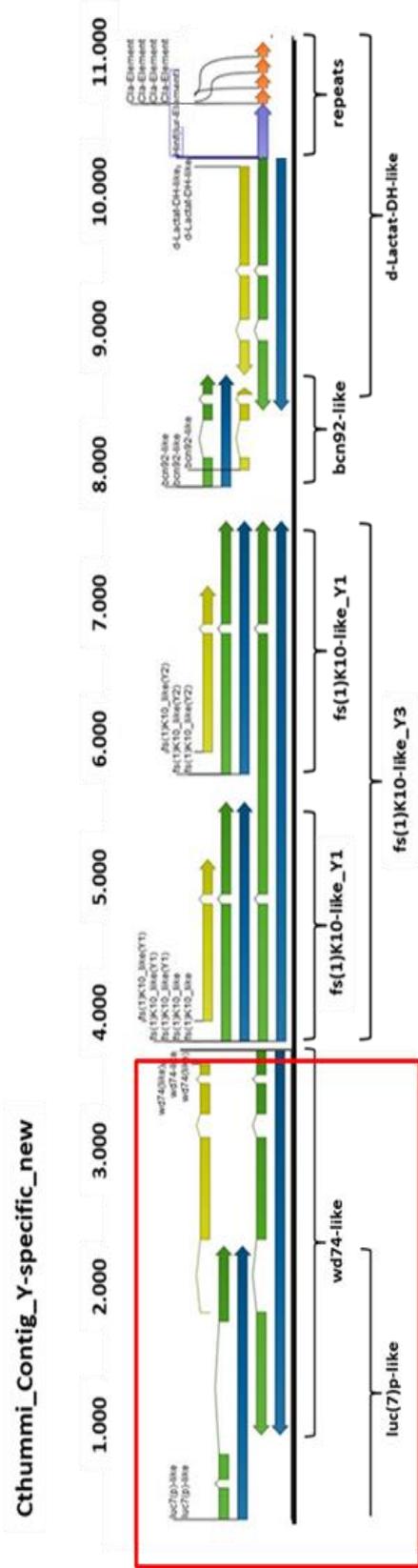
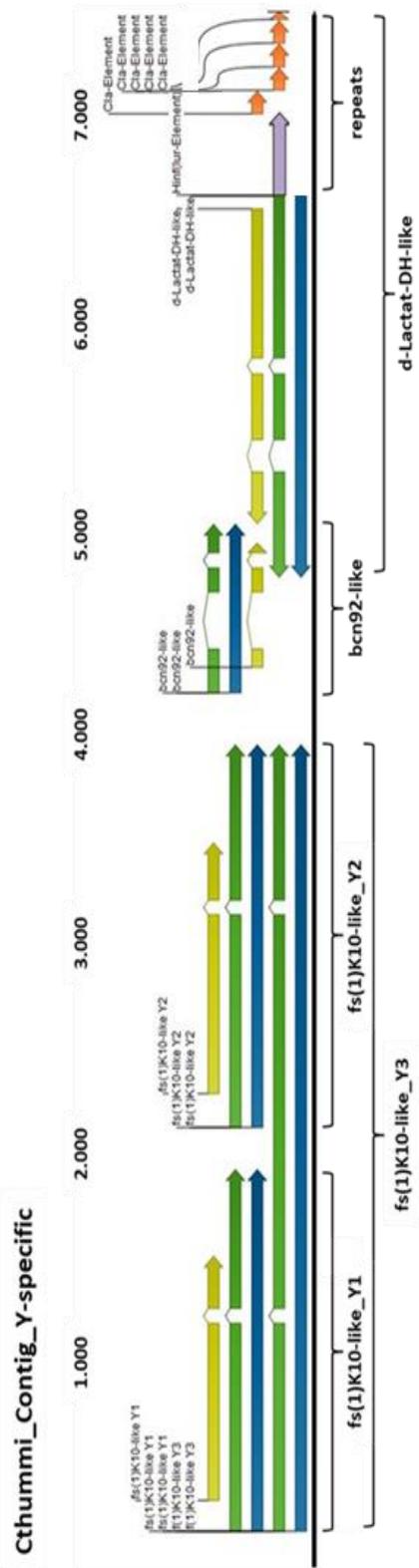


ABBILDUNG 23 | ÜBERSICHT ÜBER DEN ERWEITERTEN Y-CHROMOSOMEN-SPEZIFISCHEN CONTIG VON C. THUMMI
 Die Abbildung zeigt die Erweiterung des Y-Contigs von C. thummi („Cthummi_Contig_Y-specific_new“). Im Vergleich dazu ist der korrespondierende Ausgangs-Contig dargestellt („Cthummi_Contig_Y-specific“). **Rot** umrandet ist der Abschnitt, um den der Ausgangs-Contig verlängert werden konnte. Die **blauen** Pfeile zeigen die Genannotations, in **grün** sind potentielle mRNA-Varianten abgebildet. Die **gelben** Pfeile stellen den ORF dar.

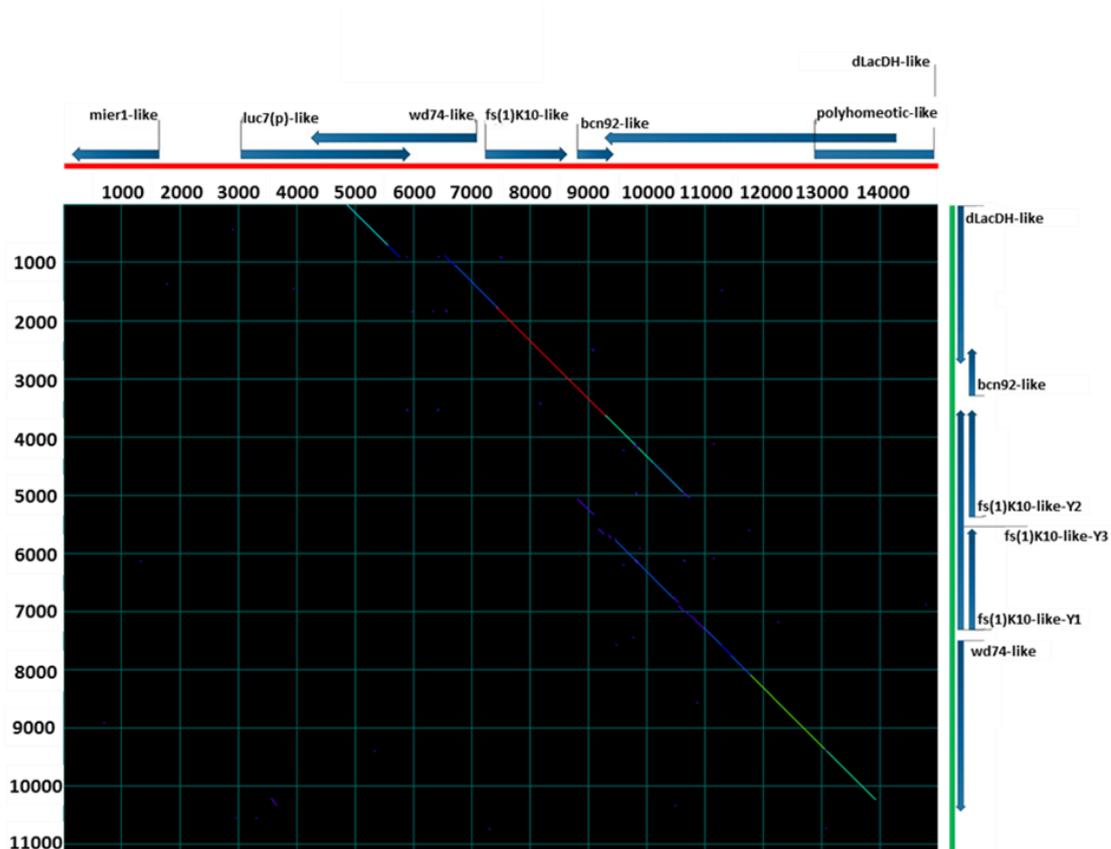


ABBILDUNG 24 | DOTPLOT DES VERLÄNGERTEN PROTO-Y-CONTIGS GEGEN DEN PROTO-X-CONTIG VON *C. THUMMI*

Der Plot zeigt den möglichen neuen Proto-Y-Contig auf der Y-Achse (grüne Sequenz) und den Proto-X-Contig entsprechend auf der X-Achse (rot). Etwa ab Basenposition 14 000 des Proto-X-Contigs stimmen die Sequenzen von X und Y nicht mehr überein. Parameter: „window size“ = 30; „percent match“ = 75

Auf dem Gegenstrang liegt das 3'-Ende des Gens *luc7(p)-like*. Es konnten lediglich die letzten drei Exons dieses Gens anhand der Kartierungs-Ergebnisse annotiert werden. Der vordere Teil des Gens mit seinen (auf dem X-Chromosom) bis zu vier weiteren Exons liegt in einem Bereich, dessen Sequenz auf dem verlängerten Proto-Y-Contig nicht mehr enthalten war.

4.3. RNA-Interferenz an *Chironomus thummi*

Ziel dieser Versuchsreihe ist es, Kandidatengene für den Faktor M aus der SDR in ihrer Expression herunter zu regulieren und durch die entstehenden Phänotypen Aufschlüsse über deren Funktion in der Geschlechtsbestimmung zu erhalten. Um das prinzipielle Funktionieren der Experimente zu testen und zur Etablierung geeigneter Positivkontrollen, wurde das Versuchssystem zunächst mit Genen

bekanntem Phänotyp getestet. Nach einer Reihe von Experimenten mit möglichen Positivkontrollen, die sich letztlich als erfolglos oder ungeeignet herausstellten, konnte auf die Gene *orthodenticle/ocelliless* (*oc*) und *hunchback* (*hb*) zurückgegriffen werden, die in einer 2015 erschienenen Publikation verwendet worden sind und nach „knock down“ mittels RNAi zu leicht erkennbaren Phänotypen führen (Klomp et al. 2015).

4.3.1. RNAi-Workflow

Im folgenden Abschnitt wird die in dieser Arbeit verwendete Form der Erstellung doppelsträngiger RNA (dsRNA) beschrieben. Bei Experimenten mit RNA-Interferenz wird häufig auf die Verwendung von kurzen siRNAs gesetzt (19 bis 25 nt), um Gene herunter zu regulieren. Weil deren Wirksamkeit aber stark von den „target sites“ innerhalb des Zielgens abhängt, werden üblicherweise gleich mehrere siRNAs eingesetzt und viele „target sites“ getestet. Aus Zeit- und Kostengründen wurde in dieser Arbeit in Anlehnung an die Publikation von Klomp et al. (2015) auf die Verwendung kurzer siRNAs verzichtet. Stattdessen wurde die *in vitro*-Transkription kompletter ORFs gewählt (Klomp et al. 2015). Diese langen, doppelsträngigen RNAs (dsRNAs) lassen sich in der Theorie mit Hilfe der angewendeten Methode ohne den Aufwand vorheriger Test-Screenings zu nahezu allen gewünschten Genen herstellen. Abbildung 25 zeigt schematisch den Arbeitsablauf, der für die Herstellung der dsRNAs etabliert wurde.

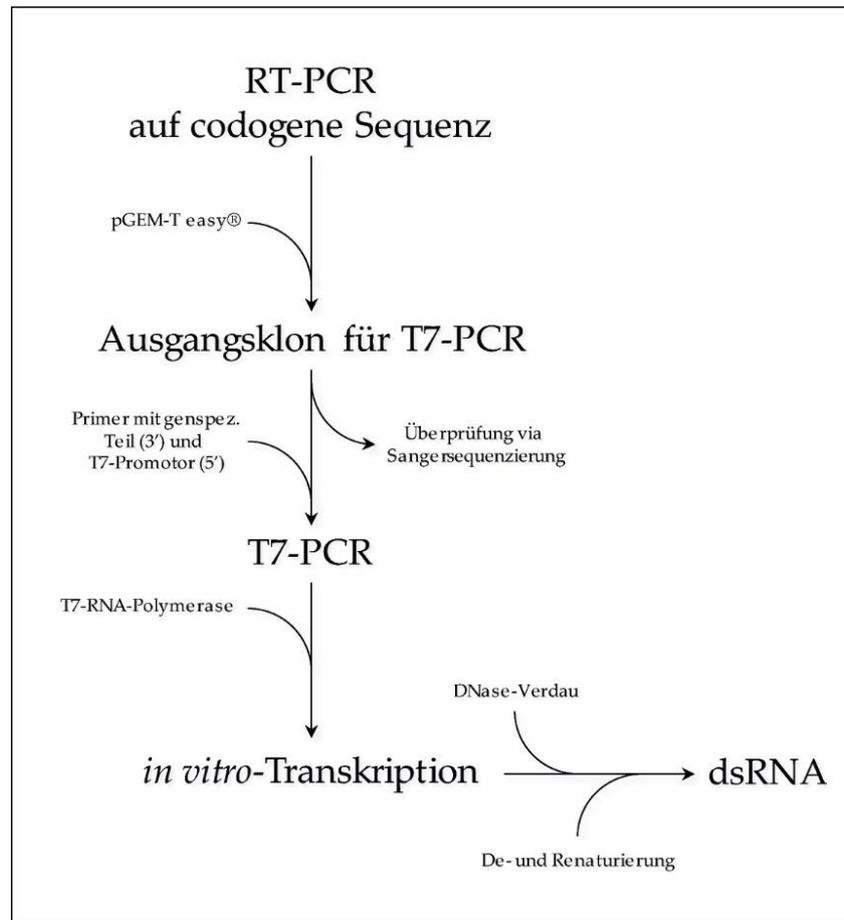


ABBILDUNG 25 | WORKFLOW DER ERSTELLUNG DOPPELSTRÄNGIGER RNA.

Zunächst wird eine PCR auf cDNA des untersuchten Gens durchgeführt. Das Produkt wird in das Plasmid *pGEM-T easy*[®] kloniert und der Klon per Sangersequenzierung überprüft. Anschließend findet eine T7-PCR mit dem Klon als Matrize statt. Hierbei werden genspezifische Primer eingesetzt, die zusätzlich in ihrem 5'-Bereich die T7-Promotorsequenz enthalten. Die entstehenden Produkte sind somit von T7-Promotoren flankiert, wodurch bei der darauffolgenden *in vitro*-Transkription beide Stränge in RNA umgeschrieben werden. Ein DNase-Verdau entfernt Matrizenreste. Als letztes wird die RNA auf 70° C erhitzt und graduell abgekühlt. Durch die langsame Renaturierung hybridisieren die komplementären RNA-Einzelstränge zu dsRNAs.

4.3.2. Die Positivkontrollen *hunchback* und *orthodenticle/ocelliless*

Bei *Drosophila* ist *hunchback* (*hb*) als Maternaleffektgen beschrieben, also als ein Gen, das bereits im mütterlichen Organismus aktiv ist und sein Genprodukt (mRNA) der sich entwickelnden Eizelle mitgegeben wird. Dabei besitzt *hunchback* eine Doppelrolle, da es neben der maternalen Expression auch eine Expression in der späteren Embryonalentwicklung erfährt. Die Herunterregulation dieses Gens sollte

zu einem homöotischen Phänotypen führen, bei dem im Larvalstadium die vorderen Parapodien verdoppelt vorliegen (Bellés 2010; Klomp et al. 2015).

Das Segmentpolaritätsgen *orthodenticle/ocelliless* (*oc*) ist essentiell für die Ausbildung des Antennensegments, welches wiederum sowohl die Entwicklung der Augen als auch der Antennen determiniert (Rosenberg et al. 2009). RNA-Interferenz an diesem Gen führt zu einem gespaltenen Mentum (Klomp et al. 2015).

In **ABBILDUNG 26** sind exemplarisch zwei Aufnahmen zu den Ergebnissen der beiden Positivkontrollen zu sehen. Sie entsprechen den Ergebnissen, die Klomp et al. mit ihren RNAi-Versuchen erzielen konnten; so lassen sich sowohl das gespaltene Mentum des RNAi(*oc*)-Phänotyps, als auch die ektopischen Parapodien des RNAi(*hb*)-Phänotyps erkennen.

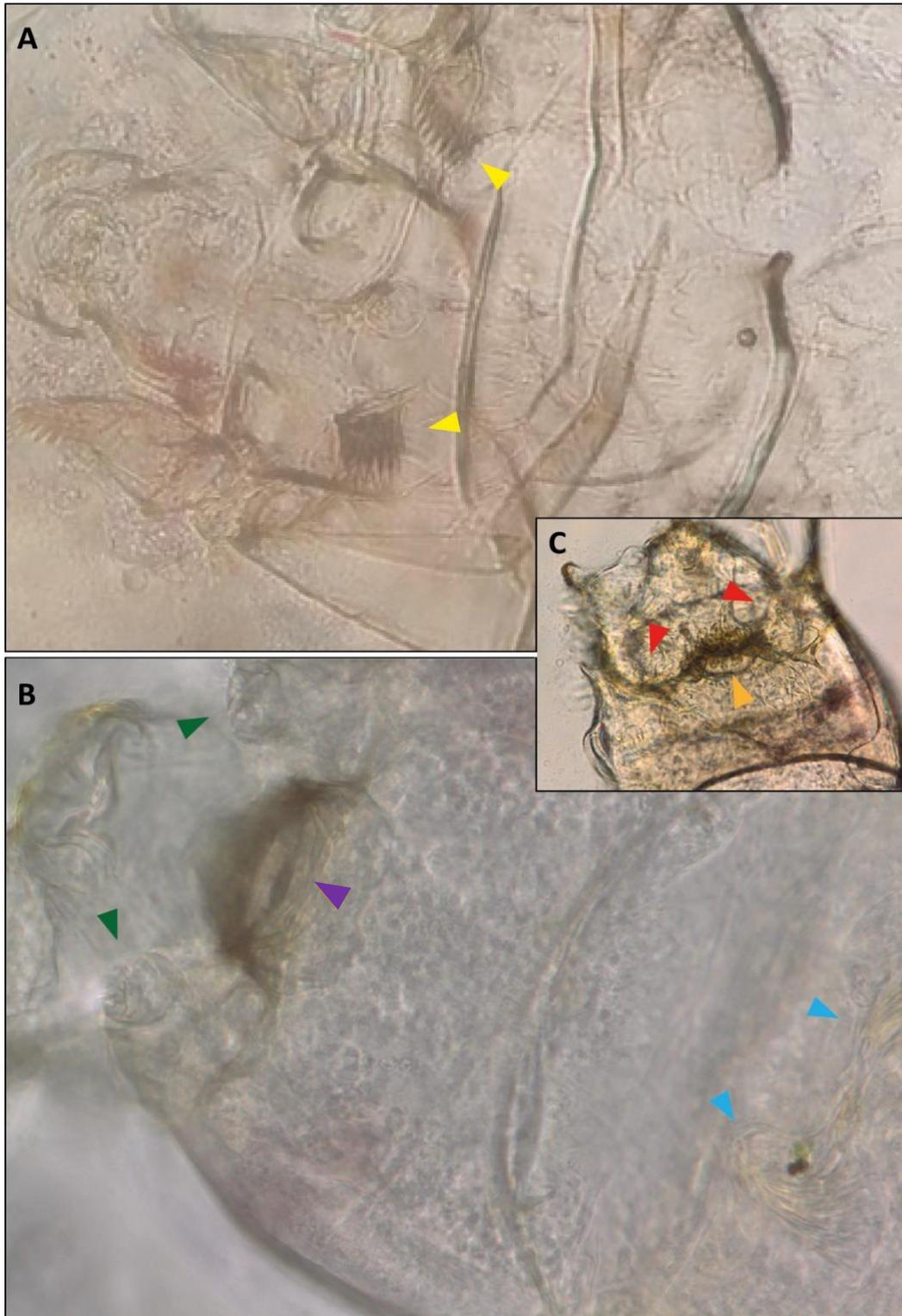


ABBILDUNG 26 | *CTH(hc)*- UND *CTH(oc)*-PHÄNOTYPEN NACH RNAi.

A RNAi gegen das Gen *orthodenticle/ocelliless* resultiert in einem gespaltenen Mentum (**gelb**). Die ungespaltene Menta der Kontrolle sowie des RNAi(*hc*)-Phänotypen sind durch **lilane** Pfeile markiert. **B** Eine Herunterregulation der Expression von *hunchback* hat die ektopische Ausbildung eines weiteren Parapodienpaares zur Folge (**grün**). Die echten Parapodien sind durch **blaue** Pfeile gekennzeichnet. Die **roten** Pfeile zeigen, dass bei der Negativkontrolle (**C**) keine ektopischen Parapodien zu sehen sind.

Pro Kontrollgen wurden zur Bestimmung der Effektivität der RNA-Interferenz insgesamt je drei Injektionsrunden durchgeführt. In beiden Fällen wurden bei ca. 70% der Larven veränderte Phänotypen beobachtet ($hb = 66,4\%$; $oc = 74,6\%$), wobei die Werte das jeweilige Verhältnis der beobachteten RNAi-Phänotypen zur Anzahl der *geschlüpften* Tiere ausdrücken, nicht der Gesamtzahl aller injizierten Embryonen. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Testreihen im Überblick.

Tabelle 5 | Injektionen zur Überprüfung der Positivkontrollen *hunchback* und *orthodenticle/ocelliless*

Diese Tabelle fasst die Ergebnisse der sechs Injektionsdurchgänge zusammen, in denen *hb*- bzw. *oc*-dsRNA in 2-6 h alte Embryonen injiziert wurde. Ermittelt wird das Verhältnis der Larven mit verändertem Phänotypen zur Anzahl der geschlüpften Larven.

<i>hunchback</i>				
Injektionsrunde	Injiziert	Geschlüpft	RNAi-Phänotypen	%
1	42	32	23	71,9
2	59	48	28	58,3
3	67	50	37	74,0
	168	130	88	66,4

<i>orthodenticle/ocelliless</i>				
Injektionsrunde	Injiziert	Geschlüpft	RNAi-Phänotypen	%
1	52	39	31	79,5
2	72	60	41	68,3
3	64	54	41	75,9
	188	153	113	74,6

4.3.3. RNA-Interferenz in der SDR von *Chironomus thummi*

Für die Injektionen der dsRNAs der Kandidatengene wurden als Positivkontrollen im Wechsel entweder *hb*- oder *oc*-dsRNAs verwendet; außerdem wurden Versuchsreihen ohne Kontrollen angefertigt, um Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen doppelsträngigen RNAs auszuschließen. Die Injektionen der Kandidatengene *fs(1)K10-like* und *luc7p-like* führten zu keinem Zeitpunkt zu erkennbaren Veränderungen.

Hierbei wurde insbesondere auf mögliche Veränderungen der Genitalimaginalscheiben sowie auf eine Verschiebung der Verteilungen der

Geschlechter geachtet, da die Kandidatengene aufgrund ihrer Lage in der SDR auf ihre möglichen Rollen in der Geschlechtsbestimmung untersucht werden sollten. Eine Auswahl an mikroskopischen Aufnahmen der männlichen Genitalimaginalscheiben nach Injektion der dsRNA für die Y1-Variante des Gens *fs(1)K10-like* ist in Abbildung 27 zu sehen (vgl. 1.2.1.4 zu den verschiedenen Varianten von *fs(1)K10-like*). Im Falle eines Einflusses von *fs(1)K10-like* auf die Geschlechtsentwicklung bei *C. thummi* wären unter Umständen strukturelle Veränderungen der Genitalimaginalscheiben zu erwarten. Vergleicht man jedoch die Bilder A-C der Abbildung 27 mit der Negativkontrolle (D), so lassen sich in allen Aufnahmen sehr ähnlichen Strukturen erkennen. Abbildung 27-A bis -C unterscheiden sich dabei durch die Positivkontrollen, die bei den jeweiligen Injektionen verwendet wurden: Teilbild A zeigt die Imaginalscheibe eines Individuums, dem als Positivkontrolle *ocelliless*_dsRNA injiziert wurde; bei der Injektionsrunde zu Teilbild B diente *hunchback*_dsRNA als Kontrolle; in Teilbild C ist lediglich *fs(1)K10-like*_dsRNA injiziert worden, ohne Positivkontrolle. Es konnten zu keinem Zeitpunkt auffällige Veränderungen der Imaginalscheiben nach dsRNA-Injektion beobachtet werden. In den drei Teilbildern A-C zeigen sowohl der *Ductus ejaculatoris* (gelbe Pfeile) als auch der *Dististylus* (blaue Pfeile) eine normale Entwicklungsform und unterscheiden sich somit nicht von den Imaginalscheiben der Negativkontrollen (vgl. Teilbild D).

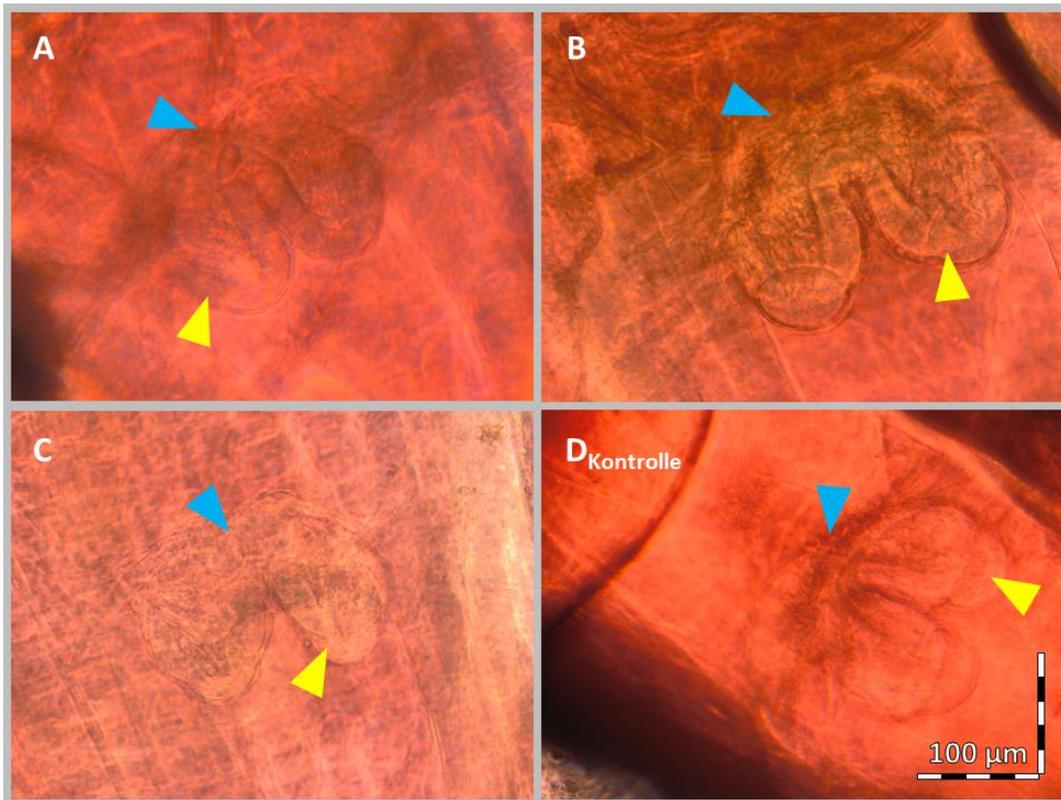


ABBILDUNG 27 | CTH-PHÄNOTYPEN MÄNNLICHER IMAGINALSCHEIBEN NACH RNAi GEGEN *fs(1)K10-LIKE*

Abgebildet sind die Imaginalscheiben männlicher Individuen von *C. thummi* nach Injektion doppelsträngiger RNA der Y1-Variante des Gens *fs(1)K10-like*, bzw. in Teilbild **D** nach Injektion des Injektionspuffers ohne dsRNA. Es lassen sich keine Abweichungen von der normalen, phänotypischen Entwicklung beobachten. Sowohl *Ductus ejaculatoris* (gelbe Pfeile), als auch *Dististylus* (blau) sind voll ausgeprägt und entsprechen der wildtypischen Form. Teilbild **A** stammt aus einer Injektionsrunde, bei der dsRNA_oc als Positivkontrolle eingesetzt wurde, die Injektionen zu Teilbild **B** wurden mit dsRNA_hb als Kontrolle durchgeführt und bei den Injektionen zu Teilbild **C** wurde auf eine Positivkontrolle verzichtet.

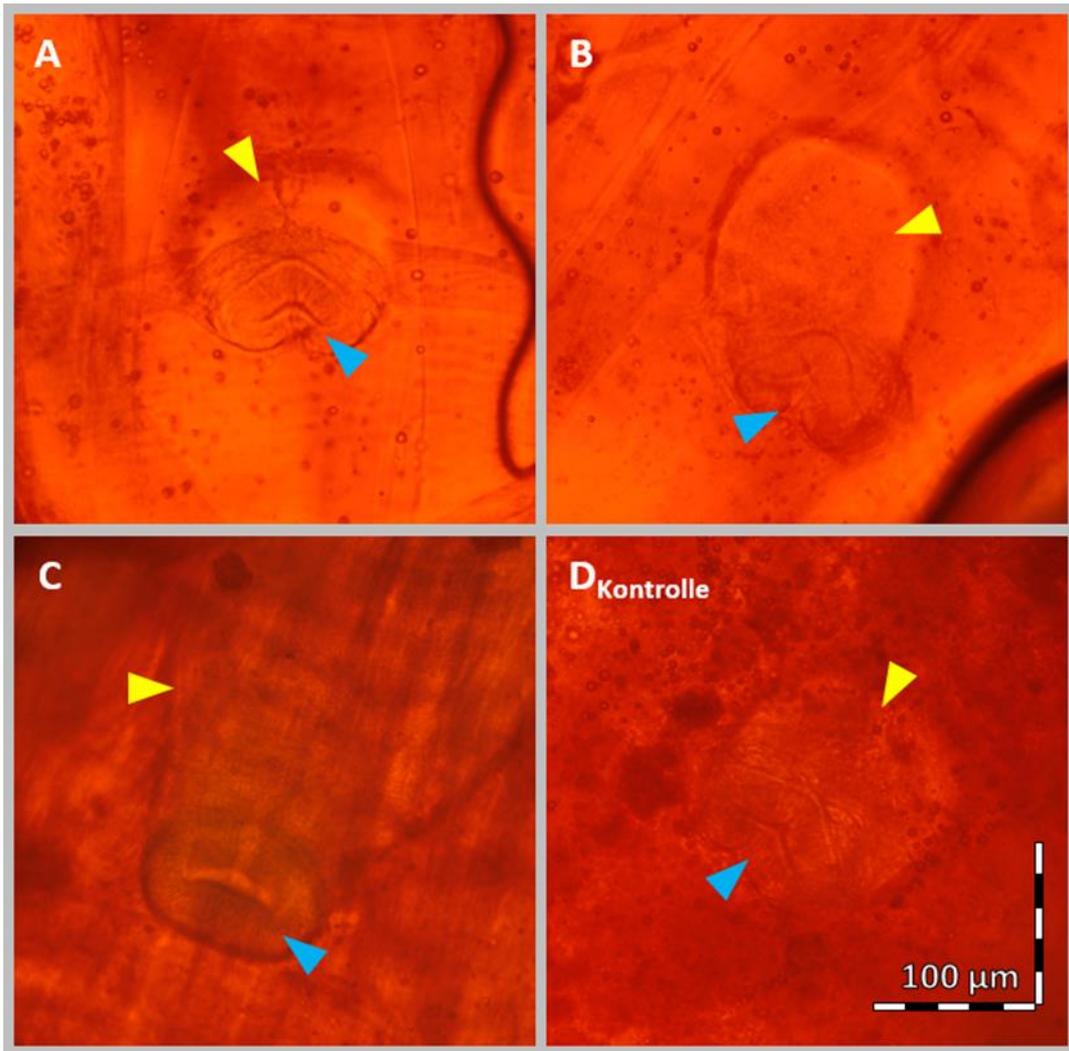


ABBILDUNG 28 | CTH-PHÄNOTYPEN WEIBLICHER IMAGINALSCHEIBEN NACH RNAi GEGEN FS(1)K10-LIKE

Es sind die Genitalimaginalscheiben weiblicher Larven von *C. thummi* nach Injektion doppelsträngiger RNA des Gens *fs(1)K10-like*, während des Embryonalstadiums zu sehen. Die Embryonen der Versuchsreihe zu Teilbild **D** wurden zur Kontrolle nicht injiziert. Es können keine Abweichungen von der normalen, phänotypischen Entwicklung der Imaginalscheiben beobachtet werden. Sowohl Schleimdrüse (gelbe Pfeile), als auch Schleimdrüsenmündung (blau) sind normal ausgeprägt und entsprechen ihrer wildtypischen Form (**D**). Teilbild **A** stammt aus einer Injektionsrunde, bei der dsRNA_{oc} als Positivkontrolle eingesetzt wurde, die Injektionen zu Teilbild **B** wurden mit dsRNA_{hb} als Kontrolle durchgeführt und bei den Injektionen zu Teilbild **C** wurde auf eine Positivkontrolle verzichtet.

Abbildung 28 zeigt mikroskopische Aufnahmen der weiblichen Genitalimaginalscheiben aus dem neunten Abdominalsegment. In diesem Segment bilden sich im Laufe der larvalen Entwicklung (L3- bis L4-Stadium) die Schleimdrüse und Schleimdrüsenmündung aus. Analog zu Abbildung 27 sind in den Bildern A-C Aufnahmen nach Injektionen von dsRNA für die Y1-Variante des

Gens *fs(1)K10-like* dargestellt, jeweils mit unterschiedlichen Positivkontrollen. Teilbild D zeigt eine Negativkontrolle ohne Injektion.

Die Injektion doppelsträngiger RNA gegen das Gen *fs(1)K10-like* führte – wie bereits bei den männlichen Geschlechtsorganen – auch bei den Genitalimaginalscheiben weiblicher Larven zu keinem Zeitpunkt zu einer sichtbaren Entwicklungsstörung. Die in und Abbildung 28 dargestellten Aufnahmen belegen das exemplarisch. Die bei dieser Versuchsreihe untersuchten weiblichen Imaginalscheiben wiesen stets die in der Abbildung erkennbare Form der Schleimdrüse und Schleimdrüsenöffnung auf und wichen somit nicht von der wildtypischen Entwicklungsform ab (Abbildung 28-D).

4.3.4. Geschlechterverteilung nach RNAi

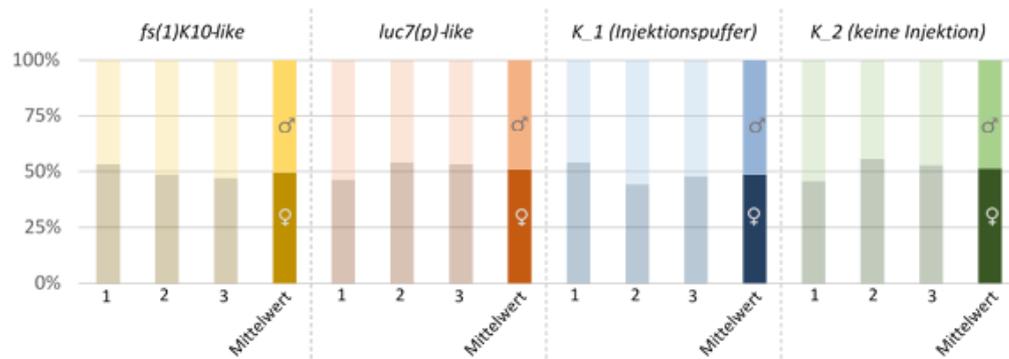
Kandidatengene für den Faktor M sollten Einfluss auf die Ausprägung des Geschlechts haben. Die Auszählung der Geschlechterverhältnisse nach Injektionen zeigten jedoch, dass die Injektion doppelsträngiger RNAs zu den Kandidatengenen *fs(1)K10-like* (Y1-Variante) und *luc7p-like* keine Auswirkung auf die Verteilung der Geschlechter haben. Das bei unbehandelten Gruppen beobachtete Geschlechterverhältnis von 1:1 zeigt sich auch nach den Injektionen der dsRNAs zu den untersuchten Genen (Tabelle 6).

Abbildung 29 stellt die Daten aus Tabelle 6 noch einmal in Diagrammform dar. So lässt sich leicht erkennen, dass das Verhältnis von Männchen zu Weibchen im Zuge der Experimente stets nahe 1:1 liegt, unabhängig davon, ob dsRNA *fs(1)K10-like* (gelbe Balken), dsRNA *luc7p-like* (braun) oder Injektionspuffer ohne dsRNA (blau) injiziert wurde. Die Verteilungen der Geschlechter weichen zu keinem Zeitpunkt signifikant von „Kontrolle_2“ ab (unbehandelte Embryonen, grün).

Tabelle 6 | Übersicht über die Geschlechtsverteilung von *C. thummi*-Larven nach Injektion von dsRNA

Die nachstehende Tabelle zeigt die Häufigkeiten, in der die Geschlechter der Larven nach Injektionen von dsRNAs gegen die beiden Gene *fs(1)K10-like* und *luc7p-like* auftraten, zusammen mit den Geschlechterverteilungen aus den Kontrollgruppen. Den Individuen aus Kontrolle_1 wurde dabei in der embryonalen Phase Injektionspuffer ohne dsRNAs injiziert. Für Kontrolle_2 wurden drei Gelege hochgezogen und die Geschlechter der daraus schlüpfenden Larven wurden ohne vorangegangene Injektionen bestimmt, wodurch sich die gerade Anzahl von 70 Individuen erklären lässt.

Injektion	Pos.-Kontrolle	Larven _{injiziert}	Larven _{geschlüpft}	Weibchen		Männlich	
				n	%	N	%
<i>fs(1)K10-like</i>	dsRNA _{hb}	76	60	32	53,3	28	46,7
	dsRNA _{oc}	56	42	18	42,8	24	57,2
	-	82	68	32	47,1	36	53,5
Mittelwert_{fs(1)K10}					49,7		52,5
<i>luc7p-like</i>	dsRNA _{hb}	91	80	37	46,3	43	53,8
	dsRNA _{oc}	76	61	33	54,1	28	45,9
	-	63	59	27	55,1	22	44,9
Mittelwert_{luc7}					51,8		48,2
Kontrolle_1 Injektionspuffer	dsRNA _{hb}	80	63	34	54,0	29	46,0
	dsRNA _{oc}	47	45	20	44,4	25	55,6
	-	58	48	23	47,9	25	52,1
Mittelwert_{k_1}					48,8		51,2
Kontrolle_2 nicht injiziert	-	-	70	32	45,7	38	54,3
	-	-	70	39	55,7	31	44,3
	-	-	70	37	52,9	33	47,1
Mittelwert_{k_2}					51,4		48,6

**ABBILDUNG 29 | GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER GESCHLECHTSVERTEILUNG *C. THUMMI* LARVEN NACH dsRNA-INJEKTION**

Das Säulendiagramm visualisiert die Verteilung der Geschlechter der verschiedenen Larvengruppen aus Tabelle 6. In jeder der vier Farbgruppen sind jeweils die drei unabhängigen Versuchsdurchführungen sowie deren arithmetischer Mittelwert dargestellt. Die Geschlechtsverteilungen nach Injektionen von dsRNA_{fs(1)K10-like} (gelb) beziehungsweise dsRNA_{luc7-p-like} (braun) weichen hierbei mit keiner erkennbaren Signifikanz von den aus Kontrolle_1 (blau) und Kontrolle_2 (grün) erhaltenen Geschlechtsverteilungen ab. In allen Fällen treten Männchen und Weibchen ca. im Verhältnis 1:1 auf.

5 Diskussion

5.1. Epigenetik bei *Chironomus*

5.1.1. Histon-Methylierung bei *Chironomus*

In der Fachliteratur sind Histon-Modifikationen bei zahlreichen Dipteren beschrieben. So gibt es Arbeiten, die bei *D. melanogaster* einen Zusammenhang zwischen Histon-Modifikationen und Dosiskompensation beschreiben. Bei der Taufliege wird zum Beispiel über Dosiskompensation eine Hochregulation X-chromosomaler Gene bei Männchen erzielt. Proteine, die im Verdacht stehen, diese Hochregulation umzusetzen, sind vor allem Proteine der sogenannten MSL-Familie („male-specific lethal“) (Lucchesi et al. 2005). Es wird dabei vermutet, dass die transkriptionelle Hochregulation durch „chromatin remodeling“ vermittelt wird (Lucchesi et al. 2005). Allerdings wird das „chromatin remodeling“, welches bei der Dosiskompensation von *D. melanogaster* auftritt, in erster Linie auf die Acetylierung von Histonen zurückgeführt. Histon-Methylierungen sind in diesem Zusammenhang nicht beobachtet worden (Bell et al. 2008).

Die Methylierung von H3K9 ist bei Dipteren vorwiegend in Verbindung mit rDNA-Clustern beschrieben worden, welche unter anderem durch diese Histon-Modifikationen aktiviert und inaktiviert werden (McStay und Grummt 2008). So ist zum Beispiel beim Modellorganismus *D. melanogaster* bekannt, dass eine Inhibition der Methylierung von H3K9 – hervorgerufen durch eine Mutation von *Su(va)3-9* („Suppressor of variegation 3-9“) – rDNA destabilisiert. Das kann eine Exzision von rDNA-„repeats“ sowie die Entstehung extrachromosomaler zirkulärer rDNA-Moleküle zur Folge haben (Peng und Karpen 2007). Ein weiteres Beispiel, bei dem Histon-Methylierungen an H3K9 nachgewiesen werden konnte, ist *Sciara coprophila* (Trauermücken, *S. coprophila*). Wie auch bei der Taufliege scheint sie dort ausschließlich eine Funktion bei der Regulation von rDNA einzunehmen. Bei

beiden Organismen konnten H3K9-Methylierungen in den perizentrischen Chromosomenregionen nachgewiesen werden. Dabei wurden über Antikörpernachweise distinkte Signale in den entsprechenden Bereichen beobachtet (Ye und Eickbush 2006; Greciano et al. 2009).

Es konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, ob H3K9-Methylierungen bei *Chironomus thummi* oder *piger* auftreten. Die Ergebnisse der Antikörpernachweise an Polytäncrosomen bei *Chironomus* lieferten diesbezüglich keine eindeutigen Hinweise. Vor dem Hintergrund der eingangs angeführten Fälle von H3K9-Methylierungen bei *S. coprophila* und *D. melanogaster* schließt sich somit die Frage an, wie die Befunde dieser Arbeit zu bewerten sind. Es muss in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass die Ergebnisse der Antikörpernachweise nicht eindeutig interpretiert werden können, weil es keine Positivkontrollen gab, die eine einwandfreie Versuchsdurchführung oder die Funktionalität der eingesetzten Antikörper belegen könnten.

Ein Hinweis darauf, dass der Sachverhalt bezüglich H3K9-Methylierungen bei Chironomiden ein anderer ist als bei *D. melanogaster* und *S. coprophila* ergibt sich aus der Nukleolusorganisatorregion (NOR). Die NOR ist für die Regulierung der rDNA zuständig und liegt bei *D. melanogaster* und *S. coprophila* im Heterochromatin der X-beziehungsweise Y-Chromosomen (Pardue et al. 1970; Madalena et al. 2007). Die NOR bei Chironomiden ist jedoch nicht im Heterochromatin lokalisiert. So liegt zum Beispiel die NOR von *C. tentans* an zwei euchromatischen Orten der Chromosomen II und III. Bei *C. thummi* und *C. piger* existiert lediglich ein NOR, welcher in einem nicht heterochromatisierten Bereich des Chromosoms IV lokalisiert ist (Beermann 1955b; Keyl 1962). Dass bei Dipteren eine Funktion der H3K9-Methylierung als regulatorische Einheit ausschließlich bei der rDNA-Organisation und Regulation beschrieben ist (Madalena et al. 2012) und dass weiterhin die rDNA bei *C. thummi* und *piger* nicht heterochromatisiert vorliegt, wird durch die in dieser Arbeit gezeigten Resultate bestätigt.

5.1.2. DNA-Methylierung bei *Chironomus*

Die DNA-Methylierung ist eine wichtige Form der epigenetischen Modifikation und spielt eine Rolle bei vielen biologischen Prozessen wie zum Beispiel der Zelldifferenzierung oder der Dosiskompensation X/Y-chromosomaler Geschlechtsbestimmung. Obwohl der Vorgang der DNA-Methylierungen, speziell der Cytosin-Methylierung, stark konserviert ist, sind in unterschiedlichen Organismen viele verschiedene DNA-Regionen von Methylierung betroffen.

Einige eukaryotische Organismen zeigen keine oder nur geringfügig methylierte DNA. Wie viele andere Eukaryoten, weisen zum Beispiel Nematoden wie etwa *Caenorhabditis elegans* kein 5-mCytosin auf (Zemach et al. 2010b). Bei vielen Vertebraten hingegen kann 5-mCytosin über das gesamte Genom verteilt vorliegen (Bird 2002). Auch innerhalb der Gruppe der Invertebraten bestehen teils erhebliche Unterschiede bezüglich der Methylierungslevel der DNA. So konnten zum Beispiel weder bei *Tribolium castaneum* noch bei *Aedes aegypti* nennenswerte Mengen an 5-mCytosin nachgewiesen werden, während zum Beispiel *Apis mellifera* und *Bombyx mori* beachtliche Level aufweisen (Zemach et al. 2010b; Wedd und Maleszka 2016; Falckenhayn et al. 2016). Generell konnte bei Dipteren DNA-Methylierung nicht oder nur in geringem Maße nachgewiesen werden. So wurde zum Beispiel am Genom von *Aedes aegypti* 2016 eine umfassende Analyse durchgeführt, die zum Ergebnis hatte, dass das Methylierungslevel dort um einige Größenordnungen niedriger ist, als bei Organismen mit methylierungsabhängiger epigenetischer Regulation (Falckenhayn et al. 2016). Auch bei *Drosophila melanogaster* konnten nur basale Mengen an DNA-Methylierung nachgewiesen werden, wobei es widersprüchliche Aussagen zum Methylierungsmuster gibt (Raddatz et al. 2013; Takayama et al. 2014). Es wird dennoch angenommen, dass DNA-Methylierung bei allen Insektenordnungen auftritt (Bewick et al. 2016; Takayama et al. 2014; Falckenhayn et al. 2016).

Chironomiden sollten als Dipteren, ähnlich den anderen untersuchten Familien dieser Ordnung, geringe Mengen an DNA-Methylierungen aufweisen. Sowohl die

Ergebnisse aus dem AP-Assay (Kapitel 4.1.1) als auch aus den RAPD-PCRs (Kapitel 4.1.4.1) zeigen, dass Cytosin-Methylierung bei *C. thummi* und *C. piger* auftritt. Allerdings erlauben die Ergebnisse keine quantitativen Aussagen zu den Methylierungsniveaus bei *Chironomus*, weil die Nachweise lediglich *qualitativ* sind. So lassen sich zwar aus den gelelektrophoretischen Auftrennungen nach den RAPD-PCRs Rückschlüsse auf vereinzelte Cytosin-Methylierungen im Genom ziehen; jedoch können den über diese Methode nachgewiesenen Methylierungen weder Mengen noch Lokalisierungen zugeordnet werden.

Auch die Antikörpernachweise mittels DotBlot (s. Kapitel 4.1.1) geben keine Informationen zu den Methylierungsmengen oder -mustern der eingesetzten DNA-Proben. Selbst ein relativer Vergleich zwischen den untersuchten DNAs und der Positivkontrolle ist nicht aussagekräftig, weil sämtliche Signale erst nach sehr langer Inkubationszeit auftreten (in der Regel nach ü.N.-Inkubation), wobei mit dem verwendeten AP-Assay üblicherweise bereits nach wenigen Stunden mit Reaktionen zu rechnen ist. Dass dies bei den vorliegenden Versuchen nicht der Fall ist, lässt vermuten, dass die Methylierungsniveaus aller Proben sehr niedrig sind.

Die geringen Mengen methylierter DNA würden schließlich auch die Befunde der Antikörpernachweise an Polytänchromosomen erklären. Im Zuge dieser Versuchsreihen wurden verschiedene Protokolle getestet oder kombiniert; jedoch ergaben die Experimente zu keinem Zeitpunkt reproduzierbare Ergebnisse, die auf signifikante Mengen methylierter DNA schließen lassen würden. Geht man nun davon aus, dass bei *Chironomus* ähnliche Methylierungsverhältnisse vorliegen wie etwa bei *D. melanogaster* oder *Aedes aegypti*, ist nicht zu erwarten, dass entsprechende Fluoreszenznachweise an Polytänchromosomen zu positiven Ergebnissen führen.

Ferner würde das Fehlen eines signifikanten Methylierungsmusters auch die Ergebnisse der MSRE-Versuchsreihe (MSRE = methylierungssensitive Restriktionsenzyme) erklären. Mit der Versuchsreihe sollten einzelne CpG-Loci in der SDR von *C. thummi* und *C. piger* gezielt auf Methylierungen untersucht werden.

Unterschiedliche Methylierungsmuster zwischen Männchen und Weibchen könnten ein Hinweis auf eine Funktion bei der Geschlechtsdetermination sein. Entsprechende geschlechtsspezifische Unterschiede konnten durch diese Arbeit allerdings nicht nachgewiesen werden. Ein Beispiel für eine methylierungsabhängige Geschlechtsdetermination wäre das sogenannte „imprinting“, bei dem geschlechtsspezifische Regionen durch differenzielle Methylierungsmuster in der Männchen- oder Weibchenkeimbahn kontrolliert werden, wodurch entweder die Männchen- oder die Weibchen-spezifische Expression geschlechtsbestimmender Gene nachgeschaltet wird (Strogantsev und Ferguson-Smith 2012). Es sind in dieser Arbeit zwar nicht alle möglichen CpG-Loci innerhalb der SDR geprüft worden, sondern lediglich welche in der Nähe von 5'-Bereichen verschiedener Gene; es ist jedoch denkbar, dass differenzielle Methylierungen ohnehin nur während einer sehr kurzen Periode in der frühen Embryonalentwicklung auftreten würden, sollte es welche geben. Das würde eine Detektion zusätzlich erschweren – nicht zuletzt, weil die mikroskopische Bestimmung der Geschlechter von Embryonen von *Chironomus* erst ab einem verhältnismäßig späten Zeitpunkt zuverlässig erfolgen kann, adäquate MSRE-Experimente aber nicht ohne geschlechtsspezifische DNA durchführbar sind.

Die Resultate aus den Methylierungsuntersuchungen dieser Arbeit lassen letztlich die Schlussfolgerung zu, dass *C. thummi* und *C. piger* zwar durchaus methylierte Cytosine aufweisen, diese jedoch allem Anschein nach in geringen Mengen und ohne distinktes Muster auftreten. Dieser Befund deckt sich auch mit den Ergebnissen aus der Suche nach Genen für DNA-Methylasen bei *Chironomus*. Die entsprechenden Ergebnisse werden im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

5.1.3. DNMT2-abhängige Methylome

DNA-Methylierungen werden bei Eukaryoten durch drei Hauptenzyme aus der Familie der DNA-Methyltransferasen umgesetzt. Aus den drei Enzymen können sich jeweils weitere Unterfamilien ableiten.

Bei Tieren fungiert in der Regel die DNA-Methyltransferase 3 (DNMT3) als *de novo* Methyltransferase, welche vor allem in der frühen Entwicklungsphase neue DNA-Methylierungsmuster etabliert. Diese Methylierungsmuster werden anschließend durch die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) aufrechterhalten. Die DNMT1 überträgt dabei Marker von methylierten CpG-Dinukleotiden der parental DNA-Stränge auf die komplementären CpG-Stellen der Tochterstränge (Law und Jacobsen 2010). Die DNA-Methyltransferase 2 (DNMT2) ist das dritte Enzym der Familie. Sie besitzt ein stark konserviertes und für die DNA-Methyltransferasen spezifisches katalytisches Motiv (Yoder 1998; Raddatz et al. 2013). Allerdings konnte bereits früh gezeigt werden, dass die tatsächliche DNA-Methylierungsaktivität der DNMT2 schwächer ist, als zunächst angenommen wurde und dass das Enzym eine wichtige Funktion bei der Methylierung bestimmter Cytosine der tRNA besitzt (Hermann et al. 2003; Goll et al. 2006). DNMT2 wird daher auch als tRNA-Methyltransferase 1 (TRDMT1) bezeichnet und ihre Rolle wird oft als Vermittler zwischen äußeren Faktoren, wie zum Beispiel Stress, und tRNA-Stabilität und somit der Regulierung der Proteinsynthese interpretiert (Becker et al. 2012; Tuorto et al. 2012; Raddatz et al. 2013).

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten keine orthologen Gene zu den Methyltransferase-Genen *DNMT1* und *DNMT3* gefunden werden – weder bei *C. thummi* noch bei *C. piger*. Es konnte allerdings ein exprimiertes *DNMT2*-Ortholog nachgewiesen werden. Gleichzeitig zeigen aber die qualitativen Analysen der DNA-Methylierung, dass die Genome der beiden *Chironomus*-Schwesternarten zumindest ein basales Level an Cytosin-Methylierungen aufweisen. Es stellt sich somit die Frage, wie diese (basale) DNA-Methylierung bei *Chironomus* erreicht wird, wenn dort scheinbar die beiden essentiellen DNA-Methyltransferasen 1 und 3 bei *Chironomus* fehlen.

Wie in Kapitel 1.3.2 dargelegt, kann die Anzahl der einzelnen *DNMT*-Gene zwischen verschiedenen Spezies stark variieren, und unterschiedliche Organismen weisen oftmals unterschiedliche *DNMT*-Verteilungen auf (vgl. dazu Abbildung 3 aus Kapitel 1.3.2). Eine mögliche Erklärung dieser Varianz ist, dass die

unterschiedlichen DNMT-Verteilungen im Grunde multiple Versionen eines einzelnen „tool kits“ für phänotypische Adaption darstellen (Lyko und Maleszka 2011). So sind durchaus auch Tierarten bekannt, bei denen als einziger Kandidat für die Realisierung funktionaler DNA-Methylierung zunächst nur das Enzym DNMT2 in Frage kommt. Zwar sind die globalen DNA-Methylierungslevel dieser Tiere in der Regel nicht sonderlich hoch und werden darüber hinaus kontrovers diskutiert; es wird jedoch vermutet, dass DNMT2 doch an der DNA-Methylierung beteiligt sein könnte (in welcher Rolle auch immer) und nicht ausschließlich als tRNA-Methyltransferase in Erscheinung tritt (Jeltsch et al. 2006; Schaefer und Lyko 2010; Jeltsch et al. 2016). Eventuell übernimmt DNMT2 in Organismen, in denen DNMT1 und DNMT3 fehlen, die Funktion der DNA-Methylierung, wenn auch mit geringer Effizienz, was sich dann in einem geringeren Methylierungszustand widerspiegelt.

Abbildung 30 zeigt eine Zusammenstellung des Inventars der DNMT-Gene einiger Insekten und des Menschen (verändert nach Werren et al. 2010). Gemäß dem engen Verwandtschaftsverhältnis zwischen *C. thummi* und *Anopheles gambiae* (beide Arten gehören zu den Nematocera) und aufgrund des durch diese Arbeit nachgewiesenen DNMT2-Orthologs bei *C. thummi* und *C. piger* konnte die Gattung *Chironomus* in den Stammbaum eingefügt werden. Der Baum verdeutlicht den Verlust von DNMT3 und DNMT1 bei den Dipteren – ein Befund, der sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt.

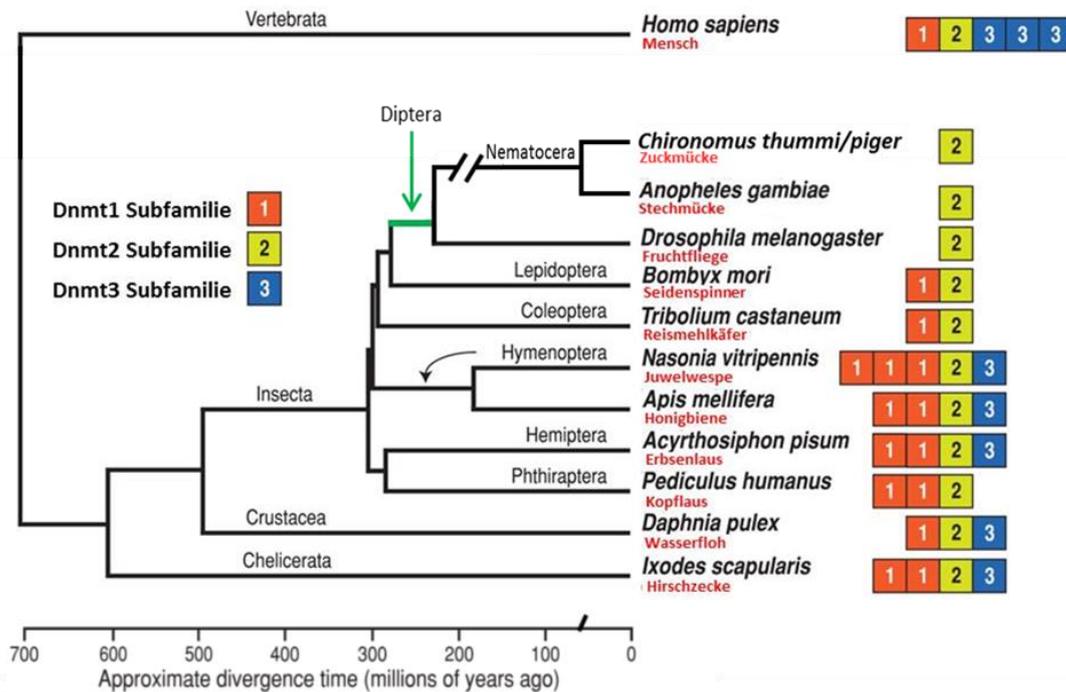


ABBILDUNG 30 | PHYLOGENETISCHE VERWANDSCHAFTSVERHÄLTNISSE VERSCHIEDENER ORGANISMEN AUF BASIS DES „TOOL KITS“ AN DNMT

Die Abbildung stellt die Phylogenie in Abhängigkeit der jeweils sequenzierten Genome dar. Dabei wird zu jedem Tier das korrespondierende DNA-Methylierungs-„tool kit“ zugeordnet, bestehend aus einer Kombination aus den DNA-Methyltransferasen 1 bis 3. Der unklare zeitliche Abstand zwischen *Chironomus* und *Anopheles* ist durch einen Bruch am entsprechenden Arm der Nematocera dargestellt. In grün wird die Abspaltung der Dipteren angezeigt. Rechts sind die zugehörigen DNA-Methyltransferase-Subfamilien zu sehen. Die Abbildung wurde nach Werren et al. 2010 verändert.

Ein Vertreter der Gruppe der Tiere, deren einziger Kandidat für eine funktionale DNA-Methylase DNMT2 ist, ist *Drosophila melanogaster*. Lange Zeit war strittig, ob das Genom von *D. melanogaster* Methylierungen aufweist. Die Entdeckung eines *Drosophila*-Homologs von DNMT2 führte daraufhin zu einer Reihe von Studien, die schließlich geringe Mengen genomischer Cytosin-Methylierungen identifizierten (Hung et al. 1999; Mandrioli 2007; Lyko et al. 2000; Kunert et al. 2003). Die genauen Ausmaße der Methylierungen bei *Drosophila* sind allerdings bis heute nicht abschließend geklärt und es wird gegenwärtig diskutiert, ob es sich dabei überhaupt um signifikante Methylierungsmuster handelt (Zemach et al. 2010a; Raddatz et al. 2013). Die Befunde, nach denen DNMT2 tRNA methylieren kann, sorgten für zusätzliche Diskussionen und nicht wenige Arbeitsgruppen vermuteten, dass die beobachteten genomischen Cytosin-Methylierungen lediglich

zufälliger Natur oder gar falsch-positive Signale seien (Schaefer und Lyko 2010). 2014 konnte jedoch zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass *Drosophila melanogaster* durchaus signifikante Muster der DNA-Methylierung besitzt (Takayama et al. 2014). Dabei wurden keine Unterschiede bei den Methylierungsniveaus zwischen wildtypischen *Drosophila*-Linien und DNMT2-defizienten Linien beobachtet. Demnach scheint bei *Drosophila* die DNA-Methylierung unabhängig von DNMT2 zu erfolgen, was dort eine andere Form einer Methyltransferase fordert.

Die Resultate dieser Arbeit deuten auf einen ähnlichen Sachverhalt bei *Chironomus* hin. So steht auch bei *Chironomus* das Fehlen von *DNMT1* und *DNMT3* einer vorhandenen wenn auch basalen Methylierungen entgegen. Eine alternative Form der DNA-Methyltransferase wäre also auch bei *Chironomus* denkbar. Alternativ ist es möglich, dass bei *Chironomus* das Enzym DNMT2 an die Stelle der sonst üblichen Methylasen tritt und für die DNA-Methylierung verantwortlich ist.

5.1. RNA-Interferenz bei *Chironomus*

RNA-Interferenz beschreibt einen biologischen Vorgang, bei dem doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) die Expression bestimmter Gene post-transkriptionell schwächen. *In vivo* handelt es sich bei den dsRNAs meist um sehr kurze Moleküle, wie zum Beispiel siRNAs (si = „small interfering“), piRNAs (pi = „PIWI interacting“) oder microRNAs. Ihnen allen ist gemeinsam, dass sie komplementär zu einem kurzen Bereich auf der mRNA des Gens sind, das sie regulieren. Über diese Komplementarität vermitteln die dsRNAs entweder eine Spaltung der Ziel-mRNA, indem sie sie in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) überführen, oder sie verhindern eine Translation durch Blockieren des Translationsapparats. Dabei führt die RNA-Interferenz nie zur vollständigen Unterdrückung der Genexpression („knock-out“), sondern lediglich zu deren Herunterregulation („knock-down“) (Kim et al. 2010).

5.1.1. Wirksamkeit der Methode

Die Positivkontrollen zu den Genen *hunchback* und *orthodenticle/ocelliless* konnten erfolgreich auf die RNAi-Experimente an den Laborstämmen von *C. thummi* und *C. piger* übertragen werden (s. Kapitel 4.3). Die Methoden, mit denen die dsRNAs letztlich hergestellt und injiziert wurden, unterschieden sich zum Teil deutlich von denen, die zu Beginn der Versuchsreihen verwendet worden waren (Bachtadse 2012, Diplomarbeit). Die Verwendung von *hunchback* und *orthodenticle/ocelliless* hatte vor allem den Vorteil, dass die injizierten Tiere das L4-Stadium erreichen konnten. Dadurch war es möglich, ihre Genitalimaginalscheiben zur Bestimmung des Geschlechts zu nutzen. Die Mengenverhältnisse von RNAi-Phänotypen zu Wildtypen deckten sich außerdem mit den Werten, die aus der entsprechenden Literatur bekannt waren (ca. 70% zugunsten der RNAi-Phänotypen; Klomp et al. 2015). Mit den Kontrollen konnte gezeigt werden, dass das RNAi-Versuchsprotokoll (Herstellung der dsRNA und Mikroinjektion der Embryonen) erfolgreich etabliert werden konnte.

5.1.2. „Knock down“ der Gene *fs(1)K10-like* und *luc7(p)-like* bei *C. thummi*

Die RNAi-Experimente hatten zum Ziel, die Expressionen spezifischer Gene in der SDR herunter zu regulieren. Dadurch sollten Rückschlüsse auf die Funktionen dieser Gene bei *Chironomus* geschlossen werden. Im Speziellen standen dabei ihre eventuellen Einflüsse auf die Geschlechtsdetermination im Fokus.

Die beiden Gene, deren Funktionen analysiert wurden, sind *fs(1)K10_like* und *luc7(p)_like*. Beide Gene befinden sich in der SDR, in unmittelbarer proximaler Nähe zum *thummi*-Poto-Y-Chromosomen-spezifischen Cla-Element-Cluster von *C. thummi*, beziehungsweise beim Proto-X-Chromosom sowie bei *C. piger* an analoger Stelle. Sie sind daher – neben anderen Genen – möglicherweise relevant für die Geschlechtsbestimmung von *Chironomus*.

Das Gen *fs(1)K10_like* ist darüber hinaus aufgrund seiner Duplikation auf dem Proto-Y-Chromosom besonders interessant im Hinblick auf seine Rolle bei der Geschlechtsdetermination. Diese Duplikation ist neben einigen Männchenspezifischen repetitiven Elementen der einzige bisher identifizierte Unterschied zwischen dem Proto-X- und Proto-Y-Chromosom bei *C. thummi*. Seinen Namen hat das Gen *fs(1)K10-like* durch seine Ähnlichkeit zu dem Gen *fs(1)K10* von *Drosophila*. Das Gen ist dort mitverantwortlich für die Ausbildung der dorso-ventralen Achse, vor allem in Stadien der frühen Oogenese. Die Transkription findet dabei überwiegend in den Nährzellen statt. Für das korrespondierende Protein konnte eine Anreicherung innerhalb des Zellkerns der Oocyte nachgewiesen werden (Serano et al. 1995). Liegt eine homozygote Mutation des X-chromosomalen Gens *fs(1)K10* vor, so kommt es durch einen maternalen Effekt zu Sterilität in Weibchen der Folgegeneration. Die Sequenzhomologie der beiden Gene *fs(1)K10* und *fs(1)K10-like* ist jedoch mit einer Übereinstimmung auf 46 % über einen Bereich von 89 AS relativ niedrig, sodass eine funktionelle Verwandtschaft fraglich ist.

Zur Funktion des Gens bei *Chironomus* ist wenig bekannt. Es konnte 2016 gezeigt werden, dass nicht nur die beiden duplizierten männlichen Genvarianten Y1 und Y2 exprimiert werden, sondern dass auch ein sogenanntes „read through“- oder Y3-Transkript existiert. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der unterschiedlichen Kopien Y1, Y2 und Y3 auf dem Proto-Y-Chromosom und die X-Kopie auf dem Proto-X-Chromosom in der Entwicklung vom Embryo zur Larve unterschiedlich reguliert werden (Stiehl 2016).

Analog zu *fs(1)K10-like* ist auch *luc7(p)-like* nach einem Gen von *D. melanogaster* benannt worden. Das Gen *luc7(p)* wurde erstmals als eine letale Mutation in einem Hefe-Stamm identifiziert, welchem der nukleare Cap-Bindekomplex (CBC) fehlte. Luc7(p) ist eine Komponente des U1-snRNPs, welches essentiell für das vegetative Wachstum bei Hefen ist. Das Fehlen von Luc7(p) führt zu einer Störung der Interaktion von U1-snRNP und CBC (Cap Bindekomplex), wodurch die 5'-Spleißstellen-Erkennung gestört und somit die Effizienz des Spleißens gesenkt wird (Fortes et al. 1999). Die Aufgabe des Gens *luc7(p)-like* bei *Chironomus* ist unbekannt.

Die Analyse der abgeleiteten Peptidsequenz bei *C. thummi* zeigte einen Abschnitt innerhalb des C-terminalen Bereichs des Luc7(p)-Proteins, der eine erhöhte Anzahl der beiden Aminosäuren Arginin (R) und Serin (S) aufweist. Eine Anreicherung der beiden AS Arginin und Serin liegt auch in den beiden Proteinen TRA und TRA2 vor (Herold 2012). Wie in Kapitel 1.2.1.3 beschrieben, spielen TRA und TRA2 bei der Geschlechtsbestimmung vieler Zwei- und Hautflügler eine zentrale Rolle. Geschlechtsspezifische Unterschiede sind bei *Chironomus* jedoch nicht bekannt.

Die RNAi-Versuche, die mit dsRNA zu *luc7(p)-like* und *fs(1)K10-like* durchgeführt wurden, konnten keine nachweisbaren phänotypischen Veränderungen erzeugen. Weiterhin ergaben die Versuche keine Hinweise auf eventuelle Einflüsse der beiden Gene bei der Geschlechtsdetermination von *C. thummi* oder *C. piger*. So konnte keine Abweichung von der üblichen Geschlechterverteilung beobachtet werden. Diese liegt üblicherweise bei 1:1 (Männchen:Weibchen), was bereits durch frühere Arbeiten beschrieben worden ist (Bachtadse 2012) und im Zuge der erneuten RNAi-Versuche bestätigt werden konnte (vgl. die Kapitel 4.3.4). Die mikroskopischen Untersuchungen der Larven nach Injektionen von dsRNAs gegen die Gene *luc7(p)-like* und *fs(1)K10-like* zeigten auch mit Blick auf die Entwicklung der Genitalimaginalscheiben keine Auffälligkeiten (Kapitel 4.3.3). Mögliche Gründe für das Ausbleiben von RNAi-induzierten Phänotypen sollen im folgenden Kapitel diskutiert werden.

5.1.3. Umstände, die den Erfolg der RNAi-Versuchen verhindern können

Die Sequenzen der Ziel-mRNA, an welche die ca. 20 nt langen siRNA binden kann, werden als „target sites“ bezeichnet. Dabei können mRNAs eine Vielzahl an „target sites“ besitzen, welche jeweils unterschiedliche Auswirkungen auf die Effizienz der RNAi haben können. Weil diese Effizienz stark schwanken kann, ist es für RNAi-Versuche in der Praxis üblich, eine Reihe verschiedener siRNAs zu erstellen und zu synthetisieren sowie anschließend nach den RNAs mit der jeweils besten Effizienz

zu „screenen“ (Heale et al. 2005; Khvorova et al. 2003). In dieser Arbeit wurden zunächst kurze siRNAs zu verschiedenen „target sites“ einiger Gene aus der SDR von *C. thummi* verwendet. Es konnten allerdings weder in der Embryonalentwicklung noch in der larvalen Entwicklung phänotypische Veränderungen beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte bei den „target sites“ zu finden sein, welche möglicherweise ungünstig gewählt worden sind. Zwar wurden die Zielsequenzen in den jeweiligen mRNAs nach den Parametern gängiger Protokolle bestimmt, jedoch gab es keine Garantie für ihre Wirksamkeit bei RNA-Interferenz. So können „Off-target“-Effekte der siRNAs, bei denen die siRNAs an falschen mRNAs binden, die Effektivität der RNAi drastisch vermindern (Jason W Myers, Jen-Tsan Chi, Delquin Gong, Marci E Schaner, Patrick O Brown and James E Ferrell Jr 2006). Neben der Wahl ungünstiger „target sites“ kann bei der Verwendung von siRNAs auch die Größe der Moleküle eine Rolle spielen. Zu kleine siRNA-Moleküle können in ihrem Eindringungsvermögen in Zellkerne limitiert werden (Nwokeoji et al. 2017). Weiterhin sind Fälle beschrieben, in denen siRNAs zuvor modifiziert werden mussten, um nicht durch wirtseigene Abwehrmechanismen abgestoßen zu werden (Kim 2015).

Versuchsweise wurden längere dsRNAs hergestellt, die den gesamten offenen Leserahmen des jeweiligen Ziel-Gens überspannten. Es ist davon auszugehen, dass die langen, stabileren dsRNAs nach Aufnahme ins Zytoplasma durch Dicer-RNase-III-Enzyme gebunden und zu siRNAs verdaut werden (Hu et al. 2016). Mit dieser Methode wurden auch die dsRNAs für die Positivkontrollen synthetisiert. Sichtbare phänotypische Veränderungen nach Injektionen von dsRNA gegen *fs(1)K10-like* und *luc7(p)-like* blieben jedoch aus (vgl. dazu Kapitel 4.3.3).

Für die fehlenden Ergebnisse nach Injektion der ORF-dsRNAs gibt es Erklärungsmöglichkeiten: Zunächst kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass die Gene zum Injektionszeitpunkt nicht exprimiert wurden. Zwar wäre bei fehlender Expression zum Zeitpunkt der dsRNA-Injektion – etwa weil die Expression noch nicht gestartet worden ist oder weil sie bereits abgeschlossen ist – ein entsprechender RNAi-„knock-down“ des jeweiligen Gens in

der Tat nicht möglich; es konnte allerdings durch eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Masterarbeit und mit Hilfe von „whole mount“ *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen gezeigt werden, dass beide Gene, sowohl *fs(1)K10-like* als auch *luc7(p)-like*, während der Embryonalentwicklung durchaus exprimiert werden (Bierwirth 2015). Diese Ergebnisse konnten später durch NGS-gestützte Transkriptomanalysen bestätigt werden (Stiehl 2016). Auch wenn die *exakten* Expressionsmuster nicht bekannt sind und es möglich ist, dass die Gene nicht während der gesamten Embryonalphase konstant exprimiert werden, ist es letzten Endes unwahrscheinlich, dass beide Gene jeweils zu den Zeitpunkten der RNA-Interferenzen inaktiv gewesen sein sollen.

Es ist weiterhin möglich, dass die dsRNAs, die zur Inhibition der Genexpressionen hätten führen sollen, degradiert waren, bevor sie intrazellulär zu siRNAs umgesetzt werden konnten. Dies ist aus zweierlei Hinsicht unwahrscheinlich: Zum einen sind lange doppelsträngige RNAs deutlich stabiler als einzelsträngige RNAs und somit weniger anfällig für Degradation in den Zellen des Zielorganismus (Bramsen et al. 2009; Hickerson et al. 2008). Zum anderen zeigen die Positivkontrollen, dass die Applikation der mit der verwendeten Methode hergestellten dsRNA-Moleküle bei *Chironomus* prinzipiell funktioniert.

Schließlich muss auch die Möglichkeit in Erwägung gezogen werden, dass die RNAi gegen zumindest eines der Gene erfolgreich war, jedoch sein entsprechender RNAi-Phänotyp nicht erkannt wurde. Aufgrund der essentiellen Funktion von *luc7(p)* in der Spleißmaschinerie bei Hefen wäre eine erhöhte Letalität der injizierten *Chironomus*-Embryonen zu erwarten, sollte das Gen dort eine ähnliche Funktion besitzen. Der RNAi-Phänotyp von *fs(1)K10* sollte sich vor allem durch Deformierungen der Dorsoventralachse äußern, falls es eine ähnliche Funktion wie sein namensgebendes Homolog bei *Drosophila* übernehmen sollte. Der mutante *fs(1)K10*-Phänotyp, der bei *Drosophila* eine Sterilität der Weibchen in der Tochtergeneration zur Folge hat (vgl. Kapitel 5.1.2 und Serano et al., 1995), sollte sich durch RNAi nicht hervorrufen lassen, weil der „knock-down“, der mittels RNA-Interferenz herbeigeführt wird, stets nur temporär ist. Entscheidend wäre

aber für die Sterilität der Tochtergeneration eine Hemmung der *fs(1)K10*-Expression während der Oogenese und nicht bereits in der Embryonalentwicklung.

Darüber hinaus müssen die Funktionen der Gene *fs(1)K10* und *luc7(p)*, wie bereits dargelegt, nicht ähnlich zu denen ihrer „Homologen“ bei *Chironomus* sein. Vor allem im Falle des Gens *fs(1)K10-like* ist davon auszugehen, dass seine Rolle bei *Chironomus* eine andere ist, als zum Beispiel bei *D. melanogaster*. Diese Vermutung ergibt sich sowohl aus der niedrigen Homologie der AS-Sequenzen von *fs(1)K10* und *fs(1)K10-like*, als auch aus die Tatsache, dass *fs(1)K10-like* in Männchen dupliziert vorliegt.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die RNAi-Versuche an *fs(1)K10-like* und *luc7(p)-like* keinen Aufschluss über die Funktionen der beiden Gene geben konnten.

5.2. Erweiterung des Y-Chromosomen-spezifischen SDR-Haplotyps von *C. thummi*

5.2.1. Kreuzung der Schwesternarten *thummi* und *piger*

C. thummi und *C. piger* sind Schwesternarten. Hybride sind zwar fertil, wenn die Kreuzung *C. thummi* ♂♂ x *C. piger* ♀♀ durchgeführt wird; reziproke Kreuzungen hingegen haben allerdings sterile Nachkommen zur Folge (Hägele 1985b). Eine Besonderheit der Kreuzungshybriden sind ihre Polytänchromosomen. Während der somatischen Homologenpaarung entstehen bei den Polytänchromosomen der Kreuzungshybriden Bereiche, in denen die Homologen nicht paarig aneinander liegen, sondern sich stattdessen in zytologisch sichtbaren Asynapsen voneinander trennen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Chromosomen in diesen Bereichen strukturell unterschiedlich sind. Eine große Rolle spielen dabei die repetitiven Cla-Element-Cluster, die bei *C. thummi* im gesamten Genom interspergiert vorliegen, bei *C. piger* jedoch fast ausschließlich in den Zentromerregionen auftreten (Schmidt 1984; Hägele 1985b).

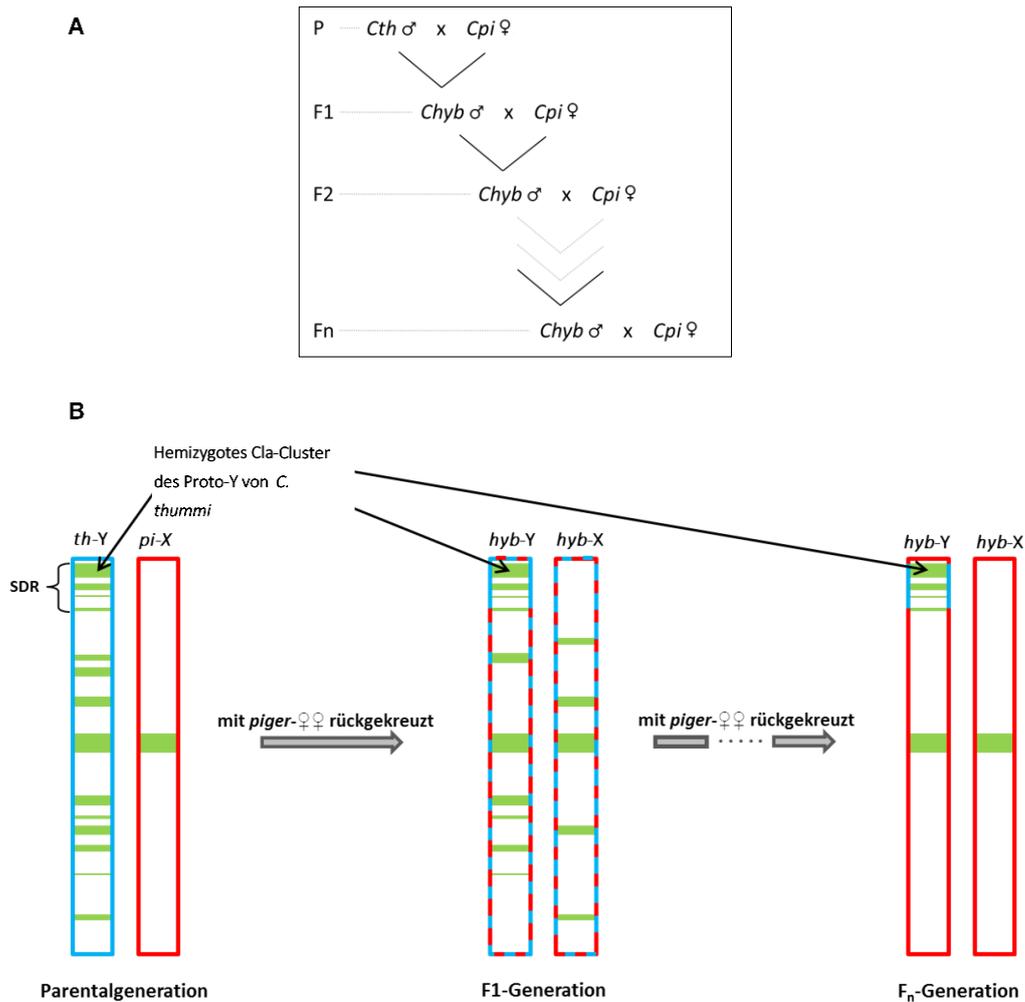


ABBILDUNG 31 | SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EVOLUTION DER GESCHLECHTSCHROMOSOMEN DER KREUZUNGSHYBRIDEN
 Abbildung **A** zeigt ein Kreuzungsschema von *thummi*-Männchen mit *piger*-Weibchen, bei der nach jeder neuen Generation mit *piger*-Weibchen rückgekreuzt wird. In Abbildung **B** ist idealisiert dargestellt, wie sich das chromosomale Gleichgewicht bei der entsprechenden Kreuzung verhält. Nach *n* Generationen ist ein Zustand zu erwarten, bei dem beide Chromosomen (Proto-Y und Proto-X) größtenteils auf *piger*-Sequenzen zurückzuführen sind, die SDR-des Proto-Y-Chromosoms jedoch *thummi*-spezifisch ist.

Ständige Rückkreuzung mit Weibchen von *C. piger* führt nach einigen Generationen über „crossing over“-Ereignisse zu einem Zustand, in dem nahezu alle Bereiche beider Chromosomen aus *piger*-spezifischen Sequenzen bestehen sollten. Lediglich die SDR auf dem Proto-Y-Chromosom der Männchen wäre dann noch aus *thummi*-spezifischen Sequenzen aufgebaut. Abbildung 31 zeigt in einer schematischen Darstellung, wie die chromosomale Entwicklung der Kreuzungshybriden in der Theorie verläuft.

Es ist nicht bekannt, nach wie vielen Rückkreuzungen ein solcher Zustand tatsächlich zu erwarten wäre. Für die Versuche in dieser Arbeit reichte jedoch aus, dass die Proto-X-chromosomalen Bereiche nahe der SDR frei von Cla-Element-Clustern waren. In diesem Zustand sollte der überwiegende Anteil der Proto-X-Sequenzen in der SDR von *C. piger* abstammen, wohingegen der homologe Abschnitt auf dem Proto-Y von *C. thummi* kommen sollte. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Cla-Element-Cluster lediglich als Hinweis für die Verteilung von *thummi*- und *piger*-Chromosomen dienen können. Es lässt sich aufgrund bloßer Abwesenheit von Cla-Element-Clustern nicht hundertprozentig ausschließen, dass der entsprechende Bereich nicht trotzdem auch *thummi*-spezifische Sequenzen enthält. Demnach besteht nach einer Hybridisierung zumindest in Abschnitten, auf denen bei Polytänochrosomen von *C. thummi* ohnehin keine Cla-Element-Cluster auftreten, keine Möglichkeit, die in diesen Abschnitten enthaltenen Sequenzen eindeutig auf eine *thummi*- beziehungsweise *piger*-Abstammung zurückzuführen. Aufgrund der hohen Dichte von vier eng beieinanderliegenden Cla-Element-Clustern in der SDR des *thummi*-Proto-Y-Chromosoms, kann jedoch mit hoher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass der homologe Bereich auf dem Proto-X-Chromosom *piger*-spezifisch ist, wenn dort keine Cla-Element-Cluster zu sehen sind (vgl. dazu Abbildung 15).

Ziel der Kreuzungen war es, eine Generation zu erhalten, bei der alle Individuen im chromosomalen Bereich, in dem die SDR vermutet wird, jeweils *piger*-spezifisch auf dem Proto-X-Chromosom und *thummi*-spezifisch auf dem Proto-Y-Chromosom waren. Dadurch sollten die geschlechtsgekoppelten Unterschiede, die zwischen der Proto-X-spezifischen SDR und der Proto-Y-spezifischen SDR bestehen, um zusätzliche artspezifische Unterschiede zwischen *C. thummi* und *C. piger* ergänzt werden. Das sollte wiederum die Chancen einer korrekten Zuordnung der nach Sequenzierung eines entsprechenden Individuums erhaltenen „reads“ zu ihrem jeweiligen Ursprung erhöhen – also entweder zur Proto-X-spezifischen oder zur Proto-Y-spezifischen SDR. Mit den so erhaltenen Proto-Y-spezifischen „reads“

sollte der bereits bestehende Contig der Proto-Y-spezifischen SDR verlängert werden.

5.2.2. Hochdurchsatz-Sequenzierung der Kreuzungshybriden

Die Sequenzierung des Kreuzungshybriden brachte knapp 146 Mio. „reads“ hervor, was statistisch etwa einer zehnfachen Abdeckung des Hybridgenoms entspricht (vgl. Kapitel 4.2.1). Das aus den getrimmten Daten errechnete Genom weist einen GC-Gehalt von 31,7% auf. Dieser Wert liegt etwas unter den Werten aus der Literatur, die für *C. thummi* 33% und *C. piger* 35% betragen (Schmidt et al. 1980). In einem vergleichbaren Versuch an *C. tentans* wurde ein GC-Gehalt von 31,2% ermittelt (Kutsenko et al. 2014). Für die Analyse des geschlechtsbestimmenden Faktors M ist ein Proto-Y-Chromosomen-spezifischer SDR-Haplotyp von großer Relevanz. Davon ausgehend, dass M bei *Chironomus* in der SDR liegt, sollte sich in dieser Region ein entsprechender Unterschied zwischen den beiden Proto-Geschlechtschromosomen zeigen. Innerhalb der SDR von *C. thummi* und *C. piger* ist die Duplikation von *fs(1)K10-like* der einzige entdeckte geschlechtsspezifische Unterschied, der ein Gen betrifft (Herold 2012). Die Sequenzierung des Kreuzungshybriden (vgl. Kapitel 4.2.1) sollte entsprechend dem chromosomalen Zustand des Individuums vor allem im Bereich der SDR ein Gemisch aus Sequenzen liefern, die entweder *piger*-Proto-X-spezifisch oder *thummi*-Proto-Y-Chromosomen-spezifisch sind. Hintergrund dieses Experiments ist die Annahme, dass eine Sortierung der Sequenzen zu Proto-X beziehungsweise Proto-Y erleichtert werden könnte, wenn die Sequenzen zumindest im Bereich der SDR neben ihrer Geschlechtsspezifität eine *thummi*- bzw. *piger*-Spezifität aufweisen. Bei der anschließenden Verlängerung des vorhandenen Proto-Y-Chromosomen-spezifischen Contigs zeigte sich, dass eine Erweiterung in Telomerrichtung mit den verwendeten bioinformatischen Methoden nicht möglich war. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass der Contig bereits in den linken Randbereich des hemizygoten Cla-Element-Clusters ragt, welches auf den Proto-Y-Chromosomen von *C. thummi* liegt (vgl. dazu Abbildung 32).

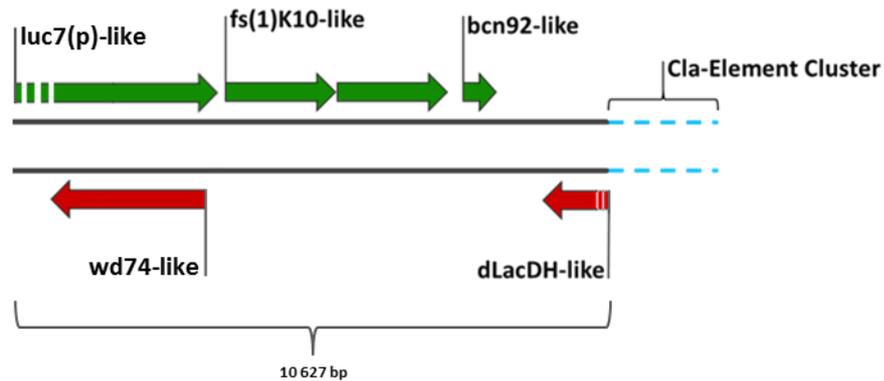


ABBILDUNG 32 | SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PROTO-Y-CONTIGS

Es ist ein Übersichtsschema des Proto-Y-Contigs gezeigt, welches die Lage des Cla-Element-Clusters (blau) verdeutlichen soll. Durch die repetitiven Elemente ist der 5'-Anfang des Gens *dLacDH-like* nicht eindeutig lokalisierbar.

Die Größe des hemizygoten Cla-Element-Clusters konnte mit Hilfe von Restriktionsanalysen und FISH-Experimenten auf ca. 20 kb geschätzt werden – die exakte Größe ist nicht bekannt (Herold 2012). Der Sequenzbereich, der das Cluster proximal bzw. in Richtung Zentromer flankiert, konnte bereits sequenziert werden. Dies wurde möglich, als die Proto-Y-Chromosomen-spezifische Duplikation von *fs(1)K10-like* mittels genomischer Southern Analysen entdeckt wurde (Stiehl 2009). Anhand der Duplikation konnten nämlich anschließend SDR-Contigs, die aus genomischen BAC-Banken erhalten worden waren, dem Proto-Y-Chromosom zugeordnet werden (Stiehl 2009). Diese Contigs ließen sich im Anschluss sequenzieren. Die Hochdurchsatzsequenzierung des Hybridgenoms, welche im Zuge dieser Arbeit durchgeführt worden ist, hatte somit unter anderem zum Ziel, Sequenzinformation für den distalen Randbereich des hemizygoten Clusters zu liefern – verschiedene Ansätze waren bisher ohne Erfolg geblieben (Stiehl 2016).

Abschnitte repetitiver Sequenzen lassen sich ab einer gewissen Größe nicht mehr assemblieren, weil gängige Assemblerprogramme keine eindeutigen Contigs generieren können und sich dadurch die Zahl der möglichen Contigs exponentiell vergrößert. NGS-Projekte tragen aus bioinformatischer Sicht zu der Problematik bei, weil sie hochparallel und in großen Mengen „reads“ generieren, die in der

Regel relativ kurz sind (< 150 nt) und somit unter Umständen um ein Vielfaches kürzer, als der jeweilige repetitive Abschnitt, der durch die „reads“ assembliert werden soll. Die Handhabung repetitiver Elemente ist demnach in den letzten Jahren zu einer der größten Herausforderungen bei der *de novo* Assemblierung gewachsen (Kajitani et al. 2014).

Zur Assemblierung Proto-Y-Chromosomen-spezifischer Contigs, die das Cla-Element-Cluster überspannen könnten, sind in dieser Arbeit diverse bioinformatische Strategien verfolgt worden (vgl. Kapitel 4.2.3). Es konnten jedoch keine „reads“ oder Contigs gefunden werden, die den realen Zustand des distalen Randbereichs des hemizygoten Clusters zuverlässig repräsentieren. Ein Grund dafür könnte sein, dass das Cluster nicht das einzige Cla-Element-Cluster bei *C. thummi* ist, sondern vielmehr Teil einer großen Gruppe repetitiver Elemente, die interspergiert im Genom vorliegen – vor allem im „non transcribed spacer“ (NTS) der rDNA Cla-Elemente (Schmidt und Godwin 1984). Außerdem konnten bei den Cla-Elementen kurze „target-site-duplications“ identifiziert werden. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass der NTS von *C. piger* kein Cla-Element-Cluster enthält, sprechen dafür, dass es sich bei den Cla-Elementen um transposable Elemente handelt, wodurch die Zuordnung einzelner „reads“ oder Contigs nach einer „shotgun“-Sequenzierung entsprechend erschwert wird (Lerat 2010).

Im Gegensatz zur Telomeraseite konnte der Proto-Y-Contig von *C. thummi* in Zentromerrichtung um circa 3,5 kb verlängert werden. Dabei ist zu beachten, dass diese Verlängerung lediglich bioinformatisch auf Grundlage der „reads“ aus der Hybridensequenzierung erstellt worden ist. Die Sequenzinformationen, die auf diese Weise erhalten wurden, sind nicht mittels klassischer molekularbiologischer Methoden überprüft worden. Allerdings sollte die Vorab-Filterung der „reads“ nach *thummi*-spezifischen (und somit nach *thummi*-♂-spezifischen) Sequenzen die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die aus ihnen assemblierten und zur proximalen Verlängerung genutzten Contigs den tatsächlichen Männchen-spezifischen Haplotypen repräsentieren.

Davon ausgehend, dass die Erweiterung des Proto-Y-Contigs in Zentromerrichtung dem realen Zustand des Chromosoms entspricht, ergibt sich, dass proximal der Genduplikation von *fs(1)K10-like* das Gen *WD74-like* liegt. Dieser Befund war zu erwarten, weil die Duplikation von *fs(1)K10-like* auf dem Proto-Y auch Sequenzabschnitte von *WD74-like* einschließt (Herold 2012), was eine räumliche Nähe beider Gene zueinander voraussetzt.

Das WD-Repeat enthaltende Protein WD74 gehört einer Proteinfamilie mit über 30 Subfamilien an (Yu et al. 2000). Proteine dieser Familie können unterschiedliche Funktionen übernehmen. Sie sind zum Beispiel an der Kontrolle der Zelldifferenzierung über transmembrane Signaltransduktion und Vesikelverschmelzung beteiligt. Weiterhin wird ihnen eine Rolle bei der Regulation oder der Zusammenlagerung des Initiationskomplexes bei der Transkription zugesprochen (Smith et al. 1999).

Zur Funktion des Gens *WD74-like* bei *Chironomus* ist nicht viel bekannt. Wie im Falle der meisten Gene aus der SDR von *C. thummi* und *C. piger* wurde *WD74-like* nach dem besten Treffer benannt, den eine entsprechende BLAST-Suche gegen die Datenbank von NCBI ergeben hatte. Somit muss keine tatsächliche funktionelle Übereinstimmung zwischen *WD74* und *WD74-like* vorliegen. Die Expression von *WD74-like* wurde in Männchen und Weibchen *C. thummi* und *C. piger* analysiert. Dabei konnten keine geschlechtsgekoppelten Expressionsunterschiede beobachtet werden. Die durch diese Arbeit neu erhaltenen Sequenzinformationen des Proto-Y-Contigs von *C. thummi* zeigen weiterhin, dass sich die Proto-Y-Variante von *WD74-like* bis auf wenige SNPs (vor allem in den Intronbereichen) kaum von der Proto-X-Variante des Gens unterscheidet. Ein entsprechendes Alignment der translatierten offenen Leserahmen beider Gene belegt, dass sie auch auf AS-Ebene eine sehr hohe Sequenzidentität aufweisen (Abbildung 33). Die hohe Ähnlichkeit der X-beziehungsweise Y-Varianten – zusammen mit dem Ausbleiben geschlechtsspezifischer Expressionen – legen nahe, dass *WD74-like* keine entscheidende Rolle bei der Geschlechtsbestimmung von *Chironomus* einnimmt.

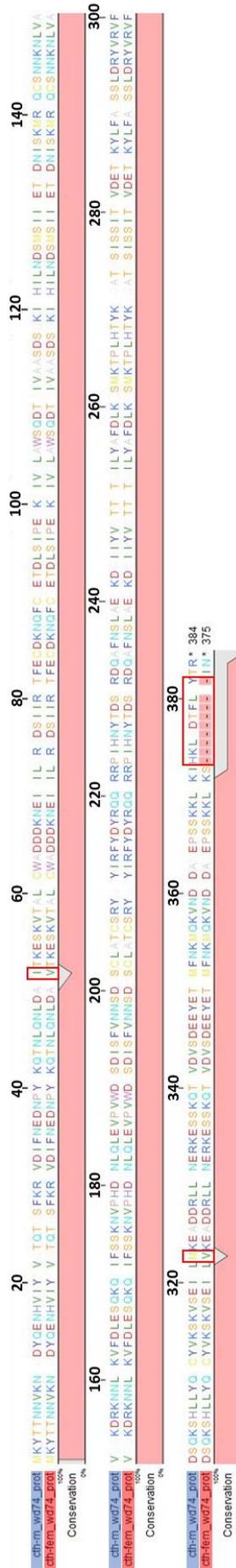


ABBILDUNG 33 | ALIGNMENT DER Y-VARIANTE DES PROTEINS WD74-LIKE MIT DER X-VARIANTE DES PROTEINS

Das Alignment zeigt deutlich die hohe Übereinstimmung der beiden homologen Proteinsequenzen. Es sind lediglich drei Polymorphismen zu sehen (rote Boxen). Bei zweien handelt es sich um einen einzelnen AS-Austausch. Der dritte Polymorphismus ergibt sich aus den unterschiedlichen Längen der beiden AS-Sequenzen. Blau hinterlegt ist die AS-Sequenz der Proto-Y-Variante von WD74-like, hellrot die Proto-X-Variante des Proteins WD74-like. Die Polymorphismen sind nicht in anderen Spezies überprüft worden.

6 Zusammenfassung

Das Geschlecht von *Chironomus* wird über männliche Heterogametie bestimmt. Bei dieser Form der Geschlechtsdetermination führt ein dominanter männchenbestimmender Faktor M zur Ausbildung des männlichen Geschlechts. Obwohl die meisten Chironomidenarten keine morphologisch unterscheidbaren Geschlechtschromosomen aufweisen, konnten anhand zytogenetischer Analysen die funktionellen Gonosomen in einigen Spezies identifiziert werden. So konnte die geschlechtsbestimmende Region, welche den Faktor M enthalten sollte, in *C. thummi* und *C. piger* auf Chromosom 3 Arm F lokalisiert werden. In *C. thummi* ist der Faktor M eng mit einem Cluster tandem-repetitiver Elemente (Cla-Elemente) assoziiert. Da es sich hier um ein frühes Stadium der Evolution von ehemals homomorphen zu heteromorphen Geschlechtschromosomen handelt, wird das den Faktor M tragende Chromosom auch als Proto-Y-Chromosom bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst analysiert, ob die Arten *C. thummi* und *C. piger* DNA- und bzw. oder Histon-Methylierungen aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass DNA-Methylierungen zumindest in basalen Mengen in beiden Arten vorkommen. Weiterhin wurden die Genome auf das Vorhandensein entsprechender DNA-Methylasen geprüft. Dabei konnten keine Sequenzhomologe zu den Methylasen DNMT1 und DNMT3 nachgewiesen werden, welche üblicherweise für die Etablierung sowie für den Erhalt funktionaler DNA-Methylierung zuständig sind. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *Chironomus* ein transkribiertes *DNMT2*-Homolog besitzt. Diese Befunde decken sich mit Erkenntnissen aus der Literatur, wonach auch die Genome anderer Dipterenarten, wie zum Beispiel *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* oder *Aedes aegypti*, zumindest in geringem Maße methyliert sind. Die beschriebenen Arten besitzen ebenfalls lediglich ein *DNMT2*-Homolog. Eventuelle geschlechtsgekoppelte DNA-Methylierungsmuster konnten jedoch ebenso wenig nachgewiesen werden, wie das Vorhandensein von Histon-Methylierungen in Form von H3K9. Es gibt demnach

keine Hinweise darauf, dass epigenetische Einflüsse bei der Geschlechtsdetermination von *Chironomus* eine Rolle spielen.

Gene aus der SDR, die als Kandidatengene für M in Frage kommen, wie die Gene *fs1(K10)-like* und *luc7(p)-like*, sollten mit Hilfe von RNA-Interferenz funktionell analysiert werden. Dazu konnten zunächst die beiden Gene *hunchback* und *orthodenticle/ocelliless* als Positivkontrollen für die RNAi-Versuchsreihen mit Erfolg verwendet werden. Die Injektionen von dsRNA gegen *fs1(K10)-like* oder *luc7(p)-like* hatten jedoch keine phänotypisch erkennbaren Veränderungen bei den behandelten Chironomiden zur Folge.

Weiterhin sollte die Sequenz des bestehenden Proto-Y-Chromosoms der SDR von *C. thummi* erweitert werden. Hierzu wurden zunächst erfolgreich *C. thummi*-Männchen mit *C. piger*-Weibchen verkreuzt. Das Genom eines Individuums aus diesem Kreuzungsstamm konnte mittels Hochdurchsatz-Technologien sequenziert werden. Die daraus erhaltenen Sequenzinformationen konnten nur teilweise dazu verwendet werden, den bestehenden Proto-Y-Contig zu erweitern. So war eine Verlängerung in distaler Richtung (Richtung Telomer) nicht möglich. Grund hierfür sind „geclustert“ vorliegende Cla-Elemente, die über eine Länge von ca. 20 kb in der Y-Chromosomen-spezifischen SDR von *C. thummi* auftreten. In Richtung des Zentromers konnte der Proto-Y-Chromosomen-spezifische SDR-Contig hingegen um ca. 3,5 kb verlängert werden. Der dadurch neu erhaltene Sequenzabschnitt enthält eine Y-Variante des Gens *WD74-like* sowie das 3'-Ende des Gens *luc7(p)-like*. Es konnten jedoch bisher keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede in dem neuen Sequenzabschnitt gefunden werden.

7 Ausblick

Um Näheres über den spezifischen Methylierungsgrad der DNA oder der Histone von *Chironomus* herauszufinden, sollten spezifische Sequenzierungen durchgeführt werden. Hier bietet sich zum einen die „Bisulfit-Sequenzierung“ an, welche eine Bestimmung von DNA-Methylierungen nach Reaktion der DNA mit Bisulfit umfasst. Sie besteht aus einer sogenannten Bisulfit-Konversion und einer anschließenden DNA-Sequenzierung. Mit ihr lassen sich quantitativ akkurate Aussagen treffen. Darüber hinaus besitzt die Bisulfit-Sequenzierung eine sehr geringe Nachweisgrenze, was für den vorliegenden Fall von großer Bedeutung sein sollte. Ein Nachteil der Methode ist jedoch der hohe bioinformatische Aufwand, den sie nach sich zieht. Zur näheren Charakterisierung des Methylierungszustands der Histone könnte etwa eine ChIP-Sequenzierung (ChIP für „Chromatin Immunoprecipitation“) mit Antikörpern gegen H3K9 durchgeführt werden.

Um die Funktionen der Gene aus der SDR von *Chironomus* zu analysieren, sind „knock-down“- oder „knock-out“-Versuche unumgänglich. Bei weiteren RNAi-Experimenten, sollten zum Beispiel anschließende RT-PCRs durchgeführt werden. Diese könnten dann zumindest Hinweise auf Erfolg oder Misserfolg der Interferenzen liefern, woraus sich weitere experimentelle Schritte ableiten lassen würden. Eine Alternative zur RNAi, bei der es sich um einen „knock-down“ der Genexpression handelt, stellt das CRISPR/Cas-System dar. Mit dieser Methode können gezielt Bereiche des Genoms herausgeschnitten werden, wodurch sich zum Beispiel spezielle Gene entfernen und somit deren Expression ausschalten lassen. Kandidaten(-Gene) für den Faktor M könnten so auf ihre eventuelle Rolle bei der Regulierung der Expression von *tra*, auf Auswirkungen auf den Doppelschalter *dsx*, oder unmittelbar auf ihre Rolle bei der Geschlechtsdetermination untersucht werden.

Die neuen Sequenzinformationen des Proto-Y-Chromosomen-spezifischen Contigs sollten zunächst verifiziert werden. Ein Mittel zur Verifizierung stellt zum Beispiel eine hochstringente PCR auf einen spezifischen Bereich der neu gewonnenen Proto-Y-Sequenz von *C. thummi*-Männchen dar. Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung ergibt sich aus Restriktionsstellen, die sich bei *C. thummi* zwischen dem Proto-X und Proto-Y unterscheiden. Verdauung von geschlechtsspezifischen genomischen DNAs mit anschließenden radioaktiven Southern-Hybridisierungen, sollten einen Aufschluss darüber geben können, ob die bioinformatisch erhaltenen neuen Proto-Y-Sequenzen der tatsächlichen Situation bei *C. thummi* entsprechen. Für eine detailliertere Analyse der Gene der SDR bietet sich außerdem das sogenannte „single molecule real-time sequencing“ (SMRT) an. Wie der Name verrät, werden bei Sequenzierungen, die auf einer solchen Technologie basieren, einzelne Moleküle am Stück sequenziert. Hierdurch lassen sich sehr lange zusammenhängende Sequenzen generieren. Solche Sequenzen – die mehrere zehn Kilobasen lang sein können – kombiniert mit der großen Datenmenge und der hohen Sequenziergenauigkeit der Illumina-Sequenzierung aus dieser Arbeit, sollten die Chancen erhöhen, eine vollständige Proto-Y-Sequenz zu erhalten, in der auch das hemizygote, *thummi*-Y-Chromosomen-spezifische Cla-Element-Cluster überspannt ist.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 EIN KONSERVIERTES PRINZIP DER GESCHLECHTSBESTIMMUNG INNERHALB DER HOLOMETABOLEN INSEKTEN	13
ABBILDUNG 2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GESCHLECHTSBESTIMMENDEN REGIONEN VON <i>C. THUMMI</i> UND <i>C. PIGER</i>	16
ABBILDUNG 3 UNTERSCHIEDE BEI DER DNMT-VERTEILUNG	21
ABBILDUNG 4 GENITALIMAGINALSCHEIBEN	24
ABBILDUNG 5 DOTBLOT ZUM NACHWEIS VON 5mC IN VERSCHIEDENEN DNA-PROBEN MITTELS ANTIKÖRPERN	42
ABBILDUNG 6 ANTIKÖRPER-NACHWEIS METHYLIERTER DNA UND METHYLIERTER HISTONE	44
ABBILDUNG 7 <i>LARGE GAP READ MAPPING</i> GEGEN DEN POTENTIELLEN GENBEREICH VON DNMT2	46
ABBILDUNG 8 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER PRODUKTE NACH PCR AUF GENOMISCHE DNA UND RT-PCR AUF <i>DNMT2</i>	47
ABBILDUNG 9 MULTIPLES ALIGNMENT DER DNMT2-PROTEINSEQUENZEN EINIGER INSEKTEN	48
ABBILDUNG 10 RAPD-PCR AUF UNGESEXTER DNA VON <i>C. THUMMI</i>	50
ABBILDUNG 11 RAPD-PCR AN GESEXTER UND MspI/HpaII-VERDAUTER DNA VON <i>C. THUMMI</i>	52
ABBILDUNG 12 GELBILD UND AUTORADIOGRAMM GESCHLECHTSSPEZIFISCHER UND MspI/HpaII-VERDAUTER DNA VON <i>C. THUMMI</i>	54
ABBILDUNG 13 GELBILD UND AUTORADIOGRAMM GESEXTER UND MspI/HpaII-VERDAUTER DNA VON <i>C. THUMMI</i> – SONDE <i>fs(1)K10-LIKE</i>	57
ABBILDUNG 14 POLYTÄNCHROMOSOMEN DER F1-GENERATION DER HYBRIDEN NACH ORCEIN-ESSIGSÄURE-FÄRBUNG	60
ABBILDUNG 15 FISH AN POLYTÄNCHROMOSOMEN VON MÄNNLICHEN KREUZUNGSHYBRIDEN	62
ABBILDUNG 16 EXEMPLARISCHES ERGEBNIS EINES BLASTn GEGEN DIE DATENBANK AUS ASSEMBLIERTEN „READS“ DER HYBRIDSEQUENZIERUNG	65
ABBILDUNG 17 VERGLEICH VON "CONTIG_3_ASM_K31_B150" MIT DEM STAMM-CONTIG " <i>CTHUMMI_MALE_2015_06_02</i> "	66
ABBILDUNG 18 ASSEMBLIERUNG DER GEBLASTETEN CONTIGS MIT DEM STAMM-CONTIG	66
ABBILDUNG 19 DOTPLOT EINES CLA-ELEMENTS GEGEN DEN STAMM-CONTIG " <i>CTHUMMI_MALE_2015_06_02</i> "	67
ABBILDUNG 20 BLASTX DES VERLÄNGERTEN PROTO-Y-CONTIGS	68
ABBILDUNG 21 „LARGE GAP READ MAPPING“ DER MÖGLICHEN VERLÄNGERUNG DES PROTO-Y-CONTIGS	69
ABBILDUNG 22 „LARGE GAP READ MAPPINGS“ DER MÖGLICHEN VERLÄNGERUNG MIT STRANGSPEZIFISCHEN RNA-SEQUENZEN	70
ABBILDUNG 23 ÜBERSICHT ÜBER DEN ERWEITERTEN Y-CHROMOSOMEN-SPEZIFISCHEN CONTIG VON <i>C. THUMMI</i> ...	72
ABBILDUNG 24 DOTPLOT DES VERLÄNGERTEN PROTO-Y-CONTIGS GEGEN DEN PROTO-X-CONTIG VON <i>C. THUMMI</i>	73
ABBILDUNG 25 WORKFLOW DER ERSTELLUNG DOPPELSTRÄNGIGER RNA.	75
ABBILDUNG 26 <i>CTH(HC)</i> - UND <i>CTH(OC)</i> -PHÄNOTYPEN NACH RNAi	77
ABBILDUNG 27 <i>CTH</i> -PHÄNOTYPEN MÄNNLICHER IMAGINALSCHEIBEN NACH RNAi GEGEN <i>fs(1)K10-LIKE</i>	80

ABBILDUNG 28 CTH-PHÄNOTYPEN WEIBLICHER IMAGINALSCHEIBEN NACH RNAI GEGEN FS(1)K10-LIKE	81
ABBILDUNG 29 GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER GESCHLECHTSVERTEILUNG <i>C. THUMMI</i> LARVEN NACH DSRNA- INJEKTION	83
ABBILDUNG 30 PHYLOGENETISCHE VERWANDSCHAFTSVERHÄLTNISSE VERSCHIEDENER ORGANISMEN AUF BASIS DES „TOOL KITS“ AN DNMT	91
ABBILDUNG 31 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EVOLUTION DER GESCHLECHTSCHROMOSOMEN DER KREUZUNGSHYBRIDEN	99
ABBILDUNG 32 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PROTO-Y-CONTIGS	102
ABBILDUNG 33 ALIGNMENT DER Y-VARIANTE DES PROTEINS WD74-LIKE MIT DER X-VARIANTE DES PROTEINS ...	105

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 STANDARD-PCR-ANSATZ.....	33
TABELLE 2 STANDARD-PCR-PROGRAMM	33
TABELLE 3 LIGATIONSANSATZ	34
TABELLE 4 ÜBERSICHT DER GENOMSEQUENZIERUNG DES MÄNNLICHEN KREUZUNGSHYBRIDEN.....	63
TABELLE 5 INJEKTIONEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER POSITIVKONTROLLEN <i>HUNCHBACK</i> UND <i>ORTHODENTICLE/OCELLILESS</i>	78
TABELLE 6 ÜBERSICHT ÜBER DIE GESCHLECHTSVERTEILUNG VON <i>C. THUMMI</i> -LARVEN NACH INJEKTION VON dsRNA	83

Literaturverzeichnis

- Achwal, C. W.; Iyer, C. A.; Chandra, H. S. (1983): Immunochemical evidence for the presence of 5mC, 6mA and 7mG in human, *Drosophila* and mealybug DNA. In: *FEBS Letters* 158 (2), S. 353–358.
- Adams, Julian; Rothman, Edward D.; Kerr, Warwick E.; Paulino, Zila L. (1977): ESTIMATION OF THE NUMBER OF SEX ALLELES AND QUEEN MATINGS FROM DIPLOID MALE FREQUENCIES IN A POPULATION OF APIS MELLIFERA. In: *Genetics* 86 (3), S. 583–596. Online verfügbar unter <http://www.genetics.org/content/86/3/583.full.pdf>.
- Allis, C. David; Berger, Shelley L.; Cote, Jacques; Dent, Sharon; Jenuwien, Thomas; Kouzarides, Tony et al. (2007): New Nomenclature for Chromatin-Modifying Enzymes. In: *Cell* 131 (4), S. 633–636. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.039.
- Armitage, P. D. (1997): *The Chironomidae. Biology and ecology of non-biting midges*. Reprinted. London: Chapman & Hall.
- Bachtadse (2012): Inhibition der Gensexpression in Embryonen von Chironomiden mittels siRNA.
- Bachtrog, Doris; Mank, Judith E.; Peichel, Catherine L.; Kirkpatrick, Mark; Otto, Sarah P.; Ashman, Tia-Lynn et al. (2014): Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? In: *PLoS Biol* 12 (7), e1001899. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001899.
- Becker, Maria; Muller, Sara; Nellen, Wolfgang; Jurkowski, Tomasz P.; Jeltsch, Albert; Ehrenhofer-Murray, Ann E. (2012): Pmt1, a Dnmt2 homolog in *Schizosaccharomyces pombe*, mediates tRNA methylation in response to nutrient signaling. In: *Nucleic Acids Research* 40 (22), S. 11648–11658. DOI: 10.1093/nar/gks956.
- Beermann, Wolfgang (1955a): Cytologische Analyse eines *Camptochironomus*-Arbastards. In: *Chromosoma* 7 (1), S. 198–259. DOI: 10.1007/BF00329725.
- Beermann, Wolfgang (1955b): Geschlechtsbestimmung und Evolution der genetischen Y-Chromosomen bei *Chironomus*. In: *Biologisches Zentralblatt* 1955 (74), S. 525–544.

- Bell, L. R.; Horabin, J. I.; Schedl, P.; Cline, T. W. (1991): Positive autoregulation of sex-lethal by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. In: *Cell* 65 (2), S. 229–239.
- Bell, O.; Conrad, T.; Kind, J.; Wirbelauer, C.; Akhtar, A.; Schubeler, D. (2008): Transcription-Coupled Methylation of Histone H3 at Lysine 36 Regulates Dosage Compensation by Enhancing Recruitment of the MSL Complex in *Drosophila melanogaster*. In: *Molecular and Cellular Biology* 28 (10), S. 3401–3409. DOI: 10.1128/MCB.00006-08.
- Bellés, Xavier (2010): Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. In: *Annual review of entomology* 55, S. 111–128. DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085301.
- Bewick, Adam J.; Vogel, Kevin J.; Moore, Allen J.; Schmitz, Robert J. (2016): Evolution of DNA Methylation across Insects. In: *Molecular biology and evolution*. DOI: 10.1093/molbev/msw264.
- Beye, Martin (2004): The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26 (10), S. 1131–1139. DOI: 10.1002/bies.20098.
- Beye, Martin; Hasselmann, Martin; Fondrk, M. Kim; Page, Robert E.; Omholt, Stig W. (2003): The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. In: *Cell* 114 (4), S. 419–429.
- Beye, Martin; Hunt, Greg J.; Page, Robert E.; Fondrk, M. Kim; Grohmann, Lore; Moritz, R. F. A. (1999): Unusually High Recombination Rate Detected in the Sex Locus Region of the Honey Bee (*Apis mellifera*). In: *Genetics* 153 (4), S. 1701–1708. Online verfügbar unter <http://www.genetics.org/content/153/4/1701.full>.
- Bierwirth, Sandra (2015): Transkriptanalyse von Entwicklungsgenen mittels in situHybridisierung bei *Chironomus*.
- Bird, Adrian (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. In: *Genes & Development* 16 (1), S. 6–21. DOI: 10.1101/gad.947102.
- Bird, Adrian (2007): Perceptions of epigenetics. In: *Nature* 447 (7143), S. 396–398. DOI: 10.1038/nature05913.

- Bopp, D.; Bell, L. R.; Cline, T. W.; Schedl, P. (1991): Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in *Drosophila melanogaster*. In: *Genes & Development* 5 (3), S. 403–415.
- Bopp, D.; Saccone, G.; Beye, M. (2014): Sex determination in insects: variations on a common theme. In: *Sexual development genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 8 (1-3), S. 20–28. DOI: 10.1159/000356458.
- Bopp, Daniel (2010): About females and males: continuity and discontinuity in flies. *Journal of Genetics*. In: *J Genet* 89 (3), S. 315–323. DOI: 10.1007/s12041-010-0043-9.
- Bramsen, Jesper B.; Laursen, Maria B.; Nielsen, Anne F.; Hansen, Thomas B.; Bus, Claus; Langkjær, Niels et al. (2009): A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. In: *Nucleic Acids Res* 37 (9), S. 2867–2881. DOI: 10.1093/nar/gkp106.
- Bridges, Calvin B. (1925): Sex in Relation to Chromosomes and Genes. In: *The American Naturalist* 59 (661), S. 127–137.
- Bull, James J. (1983a): Evolution of sex determining mechanisms. Reading, Mass.: Benjamin/Cummings Pub. Co (Evolution series, 1).
- Bull, James J. (1983b): Evolution of sex determining mechanisms. Menlo Park, Calif.: Benjamin/Cummings Pub. Co., Advanced Book Program (Evolution, 1).
- Burghardt, Geza; Hediger, Monika; Siegenthaler, Christina; Moser, Martin; Dübendorfer, Andreas; Bopp, Daniel (2005): The transformer2 gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. In: *Development genes and evolution* 215 (4), S. 165–176. DOI: 10.1007/s00427-004-0464-7.
- Burtis, K. C.; Baker, B. S. (1989): *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. In: *Cell* 56 (6), S. 997–1010.
- Buttel-Reepen, H. v. (1915): Die Parthenogenese bei der Honigbiene. In: Hugo Von (Hg.): *Leben und wesen der bienen*. [Place of publication not identified]: Springer, S. 35–45.

- Cedar, Howard; Bergman, Yehudit (2009): Linking DNA methylation and histone modification. Patterns and paradigms. In: *Nat Rev Genet* 10 (5), S. 295–304. DOI: 10.1038/nrg2540.
- Charlesworth, B. (1991): The evolution of sex chromosomes. In: *Science* 251 (4997), S. 1030–1033. DOI: 10.1126/science.1998119.
- Cho, Soochin; Huang, Zachary Y.; Green, Daniel R.; Smith, Deborah R.; Zhang, Jianzhi (2006): Evolution of the complementary sex-determination gene of honey bees: balancing selection and trans-species polymorphisms. In: *Genome research* 16 (11), S. 1366–1375. DOI: 10.1101/gr.4695306.
- Cline, T. W. (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. In: *Genetics* 119 (4), S. 829–862.
- Cline, T. W.; Meyer, B. J. (1996): Vive la difference: males vs females in flies vs worms. In: *Annual review of genetics* 30, S. 637–702. DOI: 10.1146/annurev.genet.30.1.637.
- Cline, Thomas W. (1984): AUTOREGULATORY FUNCTIONING OF A DROSOPHILA GENE PRODUCT THAT ESTABLISHES AND MAINTAINS THE SEXUALLY DETERMINED STATE. In: *Genetics* 107 (2), S. 231–277. Online verfügbar unter <http://www.genetics.org/content/107/2/231.full.pdf>.
- Cline, Thomas W. (1993): The *Drosophila* sex determination signal. How do flies count to two? In: *Trends in Genetics* 9 (11), S. 385–390. DOI: 10.1016/0168-9525(93)90138-8.
- Clynen, Elke; Ciudad, Laura; Bellés, Xavier; Piulachs, Maria-Dolors (2011): Conservation of fruitless' role as master regulator of male courtship behaviour from cockroaches to flies. *Development Genes and Evolution*. In: *Dev Genes Evol* 221 (1), S. 43–48. DOI: 10.1007/s00427-011-0352-x.
- Concha, Carolina; Scott, Maxwell J. (2009): Sexual Development in *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae) Is Controlled by the Transformer Gene. In: *Genetics* 182 (3), S. 785–798. DOI: 10.1534/genetics.109.100982.
- Cooper, D. N. (1983): Eukaryotic DNA methylation. Human Genetics. In: *Hum Genet* 64 (4), S. 315–333. DOI: 10.1007/BF00292363.

- Cronmiller, C.; Schedl, P.; Cline, T. W. (1988): Molecular characterization of daughterless, a *Drosophila* sex determination gene with multiple roles in development. In: *Genes & Development* 2 (12a), S. 1666–1676. DOI: 10.1101/gad.2.12a.1666.
- Denholm, I.; Franco, G. M.; G. Rubini, P.; Vecchi M. (1983): Identification of a male determinant on the X chromosome of housefly (*Musca domestica* L.) populations in South-East England. In: *Genetical Research* 42 (03), S. 311–322. DOI: 10.1017/S0016672300021790.
- Doerfler, W. (1983): DNA methylation and gene activity. In: *Annual review of biochemistry* 52, S. 93–124. DOI: 10.1146/annurev.bi.52.070183.000521.
- Dübendorfer, Andreas; Hediger, Monika; Burghardt, Geza; Bopp, Daniel (2002): *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. In: *The International journal of developmental biology* 46 (1), S. 75–79.
- Dzierzon, J. (1845): Gutachten über die von Hrn. Direktor Stöhr im ersten und zweiten Kapitel des General-Gutachtens aufgestellten Fragen. In: *Bienen-Zeitung* (1), 109-113, 119-121.
- Eirin-Lopez, Jose M.; Sanchez, Lucas (2015): The comparative study of five sex-determining proteins across insects unveils high rates of evolution at basal components of the sex determination cascade. In: *Development genes and evolution* 225 (1), S. 23–30. DOI: 10.1007/s00427-015-0491-6.
- Estes, P. A.; Keyes, L. N.; Schedl, P. (1995): Multiple response elements in the Sex-lethal early promoter ensure its female-specific expression pattern. In: *Mol. Cell. Biol.* 15 (2), S. 904–917. DOI: 10.1128/MCB.15.2.904.
- Falckenhayn, Cassandra; Carneiro, Vitor Coutinho; Mendonca Amarante, Anderson de; Schmid, Katharina; Hanna, Katharina; Kang, Seokyoung et al. (2016): Comprehensive DNA methylation analysis of the *Aedes aegypti* genome. In: *Scientific reports* 6, S. 36444. DOI: 10.1038/srep36444.
- Field, L. M.; Lyko, F.; Mandrioli, M.; Prantera, G. (2004): DNA methylation in insects. In: *Insect Molecular Biology* 13 (2), S. 109–115. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00470.x.
- Flintoft, Louisa (2007): An eXpanding view of DNA methylation. In: *Nat Rev Genet* 8 (4), S. 248. DOI: 10.1038/nrg2093.

- Fortes, P.; Bilbao-Cortes, D.; Fornerod, M.; Rigaut, G.; Raymond, W.; Seraphin, B.; Mattaj, I. W. (1999): Luc7p, a novel yeast U1 snRNP protein with a role in 5' splice site recognition. In: *Genes & Development* 13 (18), S. 2425–2438.
- Fuks, François (2005): DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. In: *Current opinion in genetics & development* 15 (5), S. 490–495. DOI: 10.1016/j.gde.2005.08.002.
- G. Franco, M.; G. Rubini, P.; M. Vecchi (1982): Sex-determinants and their distribution in various populations of *Musca domestica* L. of Western Europe. In: *Genetical Research* 40 (03), S. 279–293. DOI: 10.1017/S0016672300019157.
- Gabor Miklos, George L.; Maleszka, Ryszard (2011): Epigenomic communication systems in humans and honey bees: from molecules to behavior. In: *Hormones and behavior* 59 (3), S. 399–406. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2010.05.016.
- Gempe, Tanja; Beye, Martin (2011): Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33 (1), S. 52–60. DOI: 10.1002/bies.201000043.
- Gempe, Tanja; Hasselmann, Martin; Schjøtt, Morten; Hause, Gerd; Otte, Marianne; Beye, Martin (2009): Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. In: *PLoS biology* 7 (10), e1000222. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000222.
- Geuverink, E.; Beukeboom, L. W. (2013): Phylogenetic Distribution and Evolutionary Dynamics of the Sex Determination Genes doublesex and transformer in Insects. In: *Sex Dev* 8 (1-3), S. 38–49. DOI: 10.1159/000357056.
- GOLD - Genomes Online Database (2015): Genomes Online Database. Hg. v. Joint Genome Institute. The Regents of the University of California.
- Goll, Mary Grace; Kirpekar, Finn; Maggert, Keith A.; Yoder, Jeffrey A.; Hsieh, Chih-Lin; Zhang, Xiaoyu et al. (2006): Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. In: *Science (New York, N.Y.)* 311 (5759), S. 395–398. DOI: 10.1126/science.1120976.
- Goto, Tetsuya; Monk, Marilyn (1998): Regulation of X-Chromosome Inactivation in Development in Mice and Humans. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (2), S. 362–378.

Greciano, Patricia G.; Ruiz, Maria Fernanda; Kremer, Leonor; Goday, Clara (2009): Two new chromodomain-containing proteins that associate with heterochromatin in *Sciara coprophila* chromosomes. In: *Chromosoma* 118 (3), S. 361–376. DOI: 10.1007/s00412-009-0203-y.

Green, M. M. (1980): Transposable Elements in *Drosophila* and other Dipterans. In: *Annual review of genetics*, S. 109–120.

Gregory, Simon G. (2005): Contig Assembly. In: *Encyclopedia of life sciences*. London, New York: John Wiley & Sons.

Haag, Eric S.; Doty, Alana V. (2005): Sex Determination across Evolution: Connecting the Dots. In: *PLoS Biol* 3 (1), e21 EP -. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030021.

Haarlander, P.; Dzierzon, J.; Charles C. Miller Memorial Apicultural Library (1857): *Der Bienenfreund aus Oberbayern oder: Der untrügliche Wegweiser in der Bienenwelt: eine vollständige Unterweisung in der Behandlung der Bienen zu jeglicher Jahreszeit, so wie überhaupt zum vortheilhaftesten Betriebe der Bienenzucht nach der Methode des rühmlichst bekannten schlesischen Bienenvaters Dzierzon*: Central-Schulbücher-Verl. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=4J1bAAAAMAAJ>.

Hägele, K. (1977): Handbook of Genetics. In: *Evolution* 31 (2), S. 460–462. Online verfügbar unter <http://www.jstor.org/stable/2407774>.

Hägele, K. (1985a): Identification of a polytene chromosome band containing a male sex determiner of *Chironomus thummi thummi*. In: *Chromosoma* 1985 (91), S. 167–171.

Hägele, K. (1985b): Identification of a polytene chromosome band containing a male sex determiner of *Chironomus thummi thummi*. In: *Chromosoma* 1985 (91), S. 167–171.

Hall, Andrew Brantley; Basu, Sanjay; Jiang, Xiaofang; Qi, Yumin; Timoshevskiy, Vladimir A.; Biedler, James K. et al. (2015): SEX DETERMINATION. A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. In: *Science (New York, N.Y.)* 348 (6240), S. 1268–1270. DOI: 10.1126/science.aaa2850.

Hasselmann, Martin; Gempe, Tanja; Schiøtt, Morten; Nunes-Silva, Carlos Gustavo; Otte, Marianne; Beye, Martin (2008a): Evidence for the evolutionary nascence of a

- novel sex determination pathway in honeybees. In: *Nature* 454 (7203), S. 519–522. DOI: 10.1038/nature07052.
- Hasselmann, Martin; Vekemans, Xavier; Pflugfelder, Jochen; Koeniger, Nikolaus; Koeniger, Gudrun; Tingek, Salim; Beye, Martin (2008b): Evidence for convergent nucleotide evolution and high allelic turnover rates at the complementary sex determiner gene of Western and Asian honeybees. In: *Molecular biology and evolution* 25 (4), S. 696–708. DOI: 10.1093/molbev/msn011.
- Hastings, Michelle L.; Krainer, Adrian R. (2001): Pre-mRNA splicing in the new millennium. In: *Current Opinion in Cell Biology* 13 (3), S. 302–309. DOI: 10.1016/S0955-0674(00)00212-X.
- Heale, Bret S. E.; Soifer, Harris S.; Bowers, Chauncey; Rossi, John J. (2005): siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. In: *Nucleic Acids Research* 33 (3), e30. DOI: 10.1093/nar/gni026.
- Hediger, Monika; Burghardt, Géza; Siegenthaler, Christina; Buser, Nathalie; Hilfiker-Kleiner, Denise; Dübendorfer, Andreas; Bopp, Daniel (2004): Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator doublesex. In: *Development genes and evolution* 214 (1), S. 29–42. DOI: 10.1007/s00427-003-0372-2.
- Hediger, Monika; Henggeler, Caroline; Meier, Nicole; Perez, Regina; Saccone, Giuseppe; Bopp, Daniel (2010): Molecular Characterization of the Key Switch F Provides a Basis for Understanding the Rapid Divergence of the Sex-Determining Pathway in the Housefly. In: *Genetics* 184 (1), S. 155–170. DOI: 10.1534/genetics.109.109249.
- Hedley, M. L.; Maniatis, T. (1991): Sex-specific splicing and polyadenylation of dsx pre-mRNA requires a sequence that binds specifically to tra-2 protein in vitro. In: *Cell* 65 (4), S. 579–586.
- Hermann, Andrea; Schmitt, Sigrid; Jeltsch, Albert (2003): The Human Dnmt2 Has Residual DNA-(Cytosine-C5) Methyltransferase Activity. In: *J. Biol. Chem.* 278 (34), S. 31717–31721. DOI: 10.1074/jbc.M305448200.
- Herold, Thomas (2012): Vergleichende Analyse der Gene und der Genomstruktur der geschlechtsbestimmenden Chromosomenregion von *Chironomus* und *Camptochironomus*.

- Hickerson, R. P.; Vlassov, A. V.; Wang, Q.; Leake, D.; Ilves, H.; Gonzalez-Gonzalez, E. et al. (2008): Stability Study of Unmodified siRNA and Relevance to Clinical Use. In: *Oligonucleotides* 18 (4), S. 345–354. DOI: 10.1089/oli.2008.0149.
- Hiroyoshi (1964): Sex-limited inheritance and abnormal sex ratio in strains of housefly. In: *Genetics* 50, S. 373–385.
- Hoshijima, K.; Inoue, K.; Higuchi, I.; Sakamoto, H.; Shimura, Y. (1991): Control of doublesex alternative splicing by transformer and transformer-2 in *Drosophila*. In: *Science (New York, N.Y.)* 252 (5007), S. 833–836.
- Hu, Xu; Richtman, Nina M.; Zhao, Jian-Zhou; Duncan, Keith E.; Niu, Xiping; Procyk, Lisa A. et al. (2016): Discovery of midgut genes for the RNA interference control of corn rootworm. In: *Scientific reports* 6, S. 30542. DOI: 10.1038/srep30542.
- Hung, Ming-Shiu; Karthikeyan, Narayanan; Huang, Bauling; Koo, Hshi-Chi; Kiger, John; Shen, C.-K. James (1999): *Drosophila* proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. In: *PNAS* 96 (21), S. 11940–11945. DOI: 10.1073/pnas.96.21.11940.
- Hurst, Laurence D.; Peck, Joel R. (1996): Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. In: *Trends in Ecology & Evolution* 11 (2), S. 46–52. DOI: 10.1016/0169-5347(96)81041-X.
- Illumina (2015): Illumina Sequencing Methods. Hg. v. Illumina Inc. Online verfügbar unter <http://www.illumina.com>.
- Inoue, Hiroaki; Hiroyoshi, Toshiki (1982): A male-determining factor on autosome 1 and occurrence of male-recombination in the housefly, *Musca domestica* L. In: *Jpn J Genet.* 57 (3), S. 221–229. DOI: 10.1266/jjg.57.221.
- Inoue, K.; Hoshijima, K. (1984): Mapping of autosomal male-determining factors of the housefly, *Musca domestica* L., by using a female-determining factor. In: *Jpn J Genet.* 59 (5), S. 453–464. DOI: 10.1266/jjg.59.453.
- Jason W Myers*, Jen-Tsan Chi, Delquin Gong, Marci E Schaner, Patrick O Brown and James E Ferrell Jr (2006): Minimizing off-target effects by using diced siRNAs for RNA interference. In: *Journal of RNAi and Gene Silencing*. Online verfügbar unter <http://www.alliedacademies.org/journal-of-rnai-and-gene-silencing/minimizing-offtarget-effects-by-using-diced-sirnas-for-rna-interference.pdf>.

- Jeltsch, Albert; Ehrenhofer-Murray, Ann; Jurkowski, Tomasz P.; Lyko, Frank; Reuter, Gunter; Ankri, Serge et al. (2016): Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. In: *RNA biology*, S. 1–16. DOI: 10.1080/15476286.2016.1191737.
- Jeltsch, Albert; Nellen, Wolfgang; Lyko, Frank (2006): Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. In: *Trends in biochemical sciences* 31 (6), S. 306–308. DOI: 10.1016/j.tibs.2006.04.005.
- Jenuwein, T.; Allis, C. D. (2001): Translating the histone code. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (5532), S. 1074–1080. DOI: 10.1126/science.1063127.
- Kajitani, Rei; Toshimoto, Kouta; Noguchi, Hideki; Toyoda, Atsushi; Ogura, Yoshitoshi; Okuno, Miki et al. (2014): Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. In: *Genome research* 24 (8), S. 1384–1395. DOI: 10.1101/gr.170720.113.
- Kania, M. A.; Bonner, A. S.; Duffy, J. B.; Gergen, J. P. (1990): The *Drosophila* segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. In: *Genes & Development* 4 (10), S. 1701–1713.
- Kato, Yasuhiko; Kobayashi, Kaoru; Watanabe, Hajime; Iguchi, Taisen (2011): Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a Doublesex gene in the sex-determining pathway. In: *PLoS genetics* 7 (3), e1001345. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001345.
- Kelley, Joanna L.; Peyton, Justin T.; Fiston-Lavier, Anna-Sophie; Teets, Nicholas M.; Yee, Muh-Ching; Johnston, J. Spencer et al. (2014): Compact genome of the Antarctic midge is likely an adaptation to an extreme environment. In: *Nature Communications* 5. DOI: 10.1038/ncomms5611.
- Keyl, H.-G. (1962): Chromosomen evolution bei *Chironomus*. In: *Chromosoma* 13 (4), S. 464–514. DOI: 10.1007/BF00327342.
- Keyl, H.-G. (1965): Duplikationen von Untereinheiten der chromosomalen DNS während der Evolution von *Chironomus thummi*. In: *Chromosoma* 17 (2), S. 139–180. DOI: 10.1007/BF00330079.

- Khvorova, Anastasia; Reynolds, Angela; Jayasena, Sumedha D. (2003): Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. In: *Cell* 115 (2), S. 209–216. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00801-8.
- Kim, Jae Young (2015): Current Prospects of RNA Interference-based Therapy in Organ Transplantation.
- Kim, M.; Sim, C.; Denlinger, D. L. (2010): RNA interference directed against ribosomal protein S3a suggests a link between this gene and arrested ovarian development during adult diapause in *Culex pipiens*. In: *Insect Molecular Biology* 19 (1), S. 27–33. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2009.00926.x.
- Klomp, Jeff; Athy, Derek; Kwan, Chun Wai; Bloch, Natasha I.; Sandmann, Thomas; Lemke, Steffen; Schmidt-Ott, Urs (2015): Embryo development. A cysteine-clamp gene drives embryo polarity in the midge *Chironomus*. In: *Science (New York, N.Y.)* 348 (6238), S. 1040–1042. DOI: 10.1126/science.aaa7105.
- Koboldt, Daniel C.; Steinberg, Karyn Meltz; Larson, David E.; Wilson, Richard K.; Mardis, Elaine R. (2013): The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. In: *Cell* 155 (1), S. 27–38. DOI: 10.1016/j.cell.2013.09.006.
- Kondrashov, Alexey S. (1988): Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. In: *Nature* 336 (6198), S. 435–440. DOI: 10.1038/336435a0.
- Kraemer, C.; Schmidt, E. R. (1993): The sex determining region of *Chironomus thummi* is associated with highly repetitive DNA and transposable elements. In: *Chromosoma* 102 (8), S. 553–562.
- Kunert, Natascha; Marhold, Joachim; Stanke, Jonas; Stach, Dirk; Lyko, Frank (2003): A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. In: *Development (Cambridge, England)* 130 (21), S. 5083–5090. DOI: 10.1242/dev.00716.
- Kurreck, Jens (2009): RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (8), S. 1378–1398. DOI: 10.1002/anie.200802092.
- Kutsenko, Alexey; Svensson, Thomas; Nystedt, Björn; Lundeberg, Joakim; Björk, Petra; Sonnhammer, Erik et al. (2014): The *Chironomus tentans* genome sequence and the organization of the Balbiani ring genes. In: *BMC Genomics* 15 (1), S. 819. DOI: 10.1186/1471-2164-15-819.

- Law, Julie A.; Jacobsen, Steven E. (2010): Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. In: *Nature Reviews Genetics* 11 (3), S. 204–220. DOI: 10.1038/nrg2719.
- Lerat, E. (2010): Identifying repeats and transposable elements in sequenced genomes: how to find your way through the dense forest of programs. In: *Heredity* 104 (6), S. 520–533. DOI: 10.1038/hdy.2009.165.
- Lloyd, David G. (1980): Benefits and Handicaps of Sexual Reproduction. In: Max K Hecht, William C Steere und Bruce Wallace (Hg.): *Evolutionary Biology*: Springer US, S. 69–111.
- Lucchini, J. C.; Kelly, W. G.; Panning, B. (2005): Chromatin remodeling in dosage compensation. In: *Annual review of genetics* 39, S. 615–651. DOI: 10.1146/annurev.genet.39.073003.094210.
- Luger, K.; Mader, A. W.; Richmond, R. K.; Sargent, D. F.; Richmond, T. J. (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. In: *Nature* 389 (6648), S. 251–260. DOI: 10.1038/38444.
- Luger, Karolin; Richmond, Timothy J. (1998): DNA binding within the nucleosome core. In: *Current Opinion in Structural Biology* 8 (1), S. 33–40. DOI: 10.1016/S0959-440X(98)80007-9.
- Lyko, Frank; Maleszka, Ryszard (2011): Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. In: *Trends in genetics : TIG* 27 (4), S. 127–131. DOI: 10.1016/j.tig.2011.01.003.
- Lyko, Frank; Whittaker, Allyson J.; Orr-Weaver, Terry L.; Jaenisch, Rudolf (2000): The putative *Drosophila* methyltransferase gene *dDnmt2* is contained in a transposon-like element and is expressed specifically in ovaries. In: *Mechanisms of Development* 95 (1-2), S. 215–217. DOI: 10.1016/S0925-4773(00)00325-7.
- Madalena, Christiane Rodriguez Gutierrez; Amabis, Jose Mariano; Stocker, Ann Jacob; Gorab, Eduardo (2007): The localization of ribosomal DNA in Sciaridae (Diptera: Nematocera) reassessed. In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 15 (4), S. 409–416. DOI: 10.1007/s10577-007-1127-0.
- Madalena, Christiane Rodriguez Gutierrez; Diez, Jose Luis; Gorab, Eduardo (2012): Chromatin structure of ribosomal RNA genes in dipterans and its

- relationship to the location of nucleolar organizers. In: *PloS one* 7 (8), e44006. DOI: 10.1371/journal.pone.0044006.
- Mainx, F. (1964): The Genetics of *Megaselia scalaris* Loew (Phoridae): A New Type of Sex Determination in Diptera. In: *American Naturalist - AMER NATURALIST* 98 (903). DOI: 10.1086/282336.
- Mandrioli, M. (2007): A new synthesis in epigenetics: towards a unified function of DNA methylation from invertebrates to vertebrates. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64 (19-20), S. 2522–2524. DOI: 10.1007/s00018-007-7231-7.
- Marhold, J.; Rothe, N.; Pauli, A.; Mund, C.; Kuehle, K.; Brueckner, B.; Lyko, F. (2004): Conservation of DNA methylation in dipteran insects. In: *Insect Molecular Biology* 13 (2), S. 117–123. DOI: 10.1111/j.0962-1075.2004.00466.x.
- Marshall Graves, Jennifer A. (2008): Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. In: *Annual review of genetics* 42, S. 565–586. DOI: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091714.
- Martin, J. (2010): A phylogenetic analysis of the change in genomic location of the sex determining region in the genus *Chironomus* (Diptera: Chironomidae). In: *VOGiS Herald* (14), S. 62–69.
- Martin, J.; Lee, B.T.O (1988): Sex determiners and speciation in the genus *Chironomus* (42), S. 51–55.
- Martin, Jon; Kuvangkadilok, Chaliow; Peart, Dianne H.; Lee, Barry T. O. (1980): Multiple sex determining regions in a group of related *Chironomus* species (Diptera. Chironomidae). In: *Heredity* 44 (3), S. 367–382. DOI: 10.1038/hdy.1980.34.
- Martin, Jon; Lee, B.T.O (2000): Sex determination in *Chironomus* and the *Drosophila* paradigm. In: *Proceedings of XIII International Chironomid Symposium*, S. 177–181.
- Martin, Jon; Lee, B.T.O. (1984): A phylogenetic study of sex determiner location in a group of Australasian *Chironomus* species (Diptera, Chironomidae). *Chromosoma*. In: *Chromosoma* 90 (3), S. 190–197. DOI: 10.1007/BF00292396.
- McCormack, John E.; Hird, Sarah M.; Zellmer, Amanda J.; Carstens, Bryan C.; Brumfield, Robb T. (2013): Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. In: *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66 (2), S. 526–538. DOI: 10.1016/j.ympev.2011.12.007.

- McDonald, I. c.; Evenson, P.; Nickel, C. A.; Johnson, O. A. (1978): House Fly Genetics: Isolation of a Female Determining Factor on Chromosome 4. In: *Annals of the Entomological Society of America* 71 (5), S. 692–694.
- McStay, Brian; Grummt, Ingrid (2008): The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. In: *Annual review of cell and developmental biology* 24, S. 131–157. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175259.
- Meehan, R.; Lewis, J.; Cross, S.; Nan, X.; Jeppessen, P.; Bird, A. (1992): Transcriptional repression by methylation of CpG. In: *Journal of Cell Science* 1992 (Supplement 16), S. 9–14. DOI: 10.1242/jcs.1992.Supplement_16.2.
- Nwokeoji, Alison O.; Kung, An-Wen; Kilby, Peter M.; Portwood, David E.; Dickman, Mark J. (2017): Purification and characterisation of dsRNA using ion pair reverse phase chromatography and mass spectrometry. In: *Journal of Chromatography A* 1484, S. 14–25. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.12.062.
- O'Neil, M. T.; Belote, J. M. (1992): Interspecific Comparison of the Transformer Gene of *Drosophila* Reveals an Unusually High Degree of Evolutionary Divergence. In: *Genetics* 131 (1), S. 113–128.
- Pacific Biosciences (2015): PacBio Systems. Hg. v. Pacific Biosciences of California Inc. Online verfügbar unter <http://www.pacb.com>.
- Pardu, M. L.; Gerbi, S. A.; Eckhardt, R. A.; Gall, J. G. (1970): Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. In: *Chromosoma* 29 (3), S. 268–290.
- Peng, Jiamy C.; Karpen, Gary H. (2007): H3K9 methylation and RNA interference regulate nucleolar organization and repeated DNA stability. In: *Nature cell biology* 9 (1), S. 25–35. DOI: 10.1038/ncb1514.
- Pultz, M. A.; Baker, B. S. (1995): The dual role of hermaphrodite in the *Drosophila* sex determination regulatory hierarchy. In: *Development* 121 (1), S. 99–111.
- Raddatz, Gunter; Guzzardo, Paloma M.; Olova, Nelly; Fantappie, Marcelo Rosado; Rampp, Markus; Schaefer, Matthias et al. (2013): Dnmt2-dependent methylomes lack defined DNA methylation patterns. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (21), S. 8627–8631. DOI: 10.1073/pnas.1306723110.

- Rasmussen, Joseph B. (1984): Comparison of gut contents and assimilation efficiency of fourth instar larvae of two coexisting chironomids, *Chironomus riparius* Meigen and *Glyptotendipes paripes* (Edwards). In: *Can. J. Zool.* 62 (6), S. 1022–1026. DOI: 10.1139/z84-145.
- Regev, A.; Lamb, M.; Jablonka, E. (1998a): The Role of DNA Methylation in Invertebrates: Developmental Regulation or Genome Defense? In: *Mol Biol Evol* 15 (7), S. 880–891.
- Regev, A.; Lamb, M.; Jablonka, E. (1998b): The Role of DNA Methylation in Invertebrates: Developmental Regulation or Genome Defense? In: *Mol Biol Evol* 15 (7), S. 880–891.
- Rempel, J. G.; Naylor, J. M.; Rothfels, K.; Ottonen, B. (1962): THE SEX CHROMOSOME CONSTITUTION OF CHIRONOMID INTERSEXES PARASITIZED BY NEMATODES. In: *Can. J. Genet. Cytol.* 4 (1), S. 92–96. DOI: 10.1139/g62-013.
- Richards, Stephen; Gibbs, Richard A.; Weinstock, George M.; Brown, Susan J.; Denell, Robin; Beeman, Richard W. et al. (2008): The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. In: *Nature* 452 (7190), S. 949–955. DOI: 10.1038/nature06784.
- Robertson, Keith (2002): DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. In: *Oncogene* 21 (35), S. 5361–5379. DOI: 10.1038/sj.onc.1205609.
- Rödig, Jens (2013): Vergleichende Analyse der Methylierungsmuster von *Chironomus thummi* und *Chironomus piger* 2013.
- Rosenberg, Miriam I.; Lynch, Jeremy A.; Desplan, Claude (2009): Heads and tails: evolution of antero-posterior patterning in insects. In: *Biochimica et biophysica acta* 1789 (4), S. 333–342. DOI: 10.1016/j.bbagr.2008.09.007.
- Ross, R.; Hankeln, T.; Schmidt, E. R. (1997): Complex evolution of tandem-repetitive DNA in the *Chironomus thummi* species group. In: *Journal of molecular evolution* 44 (3), S. 321–326.
- Russo, V. E. A.; Martienssen, R. A.; Riggs, D. A. (1997): *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Edited by V. E. A. Russo, R. A. Martienssen and A. D. Riggs. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996. 693+xii

- pages. Price \$125. ISBN 0 87969 490 4. In: *Genetical Research* 69 (02), S. 159–162. Online verfügbar unter http://journals.cambridge.org/article_S0016672397229320.
- Salzberg, Adi; Fisher, Ohad; Siman-Tov, Rama; Ankri, Serge (2004): Identification of methylated sequences in genomic DNA of adult *Drosophila melanogaster*. In: *Biochemical and biophysical research communications* 322 (2), S. 465–469. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.134.
- Sánchez, L.; Nöthiger, R. (1983): Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: production of male clones in XX females. In: *The Embo Journal* 2 (4), S. 485–491.
- Sánchez, Lucas (2008): Sex-determining mechanisms in insects. In: *The International journal of developmental biology* 52 (7), S. 837–856. DOI: 10.1387/ijdb.0723961s.
- Schaefer, Jutta; Schmidt, Erwin R. (1981): Different repetition frequencies of a 120 base-pair DNA-element and its arrangement in *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. *Chromosoma*. In: *Chromosoma* 84 (1), S. 61–66. DOI: 10.1007/BF00293363.
- Schaefer, Matthias; Lyko, Frank (2010): Solving the Dnmt2 enigma. In: *Chromosoma* 119 (1), S. 35–40. DOI: 10.1007/s00412-009-0240-6.
- Schmidt, E. R. (1984): Clustered and interspersed repetitive DNA sequence family of *Chironomus*. The nucleotide sequence of the Cla-elements and of various flanking sequences. In: *Journal of Molecular Biology* 178 (1), S. 1–15.
- Schmidt, E. R.; Vistorin, Gerda; Keyl, H.-G (1980): An AT-rich DNA component in the genomes of *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. In: *Chromosoma* 76 (1), S. 35–45. DOI: 10.1007/BF00292224.
- Schmidt, Erwin R.; Godwin, E. A. (1984): The nucleotide sequence of an unusual non-transcribed spacer and its ancestor in the rDNA in *Chironomus thummi*.
- 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. In: *Genetics* 145 (1), S. 173–183. Online verfügbar unter <http://www.genetics.org/content/145/1/173.full.pdf>.
- Schuett, C.; Noethiger, R. (2000): Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. In: *Development (Cambridge, England)* 127 (4), S. 667–677.

- Schurko, Andrew M. (2012): To “Bee or Not to Bee” Male or Female? An Educational Primer for Use with “The Am-tra2 Gene Is an Essential Regulator of Female Splice Regulation at Two Levels of the Sex Determination Hierarchy of the Honeybee”. In: *Genetics* 193 (4), S. 1019–1023. DOI: 10.1534/genetics.113.150417.
- Sciabica, Kathryn S.; Hertel, Klemens J. (2006): The splicing regulators Tra and Tra2 are unusually potent activators of pre-mRNA splicing. In: *Nucleic Acids Research* 34 (22), S. 6612–6620. DOI: 10.1093/nar/gkl984.
- Serano, T. L.; Karlin-McGinness, M.; Cohen, R. S. (1995): The role of fs(1)K10 in the localization of the mRNA of the TGF alpha homolog gurken within the Drosophila oocyte. In: *Mechanisms of Development* 51 (2-3), S. 183–192.
- Shanmugam, Raghuvaran; Fierer, Jacob; Kaiser, Steffen; Helm, Mark; Jurkowski, Tomasz P.; Jeltsch, Albert (2015): Cytosine methylation of tRNA-Asp by DNMT2 has a role in translation of proteins containing poly-Asp sequences. In: *Cell Discov.* 1, S. 15010. DOI: 10.1038/celldisc.2015.10.
- Shearer, Lindsay A.; Anderson, Lorinda K.; Jong, Hans de; Smit, Sandra; Goicoechea, José Luis; Roe, Bruce A. et al.: Fluorescence In Situ Hybridization and Optical Mapping to Correct Scaffold Arrangement in the Tomato Genome. In: *G3* 4 (8), S. 1395–1405. DOI: 10.1534/g3.114.011197.
- Shukla, Jayendra Nath; Palli, Subba Reddy (2012): Sex determination in beetles: production of all male progeny by parental RNAi knockdown of transformer. In: *Scientific reports* 2, S. 602. DOI: 10.1038/srep00602.
- Smith, T. F.; Gaitatzes, C.; Saxena, K.; Neer, E. J. (1999): The WD repeat: a common architecture for diverse functions. In: *Trends in biochemical sciences* 24 (5), S. 181–185.
- Steinmann-Zwicky, Monica; Schmid, Helen; Nöthiger, Rolf (1989): Cell-autonomous and inductive signals can determine the sex of the germ line of Drosophila by regulating the gene Sxl. In: *Cell* 57 (1), S. 157–166. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90181-5.
- Stiehl, Regina (2009): Diplomarbeit.
- Stiehl, Regina (2016): Kandidatengene für den männchendominanten geschlechtsbestimmenden Faktor M bei Chironomus thummi und Chironomus piger. Dissertation.

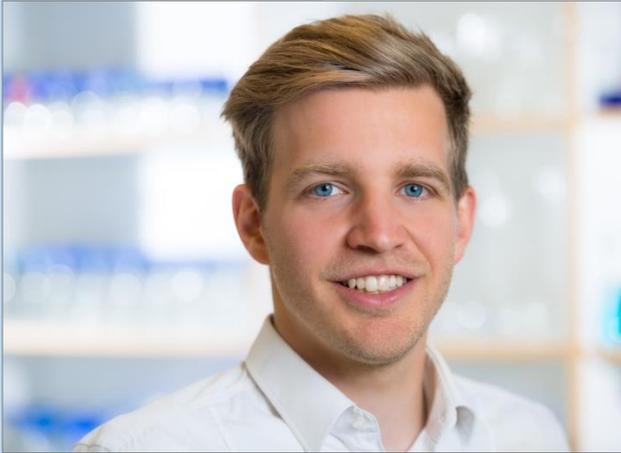
- Strogantsev, Ruslan; Ferguson-Smith, Anne C. (2012): Proteins involved in establishment and maintenance of imprinted methylation marks. In: *Briefings in functional genomics* 11 (3), S. 227–239. DOI: 10.1093/bfgp/els018.
- Takayama, Sachiko; Dhahbi, Joseph; Roberts, Adam; Mao, Guanxiong; Heo, Seok-Jin; Pachter, Lior et al. (2014): Genome methylation in *D. melanogaster* is found at specific short motifs and is independent of DNMT2 activity. In: *Genome research* 24 (5), S. 821–830. DOI: 10.1101/gr.162412.113.
- Thompson, Peter E. (1971): MALE AND FEMALE HETEROGAMETY IN POPULATIONS OF CHIRONOMUS TENTANS (DIPTERA. CHIRONOMIDAE). In: *Can. Entomol.* 103 (3), S. 369–372. DOI: 10.4039/Ent103369-3.
- Traut, W. (1994): Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. In: *Genetics* 136 (3), S. 1097–1104. Online verfügbar unter <http://www.genetics.org/content/136/3/1097.full.pdf>.
- Traut, W.; Sahara, K.; Marec, F. (2007): Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. In: *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 1 (6), S. 332–346. DOI: 10.1159/000111765.
- Traut, W.; Willhoeft, U. (1990): A jumping sex determining factor in the fly *Megaselia scalaris*. In: *Chromosoma* (99), S. 407–412.
- Tuorto, Francesca; Liebers, Reinhard; Musch, Tanja; Schaefer, Matthias; Hofmann, Sarah; Kellner, Stefanie et al. (2012): RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. In: *Nature structural & molecular biology* 19 (9), S. 900–905. DOI: 10.1038/nsmb.2357.
- Turner, Bryan M. (2009): Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 364 (1534), S. 3403–3418. DOI: 10.1098/rstb.2009.0125.
- Tweedie, S.; Ng, H. H.; Barlow, A. L.; Turner, B. M.; Hendrich, B.; Bird, A. (1999): Vestiges of a DNA methylation system in *Drosophila melanogaster*? In: *Nature Genetics* 23 (4), S. 389–390. DOI: 10.1038/70490.
- van Dijk, Erwin L.; Auger, Hélène; Jaszczyszyn, Yan; Thermes, Claude (2014): Ten years of next-generation sequencing technology. In: *Trends in Genetics* 30 (9), S. 418–426. DOI: 10.1016/j.tig.2014.07.001.

- Verhulst, Eveline C.; van de Zande, Louis (2015): Double nexus-Doublesex is the connecting element in sex determination. In: *Briefings in functional genomics*. DOI: 10.1093/bfgp/elv005.
- Verhulst, Eveline C.; van de Zande, Louis; Beukeboom, Leo W. (2010): Insect sex determination: it all evolves around transformer. In: *Current opinion in genetics & development* 20 (4), S. 376–383. DOI: 10.1016/j.gde.2010.05.001.
- Waddington, C. H. (1942): The Epigenotype. In: *Int. J. Epidemiol.* 41 (1), S. 10–13. DOI: 10.1093/ije/dyr184.
- Waddington, C. H. (1957): The strategy of the genes a discussion of some aspects of theoretical biology. London: Allen & Unwin. Online verfügbar unter <http://worldcatlibraries.org/wcpa/oclc/1491605>.
- Wang, Ying; Jorda, Mireia; Jones, Peter L.; Maleszka, Ryszard; Ling, Xu; Robertson, Hugh M. et al. (2006): Functional CpG Methylation System in a Social Insect. In: *Science* 314 (5799), S. 645–647. DOI: 10.1126/science.1135213.
- Weber, R. E. Y. (1980): Functions of Invertebrate Hemoglobins with Special Reference to Adaptations to Environmental Hypoxia. In: *Integr Comp Biol* 20 (1), S. 79–101. DOI: 10.1093/icb/20.1.79.
- Wedd, Laura; Maleszka, Ryszard (2016): DNA Methylation and Gene Regulation in Honeybees: From Genome-Wide Analyses to Obligatory Epialleles. In: *Advances in experimental medicine and biology* 945, S. 193–211. DOI: 10.1007/978-3-319-43624-1_9.
- Weinstock, George M.; Robinson, Gene E.; investigators, Principal; Gibbs, Richard A.; coordination, Community; Worley, Kim C. et al. (2006): Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. In: *Nature* 443 (7114), S. 931–949. DOI: 10.1038/nature05260.
- Werren, John H.; Richards, Stephen; Desjardins, Christopher A.; Niehuis, Oliver; Gadau, Jurgen; Colbourne, John K. et al. (2010): Functional and evolutionary insights from the genomes of three parasitoid *Nasonia* species. In: *Science (New York, N.Y.)* 327 (5963), S. 343–348. DOI: 10.1126/science.1178028.
- Whiting, P. W. (1943): Multiple Alleles in Complementary Sex Determination of *Habrobracon*. In: *Genetics* 28 (5), S. 365–382.

- Wilkins, A. S. (1995): Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 17 (1), S. 71–77. DOI: 10.1002/bies.950170113.
- Wülker, Wolfgang; Götz, Peter (1968): Die Verwendung der Imaginalscheiben zur Bestimmung des Entwicklungszustandes von Chironomus-larven (Dipt.). In: *Z. Morph. Tiere (Zeitschrift für Morphologie der Tiere)* 62 (4), S. 363–388. DOI: 10.1007/BF00401562.
- Yan, Hua; Bonasio, Roberto; Simola, Daniel F.; Liebig, Jürgen; Berger, Shelley L.; Reinberg, Danny (2015): DNA methylation in social insects: how epigenetics can control behavior and longevity. In: *Annual review of entomology* 60, S. 435–452. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-020803.
- Ye, Junqiang; Eickbush, Thomas H. (2006): Chromatin structure and transcription of the R1- and R2-inserted rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. In: *Molecular and Cellular Biology* 26 (23), S. 8781–8790. DOI: 10.1128/MCB.01409-06.
- Yoder, J. (1998): A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. In: *Human Molecular Genetics* 7 (2), S. 279–284. DOI: 10.1093/hmg/7.2.279.
- Yokoyama, Shozo; Nei, Masatoshi (1979): POPULATION DYNAMICS OF SEX-DETERMINING ALLELES IN HONEY BEES AND SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES IN PLANTS. In: *Genetics* 91 (3), S. 609–626. Online verfügbar unter <http://www.genetics.org/content/91/3/609.full.pdf>.
- Yu, L.; Gaitatzes, C.; Neer, E.; Smith, T. F. (2000): Thirty-plus functional families from a single motif. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 9 (12), S. 2470–2476. DOI: 10.1110/ps.9.12.2470.
- Zemach, Assaf; McDaniel, Ivy E.; Silva, Pedro; Zilberman, Daniel (2010a): Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. In: *Science (New York, N.Y.)* 328 (5980), S. 916–919. DOI: 10.1126/science.1186366.
- Zemach, Assaf; McDaniel, Ivy E.; Silva, Pedro; Zilberman, Daniel (2010b): Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. In: *Science* 328 (5980), S. 916–919. DOI: 10.1126/science.1186366.

Anhang

Alle in dieser Arbeit angegebenen und beschriebenen Dateien befinden sich im beigefügten, elektronischen Anhang.



NICHOLAS BACHTADSE

DIPLOM-BIOLOGE

PERSÖNLICHE DATEN

Nicholas Bachtadse
Große Bleiche 38-40
55116 Mainz
+49 (0)179 9208190
nickbachtadse@gmail.com

Geburtsdatum

- 29.11.1984

Geburtsort

- Ann Arbor (Michigan, USA)

Nationalitäten

- Deutsch
- US-amerikanisch

Familienstand

- ledig

BERUFSPRAXIS

seit 10/2016

Olbricht Patentanwälte

- Patentreferent

10/2012 - 09/2015

Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Molekulargenetik

- **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
- Eigenständige Forschungsarbeit
- Verantwortlich für Lehre und Betreuung von Studierenden
- Etablierung und Beaufsichtigung von Diplom-, Bachelor- und Masterarbeiten
- Stv. Strahlenschutzbeauftragter; Grundkurs „Strahlenschutz“ (nach Fachkundegruppen S 2.3 und S 4.2)
- Fortbildung „Sicherheit in der Gentechnik“

01/2010 – 03/2012

Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Molekulargenetik

- **Wissenschaftliche Hilfskraft**
- Betreuung von Studierenden in Grund- und Fortgeschrittenenpraktika
- Organisation und Leitung der Kurstage

04/2009 - 08/2012

Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für spezielle Botanik

- **Wissenschaftliche Hilfskraft**
- Betreuung von Studierenden in Grundpraktika
- Wöchentliches Tutorium
- Vorbereitung und Organisation der Kurstage

AUSBILDUNG

seit 10/2012

Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Molekulargenetik

- **Doktorarbeit**
- Promotion zum Thema: Untersuchung von Mechanismen der Geschlechtsdetermination bei *Chironomus thummi* und *piger*
- Illumina Next-Generation Sequencing und vergleichende bioinformatische Analysen der Genome weiblicher und männlicher Individuen
- Herunterregulation der Expression bestimmter Kandidatengene mittels RNA-Interferenz (RNAi)
- **Diplomarbeit**
- Thema: Inhibition der Expression von Genen in der geschlechtsbestimmenden Region von *Chironomus thummi*
- Verwendung molekularbiologischer Standardmethoden zur Untersuchung der Expression bestimmter Gene in Chironomiden nach RNAi
- Abschlussnote 1,6

11/2011 - 07/2012

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

- **Studium der Biologie**
- Genetik
- Botanik
- Anthropologie
- Abschlussnote 1,7

04/2006 - 07/2012

Gymnasium am Römerkastell, Bad Kreuznach

- **Abitur**
- Abschlussnote 2,8

08/1995 - 03/2004

WEITERE FÄHIGKEITEN**Molekularbiologische Methoden**

- Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren
- Erstellung genomischer und transkriptomischer Bibliotheken für die Hochdurchsatzsequenzierung
- Illumina-Sequenzierungen
- Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung (FISH)
- PCR und qPCR
- Gelelektrophorese, Southern-Blot
- Klonierung
- Radioaktive Hybridisierung
- Mikroinjektion
- RNAi

Bioinformatische Methoden

- *De novo* Assemblierung
- RNA-Seq
- Annotation von Genen und Polymorphismen
- Varianten-Detektion

Programme

- CLC bio Genomics
- DNASTAR Lasergene
- BLAST2GO

Sprachen

- Englisch (fließend in Wort und Schrift)
- Französisch (Grundkenntnisse)
- Italienisch (Grundkenntnisse)
- Latein (großes Latinum)

BEITRÄGE ZU KONFERENZEN

Bachtadse, N., Schmidt, E.R. (2013). Epigenetic Modifications in the SDR of the Harlequin Fly *Chironomus thummi*. „Noethiger“ meeting - Insect Sex Determination, Juni 2013, Paris

Bachtadse, N., Schmidt, E.R. (2015). Understanding Sex Determination in the Harlequin Fly (Poster). Black Forest Summer School, September 2015, Herzogenhorn

SONSTIGES

1991 – 2009

Hockey beim Kreuznacher Hockey Club

- Jugendspieler der Landesauswahl Rheinland-Pfalz

2009

Wechsel zum Bundesligisten Rüsselsheimer RK

- Spieler der 1. Herren
- Engagement als Kinder- und Jugendtrainer

2011 – 2013

Mitglied der Hochschultheatergruppe „Spielsache“ an der Uni Mainz

Danksagung

Für elektronische Veröffentlichung gelöscht.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Weiterhin versichere ich, übernommene Ausführungen anderer Autoren sowie eigene Formulierungen, die an Gedankengänge Anderer angelehnt sind, entsprechend gekennzeichnet und mit Angabe der Quellen zitiert zu haben.

(Nicholas Bachtadse)

(Ort, Datum)