

Kandidatengene für den männchendominanten
geschlechtsbestimmenden Faktor M bei
Chironomus thummi und *Chironomus piger*

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie der

Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Regina Stiehl

Geboren am 17. April 1985 in Wiesbaden

Im Juli 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2016

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Chironomiden	1
1.2	Mechanismen der Geschlechtsbestimmung	3
1.2.1	Geschlechtsbestimmung bei Insekten	5
1.2.1.1	Geschlechtsbestimmung im Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	5
1.2.1.2	Geschlechtsbestimmende Gene bei <i>Musca Domestica</i>	7
1.2.1.3	Molekulare Mechanismen der Geschlechtsdetermination bei <i>Apis mellifera</i>	8
1.2.1.4	piRNA als Primäres Signal in der Geschlechtsbestimmung von <i>Bombyx mori</i>	9
1.2.1.5	Konservierte Gene in unterschiedlichen Geschlechtsbestimmungskaskaden	11
1.2.1.6	Geschlechtsbestimmung bei <i>Chironomus thummi</i> und <i>Chironomus piger</i>	13
1.2.1.7	Evolution von Geschlechtschromosomen	18
2	Zielsetzung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Versuchstiere	21
3.2	Feststellung des Geschlechts bei Chironomiden-Larven	21
3.3	DNA-Isolation	22
3.3.1	Isolation genomischer DNA aus Chironomiden	22
3.3.2	Isolation von Plasmid-DNA aus DH10B	23
3.4	RNA-Isolation	24

Inhaltsverzeichnis

3.4.1	RNA-Präparation (Guanidinthiocyanat (GTC)-Methode).....	24
3.4.2	Poly-A+-Aufreinigung	25
3.4.3	Anreicherung über magnetische Beads	25
3.5	Molekulargenetische Standard-Methoden.....	25
3.5.1	Ethanol-Fällung von DNA	25
3.5.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	26
3.5.3	Restriktion von DNA	26
3.5.3.1	Restriktion genomischer DNA zur Erstellung von Southern Blots.....	26
3.5.3.2	Restriktion von Plasmid-DNA	27
3.5.4	Agarose Gelelektrophorese.....	27
3.5.4.1	Testgele	28
3.5.4.2	Präparative/ analytische Gele	29
3.5.4.3	RNA-Gele	29
3.5.5	Wiedergewinnung von DNA aus Agarosegelen	30
3.5.5.1	Elektroelution	30
3.5.5.2	Wiedergewinnung über Kit	30
3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
3.6.1	Standard-PCR.....	30
3.6.2	Long-Range-PCR	32
3.7	Klonierung von PCR-Produkten	32
3.8	Herstellung Elektrokompeter Zellen.....	33
3.9	Transformation mittels Elektroporation	33
3.10	Sanger-Sequenzierung.....	34
3.10.1	Bioinformatische Sequenzauswertung	34

Inhaltsverzeichnis

3.11	DNA-Markierungs-Techniken	35
3.11.1	Random Primed Oligo Labeling	35
3.11.1.1	Radioaktive Markierung mit [α ³² P]-dATP	35
3.11.1.2	Fluoreszenzmarkierung mit Digoxigenin	36
3.11.2	Nick Translation	36
3.12	Hybridisierungstechniken	36
3.12.1	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	36
3.12.2	Southern-Hybridisierung	38
3.12.3	Northern-Hybridisierung	39
3.12.4	Koloniefilterhybridisierung	40
3.13	Erstellung von genomischen DNA-Bibliotheken	41
3.14	Next Generation Sequencing	42
3.14.1	Bioinformatische Auswertung der Daten	42
3.14.1.1	Kartierung von Rohdaten	43
3.14.1.2	RPKM-Normalisierung	43
3.14.1.3	Statistische Analysen	43
3.15	Puffer und Lösungen	45
4	Ergebnisse	49
4.1	Klonierung und Sequenzierung eines Bereichs des Proto-Y-Chromosoms von <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i>	49
4.1.1	pUC-Klone aus zwei genomischen DNA-Bibliotheken von <i>C. piger</i> Männchen	49
4.1.1.1	Klone aus der SDR von <i>C. piger</i>	53
4.1.1.2	FISH der aus der SDR stammenden Klone an Polytäanchromosomen von <i>C. thummi</i>	54

Inhaltsverzeichnis

4.1.1.3	Klon L208B1/1-24	57
4.1.1.4	Klon L208B8/3-6	58
4.1.1.5	Klon pipUC1D8/1-4.....	59
4.1.1.6	Klon pipUC1A4/6-5	60
4.1.1.7	Klon L208 B10/3-6	62
4.1.1.8	pipUC1B3/6-7	64
4.1.2	Analyse einer ein kb großen Insertion auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. piger</i>	65
4.1.2.1	Lokalisierung von <i>Cla-Adjacent-DNA</i> bei <i>C. piger</i> und <i>C. thummi</i> mittels FISH	69
4.1.3	Molekulare Lokalisation des hemizygoten <i>Cla-element</i> -Clusters auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. thummi</i>	72
4.1.3.1	Proximales Ende des hemizygoten <i>Cla-Element</i> -Clusters auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. thummi</i>	74
4.1.4	Distales Ende des hemizygoten <i>Cla-Element</i> -Clusters auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. thummi</i>	79
4.1.4.1	Inverse PCR zur Aufklärung der Sequenz distal des hemizygoten <i>Cla-Element</i> -Clusters	80
4.1.5	Größenbestimmung für das hemizygote <i>Cla-Element</i> -Cluster auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. thummi</i> mittels Southern Analyse	82
4.1.6	Long-Range-PCR zur Amplifikation und Sequenzierung des Proto-Y-Chromosoms von <i>C. thummi</i> zwischen <i>fs(1)K10-like Y2</i> und dem proximalen Ende des hemizygoten <i>Cla-Element</i> -Clusters.....	84
4.1.7	Überblick über die Struktur der <i>SDR</i> der beiden Spezies <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i>	85

Inhaltsverzeichnis

4.2	Transkript-Analyse des auf dem Proto-Y-Chromosom dupliziert vorliegenden Gens <i>fs(1)K10-like</i>	87
4.2.1	Darstellung verschiedener Transkriptvarianten von <i>fs(1)K10-like</i> mittels Northern Blot	87
4.3	Expressionsanalyse der Gene aus der SDR von <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i> Männchen und Weibchen.....	92
4.3.1	„Foldchange“-Analysen: Expressionsvergleich der Gene in der SDR zwischen unterschiedlichen Geschlechtern und Entwicklungsstadien.....	93
4.3.2	Expression zweier intronloser Gene aus der SDR	99
4.3.3	Expression von <i>dsx</i> in unterschiedlichen Entwicklungsstadien	101
4.3.4	Expression der unterschiedlichen Kopien von <i>fs(1)K10-like</i>	102
5	Diskussion	105
5.1	Identifikation Y-Chromosomaler Sequenzen	105
5.1.1	Genomische pUC-Bibliotheken von <i>C. piger</i> Männchen	108
5.2	Repetitive Elemente auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. piger</i> und <i>C. thummi</i>	110
5.2.1	<i>Cla-adjacent DNA</i> auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. piger</i>	110
5.2.2	Hemizygoter <i>Cla-Element-Cluster</i> auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. thummi</i>	113
5.2.3	<i>Hind-Element-Cluster</i> auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. luridus</i>	115
5.3	Gene in der SDR von <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i>	116
5.3.1	Expression der Gene aus der SDR von <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i> im Vergleich zwischen Männchen und Weibchen	116
5.3.1.1	Expression zweier intronloser Gene aus der SDR	118
5.3.1.2	Expression von <i>dsx</i> in unterschiedlichen Entwicklungsstadien	119

Inhaltsverzeichnis

5.3.1.3	Expression der unterschiedlichen Transkripte von <i>fs(1)K10-like</i>	120
5.4	Duplikation des Gens <i>fs(1)K10-like</i> auf den Proto-Y-Chromosomen von <i>C. thummi</i> , <i>C. piger</i> und <i>C. luridus</i>	121
5.4.1	Mögliche Funktion von <i>fs(1)K10-like Y3</i>	128
5.4.2	Mögliche Funktionen für Y1 und Y2	130
6	Zusammenfassung	133
7	Abkürzungsverzeichnis	135
8	Abbildungsverzeichnis	137
9	Literaturverzeichnis	143
10	Supporting Information	165
	Curriculum vitae	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Eidesstattliche Erklärung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 EINLEITUNG

1.1 CHIRONOMIDEN

Bei den Chironomiden handelt es sich mit weltweit etwa 15.000 bekannten Arten (Armitage 1995) um eine artenreiche Familie innerhalb der Klasse der Insekten. Dabei lassen sie sich in die Ordnung der Diptera, die Unterordnung Nematocera und die Teilordnung Culicomorpha einordnen. Bei Chironomiden handelt es sich um holometabole Insekten, welche ihre Eier in Form von gallertig umhüllten Gelegen an der Oberfläche von Gewässern ablegen. Die Larven schlüpfen nach wenigen Tagen und durchlaufen meist 4 distinkte Larvenstadien. Dabei ist die Dauer der Stadien je nach äußeren Einflüssen unterschiedlich. Die Larven entwickeln sich in diesem längsten Lebensabschnitt meist im Sediment und ernähren sich von Detritus und Algen. Die hier untersuchten Arten *Chironomus (C.) thummi* und *C. piger* bilden Wohnröhren aus, welche sie mit in den Speicheldrüsenzellen gebildeten Spinnsekret und Sedimentteilen bauen. Die Art *C. thummi* (Kieffer) ist mit der zuvor beschriebenen Art *C. riparius* (Meigen 1804) identisch (Credland 1973), wird im Folgenden jedoch als *C. thummi* bezeichnet. Schließlich verpuppen sich die Larven und innerhalb von 3 Tagen findet eine komplette Veränderung hin zur Imago statt. Die Puppe begibt sich am Ende dieser 3 Tage an die Wasseroberfläche, so dass die Imago schlüpfen kann. Anders als bei Larven, bei denen das Geschlecht nur anhand mikroskopischer Untersuchungen der Genitalimaginalscheiben erfolgen kann (s. Abschnitt 3.2), weisen adulte Tiere einen eindeutigen Geschlechts-Dimorphismus auf. Männliche Tiere besitzen im Gegensatz zu den Weibchen wirtelig behaarte Antennen.

Erstmals in den Fokus wissenschaftlichen Interesses rückten Chironomiden, als Balbiani die nach ihm benannten Balbiani-Ringe in Riesenchromosomen-Präparaten aus Speicheldrüsenzellen entdeckte (Balbiani 1881). Die durch ihren hohen Polytäniegrad von bis zu $2^{14}n$ (= 16.384 n) sehr gut sichtbaren Chromosomen eignen sich hervorragend für cytologische Untersuchungen. So gelingen Fluoreszenz-*in-situ*-

Einleitung

Hybridisierungen (FISH) besonders gut und dienen zur Lokalisation von Genen bzw. repetitiven Elementen. Eine für Insekten außergewöhnliche Eigenschaft weisen einige Chironomiden-Arten durch das Vorhandensein von Hämoglobin als Blutfarbstoff auf (Burmester und Hankeln 2007; Hankeln et al. 1988; Burmester und Hankeln 2007; Nowak et al. 2006, Weber et al. 1985). Dies ermöglicht ihnen ein Überleben auch in besonders sauerstoffarmen Gewässern. Generell sind die Ansprüche verschiedener Chironomiden-Arten an ihren Lebensraum sehr unterschiedlich. Sie besiedeln sowohl stark verunreinigte, sehr salzhaltige als auch besonders kalte Habitats und dienen durch ihre spezifischen Anpassungen als Bioindikatoren (Oliver 1971; Pinder 1986; Taenzler et al. 2007). Eine besondere Art der Anpassung zeigt die flügellose Chironomidenart *Belgica antarctica*, welche die Antarktis besiedelt. Um den Mechanismen dieser speziellen Anpassung auch molekulargenetisch näher zu kommen, wurde das Genom von *Belgica antarctica* mittels Next Generation Sequencing (NGS) sequenziert und assembliert (Kelley et al. 2014). Auch das Genom von *Chironomus tentans* wurde mit NGS-Techniken sequenziert und anschließend assembliert (Kutsenko et al. 2014).

1.2 MECHANISMEN DER GESCHLECHTSBESTIMMUNG

Nahezu alle Eukaryoten nutzen sexuelle Reproduktion, um sich fortzupflanzen. Damit es überhaupt zu geschlechtlicher Vermehrung kommen kann, müssen weibliche und männliche Gameten vorhanden sein. Diese gewährleisten durch die bei ihrer Entstehung während der Meiose stattfindenden Rekombination und die Verschmelzung zur Zygote eine Neukombination des Erbgutes. Es ist jedoch eine vieldiskutierte Frage, ob dies tatsächlich den großen evolutiven Vorteil bietet, der die Erhaltung der sexuellen Reproduktion erklären würde (Charlesworth 1989; Hurst und Peck 1996; Maynard Smith 1978).

Eine Voraussetzung für die Entstehung weiblicher bzw. männlicher Gameten ist die Determination des Geschlechts eines Individuums und dessen in der Folge stattfindende geschlechtsspezifische Entwicklung. Die meisten Eukaryoten pflanzen sich sexuell fort, dabei existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen zur Geschlechtsbestimmung (Bull 1983). Diese kann man anhand des Ursprungs des primären geschlechtsbestimmenden Faktors in drei Hauptgruppen unterteilen. Zum einen kann das Geschlecht durch bestimmte genetische Faktoren, welche teilweise auf spezifischen Geschlechtschromosomen liegen, in der Zygote festgelegt werden. Es existieren auch Mechanismen, in denen der geschlechtsbestimmende Faktor maternal weitergegeben wird (Ullerich 1975). Zum anderen können äußere Einflüsse die Geschlechtsdetermination beeinflussen. Eine durch die Inkubationstemperatur der Eier regulierte Geschlechtsbestimmung konnte bei Krokodilen (Janzen und Paukstis 1991), Schildkröten (Bull und Vogt 1981; Bull und Vogt 1979) und Echsen (Bull 1987; Charnier 1966) nachgewiesen werden. Bei der Tiefseegarnele *Gammarus duebeni* beeinflusst die Photoperiode das Geschlecht (Bulnheim 1965). Eine strikte Trennung zwischen den unterschiedlichen Mechanismen findet jedoch nicht immer statt, wie u.a. bei zwei Eidechsenarten gezeigt werden konnte, in welchen das genetisch bestimmte Geschlecht durch äußere Einflüsse verändert werden kann (Radder et al. 2009; Warner et al. 2009).

Einleitung

Für die häufiger vorkommende zygotische Geschlechtsdetermination können wiederum unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sein. Bildet ein Geschlecht einer Spezies unterschiedliche Gameten, so spricht man von Heterogametie. Bei der weiter verbreiteten männlichen Heterogametie ist das Weibchen das homogametische Geschlecht (XX). In Männchen ist ein Y-Chromosom vorhanden (XY), welches oft den männchenbestimmenden Faktor M trägt und somit die männchenspezifische Entwicklung einleitet. Männliche Heterogametie tritt bei Säugern und teilweise bei Amphibien, Reptilien, Fischen und Insekten auf. Bei der weiblichen Heterogametie, welche u.a. bei Vögeln, Schlangen, Fischen und Schmetterlingen auftritt, kommt es in homogametischen Individuen (ZZ) zur Ausprägung des männlichen Geschlechts. Nur unter Anwesenheit eines W-Chromosoms (ZW) leitet ein W-Chromosom gekoppelter weibchenbestimmender Faktor F die weibliche Entwicklung des Embryos ein. In beiden Systemen gibt es Spezies, in denen das heterogametische Geschlecht nur ein Geschlechtschromosom trägt (ZO-Weibchen bzw. XO-Männchen). ZO/ZZ-Systeme konnten in einigen Lepidoptera-Arten identifiziert werden (Ennis und Sohi 1976; Traut et al. 2007). XO-Männchen treten u.a. in einigen Grashüpfer-Arten (Mesa und Mesa 1967) sowie in Nematoden auf. Der hermaphrodite Modellorganismus *Caenorhabditis (C.) elegans* nimmt dabei eine Sonderstellung ein (Brenner 1974; Hodgkin 1983; White 1977). Hier entwickeln sich XO Individuen zu Männchen und XX Individuen zu hermaphroditen Weibchen. Arrhenotokie oder Haplo-Diploidie ist ein weiterer geschlechtsbestimmender Mechanismus und kommt vor allem bei *Hymenoptera* und *Thysanoptera* vor. Bei diesem Mechanismus entstehen aus befruchteten Eizellen Weibchen und aus unbefruchteten Eizellen Männchen. Durch Kreuzungsversuche konnte gezeigt werden, dass auch dann männliche Individuen entstehen, wenn diese für einen bestimmten Locus homozygot sind. Daraus wurde geschlossen, dass eine Heterozygotie eines bzw. mehrerer geschlechtsbestimmender Loci Voraussetzung für eine weibliche Entwicklung ist. Daher spricht man auch von einem komplementären Geschlechtsbestimmungsmechanismus (siehe Abschnitt 1.2.1.3).

Einleitung

1.2.1 GESCHLECHTSBESTIMMUNG BEI INSEKTEN

1.2.1.1 GESCHLECHTSBESTIMMUNG IM MODELLORGANISMUS *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Das Geschlecht der zur Familie der Taufliegen (Drosophilidae) gehörenden Art *Drosophila (D.) melanogaster* wird durch eine Sonderform der männlichen Heterogamete determiniert. Individuen mit gleichen Geschlechtschromosomen (XX) entwickeln sich zu Weibchen, während sich Individuen mit einer XY-Chromosomenkonstellation zu Männchen entwickeln. Jedoch findet die Entwicklung zum Männchen auch bei Abwesenheit des Y-Chromosoms (X0) statt. Diese Männchen sind steril, da sich wichtige Fertilitätsfaktoren auf dem Y-Chromosom befinden. Das primäre geschlechtsbestimmende Signal liegt bei *D. melanogaster* nicht auf dem Y-Chromosom, sondern wird durch das zahlenmäßige Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen (X:A) bestimmt (Bridges 1916; Bridges 1921). Ziel des Primärsignals ist das Schlüsselgen *Sex-lethal (Sxl)*, welches über eine Reihe verschiedener regulatorischer Gene schließlich das geschlechtsspezifische Spleißen des Doppelschalter-Gens *doublesex (dsx)* steuert. Die Umsetzung des Primärsignals findet bei *D. melanogaster* zellautonom in der frühen Embryogenese statt (Sánchez und Nöthiger 1983). Dabei besteht das Primärsignal aus drei Gen-Klassen, welche alle für Transkriptionsfaktoren kodieren: die auf den X-Chromosomen liegenden Numeratoren, die auf den Autosomen liegenden Denominatoren sowie maternale Gene (Cline 1993; Schütt und Nöthiger 2000). Die derzeit vier bekannten Numerator-Gene sind *sisterlessA (sisA)*, *sisB*, *sisC* und *runt*. Der einzige bekannte Denominator ist *deadpan (dpn)*, wobei DPN mit SISA/B-Proteinen Dimere bilden kann. Bei einem X:A-Verhältnis von 1,0 können nicht alle SISA/B-Moleküle von DPN abgefangen werden und bilden Heterodimere mit dem maternalen Faktor DA (DAUGHTERLESS) (Cline 1978, 1983; Parkhurst und Ish-Horowicz 1992). Dieser Komplex kann wiederum als Transkriptionsfaktor den frühen Promotor P_E von *Sxl* aktivieren. Dies ist jedoch nur eine vereinfachte Darstellung der molekularen Mechanismen, an denen u.a. weitere maternale Faktoren, wie *hermaphrodite*, *extramacrochaetae* und *groucho* beteiligt

Einleitung

sind. Durch die Aktivierung des frühen Promotors P_E von *Sxl* in weiblichen Embryonen wird ein aktives SXL-Protein gebildet. In späteren Entwicklungsstadien wird die Transkription von *Sxl* von einem weiteren Promotor P_M gesteuert, welcher in beiden Geschlechtern aktiv ist.

Da das frühe SXL-Protein nur in Weibchen anwesend ist, wird das dritte Exon des späten *Sxl*-Transkriptes, welches ein STOPP-Kodon enthält, heraus gespleißt und aktives SXL-Protein kann gebildet werden (Cline 1984). In Männchen, denen das Genprodukt des frühen *Sxl*-Promotors fehlt, geschieht dies nicht, und es wird ein trunkiertes, nicht funktionsfähiges SXL-Protein von dem späten *Sxl*-Promotor P_M gebildet. Neben seiner autoregulatorischen Funktion kontrolliert SXL drei weitere Gene. Das Gen *transformer (tra)* stellt dabei einen wichtigen Faktor in der Geschlechtsbestimmungskaskade dar. Durch seine Funktion als Spleißfaktor führt aktives SXL-Protein in Weibchen zur Bildung eines aktiven TRA-Proteins (Valcárcel et al. 1993), welches gemeinsam mit TRA2 weitere Spleißfaktoren rekrutiert und so eine weibchenspezifische Prozessierung der *dsx*-pre-mRNA bewirkt (Hedley und Maniatis 1991; Ryner und Baker 1991). DSX gehört zu den DM-Proteinen, welche u.a. in *C. elegans (mab-3)* und Vertebraten (z.B. *Dmrt1* im Mensch) ebenfalls eine wichtige Funktion in der Geschlechtsdetermination haben (Raymond et al. 1998; Shen und Hodgkin 1988). Bei der DM-Domäne handelt es sich um eine DNA-bindende Domäne, welche in allen bisher identifizierten Proteinen stark konserviert zu sein scheint. Die *dsx*-Transkripte werden geschlechtsspezifisch gespleißt, so dass in beiden Geschlechtern spezifische aktive Proteine entstehen. Diese fungieren als Transkriptionsfaktoren in unterschiedlichen Genkaskaden.

Neben der somatischen Geschlechtsbestimmung kontrolliert das SXL-Protein in *Drosophila* ebenfalls die Dosiskompensation und die Oogenese. Während die genaue Funktion von SXL in den Keimbahn-Vorläuferzellen nicht bekannt ist, konnten bei der Dosiskompensation zwei Funktionen für SXL identifiziert werden. Zum einen bindet SXL in der frühen Embryogenese bei Weibchen entlang der X-Chromosomen und reguliert die Aktivität X-chromosomaler Gene. Zum anderen verhindert es das männchenspezifische Spleißen der pre-mRNA von *male-specific-lethal-2 (msl-2)*,

Einleitung

welches gemeinsam mit anderen Faktoren eine Hyperaktivierung des männlichen X-Chromosoms in Männchen und damit eine Dosiskompensation bewirkt (Bernstein und Cline 1994).

1.2.1.2 GESCHLECHTSBESTIMMENDE GENE BEI *MUSCA DOMESTICA*

Die Umsetzung des primären geschlechtsbestimmenden Signals in einen männlichen oder weiblichen Phänotyp scheint bei *Musca (M.) domestica* durch einen einfacheren Mechanismus reguliert zu sein als bei *D. melanogaster*. Eher außergewöhnlich ist jedoch, dass in verschiedenen Stämmen unterschiedliche Primärsignale die Geschlechtsdetermination steuern. Am häufigsten wirkt ein dominanter Männchenbestimmer M als Primärsignal. Es konnte jedoch ebenfalls ein dominanter weibchenbestimmender Faktor F^D identifiziert werden (McDonald et al. 1978). Zudem existieren Stämme, in welchen maternale Effekte eine Rolle spielen (Inoue und Hiroyoshi 1986).

Der dominante Männchenbestimmer M ist in dem sogenannten Standard-Stamm von *M. domestica* auf dem Y-Chromosom lokalisiert (Hiroyoshi 1964), welches sich zwar morphologisch vom X-Chromosom unterscheiden lässt (Hediger et al. 1998), an genetischer Information aber relativ geringe Unterschiede zeigt. Diese geringen genetischen Unterschiede machen eine Dosiskompensation unnötig. Es konnten auch Stämme identifiziert werden, in denen M durch Translokationen auf jedem der fünf Autosomen oder auf dem X-Chromosom lokalisiert sein kann (Hiroyoshi 1964; Wagoner 1969; Denholm et al. 1983). In diesen Fällen tragen sowohl Männchen als auch Weibchen zwei X-Chromosomen. In allen gefundenen Stämmen spielt F, welches molekular als *tra*-Ortholog identifiziert werden konnte (Hediger et al. 2010), eine entscheidende Rolle bei der Geschlechtsdetermination. Maternale Transkripte von *Mdtra* und *Mdtra2* initiieren in der weiblichen Zygote eine autoregulatorische Schleife, welche durch ein weibchenspezifisches Spleißen von *Mdtra*-Transkripten aktives TRAF Protein zur Verfügung stellt (Burghardt et al. 2005). Dieses wiederum dient als Spleißfaktor für die Transkripte des Doppelschaltergens *Mddsx*, welche

Einleitung

weibchenspezifisch gespleißt werden (Hediger et al. 2004). In Anwesenheit von M wird die autoregulatorische Schleife unterbrochen und das inaktive männchenspezifische TRA^M wird gebildet. Da das inaktive Protein seine Funktion als Spleißfaktor nicht wahrnehmen kann, wird das männchenspezifische DSX^M gebildet, das die Entwicklung zum Männchen einleitet.

In Stämmen, die den dominanten Weibchenbestimmer F^D tragen, führt auch ein homozygotes Vorkommen des Faktors M nicht zu einer männchenspezifischen Entwicklung. Die Expression ist ebenfalls nicht von maternalem MDTRA/MDTRA2 bzw. der oben beschriebenen autoregulatorischen Schleife abhängig (Dübendorfer und Hediger 1998). Es entstehen also auch bei Anwesenheit von M bzw. bei fehlenden maternalen Transkripten weibliche Individuen. Der umgekehrte Fall tritt bei der rezessiven in Laborstämmen identifizierten *loss-of-function*-Mutation F^{man} auf. Liegt diese homozygot vor, entstehen auch bei Abwesenheit von M männliche Individuen (Schmidt et al. 1997). Die molekularen Grundlagen dieser Allele sind nicht bekannt.

Die aufgeführten Unterschiede in verschiedenen Stämmen von *M. domestica* zeigen, dass eine Mutation in einem einzelnen Gen den Mechanismus der Geschlechtsbestimmung beeinflussen kann (Dübendorfer et al. 2002).

1.2.1.3 MOLEKULARE MECHANISMEN DER GESCHLECHTSDETERMINATION BEI *APIS MELLIFERA*

Wie bei den meisten *Hymenoptera* wird das Geschlecht bei *Apis (A.) mellifera* durch Haplo-Diploidie bestimmt. Durch ihre große wirtschaftliche Bedeutung wurde die Honigbiene schon früh zu einem beliebten Forschungsobjekt. Schon 1845 konnte Dzierzon beobachten, dass männliche Drohnen aus unbefruchteten Eiern entstehen, wohingegen die weiblichen Arbeiterinnen und die Königin aus befruchteten Eiern schlüpfen. Später wurde dann ein komplementärer Geschlechtsbestimmungsmechanismus nachgewiesen bei dem unterschiedliche Allele eines einzelnen Genlocus das Geschlecht determinieren (Whiting 1943; Mackensen 1955). Durch Rückkreuzungen zwischen Söhnen mit ihren Müttern entstanden diploide

Einleitung

Männchen, welche für diesen Locus homozygot waren. Folglich ist eine Heterozygotie dieses Locus Voraussetzung für eine weibchenspezifische Entwicklung. An diesem Locus konnte als primäres geschlechtsdeterminierendes Signal durch Klonierung und *knock-down*-Versuche das Gen *csd* (*complementary sex determination*) identifiziert werden (Beye et al. 2003). Es konnten mindestens 15 Allele für *csd* gezeigt werden, welche auf Aminosäure (AS)-Ebene im paarweisen Vergleich einen Unterschied von 3 % zeigen (Hasselmann und Beye 2004; Hasselmann et al. 2008). Individuen, welche für den Locus *csd* heterozygot sind, entwickeln sich zu Weibchen, während hemizygote Individuen zu Männchen werden. Liegt *csd* homozygot vor, entwickeln sich ebenfalls Männchen, welche jedoch steril sind. In anderen Hymenoptera-Arten konnten auch Multi-Locus-Mechanismen nachgewiesen werden.

Eine genaue Analyse von CSD zeigte im C-Terminus Übereinstimmungen zu dem u. a. aus *D. melanogaster* und *M. domestica* bekannten TRA-Protein (Beye et al. 2003). In *Apis mellifera* konnte ebenfalls ein *dsx*-Ortholog und dessen geschlechtsspezifisch gespleißte mRNA nachgewiesen werden (Cho et al. 2007; Cristino et al. 2006). Dieses wird jedoch nicht direkt durch CSD, sondern durch FEM (FEMINIZER) reguliert. Das Gen *fem* konnte nur etwa 12 kb upstream von *csd* lokalisiert und durch höhere Homologien als ursprüngliches Ortholog von *tra* identifiziert werden (Hasselmann et al. 2008). Dabei sind die beiden als primäres Geschlechtsdeterminationssignal fungierenden Gene *csd* und *fem* bei einem Duplikationsereignis aus einem ursprünglichen *tra*-Ortholog entstanden. Bei Anwesenheit von CSD-Heterodimeren werden *fem*-Transkripte weibchenspezifisch gespleißt, so dass ein aktives Protein entsteht. FEM^F reguliert dann sowohl sein eigenes Spleißen durch eine autoregulatorische Feedbackschleife, als auch das weibchenspezifische Spleißen von *Amdsx*-Transkripten (Gempe et al. 2009).

1.2.1.4 PI-RNA ALS PRIMÄRES SIGNAL IN DER GESCHLECHTSBESTIMMUNG VON *BOMBYX MORI*

Im Seidenspinner *Bombyx mori* zeichnet sich das weibliche Geschlecht durch das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Geschlechtschromosomen (ZW) aus,

Einleitung

wohingegen Männchen zwei homomorphe Geschlechtschromosomen besitzen (ZZ). Das W-Chromosom spielt eine entscheidende Rolle bei der Etablierung des weiblichen Geschlechts. Molekulare Analysen zeigten, dass fast ausschließlich verschiedene Transposons auf dem W-Chromosom angesiedelt sind, jedoch keine proteinkodierenden Gene (Abe et al. 1998; Abe et al. 2005). Die einzigen nachweisbaren Transkripte aus der geschlechtsbestimmenden Region kodieren für PIWI-interacting RNAs (Abe et al. 2000; Kawaoka et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem piRNA-Vorläufer um den primären weibchenbestimmenden Faktor *feminizer (fem)* handelt (Kiuchi et al. 2014). Mehrere Kopien des Gens sind tandem-repetitiv angeordnet, wobei etwa 30 Kopien pro haploidem Genom vorliegen. Versuche mit Mutanten haben gezeigt, dass mehrere Kopien des Gens nötig sind, um durch eine entsprechende Dosis einen Effekt zu erzielen. piRNAs formen zusammen mit PIWI-Proteinen einen RNA-*induced silencing complex* (RISC) und regulieren die Genaktivität durch Anlagerung an und Zerschneiden von komplementären mRNAs. Das einzige Gen, welches in *Bombyx* komplementäre Abschnitte zu *fem* aufweist, ist *masculinizer (masc)*, welches auf dem Z-Chromosom liegt. Es konnte gezeigt werden, dass *masc* wahrscheinlich das Zielmolekül der *fem*-piRNA ist und bei deren Anwesenheit auf mRNA-Ebene ausgeschaltet wird (Kiuchi et al. 2014). Wird jedoch aktives MASC-Protein gebildet, kommt es zu einer Repression des weibchenspezifischen Spleißens von *Bmdsx*-mRNA (Suzuki et al. 2001; Suzuki et al. 2003). In *D. melanogaster*, *M. domestica* und *A. mellifera* erfolgt das weibchenspezifische Spleißen von *dsx*-Transkripten jedoch durch den Spleiß-Aktivator TRA^F. Somit stellt das System von *B. mori* nicht nur durch das außergewöhnliche Primärsignal, sondern auch in der Regulation des konservierten Doppelschaltergens *dsx* eine Ausnahme unter den bisher bekannten Geschlechtsbestimmungsmechanismen in Insekten dar.

1.2.1.5 KONSERVIERTE GENE IN UNTERSCHIEDLICHEN GESCHLECHTSBESTIMMUNGSKASKADEN

Obwohl der geschlechtsbestimmende Mechanismus (Heterogamete, Haplo-Diploidie usw.) bei vielen Arten bekannt ist, weiß man nur von wenigen Organismen mehr über die genauen molekularen Vorgänge während der Geschlechtsrealisierung. Dies liegt u.a. daran, dass es eine große Vielfalt geschlechtsbestimmender Faktoren gibt und vor allem die am oberen Ende der Geschlechtsbestimmungskaskade stehenden Schalter-Gene schnell zu evolvieren scheinen (Hodgkin 1992; Wilkins 1995). Weiter stromabwärts in der Kaskade stehende Gene scheinen stärker konserviert zu sein. So sind die aus *D. melanogaster* bekannten Gene *transformer (tra)* und *doublesex (dsx)* vor allem bei Insekten in ihrer Funktion stark konserviert (Geuverink und Beukeboom 2014; Verhulst et al. 2010b). Bei *D. melanogaster* und *A. mellifera* wird im Grundzustand eine männliche Entwicklung eingeleitet. Nur bei Anwesenheit eines weibchenbestimmenden Primärsignals (X:A = 1 bzw. CSD-Heterodimere) führt die Bildung aktiven TRA- bzw. FEM-Proteins zu weibchenspezifischem Spleißen von *dsx*-Transkripten und somit zur Entwicklung eines Weibchens. Bei *M. domestica* hingegen findet im Grundzustand eine weibliche Entwicklung statt. Nur wenn die autoregulatorische Rückkopplungsschleife von *Mdtra* durch den dominanten Männchenbestimmer M gestört wird, kommt es zur Ausbildung des männlichen Geschlechts. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Mechanismen der drei Spezies.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Mechanismen zur Geschlechtsdetermination besonders schnell evolvieren und selbst in relativ nah verwandten Spezies selten Homologien gefunden werden können, ist es erstaunlich, dass DM-Faktoren immer wieder eine Rolle spielen. Es ist denkbar, dass diese einen gemeinsamen Ursprung haben und als konservierter Faktor bestehen geblieben sind, während sich die vor- und nachgeschalteten Gene im Laufe der Evolution verändert haben. Jedoch könnte auch eine konvergente Entwicklung stattgefunden haben, in der DM-Faktoren bevorzugt als Transkriptionsfaktoren in der Geschlechtsdetermination rekrutiert wurden (Hodgkin 2002).

Einleitung

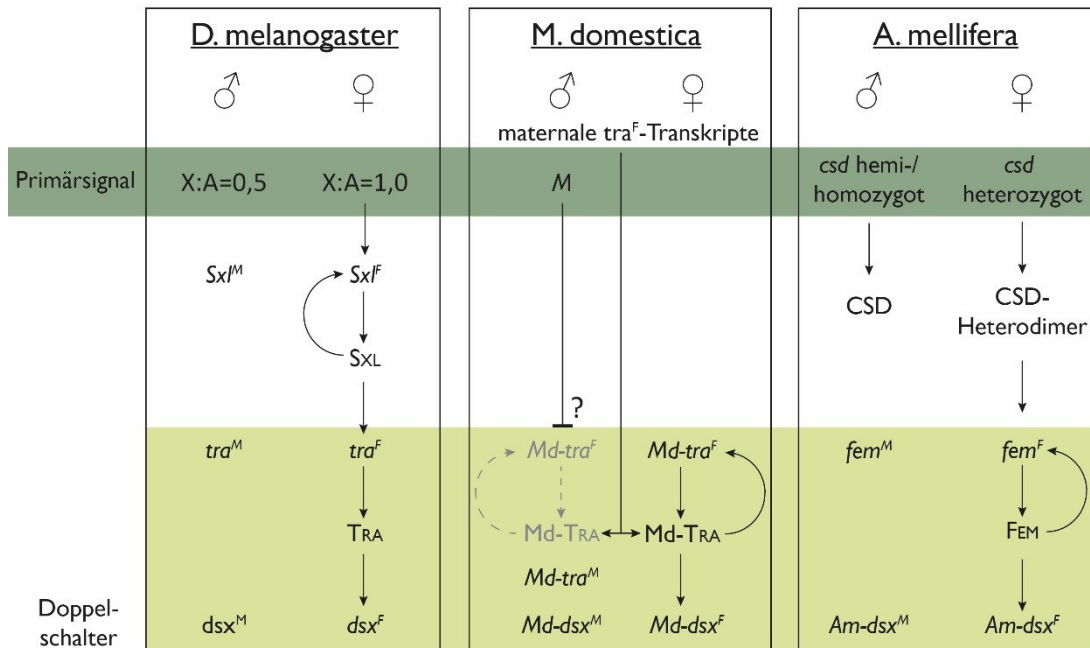


Abbildung 1: Die Geschlechtsbestimmungskaskaden von *D. melanogaster*, *M. domestica* und *A. mellifera* im Vergleich

Bei *D. melanogaster* dient das Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen als Primärsignal in der Geschlechtsdetermination. Wird durch verschiedene Faktoren ein Verhältnis von 1,0 festgelegt, kommt es zu einem weibchenspezifischen Spleißen von *Sxl*-mRNA und durch das folglich gebildete Protein SXL wiederum zum ebenfalls weibchenspezifischen Spleißen von *tra*-mRNA. Das nur dann entstehende Protein TRA beeinflusst die Bildung des weibchenspezifischen Spleißprodukts *dsx^F*.

Bei *M. domestica* wird durch maternale *Mdtra*-mRNA eine autoregulatorische Feedbackschleife in Gang gesetzt, welche die Bildung aktiven TRA-Proteins im Weibchen steuert. Dieses dient, wie bei *D. melanogaster*, als Spleißfaktor für die weibchenspezifische Form von *Mddsx*. Nur unter Anwesenheit von M wird die autoregulatorische Feedbackschleife unterbrochen und durch das Fehlen aktiven TRA-Proteins kommt es zum männchenspezifischen Spleißen von *dsx*-mRNA.

Während *dsx*-Homologe über ihre DM-Domäne relativ häufig identifiziert werden konnten, wurden aufgrund geringer Ähnlichkeiten *tra*-Homologe in nur wenigen Spezies nachgewiesen. Nachdem zuerst bei der mit *M. domestica* nah verwandten Art *Ceratitis capitata* ein *tra*-Homolog als Spleißregulator von *dsx*-mRNA identifiziert werden konnte (Pane et al. 2002), gelang es auch bei anderen Insektenspezies, wie

Einleitung

Bactrocera oleae, *Lucilia cuprina*, *Apis mellifera* und *Nasonia vitripennis* (Concha und Scott 2009; Hasselmann et al. 2008; Lagos et al. 2007; Liu et al. 2015; Verhulst et al. 2010a), *tra*-Homologe zu finden.

1.2.1.6 GESCHLECHTSBESTIMMUNG BEI *CHIRONOMUS THUMMI* UND *CHIRONOMUS PIGER*

Die meisten Chironomidenspezies besitzen 4 Chromosomen, wobei es wahrscheinlich durch reziproke Translokationen zu unterschiedlichen Kombinationen der Chromosomenarme gekommen ist (Keyl 1959, 1961, 1962). In den meisten Fällen treten keine heteromorphen Geschlechtschromosomen auf (Bauer und Beermann 1952; Beermann 1955). Jedoch konnte das genetische Y-Chromosom durch geschlechtsspezifisch auftretende Inversionen zunächst in den Arten *C. tentans* und *C. pallidivittatus* auf dem Chromosomenarm B lokalisiert werden (Beermann 1955, Rosin und Fischer 1972). Diese treten in Männchen heterozygot auf und sind niemals bei Weibchen zu finden. Somit wurde das Prinzip der männlichen Heterogamete als geschlechtsbestimmender Mechanismus bei Chironomiden nachgewiesen. Hierbei kommt es bei Anwesenheit eines dominanten Männchenbestimmers M zur Ausprägung des männlichen Geschlechts. Beide Arten zeigen eine weitere nur in Männchen auftretende Inversion auf Chromosomenarm F, welche auch in der Art *C. annularius* beobachtet werden konnte (Acton 1957, Tabelle 1).

Tabelle 1: Überblick über die chromosomale Lage der SDR in verschiedenen Chironomidenspezies

Das genetische Y-Chromosom konnte bei Chironomiden durch das Fehlen heteromorpher Geschlechtschromosomen nur über die Kopplung mit Inversionen oder heterochromatischen Banden als Marker identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass dieses in unterschiedlichen Spezies oder teilweise sogar innerhalb einer Spezies auf verschiedenen Chromosomenarmen lokalisiert sein kann. Die in dieser Arbeit untersuchten Spezies sind grau unterlegt.

Arm	Spezies	Erkennungsmerkmal	Autor
A	<i>crassicaudatus</i>	komplexe Inversion	(Martin und Wülker 1971)
	<i>nuditarsis</i>	komplexe und einfache Inversionen	(Rosin und Fischer 1972)
	<i>occidentalis</i>	Spezieshybriden	(Martin et al. 1980)
	<i>oppositus C</i>	einfache Inversion	(Martin et al. 1978)
	<i>plumosus</i>	komplexe Inversion	(Acton 1957; Keyl 1962)
B	<i>duplex</i>	komplexe Inversion, Spezieshybriden	(Atchley und Martin 1971; Martin et al. 1980)
	<i>nuditarsis</i>	einfache Inversion	(Rosin und Fischer 1972)
	<i>pallidivittatus</i>	komplexe Inversion	(Beermann 1955; Rosin und Fischer 1972)
	<i>tentans (Europa)</i>	komplexe Inversion	(Beermann 1955; Rosin und Fischer 1972)
C	<i>australis</i>	heterochromatische Bande	(Martin et al. 1980)
	<i>oppositus A</i>	einfache Inversion	(Martin et al. 1980)
	<i>plumosus</i>	einfache Inversion?	(Rosin und Fischer 1972)
	<i>pallidivittatus</i>	komplexe perizentrische Inversion	(Beermann 1955)
	<i>tentans (Europa)</i>	mit Arm F	(Beermann 1955)
	<i>tentans (Kanada)</i>	komplexe und einfache Inversionen	(Acton 1959; Thompson und Bowen 1972)
D	<i>australis</i>	heterochromatische Bande	(Martin et al. 1980)
	<i>oppositus A</i>	einfache Inversion	(Martin et al. 1980)
	<i>plumosus</i>	einfache Inversion ?	(Rosin und Fischer 1972)
E	<i>Keine</i>		
F	<i>luridus</i>	einfache Inversion	(Acton 1959)
	<i>annularius</i>	komplexe Inversion	(Beermann 1955; Keyl 1962)
	<i>bernensis</i>	einfache Inversion	(Wülker und Klötzli 1973)
	<i>obtusidens</i>	einfache Inversion mit heterochromatischer Bande	(Keyl 1961, 1962)
	<i>oppositus A</i>	einfache Inversion	(Martin et al. 1980)
	<i>pallidivittatus</i>	komplexe Inversion	(Beermann 1955)
	<i>tentans (Europa)</i>	komplexe Inversion	(Beermann 1955)
	<i>tentans (Ost-Kanada)</i>	komplexe Inversion	(Thompson 1971; Thompson und Bowen 1972)
	<i>rempelii</i>	einfache Inversion mit Puff	(Rempel et al. 1962)
	<i>stigmaterus</i>	einfache Inversion mit Puff	(Martin 1974)
	<i>thummi</i>	heterochromatische Bande, Spezieshybriden	(Hägele 1985)
G	<i>piger</i>	Spezieshybriden	(Hägele 1985)
	<i>nuditarsis</i>	einfache Inversion und heterochromatische Bande	(Rosin und Fischer 1972)
	<i>oppositus B</i>	einfache Inversion	(Martin und Lee 1984; Martin et al. 1980)

Einleitung

Das genetische Y-Chromosom (Proto-Y-Chromosom) kann demzufolge auf verschiedenen Chromosomenarmen liegen. Diese Beobachtung wurde auch bei anderen Arten gemacht, in welchen das genetische Y-Chromosom entweder durch die Kopplung mit männchenspezifischen Inversionen oder mit nur im Männchen hemizygot auftretenden heterochromatischen Banden lokalisiert werden konnte (Tabelle 1).

Für das Auftreten unterschiedlicher Loci für die SDR kommen zwei verschiedene Erklärungen in Betracht. Zum einen kann es sich bei M um ein transposables Element handeln, welches durch Transpositionereignisse auf verschiedene Chromosomenarme gelangt ist (Green 1980). Zum anderen könnten die unterschiedlichen Loci Komponenten einer komplexen Genkaskade für die Geschlechtsbestimmung darstellen und unterschiedliche Gene können in verschiedenen Spezies die Funktion des primären männchenbestimmenden Faktors M übernehmen (Martin et al. 1980).

Die geschlechtsbestimmende Region der beiden in dieser Arbeit untersuchten Spezies *C. thummi* und *C. piger* wurde durch Kreuzungsversuche zwischen den beiden Schwesternarten auf dem Chromosomenarm F lokalisiert (Hägele 1985). Hierbei zeigte sich bei der Rückkreuzung von männlichen FI-Individuen mit weiblichen *C. piger* (*C. thummi* ♂ x *C. piger* ♀) eine Asynapsis in der Region D₃d-g auf Chromosom III Arm F. In dem darin enthaltenen Abschnitt D₃e₁ konnte eine heterochromatische Bande identifiziert werden, welche nur in *C. thummi* Männchen hemizygot auftritt. Bei weiblichen *C. thummi* Individuen und in beiden Geschlechtern von *C. piger* ist diese Bande nicht zu finden. Es ist davon auszugehen, dass der dominante Männchenbestimmer M in dem Bereich D₃d-g enthalten ist und bei *C. thummi* eine enge Kopplung mit der hemizygoten heterochromatischen Bande besteht. Trotz des Fehlens dieser Bande bei *C. piger* ist davon auszugehen, dass der geschlechtsbestimmende Mechanismus der gleiche ist wie bei *C. thummi*. Folglich kann angenommen werden, dass die nur in *C. thummi* Männchen vorkommende heterochromatische Bande keine essenzielle Funktion in der Determination des männlichen Geschlechts hat. Die Lage der geschlechtsbestimmenden Region bei *C. thummi* und *C. piger* scheint homolog zu einem der beiden bei *C. tentans* und

Einleitung

C. annularius identifizierten Loci für M auf dem Chromosomenarm F zu sein. Dies legt nahe, dass es sich bei M in diesen Arten um dasselbe Gen handelt (Kraemer und Schmidt 1993).

Bei FISH an polytären Riesenchromosomen aus Speicheldrüsenzellen von *C. thummi* konnte im Bereich der mit M gekoppelten heterochromatischen Bande ein hemizygoter *Cla-Element*-Cluster identifiziert werden (Kraemer und Schmidt 1993). Dieses tritt nur bei männlichen Individuen auf und fehlt bei Weibchen. Bei der Schwesternart *C. piger* fehlt das Cluster sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen. Bei *Cla-Elementen* handelt es sich um eine hochrepetitive Sequenzfamilie einer ca. 120 bp langen Sequenz, welche besonders durch ihren hohen AT-Gehalt von > 80 % auffällt (Schaefer und Schmidt 1981; Schmidt et al. 1980; Schmidt 1984). Generell treten *Cla-Elemente* bei *C. thummi* etwa 6-mal häufiger auf als bei *C. piger* (Schaefer und Schmidt 1981). Während sie bei *C. piger* hauptsächlich auf die Zentromerregion beschränkt sind, konnten bei *C. thummi* zusätzlich über 200 Loci mit *Cla-Element*-Clustern verteilt auf alle Chromosomenarme beobachtet werden. Unter anderem konnte im *non-transcribed-spacer (NTS)* der *rDNA* ein *Cla-Element*-Cluster identifiziert werden, welches nur bei *C. thummi* jedoch nicht bei *C. piger* vorkommt (Israelewski und Schmidt 1982; Schmidt und Godwin 1983). Die Sequenzierung der *Cla-Elemente* und der flankierenden Bereiche aus dem *NTS* zeigte, dass auch diese einen repetitiven Charakter haben. Des Weiteren konnten kurze „*target-site duplications*“ identifiziert werden. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass der *NTS* von *C. piger* kein *Cla-Element*-Cluster enthält, spricht für die Transponierbarkeit der *Cla-Elemente*. Der Vermehrung der *Cla-Elemente* während der Evolution könnten u. a. die Mechanismen des ungleichen „*crossing-overs*“ oder der Genkonversion zu Grunde liegen.

Da die Kopplung des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters mit M in *C. thummi* eindeutig ist, wurden *Cla-Elemente* als Sonde für das „*screening*“ einer genomischen λ -DNA-Bibliothek von *C. thummi* verwendet, um einen molekularen Zugang zu der geschlechtsbestimmenden Region zu erhalten (Kraemer und Schmidt 1993). Alle so erhaltenen Klone wurden durch FISH an Polytänchromosomen von *C. thummi*

Einleitung

lokalisiert. Ausgehend von zwei Klonen, die aus der „sex determining region“ (SDR) von *C. thummi* stammen und das hemizygoten *Clu-Element-Cluster* rechts und links flankieren, wurde ein „chromosomal walk“ gestartet. Auf diese Weise konnten insgesamt ca. 200 kb der SDR von *C. thummi*, sowie 120 kb der SDR von *C. piger* kloniert werden. Die ca. 200 kb lange Region von *C. thummi* wurde vollständig sequenziert. Es wurden insgesamt 15 Gene identifiziert (Abbildung 2). Eine Zuordnung der Sequenzinformation zu Proto-X- bzw. Proto-Y-Chromosom war zunächst nicht eindeutig möglich (Funke 2011). Auch der Übergang zum hemizygoten *Clu-Element-Cluster* auf dem Proto-Y-Chromosom konnte nicht identifiziert werden.

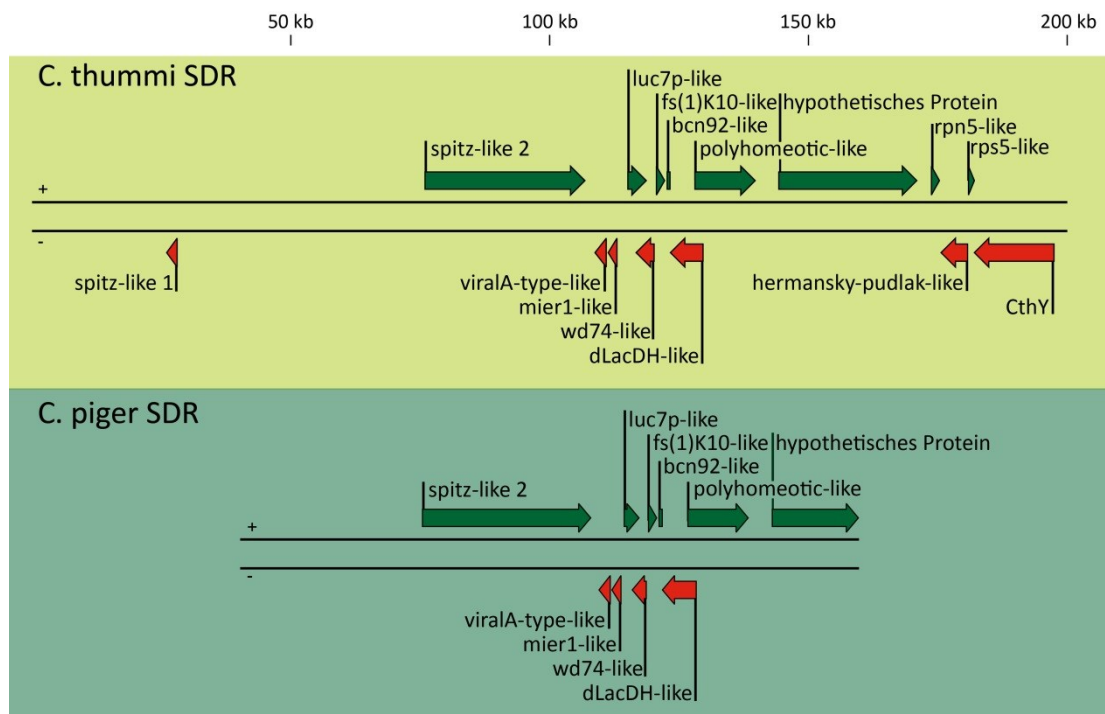


Abbildung 2: Lage der Gene in den bekannten Sequenzen der SDR aus *C. thummi* und *C. piger*

In der etwa 200 kb langen Sequenz aus *C. thummi* konnten 15 Gene identifiziert werden, in der etwas kürzeren Sequenz von *C. piger* 10 Gene. Lage und Orientierung der Gene ist in beiden Arten gleich. Eine eindeutige Zuordnung der vorliegenden Sequenzdaten zu Proto-X- oder Proto-Y-Chromosom konnte nur für wenige Sequenzbereiche erfolgen.

Auf Grundlage der vorliegenden Sequenzinformationen wurden jedoch genomische Southern Blots erstellt, welche geschlechtsspezifische Unterschiede u.a. im Bereich des Gens *fs(1)K10-like* zeigen (Stiehl 2009). Die beobachteten Unterschiede sind auf

Einleitung

die Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* auf dem Proto-Y-Chromosom zurück zu führen. Die Duplikation ist sowohl bei *C. thummi* als auch bei *C. piger* zu finden. Bei der Duplikation handelt es sich bisher um den einzigen deutlichen Unterschied, der zwischen Proto-X- und Proto-Y-Chromosom identifiziert werden konnte. Daher sind die beiden Genkopien *fs(1)K10-like Y1* und *fs(1)K10-like Y2* auf der Suche nach dem männchenbestimmenden Faktor M von besonderem Interesse.

1.2.1.7 EVOLUTION VON GESCHLECHTSCHROMOSOMEN

Weibliche oder männliche Heterogametie sind zwei der am weitesten verbreiteten Mechanismen zur Geschlechtsdetermination (Bull 1983). Um eine korrekte Entwicklung in weibliche bzw. männliche Individuen zu gewährleisten, sollte es im jeweils heterogametischen Geschlecht während der Meiose nicht zu Rekombinationsereignissen zwischen den geschlechtsbestimmenden Genen kommen (Nei 1969). Auch Rekombinationereignisse bei frühen mitotischen Teilungen der befruchteten Eizelle könnten sich negativ auswirken. Wird die Rekombination unterdrückt, führt dies wahrscheinlich in vielen Organismen mit heterogametischer Geschlechtsdetermination mehrfach zur Entwicklung heteromorpher Geschlechtschromosomen (Bergero und Charlesworth 2009; Charlesworth und Charlesworth 2000; Charlesworth et al. 2005). Schon früh wurde die These aufgestellt, dass sich Heterosomen aus einem Paar ursprünglich homologer Autosomen entwickelt haben (Muller 1918). Es wird davon ausgegangen, dass zunächst der Erwerb von mindestens zwei geschlechtsbestimmenden Loci stattgefunden haben muss (Kaiser und Bachtrog 2010). Dabei zeichnet sich das Proto-Y-Chromosom durch das Vorhandensein eines dominanten Weibchensuppressors und eines dominanten Männchenbestimmers aus. Das Proto-W-Chromosom hingegen trägt einen weiblichen Fertilitätsfaktor sowie einen Locus für männliche Sterilität. Als Folge der in diesem Bereich nicht stattfindenden Rekombination mit dem jeweiligen Homologen ist für das Y- bzw. W-Chromosom eine genetische Degeneration zu beobachten, die zum Verlust oder der Inaktivierung der meisten

Einleitung

Gene führt (Barton und Charlesworth 1998; Comeron et al. 2008; Charlesworth et al. 2009). Zudem ist oft eine Anhäufung repetitiver Elemente (z.B. Transposons) und eine damit einhergehende Heterochromatisierung des Y- bzw. W-Chromosoms zu beobachten. Bei fortschreitender Entwicklung der Heterosomen kommt es häufig zum Erwerb weiterer weibchen- bzw. männchenspezifischer Fertilitätsfaktoren auf dem W- bzw. Y-Chromosom (Ellegren und Parsch 2007). Durch diese unterschiedliche Entwicklung der beiden Geschlechtschromosomen weitet sich der von der Rekombination ausgeschlossene Bereich immer weiter aus, bis eine Paarung der Homologen nur noch in sogenannten pseudoautosomalen Bereichen stattfinden kann, die vorrangig der korrekten Segregation der Geschlechtschromosomen während der Meiose im heterogametischen Geschlecht. Entgegen der Hypothese von Muller ist bei ursprünglichen Lepidoptera-Arten ein X0-System zu beobachten. Dies könnte für eine spätere Entstehung des W-Chromosoms aus der Fusion eines Z-Chromosoms mit einem Autosom sprechen. Bei den in den meisten Arten auftretenden W-Chromosomen würde es sich demzufolge um ein Neo-W-Chromosom handeln (Traut et al. 2007; Sahara et al. 2012). Um die Mechanismen, die zur Evolution heteromorpher Geschlechtschromosomen geführt haben, besser zu verstehen, ist es von besonders großem Interesse, ursprüngliche Formen von Geschlechtschromosomen zu untersuchen. So weist z.B. *M. domestica* heteromorphe Geschlechtschromosomen auf, welche jedoch in ihrem genetischen Informationsgehalt relativ geringe Unterschiede zeigen (s. Abschnitt 1.2.1.2). Der geringe genetische Unterschied zwischen den Heterosomen macht auch ein System zur Dosiskompensation, wie es bei *Drosophila* oder *C. elegans* zu finden ist, unnötig (Charlesworth 1996; Marin et al. 2000). Auch Chironomiden weisen ein eher ursprüngliches System der Geschlechtsdetermination auf und befinden sich in einem frühen Stadium in der Entwicklung heteromorpher Geschlechtschromosomen, weswegen diese Spezies ideal geeignet sind, um frühe Prozesse während der Evolution heteromorpher Geschlechtschromosomen zu analysieren.

2 ZIELSETZUNG

Obwohl für *C. thummi* ein ca. 200 kb und für *C. piger* ein ca. 120 kb großer Abschnitt der SDR kloniert und sequenziert vorliegt (Blumensatt 2009; Funke 2011; Kraemer und Schmidt 1993), konnte bislang nur ein kleiner proto-Y-chromosomaler Bereich molekular identifiziert werden. Dieser umfasst eine männchenspezifische Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* (Stiehl 2009). Um weitere Informationen über die Struktur des Proto-Y-Chromosoms und eventuelle männchenspezifische Gene oder repetitive Elemente zu erhalten, sollen in dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden proto-Y-chromosomale Sequenzen identifiziert werden. Durch die Erstellung einer DNA-Bibliothek mit DNA aus männlichen *C. piger* Larven sollen proto-Y-chromosomale Klone identifiziert und die bekannte Sequenz im Bereich der Duplikation erweitert werden. Ein Vergleich mit der bekannten proto-X-chromosomalen Sequenz kann hierbei Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern zeigen. Auch soll versucht werden, das auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* hemizygot vorliegende *Clα-Element*-Cluster molekular zu lokalisieren.

Ein besonderer Fokus liegt in dieser Arbeit auf der genauen Analyse des auf dem Proto-Y-Chromosom dupliziert vorliegenden Gens *fs(1)K10-like*. Dabei sollen unter anderem transkriptomische NGS-Daten Auskunft über die eventuell differenzielle Expression der beiden männchenspezifischen Duplikate *fs(1)K10-like Y1* und *fs(1)K10-like Y2* im Vergleich zur proto-X-chromosomalen Kopie *fs(1)K10-like X* geben. Da es sich bei der Duplikation um den zu Beginn dieser Arbeit einzigen bisher identifizierten Unterschied zwischen Proto-X- und Proto-Y-Chromosom handelt, welcher in beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger* gezeigt werden konnte, ist die Analyse dieser Gene im Hinblick auf die Identifikation des männchenbestimmenden Faktors M von besonderem Interesse.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 VERSUCHSTIERE

Es wurden sowohl Embryonen als auch Larven der beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger* verwendet. Die Versuchstiere wurden aus einer ständigen Laborzucht des Instituts für Molekulargenetik der Universität Mainz entnommen. Die Zucht wird regelmäßig durch Wildfänge ergänzt. Dabei erfolgt die Identifikation der Spezies über das artspezifische Bandenmuster in den polytären Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsenzellen (Keyl 1962). Die Embryonen wurden in Form von Gelegen etwa 3-4 h nach Ablage entnommen. Die Larven wurden im 4. Larvalstadium (L4) für die Versuche eingesetzt.

3.2 FESTSTELLUNG DES GESCHLECHTS BEI CHIRONOMIDEN-LARVEN

Die Bestimmung des Geschlechts erfolgt bei Chironomiden-Larven anhand morphologischer Unterschiede der Genitalimaginalscheiben, welche im adulten Tier Ductus ejaculatorius (♂), Oviduct, Spermatheken und Schleimdrüsen (♀) bilden (Wülker und Götz 1968). Männliche Individuen bilden eine Genitalimaginalscheibe im 9. Segment und Weibchen zwei Genitalimaginalscheiben im 8. und 9. Segment aus. Da diese nur mikroskopisch untersucht werden können, wurden die lebenden Larven mit der ventralen Seite nach oben mit einem Deckglas und Knetmasse auf einem Objektträger fixiert und anschließend unter einem Mikroskop („Axiostar plus“ der Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) betrachtet. Die Entwicklung der Larve bzw. der Genitalimaginalscheiben in Larvenstadium 4 ist in 9 Phasen eingeteilt. Eine eindeutige Zuordnung kann etwa ab Phase 3 der Entwicklung vorgenommen werden. Abbildung 3 zeigt die männlichen und weiblichen Genitalimaginalscheiben in Phase 7.

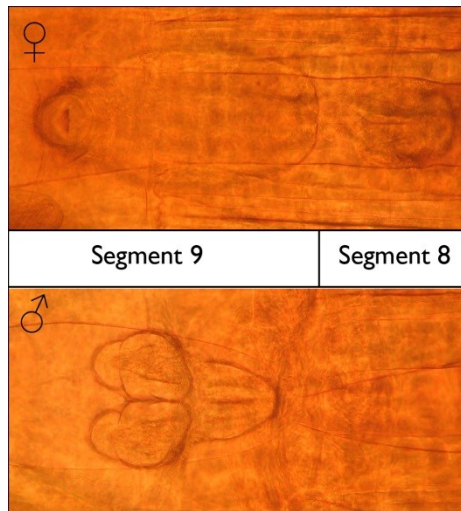


Abbildung 3: Genitalimaginalscheiben von *C. thummi* im Vergleich zwischen Weibchen und Männchen

Das obere Bild zeigt die beiden weiblichen Genitalimaginalscheiben, welche sich in Segment 8 und 9 befinden. Beim Männchen tritt nur eine Genitalimaginalscheibe in Segment 9 auf.

3.3 DNA-ISOLATION

3.3.1 ISOLATION GENOMISCHER DNA AUS CHIRONOMIDEN

Die Isolation genomischer DNA aus Chironomiden-Larven erfolgte nach einem abgeänderten Protokoll von (Schmidt et al. 1980). Etwa 2 g Larven (*C. thummi* bzw. *C. piger*, ♂ und ♀ getrennt) wurden mit 4,5 ml Homogenisierungspuffer (+ 1 % (v/v) Triton-X-100) in einem Glas-Teflon-Homogenisator auf Eis mechanisch aufgeschlossen. Das Homogenat wurde durch eine Gaze filtriert und diese mit 2 ml Homogenisierungspuffer gespült. Das Filtrat wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und 15 Minuten bei 2.500 g und 4 °C zentrifugiert (Kühlzentrifuge 3K30 der Fa. Sigma, Osterode am Harz, Deutschland). Die pelletierten Kerne wurden in 6 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 2-3-mal wiederholt und die Kerne zuletzt in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 125 µl Natriumdodecylsulfat (SDS, 10 %), 125 µl 10 x Dialysepuffer und einer Spatelspitze Proteinase K 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Zur Entfernung der Proteine aus der Lösung wurden mehrere Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI)- und Chloroform-Isoamylalkohol (CI)-Extraktionen

Material und Methoden

durchgeführt. Nach Zugabe von 200 µl 10 x Dialysepuffer wurde die DNA-haltige Lösung mit 2 ml 100 % eiskaltem Ethanol überschichtet. Die an der Grenzschicht ausfallende DNA wurde auf einem Glasstab aufgewickelt, in 70 % EtOH (Ethanol) gewaschen, anschließend an der Luft getrocknet und in 500 µl HPLC-H₂O (High Pressure Liquid Chromatography-H₂O) gelöst.

Für die Präparation von Einzellarven wurde das Protokoll wiederum leicht modifiziert. Die Larve wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 55 µl Homogenisierungspuffer (+ 1 % Triton-X-100) mit einem Mikropistill zerkleinert und direkt 15 Minuten bei 2.500 g und 4 °C zentrifugiert. Nach den oben beschriebenen Waschschritten wurde das Pellet in 300 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert. Um die Menge an Proteinase K entsprechend anzupassen, wurde eine Mikrospatelspitze in 200 µl 10x Dialysepuffer gelöst und davon 30 µl sowie 30 µl SDS zu jedem Ansatz pipettiert und bei 60 °C für 50 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die schon oben beschriebenen PCI- und CI-Extraktionen sowie eine Standard-Ethanol-Fällung durchgeführt.

3.3.2 ISOLATION VON PLASMID-DNA AUS DH10B

Um große Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde ein Protokoll nach Whitehead (Whitehead Institute/ MIT) angewendet, welches das Prinzip der alkalischen Lyse nutzt. Hierfür wurde eine 5 ml Vorkultur (5 ml L-Medium + 50 µl Ampicillin 100 mg/ml) einer einzelnen Bakterienkolonie mindestens 6 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Diese wurde in 500 ml L-Medium (+ 5 ml Ampicillin-Stammlösung) überführt und 12-18 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 Minuten bei 5.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 10 ml Lösung I resuspendiert und 5 Minuten bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml Lösung 2 wurde vorsichtig invertiert und wieder 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 15 ml Lösung III und anschließendem Invertieren erfolgte eine schnelle Neutralisation, was zum Ausfallen von Zellmembranbestandteilen führt. Nach einer 10 minütigen Inkubation

Material und Methoden

auf Eis wurden diese und die mit ihnen assoziierte genomische DNA in 20 Minuten bei 20.000 g und 4 °C pelletiert. Im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde mit 1 Vol. Isopropanol (100 %) gefällt und bei RT für 20 Minuten bei 5.000 g pelletiert. Das Pellet wurde in 6 ml TE-Puffer gelöst und nach der Zugabe von 3 ml 7,5 M Kaliumacetat 45 Minuten bei -80 °C inkubiert. Das hierbei ausfallende Kalium-SDS wurde bei RT und 5.000 g in 15 Minuten pelletiert. Die im Überstand verbleibende Plasmid-DNA wurde mit 2 Vol. EtOH (100 %) für 20 Minuten bei -20 °C gefällt und anschließend bei 5.000 x g (4 °C, 15 min) pelletiert. Das Pellet wurde in 700 µl 50T/50E-Puffer gelöst und nach Zugabe von 1 µl RNase A (Plasmid Miniprep.Kit I, Peqlab, Erlangen, DE) 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach drei PCI-Extraktionen und einer CI-Extraktion erfolgte erneut eine Fällung mit 1 Vol. Isopropanol (100 %). Das durch Zentrifugation (15 min, RT, 14.000 x g) entstandene Pellet wurde mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 100-300 µl HPLC-H₂O gelöst.

Für die Isolation kleiner Mengen an Plasmid-DNA (pUC-Klone aus pUC-Bibliothek oder pGEM T-easy-Klone aus der Klonierung von PCR-Produkten) wurde das Plasmid-Präparations-Kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit der Fa. Sigma Aldrige (St. Louis, USA) verwendet. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.4 RNA-ISOLATION

3.4.1 RNA-PRÄPARATION (GUANIDINTHIOCYANAT (GTC)-METHODE)

Ca. 100 männliche und weibliche Larven der Spezies *C. thummi* und *C. piger* wurden in je 6 ml GTC-Arbeitslösung aufgenommen und mit einem Glas-Teflon-Homogenisator zerkleinert. Dem Homogenat wurde 1/10 Vol. 2 M NaAcetat (pH 4,1) zugegeben. Anschließend wurden 6 PCI-Extraktionen, eine CI-Extraktion sowie eine Standardfällung mit 100 %igem EtOH durchgeführt. Das Pellet wurde in DEPC-H₂O gelöst. Die RNA aus *C. piger* Männchen und Weibchen wurde DNase I-verdaut. Es wurde der Lösung 1 Vol. DNase-Puffer (NEB, Frankfurt Deutschland) und 1 µl DNase I zugegeben und 10 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die

Material und Methoden

Lösung 10 min bei 75 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Poly-A+-Aufreinigung durchgeführt (s. Abschnitt 3.4.2). Die RNA aus *C. thummi* Männchen und Weibchen wurde direkt über an magnetische Beads gekoppelte genspezifische Oligonukleotide angereichert (s. Abschnitt 3.4.3). Vor den jeweiligen Anreicherungen wurden eine Gelelektrophorese und eine NanoDrop-Messung durchgeführt.

3.4.2 POLY-A+-AUFREINIGUNG

Die Poly-A+-Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoTrap® mRNA Mini-Kit der Fa. Macherey und Nagel (Düren, Deutschland). Es wurde nach dem Protokoll gearbeitet.

3.4.3 ANREICHERUNG ÜBER MAGNETISCHE BEADS

Gesamt-RNA aus *C. thummi* Männchen und Weibchen wurde über magnetische Beads (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles, Promega, Mannheim Deutschland) angereichert. Dabei wurde nach dem Protokoll vorgegangen. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide K10Y1-rev-bio und K10X-rev-bio befinden sich im Anhang.

3.5 MOLEKULARGENETISCHE STANDARD-METHODEN

3.5.1 ETHANOL-FÄLLUNG VON DNA

Um die DNA-Konzentration in einer Lösung zu erhöhen bzw. um Salze aus der DNA-Lösung zu entfernen, wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 10 x Dialysepuffer und 2 Vol. EtOH (abs.) bei -20 °C für mindestens 60 Minuten gefällt. Bei anschließender Zentrifugation (30 min., 4 °C, 16.000 x g) wurde die DNA pelletiert und das Pellet anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen. Das vollständig an Raumluft getrocknete Pellet wurde in einer entsprechenden Menge HPLC-H₂O gelöst.

Material und Methoden

3.5.2 PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION

Eine Extraktion mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1, v:v:v) wurde zur Entfernung von Proteinverunreinigungen aus Nukleinsäurelösungen verwendet. Hierfür wurde 1 Vol. PCI auf die Nukleinsäurelösung gegeben und die dabei entstehenden beiden Phasen durch Invertieren (5 min) durchmischt. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation (10 min., RT, 16.000 x g) beschleunigt und die obere nukleinsäurehaltige Phase anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Je nach Grad der Verunreinigung wurde die Extraktion mehrfach wiederholt. Um Phenolreste zu entfernen, wurde zuletzt eine Extraktion mit Chloroform und Isoamylalkohol (CI, 24:1, v:v) durchgeführt. Auch hier wurde 1 Vol. auf die Nukleinsäurelösung gegeben, durch leichtes Invertieren beide Phasen gemischt und nach einer Zentrifugation (10 min., RT, 16.000 x g) die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.5.3 RESTRIKTION VON DNA

3.5.3.1 RESTRIKTION GENOMISCHER DNA ZUR ERSTELLUNG VON SOUTHERN BLOTS

Um Restriktionsfragmentanalysen vorzunehmen, wurden genomische Southern Blots hergestellt (3.12.2). Zu diesem Zweck wurde genomische DNA von *C. piger* bzw. *C. thummi* Männchen und Weibchen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen behandelt. Um einen vollständigen Verdau der genomischen DNA zu gewährleisten, wurden jeweils ca. 5 µg DNA mit 2 µl Enzym in einem Gesamtvolumen von 150 µl für 2 h bei 37 °C restringiert. Es wurde ein µl Enzym hinzugegeben und die Restriktion über Nacht fortgesetzt. Danach erfolgte eine Standard-Ethanol-fällung. $\frac{1}{10}$ Vol. der restringierten DNA wurde auf einem Agarose-Testgel auf eine vollständige Restriktion überprüft. War keine vollständige Restriktion erfolgt, wurde die gefällte DNA erneut wie oben beschrieben verdaut. Für die Restriktion der genomischen DNA wurden die

Material und Methoden

Enzyme HincII und HindIII der Fa. Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet.

3.5.3.2 RESTRIKTION VON PLASMID-DNA

Zur Überprüfung der Integratgröße rekombinanter Plasmide wurden diese mit Restriktionsenzymen behandelt. Der für die Klonierung von PCR-Produkten verwendete Vektor pGEM®-T Easy wurde mit dem Enzym EcoRI behandelt, um das Integrat herauszuschneiden. Bei der Restriktion rekombinanter pUC-Vektoren erfolgte ein gleichzeitiger Verdau mit den Enzymen EcoRI und HindIII. Alle verwendeten Enzyme stammen von der Fa. Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Für die Restriktion wurden ca. 300 µg Plasmid-DNA mit einem µl Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2-3 h bei 37 °C verdaut.

3.5.4 AGAROSE GELELEKTROPHORESE

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte je nach Anwendung in unterschiedlichen Gelelektrophorese-Kammern. Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäure-Fragmente wurden Agarosegele mit 1 % - 1,5 % Agarose in 1 x TBE (w:v) hergestellt. Als Marker wurden die in Abbildung 4 dargestellten Molekulargewichtsstandards der Fa. Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Zur Beschwerung der Proben und um die Laufgeschwindigkeit einschätzen zu können, wurde diesen $\frac{1}{6}$ Vol. Bromphenolblau-DNA-Ladepuffer (BPB) oder 30 %ige Saccharose-Lösung zugegeben. Die Gele wurden in einer Ethidiumbromid-(EtBr)-Färbelösung (5 µg/ml in 1 x E-Puffer) inkubiert und anschließend kurz gewässert. Die DNA kann durch Anregung des interkalierenden Farbstoffs EtBr bei 312 nm auf dem Transilluminator der Fa. Bachofer (Reutlingen, Deutschland) sichtbar gemacht werden. Die Dokumentation erfolgte durch das Carestream Gel Logic 112 System (Carestream Health, Rochester, USA). Zur besseren Darstellung der Gelbilder wurden diese farblich invertiert.

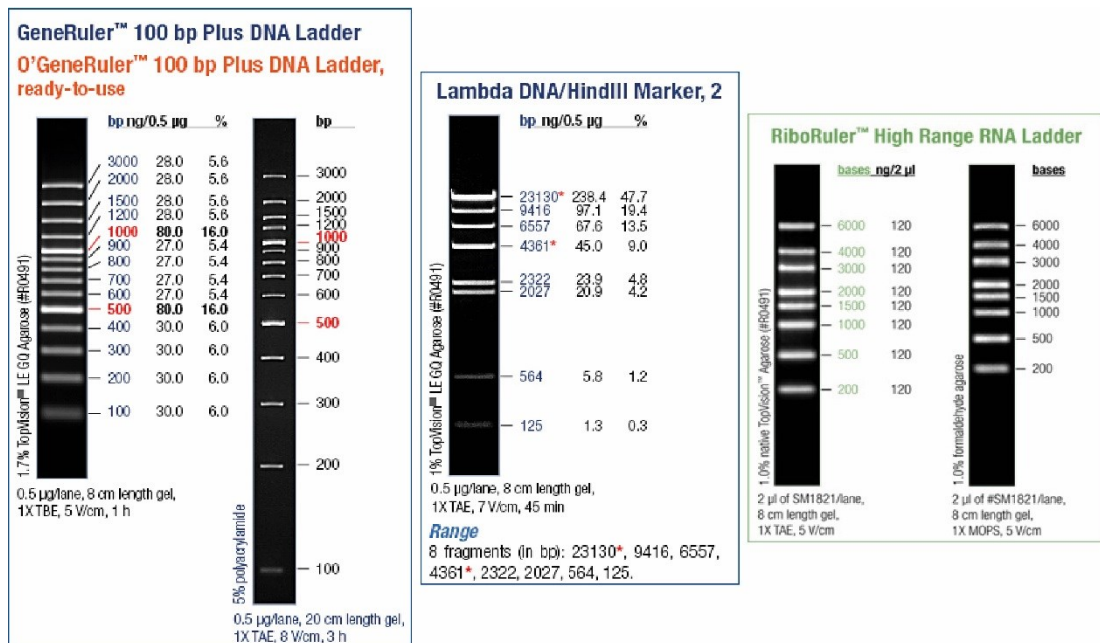


Abbildung 4: Verwendete Molekulargewichtsstandards der Fa. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

Die beiden linken Bilder zeigen die verwendeten DNA-Marker, wohingegen der auf dem rechten Bild dargestellte Marker für RNA-Gele eingesetzt wurde.

3.5.4.1 TESTGELE

Zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von DNA-Lösungen wurden diese auf vertikale GENTERphorese™-Kammern der Fa. GENTERprise (Mainz, Deutschland) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in den 7 cm x 6,5 cm x 0,1 cm großen Gelen in einem TBE-Puffersystem bei 100-150 mA für 30-45 Minuten. Von den oben aufgeführten Markern wurden je 2 µl eingesetzt. Die Testgele wurden anschließend für 3-5 Minuten im EtBr-Färbepfad inkubiert

3.5.4.2 PRÄPARATIVE/ ANALYTISCHE GELE

Um DNA-Fragmente besser aufzutrennen, wurde die Gelelektrophorese in großen vertikalen Gelkassetten (18 cm x 13 cm x 0,4 cm) durchgeführt. Mit dem auch bei den Testgelen verwendeten TBE-Puffersystem erfolgte die Auftrennung bei 30 mA für 3 bis 4 h. Bei einer längeren Laufzeit von 16-20 h erfolgte die Gelelektrophorese bei 15 mA in einem speziellen Natriumphosphatpuffer-System (E-Puffer). Die dabei verwendeten Gele wurden ebenfalls mit E-Puffer hergestellt. Bei beiden Systemen wurden jeweils 5 µl der oben aufgeführten Molekulargewichtsstandards eingesetzt. Das Anfärben in der EtBr-Lösung erfolgte für mindestens 5-10 Minuten. Um bei der Wiedergewinnung der aufgetrennten DNA für die pUC-Bibliotheken eine Schädigung der DNA zu vermeiden, wurden in diesem Fall nur die Marker-Spuren und schmale Randbereiche der DNA-Spur gefärbt und mit UV-Licht bestrahlt.

3.5.4.3 RNA-GELE

Um RNA gelelektrophoretisch aufzutrennen, ist es von Vorteil, die Bildung von Sekundärstrukturen durch denaturierende Bedingungen während der Gelelektrophorese zu verhindern. Denaturierende Agarosegele wurden aus 1,2 % Agarose in 1 x MOPS, versetzt mit 15 % Formaldehyd, hergestellt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1 x MOPS verwendet. Den RNA-Proben wurden 1 µl EthBr-Stammlösung und 3 Vol. RNA-Ladepuffer zugegeben. Es erfolgte eine Denaturierung bei 72 °C für 10 min und die Zugabe von 0,1 Vol. RNA-Färbelösung. Als Molekulargewichtsstandard wurde die RiboRuler High Range RNA Ladder der Fa. Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet. Zur qualitativen und quantitativen Überprüfung von RNA-Isolationen wurden die auch bei DNA-Testgelen verwendeten Gelkammer-Systeme eingesetzt. Bei der Anfertigung eines Northern Blots wurden die unter 3.5.4.2 beschriebenen großen Gelkammern verwendet. Der Nachweis erfolgte wie in Abschnitt 3.5.4 erläutert.

3.5.5 WIEDERGEWINNUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN

3.5.5.1 ELEKTROELUTION

Größere DNA-Fragmente wurden durch Elektroelution aus Agarosegelen wiedergewonnen. Dabei wurden die gewünschten Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und je ein ca. 0,5 cm breites Gelstück mit 600 µl 0,5 x TBE in einen Dialyseschlauch der Fa. Medicell International (London, UK) überführt. Dieser wurde mit Kunststoff-Klammern verschlossen und in eine Elektrophoresekammer mit 0,5 x TBE gelegt. Die Elektroelution erfolgte unter Eiskühlung bei 100 mA für 1-2 h. Um an der Dialysemembran anhaftende DNA-Fragmente zu lösen, wurde die elektrische Schaltung für 5 min umgepolt und anschließend für 1 min in die ursprüngliche Richtung gestellt. Die im Dialyseschlauch befindliche DNA-Lösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, der Schlauch anschließend mit 300 µl 0,5 x TBE gespült und das Eluat mit der ersten DNA-Lösung vereint.

3.5.5.2 WIEDERGEWINNUNG ÜBER KIT

Um kleinere DNA-Fragmente (meist PCR-Produkte) aus Agarosegelen wiederzugewinnen, wurde das GenElute™ Gel Extraction Kit der Fa. Sigma Aldrich (St. Louis, USA) verwendet. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

3.6 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

3.6.1 STANDARD-PCR

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche wurde die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion genutzt. Standardmäßig wurde die GoTaq® DNA Polymerase der Fa. Promega (Madison, USA) sowie der Thermocycler T3 der Fa. Biometra, (Göttingen, Deutschland) verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Fa. Sigma Aldrich (St.

Material und Methoden

Louis, USA) bezogen. Eine Liste der verwendeten Primer befindet sich im Anhang. Die Parameter der PCR wurden an die jeweiligen Versuche angepasst. In Tabelle 2 und Tabelle 3 sind ein Standard PCR-Ansatz sowie ein Standard PCR-Programm gezeigt.

Tabelle 2: Standard PCR-Ansatz

5 x GoTaq[®]-Puffer	10 µl
MgCl₂ (25 mM)	4 µl
dNTPs (10 mM each)	1 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
Template DNA (ca. 20 ng/µl)	1 µl
HPLC-H₂O	31,75 µl
GoTaq[®] DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl

Tabelle 3: Standard PCR-Programm

Initiale	94°C	5 min	
Denaturierung			
Denaturierung	94°C	30 sec	
Annealing	54-58°C	30 sec	40 x
Elongation	72°C	1 min/kb	
Finale	72°C	5 min	
Elongation			
	4°C	∞	

Erfolgte eine direkte Sequenzierung der PCR-Produkte, so wurden diese mit 10 U Exonuklease I und 0,9 U alkalischer Phosphatase der Fa. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) für 25 min bei 37 °C verdaut und anschließend zur Inaktivierung der Enzyme

Material und Methoden

15 min bei 72 °C inkubiert. Teilweise wurden die PCR-Produkte zunächst in den Vektor pGEM[®]-T Easy der Fa. Promega (Madison, WI, USA) kloniert (s. Abschnitt 3.7). Waren die Ergebnisse der Standard-PCR nicht zufriedenstellend (kein Produkt, viele unspezifische Produkte), wurde in Einzelfällen eine Amplifikation mit der Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase der Fa. NEB (Ipswich, USA) durchgeführt.

3.6.2 LONG-RANGE-PCR

Zur Amplifikation eines ca. 4 kb großen Abschnittes des Proto-Y-Chromosoms von *C. thummi* wurde die LA Taq DNA-Polymerase der Fa. Takara Bio (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Tabelle 4 und 5 zeigen PCR-Ansatz und PCR-Programm für die durchgeführte Long-Range-PCR.

Tabelle 4: Long-Range PCR-Ansatz

Puffer (MgCl₂ plus)	5 µl
dNTPs (10 mM each)	2 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
Template DNA (ca. 600 ng/µl)	2 µl
HPLC-H₂O	38,5 µl
LA Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl

Tabelle 5: Long-Range-PCR-Programm

Initiale	95°C	1 min	
Denaturierung			
Denaturierung	95°C	10 sec	
Annealing	53°C	1 min	30 x
Elongation	72°C	5 min	
Finale	72°C	10 min	
Elongation			
	4°C	∞	

3.7 KLONIERUNG VON PCR-PRODUKTEN

PCR-Produkte wurden standardmäßig in den Vektor pGEM[®]-T Easy der Fa. Promega (Madison, WI, USA) kloniert. Hierbei wurden etwa 100 ng PCR-Produkt (direkt oder

Material und Methoden

nach Gelextraktion) in 5 ng Vektor (5 ng/ μ l) kloniert. Nach Zugabe von 1 μ l 10 x Ligasepuffer und 1 μ l T4 DNA Ligase (1 U/ μ l) (Roche, USA) wurde die Ligation in insgesamt 10 μ l \ddot{u} . N. bei 4 $^{\circ}$ C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde gefällt und in 10 μ l HPLC-H₂O gelöst. 1-2 μ l der gefällten Ligation wurden anschließend in elektrokompetente *E. coli*-Zellen des Typs DH10B elektrotransformiert.

3.8 HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden *E. coli*-Bakterien des Stammes DH10B (Grant et al. 1990) verwendet. 50 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie DH10B angeimpft und \ddot{u} . N. bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Je 10 ml der \ddot{u} . N.-Kultur wurden 4 x 500 ml LB-Medium überführt und unter Schütteln bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert, bis eine definierte Zelldichte erreicht war. Diese wurde durch eine OD600-Messung mit dem BioPhotometer der Fa. Eppendorf (Hamburg, Deutschland) ermittelt, wobei der Absorptionswert zwischen 0,71 und 0,72 liegen soll. Nach dem Erreichen dieses Wertes folgte eine 45 minütige Inkubation auf Eis und anschließend eine Zentrifugation bei 2.500 Upm (15 min, 4 $^{\circ}$ C) in vorgekühlten Zentrifugenbechern der Zentrifuge 4K15C der Fa. Sigma (Osterode am Harz, Deutschland). Je zwei der entstandenen Pellets wurden in 100 ml sterilem, eiskaltem HPLC-H₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert (2.500 Upm, 20 min, 4 $^{\circ}$ C). Die Zellpellets wurden nun in 30 ml eiskaltem HPLC-H₂O resuspendiert, in kleinere 80 ml Zentrifugenbecher überführt und bei 2.500 Upm (20 min, 4 $^{\circ}$ C) in der Kühlzentrifuge 3K30 der Fa. Sigma (Osterode am Harz, Deutschland) zentrifugiert. Zuletzt wurden die Pellets in 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut 20 min bei 2.500 Upm (4 $^{\circ}$ C) zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis zu je 40 μ l in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -80 $^{\circ}$ C gelagert.

3.9 TRANSFORMATION MITTELS ELEKTROPORATION

Elektroporation ist eine effiziente Methode zur Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA (Dower et al. 1988). Hierfür

Material und Methoden

wurde das rekombinante Plasmid in ca. 40 µl einer Suspension elektrokompetenter Zellen gegeben und kurze Zeit bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine gekühlte Küvette (Gene Pulser® Cuvette) der Fa. Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) mit einer Spaltbreite von 0,1 cm überführt. Die Transformation erfolgte im Elektroporator Micro Pulser™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) bei 1,8 kV für ca. 3-5 ms. Die Zellsuspension wurde sofort in vorgewärmtes LB-Medium aufgenommen und in einem 15 ml Reaktionsgefäß unter Schütteln für maximal 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100-200 µl des Transformationsansatzes auf Agarplatten ausplattiert und 16-20 h bei 37 °C bebrütet.

3.10 SANGER-SEQUENZIERUNG

Zur Aufklärung der Sequenz von PCR-Produkten (direkt oder kloniert) und von pUC-Klonen aus den DNA-Bibliotheken von *C. piger* wurden diese bei der Fa. Starseq GmbH (Mainz, Deutschland) Sanger-sequenziert. Hierfür wurden bei der direkten Sequenzierung der PCR-Produkte etwa 50-100 ng aufgereinigte DNA eingesetzt. Für die Sequenzierung der pUC-Klone bzw. klonierter PCR-Produkte wurden je 400-700 ng benötigt. Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte erfolgte mit den Standard-Primern Sp6 und T7, wohingegen die puC-Klone und die nicht klonierten PCR-Produkte mit sequenzspezifischen Primern sequenziert wurden.

3.10.1 BIOINFORMATISCHE SEQUENZAUSWERTUNG

Die von der Fa. Starseq erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme EditSeq und SeqMan (Lasergene8® der Fa. DNASTAR Inc., Madison, USA) editiert und analysiert. Die optische Kontrolle der Chromatogramm-Dateien erfolgte mit dem Programm FinchTV der Fa. Geospiza Inc. (Seattle, USA). SeqMan wurde vor allem für die Erstellung von Sequenz-Alignments aus den einzelnen Subsequenzen der pUC-Klone aus den genomischen DNA-Bibliotheken genutzt. Bei den Alignments auftretende Lücken oder heterogene Bereiche wurden mit speziell angepassten Primern erneut sequenziert und abgesichert.

Material und Methoden

Um die Lage von Sequenzen in einer bekannten Referenzsequenz zu überprüfen, wurden diese mit Hilfe des Programms CLC Main Workbench (CLCBio, Aarhus, Dänemark) an die Referenz aligniert.

Der BLAST-Algorithmus wurde genutzt, um die Datenbank des NCBI (Bethesda, USA) nach ähnlichen Sequenzen zu durchsuchen und so Rückschlüsse auf die Struktur bzw. Funktion bestimmter Sequenzen ziehen zu können.

3.11 DNA-MARKIERUNGS-TECHNIKEN

3.11.1 RANDOM PRIMED OLIGO LABELING

Beim „*random primed oligo labeling*“ binden Oligonukleotide zufälliger Sequenz an eine einzelsträngige DNA-Matrize (Feinberg und Vogelstein 1983). Diese dienen dann als Primer für das Klenow-Enzym (Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*) und es findet eine Elongation unter Einbau markierter Nukleotide statt. Diese Methode wurde für die radioaktive Markierung bzw. für die Fluoreszenzmarkierung mit Digoxigenin (DIG) eingesetzt.

3.11.1.1 RADIOAKTIVE MARKIERUNG MIT [α 32 P]-dATP

Es wurden zunächst ca. 200 ng der zu markierenden DNA in 11 μ l HPLC-H₂O aufgenommen, für 10 Minuten bei 96 °C denaturiert und sofort auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von je 1 μ l dTTP, dGTP und dCTP (je 0,5 mM), sowie 2 μ l Hexanukleotidmix aus dem Random Primed DNA Labeling Kit der Fa. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland). Im Isotopenlabor wurden 5 μ l [α 32 P]-dATP (10 μ Ci/ μ l) und 1 μ l Klenow-Enzym (2 U/ μ l) hinzugegeben. Die Markierung erfolgte für 2,5 h bei RT. Die DNA wurde im Anschluss gefällt und in 100 μ l HPLC-H₂O gelöst.

Material und Methoden

3.11.1.2 FLUORESZENZMARKIERUNG MIT DIGOXYGENIN

Die Markierung von Sonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin(DIG)-markiertem dUTP wurde mit dem DIG DNA Labeling Kit der Fa. Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Es wurde ca. 100 ng zu markierender DNA mit HPLC-H₂O auf ein Volumen von 15 µl aufgefüllt, 10 Minuten bei 96 °C denaturiert und auf Eis inkubiert. Es wurden 2 µl Hexanukleotid-Mix, 2 µl dNTP-Mix sowie 1 µl Klenow-Enzym zugegeben. Die Markierung erfolgte ü. N. bei RT. Im Anschluss folgte die Zugabe von 30 µl HPLC-H₂O, 50 µl 10 x SSC, 1 µl 1 % SDS sowie 4 µl heterologe *E. coli*-DNA („Carrier“-DNA, 50 µg/ml).

3.11.2 NICK TRANSLATION

Für die Markierung mit Biotin wurde das BioNick™ Labeling System der Fa. Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Hier wird die 5´-3´-Exonuklease- und 3´-5´-Polymerase-Aktivität der Polymerase I von *E. coli* genutzt, um an Einzelstrangbrüchen („Nicks“) unter Abbau der ursprünglichen Nukleotiden neue markierte Nukleotide einzubauen. Ca. 1 µg DNA wurde mit HPLC-H₂O auf 40 µl aufgefüllt. Es wurden 5 µl dNTP-Mix und 5 µl Enzym-Mix zugesetzt. Nach 2,5 h bei RT wurden 5 µl Stopp-Puffer, 50 µl 10 x SSC sowie 1 µl 10 % SDS und 4 µl Carrier-DNA (*E. coli* 50 µg/ml) zugesetzt.

3.12 HYBRIDISIERUNGSTECHNIKEN

3.12.1 FLUORESZENZ-*IN-SITU*-HYBRIDISIERUNG (FISH)

Die FISH erfolgte an polytären Riesenchromosomen aus Speicheldrüsen von *C. thummi* bzw. *C. piger*. Beim Öffnen von Larven im 4. Larvalstadium zwischen dem ersten und zweiten Thorakalsegment treten zwei Speicheldrüsen aus. Diese wurden für 5-10 Minuten in 50 %iger Essigsäure fixiert. Anschließend wurden die Speicheldrüsen unter einem Deckgläschen gequetscht und für mindestens 10 Minuten auf Kohlendäureschnee mit dem Objekt nach unten inkubiert. Das

Material und Methoden

Deckgläschen wurde anschließend mit einem Skalpell abgehoben und die Objektträger in eine Küvette mit 100 % Isopropanol überführt.

Um die Präparate für die FISH vorzubereiten, wurden diese für jeweils 5 Minuten in 70 %, 50 % und 30 % Isopropanol sowie in 0,1 x SSC inkubiert. Zur Stabilisierung der Chromosomen folgte eine Inkubation in 2 x SSC für 30 Minuten bei 70 °C. Nach dem Abkühlen auf RT wurden die Präparate erneut in 0,1 x SSC überführt, in 0,05 N NaOH für 1 Minute denaturiert und dann in eiskaltem 0,1 x SSC neutralisiert. Die Präparate wurden die Alkoholreihe wieder bis zum 100 % Isopropanol aufwärts geführt und an der Luft getrocknet.

Auf die so vorbereiteten Präparate wurden bei Einzelhybridisierungen 8 µl, bei Doppelhybridisierungen je 5 µl einer Fluoreszenz-markierten Sonde (3.11.1 und 3.11.2) pipettiert. Die Sonden wurden zuvor bei 96 °C für 10 Minuten denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert. Die Präparate wurden mit Deckgläschen abgedeckt, mit Flüssiggummi abgedichtet und in einer feuchten Kammer ü. N. bei 52 °C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 5 Minuten in 2 x SSC und 10 Minuten in 1 x PBS gewaschen. Es wurden, je nach Markierung der Sonde, 8 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierter Anti-DIG-Antikörper (1:30 verdünnt mit PBS / BSA) bzw. 8 µl Rhodaminisothiocyanat (TRITC)-markiertes Avidin (1:75 verdünnt mit PBS / BSA) auf die Chromosomenpräparate gegeben. Bei Doppelmarkierungen wurden je 5 µl beider Antikörper eingesetzt. Die Präparate wurden mit Deckgläschen und Flüssiggummi abgedichtet. Die Nachweisreaktion erfolgte für 2-3 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Es folgte ein weiterer Waschschrift für 10 Minuten in 1 x PBS. Um ein schnelles Ausbleichen der Präparate zu verhindern, wurden diese in 5 µl Glycerin-Para-Phenylendiamin-Mix eingebettet und mit einem Lack versiegelt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Olympus BX61 der Fa. Olympus (Hamburg, Deutschland). Die Dokumentation wurde mit der Software CellF und der Kamera Color View III der Fa. Soft Imaging System GmbH (Münster, Deutschland) durchgeführt.

3.12.2 SOUTHERN-HYBRIDISIERUNG

Bei der DNA-DNA-Hybridisierung (Southern 1975) wird mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen verdaute DNA zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann durch Diffusionsvorgänge auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Bei der hier angewendeten „Sandwich“-Technik wird die DNA gleichzeitig auf zwei Membranen übertragen. Das Agarosegel wird hierfür zunächst in einem EtBr-Bad gefärbt und anschließend dokumentiert (3.5.4.2). Die Markerbanden wurden mit einem Spatel durchstoßen.

Durch Inkubation in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl) wird die DNA für 25 Minuten im Gel denaturiert und danach 25 Minuten in Neutralisierungslösung (3 M NaCl/ 0,5 M Tris pH 7,0) neutralisiert. Das so vorbereitete Gel wurde zwischen zwei Nitrozellulosemembranen gelegt und zur Verstärkung des Diffusionsstroms beidseitig mit Filterpapier und Handtuchpapier umgeben. Der Transfer erfolgte ü. N. Die bei Anregung durch UV-Licht sichtbaren Markerbanden wurden auf der Nitrozellulosemembran mit einem Fettstift markiert. Zur Fixierung der DNA auf der Membran wurde diese 2 h bei 80 °C inkubiert. Die Blots wurden für 3-4 Stunden in 2 x PM / 6 x SSC / 1 % SDS (DENHARDT, 1966) bei 60 °C präinkubiert. Den, wie in Abschnitt 3.11.1.1 beschrieben, mit [α 32 P]-dATP markierten Sonden wurden 100 μ l Carrier-DNA (*E. coli* 50 μ g/ml) zugegeben. Die Sonden wurden 10 Minuten bei 96 °C denaturiert, auf Eis inkubiert, in 20 ml Hybridisierungslösung aufgenommen und mit der Nitrozellulosemembran in Glashybridisierungsröhren überführt. Die Hybridisierung erfolgte für 18-20 h bei 60 °C. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mehrfach bei 60 °C mit 2 x SSC gewaschen, um ungebundene Sonden zu entfernen. Die Nitrozellulosemembran wurde getrocknet, auf Filterpapier aufgeklebt und in Folie verpackt. Die Exposition eines für Röntgenstrahlen empfindlichen Films (Fuji Medical X-Ray, Japan) fand in einer Expositionskassette mit Verstärkerfolie bei -80 °C statt.

3.12.3 NORTHERN-HYBRIDISIERUNG

Bei der Northern-Hybridisierung wird die bei der Southern-Hybridisierung (3.12.2) eingesetzte Technik auf RNA übertragen. Um die Bildung von Sekundärstrukturen in der RNA zu vermeiden, wird bei der Gelelektrophorese ein denaturierendes Agarosegel verwendet (3.5.4.3). Da von einer geringen Menge an Transkripten auf dem RNA-Gel ausgegangen wurde, erfolgte die Übertragung der RNA auf nur eine Nitrozellulosemembran. Bei einem solchen unidirektionalen Blot wird der Diffusionsstrom erhöht, indem über ein Filterpapier 20 x SSC durch das Gel und die Nitrozellulosemembran gesaugt wird. Da RNA bereits einzelsträngig ist, entfällt in diesem Fall die Denaturierung. Das Gel wurde nach dem Färben und Dokumentieren kurz in 10 x SSC überführt. Der Blot wurde, wie in Abbildung 5 dargestellt, aufgebaut. Der Transfer erfolgte ü. N. Die Hybridisierung erfolgte mit einer DNA-Sonde. Die Sonden-Herstellung, Hybridisierung und Exposition erfolgte wie in den Abschnitten 3.11.1.1 und 3.12.2 dargestellt.

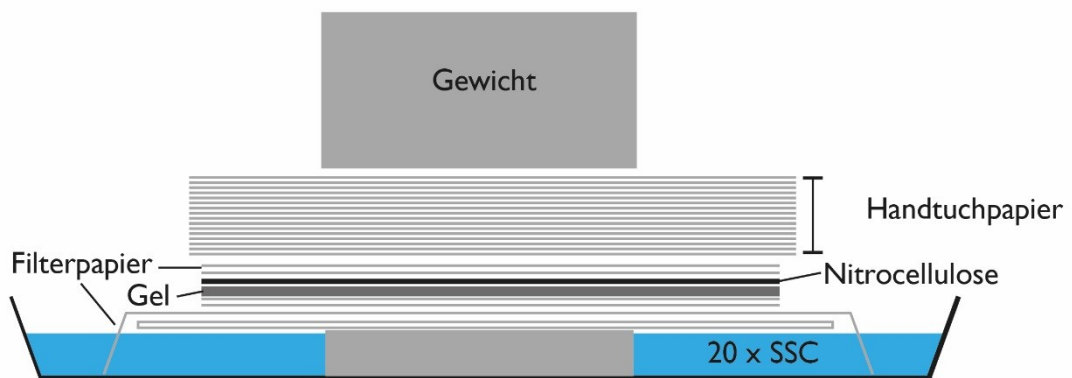


Abbildung 5: Aufbau eines unidirektionalen Blots

20 x SSC wird über ein Filterpapier durch das Gel geleitet und verstärkt die Diffusion der Nukleinsäure. Diese bindet an die darüber befindliche Nitrozellulosemembran.

3.12.4 KOLONIEFILTERHYBRIDISIERUNG

Bei der Koloniefilterhybridisierung (Grunstein und Hogness 1975) wurde zunächst mit einem Nitrozelluloserundfilter ein Abklatsch von einer Agarplatte mit potenziell rekombinanten Bakterienkolonien angefertigt. Die Rundfilter wurden 7 Minuten in 0,5 M NaOH inkubiert und getrocknet. Es folgten je 5 Minuten Inkubation in 1,5 M Tris (pH 7) sowie in 0,5 M Tris/ 1,5 M NaCl (pH 7,4). Die trockenen Filter wurden 30 Minuten in einer Proteinase K-Lösung (1 mg/ml in 1 x SSC) inkubiert und anschließend kurz durch 100 % EtOH gezogen. Nach 5 Minuten Inkubation in 0,3 M NaCl wurden Koloniereste durch festes Drücken zwischen Filterpapieren entfernt und die DNA für 2 h bei 80 °C auf den Nitrozelluloserundfiltern fixiert. Die Vorbereitung der Nitrozelluloserundfilter für die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde erfolgte wie bei der Southern-Hybridisierung (Abschnitt 3.12.2). Die Hybridisierung fand ü. N. bei 60 °C in einer Petrischale statt, wobei pro Filter 900 µl Hybridisierungslösung mit Sonde (Abschnitt 3.11.1.1) eingesetzt wurden. Die Filter wurden mehrmals 10-15 Minuten bei 60 °C mit 2 x SSC gewaschen, getrocknet und in einer Expositionskassette mit Verstärkerfolie bei -80 °C exponiert (Röntgenfilm: Fuji Medical X-Ray (Japan)). Durch den Vergleich des Autoradiogramms mit den bewachsenen Agarplatten konnten mögliche Positivklone bestimmt werden. Um positive Signale zu bestätigen, wurden die in Frage kommenden Kolonien auf einem gerasterten Nitrozelluloserundfilter ausgestrichen. Von dem Filter wurde eine Replik angefertigt, von der später die positiven Kolonien gepickt und vermehrt werden konnten. Die Filter wurden ü. N. bei 37 °C inkubiert und dann, wie oben beschrieben, behandelt.

3.13 ERSTELLUNG VON GENOMISCHEN DNA-BIBLIOTHEKEN

Im Rahmen einer Bachelorarbeit (D. Kappes 2011) wurde eine genomische DNA-Bibliothek (pipUC1) im Vektor pUC18/19 von *C. piger* Männchen angefertigt. Eine weitere pUC-Bibliothek (L208) aus DNA von *C. piger* Männchen wurde von R. Baader hergestellt. Beide Bibliotheken wurden mit Sonden aus der SDR von *C. thummi* durchsucht, welche sich im Bereich der Gene *fs(1)K10-like* (*K10*) und *d-Lactat-DH-like* (*dLacDH*) befinden.

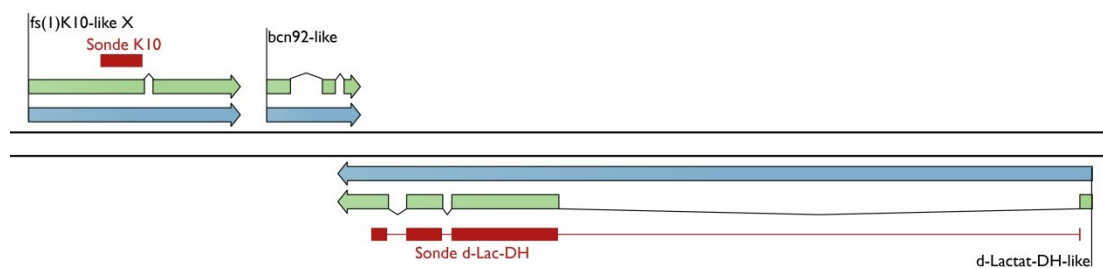


Abbildung 6: Lage der für das "screening" der pUC-Banken L208 und pipUC1 verwendeten Sonden K10 und dLacDH (rot) in der SDR von *C. thummi* Weibchen

Als Sonden für das "screening" wurden PCR-Produkte aus einer Amplifikation aus cDNA im Bereich der Gene *fs(1)K10-like* und *d-Lactat-DH-like* verwendet.

Abbildung 6 zeigt die Lage der Sonden, welche mit den Primern K10for-TM und K10rev-TM bzw. dLacDH-Test-31kb-Exon-for und dLacDH-1rev aus cDNA von *C. thummi* Weibchen durch RT-PCR generiert wurden. Des Weiteren wurde eine Sonde aus dem Bereich des Gens *doublesex* (*dsx*) verwendet, welches außerhalb der geschlechtsbestimmenden Region liegt. Die mit der *dsx*-Sonde identifizierten Klone werden hier nicht weiter besprochen.

Aus dem ersten "screening" mit den oben aufgeführten Sonden ergaben sich 149 Signale bei pipUC1 und 771 Signale bei L208. Die entsprechenden Klone wurden als Duplikat auf gerasterte Nitrozellulosemembranen ausgestrichen und nach einer Koloniefilterbehandlung erneut mit den Sonden hybridisiert. Dabei konnten für pipUC1 23 Signale und für L208 18 Signale verifiziert werden. Die DNA der insgesamt 41 positiven Klone wurde über eine Plasmid-Minipräparation isoliert. Es folgte eine

Material und Methoden

Restriktion der Plasmid-DNA mit *EcoRI* und *HindIII* und eine elektrophoretische Auftrennung der restringierten DNA. Die anschließend angefertigten Southern Blots wurden mit den einzelnen Sonden aus den ersten beiden „screenings“ hybridisiert, um die Klone den entsprechenden Sonden zuzuordnen bzw. um falsch-positive Klone auszusortieren.

3.14 NEXT GENERATION SEQUENCING

Es wurden die Transkriptome der beiden Schwesternarten *C. thummi* und *C. piger* getrennt nach Geschlechtern auf dem Illumina HighSeq 2000 des Nukleinsäure-Analyse-Zentrums (IMSB, Mainz, Deutschland) sequenziert. Es wurden jeweils eine „single end“- und eine „paired end“-Bibliothek aus männlichen bzw. weiblichen L4-Larven der beiden Spezies hergestellt. Eine weitere „paired end“-Bibliothek entstand aus Embryonen der Spezies *C. thummi*. Diese konnten jedoch nicht nach ihrem Geschlecht getrennt werden. Mit den „paired end“-Bibliotheken wurden 100 bp „paired end“-Läufe durchgeführt, mit der „single end“-Bibliothek ein 50 bp „single end“-Lauf.

3.14.1 BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG DER DATEN

Die aus der Sequenzierung erhaltenen Rohdaten wurden mit einem PERL-Skript von Benjamin Rieger und Dr. Steffen Rapp (IMSB, Mainz) aufbereitet. Dabei wurden Sequenzen mit schlechter Qualität entfernt und nicht eindeutige Basen (N) aussortiert. Zudem wurden am 5'-Ende 6 bp und am 3'-Ende 1 bp abgeschnitten. Um eine höhere Vergleichbarkeit der Daten zu erzielen, wurden die 100 bp „paired end-reads“ ebenfalls mit einem PEARL-Skript von Benjamin Rieger in „reads“ mit einer Länge von maximal 50 bp unterteilt. Die so vorbereiteten Rohdaten wurden über die Funktion NGS-Import in das Programm CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Dänemark) importiert.

Material und Methoden

3.14.1.1 KARTIERUNG VON ROHDATEN

Die Rohdaten wurden mit dem Programm CLC Genomics Workbench gegen Referenzsequenzen des Proto-X- und des Proto-Y-Chromosoms sowie 6 Haushaltsgene der beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger* mittels RNASeq kartiert. Dabei wurden relativ stringente Parameter gewählt. "reads" mit < 56 bp wurden nur kartiert, wenn maximal eine Base nicht zur Referenz passte. Bei "reads" mit einer Länge von 56 bp oder mehr mussten mindestens 99 % der Basen eine Ähnlichkeit von 99 % zur Referenz aufweisen. Aus der Anzahl der kartierten "reads" wurden Expressionslevel für jedes Gen ermittelt.

3.14.1.2 RPKM-NORMALISIERUNG

Die ermittelten Expressionswerte entsprechen den RPKM-Werten nach (Mortazavi et al. 2008), welche sich aus folgender Formel errechnen:

$$RPKM = \frac{\text{kartierte Exon Reads}}{\text{gesamt kartierte Reads (Millionen)} \times \text{Exonlänge(kb)}}$$

Die Expressionswerte wurden anschließend auf die Größe des Sequenzdatensatzes normalisiert, indem sie durch die Gesamtzahl der "reads" geteilt und anschließend mit 1.000.000 multipliziert wurden. Mit diesen normalisierten Expressionswerten wurden alle weiteren Vergleiche durchgeführt.

3.14.1.3 STATISTISCHE ANALYSEN

Wurden zwei Zustände miteinander verglichen, erfolgte dies durch die Ermittlung der "foldchanges" zwischen den Expressionswerten. Da für Larven jeweils zwei biologische Replikate zur Verfügung standen, konnten jeweils 4 "foldchanges" errechnet werden, aus welchen dann ein Mittelwert gebildet wurde. Da die Anzahl

Material und Methoden

der Gene in den Referenzen aus dem Proto-X- und Proto-Y-Chromosom relativ gering ist, wurden Haushaltsgene ebenfalls mit in die Analyse einbezogen. Im Idealfall sollten diese Gene im Durchschnitt zwischen verschiedenen Stadien bzw. Zuständen keine Expressionsunterschiede zeigen (Mittelwert der *“foldchanges”* = 1). Die Schwankungen der Expressionswerte, welche nicht auf den jeweils untersuchten Zustand zurückzuführen sind, sollten berücksichtigt werden. Hierfür wurden die Mittelwerte der *“foldchanges”* für die Gene aus der SDR durch die mittlere Schwankung der *“foldchanges”* für die Haushaltsgene dividiert. Des Weiteren wurde eine Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.

Material und Methoden

3.15 PUFFER UND LÖSUNGEN

Homogenisierungspuffer (500 ml)	58 g Saccharose 10 ml 0,1 M Na ₂ EDTA, pH 7,4 2,5 ml 0,1 M Na ₂ EGTA, pH 7,4 50 ml Puffer A
Dialysepuffer (10x)	3 M NaCl 0,25 M Tris-HCl 1 M Na ₂ EDTA
Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (PCI) (25:24:1)	50 % 50 mM Phenol 48 % Chloroform 2 % Isoamylalkohol
Chloroform/ Isoamylalkohol (Cl) (24:1)	98 % Chloroform 2 % Isoamylalkohol
Lösung I (Whitehead), pH 8	10 mM Na ₂ EDTA
Lösung II (Whitehead)	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
Lösung III (Whitehead), pH 5,2	1,875 M Kaliumacetat

Material und Methoden

TE-Puffer (Whitehead), pH 8,0	10 mM Tris 50 mM Na ₂ EDTA
50T/50E-Puffer, pH 8,0	50 mM Tris 50mM Na ₂ EDTA
Guanidinthiocyanat (GTC)- Stammlösung	4,4 ml 0,75 M Na-Citrat pH 7,0 6,6 ml 10 % N-Lauroylsarkosin 62,5 g Guanidinthiocyanat in 73,3 ml DEPC-Wasser
Guanidinthiocyanat (GTC)- Arbeitslösung	12,5 ml GTC-Stammlösung 87,5 µl β-Mercaptoethanol
TBE-Puffer (1x)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 25 mM Na ₂ EDTA
Bromphenolblau- DNA-Ladepuffer (BPB)	4 M Harnstoff 0,1 M Na ₂ EDTA 50 % (w/v) Saccharose 0,1 % (w/v) BPB
EtBr-Färbelösung	0,1 % EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) In 1x E-Puffer

Material und Methoden

Elektrophorese-Puffer (10 x) (E-Puffer)	0,36 M Tris 0,3 M NaOH 0,1 M Na ₂ EDTA
MOPS-Puffer (1 x)	0,2 M MOPS, pH 7,0 20 mM NaAcetat 10 mM Na ₂ EDTA pH 8,0
LB-Medium	0,5 % (w/v) Natriumchlorid 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) Trypton
Ampicillin-Stammlösung	100 mg Ampicillin in 10 ml HPLC-H ₂ O
Agarplatten (500 ml)	7 g Agar-Agar 25 mg IPTG (in 500 µl DMF) 50 mg X-Gal (in 500 µl DMF) 5 ml Ampicillin-Stammlösung
Standard-Salz-Citrat-Lösung (SSC) (10 x)	1,5 M NaCl 0,15 M NaCitrat

Material und Methoden

Phosphate-Buffered-Saline (PBS) (10 x)	1,37 M Natriumchlorid 30 mM Kaliumchlorid 10 mM Kaliumdihydrogenphosphate
PBS/BSA	10 mM MgCl ₂ 10 mg/ml BSA in 1x PBS
Glycerin-Paraphenyldiamin	0,01 g para-Phenyldiamin 6,6 g Glycerin in 1 x PBS
Denaturierungslösung	50 mmol/l NaOH 1,5 mol/l NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 mol/l Tris/ HCl, pH 7,4 3 mol/l NaC
Präinkubationsmedium (nach Denhardt 1966)	0,02 % (w/v) Ficoll 400 0,02 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 0,02 % (w/v) BSA in 3 x SSC

4 ERGEBNISSE

4.1 KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG EINES BEREICHS DES PROTO-Y-CHROMOSOMS VON *C. THUMMI* UND *C. PIGER*

Zu Beginn dieser Arbeit lag ein etwa 200 kb großer Abschnitt der SDR von *C. thummi* sowie ein etwas kleinerer Bereich mit 120 kb von *C. piger* kloniert und sequenziert vor. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Sequenzen Proto-X-chromosomalen Ursprungs. Von dem Proto-Y-Chromosom lagen nur sehr wenige Sequenzinformationen vor, welcher sich auf das dort dupliziert vorliegende Gen *fs(1)K10-like* beschränken. In den folgenden Abschnitten werden verschiedene Analysen erläutert, durch die weitere Bereiche des Proto-Y-Chromosoms von *C. piger* und *C. thummi* kloniert und sequenziert wurden.

4.1.1 PUC-KLONE AUS ZWEI GENOMISCHEN DNA-BIBLIOTHEKEN VON *C. PIGER* MÄNNCHEN

Durch das „*screening*“ von zwei genomischen DNA-Bibliotheken aus *C. piger* Männchen mit Sonden aus den Abschnitten der Gene *fs(1)K10-like*, *d-Lactat-DH-like* und *doublesex* konnte insgesamt 41 positive Klone identifiziert werden. Zur Überprüfung wurden Southern Blots mit EcoRI/HindIII-restringierter DNA der positiven Klone hergestellt und Autoradiogramme angefertigt. Abbildung 7 zeigt als Beispiel das Autoradiogramm eines Southern Blots, der mit der *K10*-Sonde hybridisiert wurde.

Ergebnisse

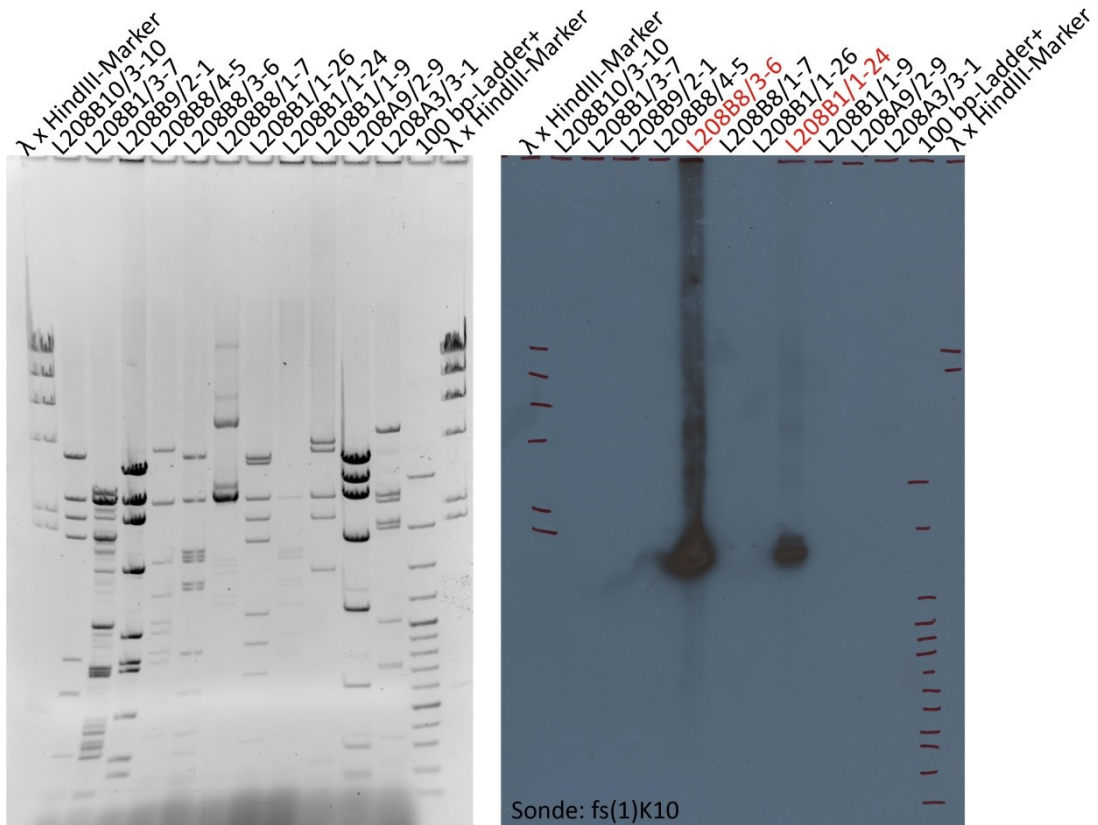


Abbildung 7: Analytisches Agarosegel mit EcoRI- und HindIII-restringierte Plasmid-DNA vom positiven Klonen der pUC-Bibliothek L208 (links). Rechts ist das entsprechende Autoradiogramm nach Hybridisierung mit der Sonde K10 gezeigt.

Der Southern Blot wurde mit der K10-Sonde (siehe Abbildung 6) hybridisiert. Die Klone L208B8/3-6 und L208B1/1-24 (rot) hybridisieren eindeutig mit der Sonde. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 100 bp Ladder+ und λ -DNA x HindIII der Fa. Fermentas verwendet.

Die Klone pipUC1E10/1-4, pipUC1A4/3-4, pipUC1E6/2-2, pipUCF7/1-4, pipUC1A3/2-5, pipUC1B10/2-1, pipUC1B4/5-4, L208B9/3-7, L208C6/2-8 und L208A3/3-1 zeigten eine Hybridisierung mit der dsx-Sonde. Eine starke Hybridisierung mit der K10-Sonde wiesen die Klone pipUC1E6/5-2, pipUC1B3/6-7 und L208B10/3-6 auf. Bei der Hybridisierung mit der dLacDH-Sonde waren Signale bei den Klonen pipUC1C2/1-3, pipUC1A4/6-5 und L208B8/1-7 zu erkennen. Die Klone pipUC1C2/1-4,

Ergebnisse

pipUC1D8/1-2, L208B1/1-24 und L208B8/3-6 zeigen sowohl mit der *K10*-Sonde als auch mit der *dLacDH*-Sonde Hybridisierungssignale.

Zur weiteren Analyse der Klone wurden diese mit den Primern SP6 und T7 sequenziert. Die Randsequenzen wurden mit der bekannten SDR aus *C. piger* mittels Dotplot (MegAlign™, Lasergene 8) verglichen und es wurden BLASTn-Suchen in der nr-Datenbank von NCBI durchgeführt. Die Chromatogramme der Randsequenzen von pipUC1D8/1-4, pipUC1B10/1-3, pipUC1F3/3-4, pipUC1B3/6-7, L208A5/4-5, L208D6/4-1 und L208A1/2-1 zeigen heterogene Signale. Dies deutet darauf hin, dass es sich um „Mischklone“ (2 oder mehr Klone wurden zusammen isoliert) handelt. Daher wurden Verdünnungsausstriche hergestellt und je Klon 5-10 Kolonien auf einen gerasterten Filter ausgestrichen und erneut mit den zuvor verwendeten Sonden hybridisiert. Die so ermittelten positiven Klone wurden erneut mit SP6 und T7 sequenziert und, wie oben aufgeführt, analysiert. Die Klone pipUC1D8/1-4, pipUC1D8/1-2, pipUC1A4/6-5, pipUC1B3/6-7, L208B10/3-6, L208B1/1-24 und L208B8/3-6 konnten durch die Randsequenzen eindeutig der SDR zugeordnet werden. Die Klone pipUC1D8/1-4 und pipUC1D8/1-2 stimmen in ihren Randsequenzen überein. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um denselben Klon handelt.

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die aus der SDR stammenden Klone und die Ergebnisse der durchgeführten Analysen.

Tabelle 6: Übersicht der in der SDR lokalisierten Klone aus den pUC-Bibliotheken pipUC1 und L208.

Aufgelistet sind Sonden, die ein Hybridisierungssignal bei Southern Blots mit restringierter Klon-DNA gezeigt haben (schwache Hybridisierungen sind hellgrau dargestellt), BLASTn-Treffer einer Datenbanksuche auf NCBI mit entsprechendem E-Value, Treffer mit der Referenzsequenz des Proto-X-Chromosoms von *C. piger* sowie die Ergebnisse der FISH. Eine vollständige Tabelle aller ausgewerteten Klone befindet sich im elektronischen Anhang.

Klonname	Hyb. mit Sonde	BLASTn-Treffer	E-value	Treffer mit SDR	FISH
pipUC1D8/1-4	Kein Signal	<i>Aedes aegypti dLacDH 2 partial mRNA</i> (ref XM_001651657.1)	1e ⁻²³	ja	Single-copy-Signal in Chr. 3 Arm F (SDR)
		<i>Bombyx mori mier protein 1-like, mRNA</i> (ref XM_004929387.1)	6e ⁻⁰⁹	ja	
pipUC1D8/1-2	d-Lac/K10	<i>Aedes aegypti dLacDH 2 partial mRNA</i> (ref XM_001651657.1)	1e ⁻²³	ja	Single-copy-Signal SDR (schwache Hybridisierung)
		<i>Bombyx mori mier protein 1-like, mRNA</i> (ref XM_004929387.1)	6e ⁻⁰⁹	ja	
pipUC1A4/6-5	d-Lac	<i>Aedes aegypti dLacDH 2 partial mRNA</i> (ref XM_001651657.1)	3e ⁻⁶⁹	ja	Single-copy-Signal auf Chr. 3 Arm F (SDR), distal des hemizygoten <i>Cla-Element</i> -Clusters
		kein signifikanter Treffer		ja	
pipUC1B3/6-7	K10	<i>Pediculus humanus corporis mier protein, putative, mRNA</i> (ref XM_002428018.1)	4e ⁻¹⁷	ja	starkes Signal in Chr. 3 Arm F (SDR), spaltet um hemizygoten <i>Cla-Element</i> -Cluster auf, zusätzliche Banden auf anderen Chr.
		kein signifikanter Treffer		ja	
L208B10/3-6	K10	kein signifikanter Treffer		ja	starkes Signal in Chr. 3 Arm F (SDR), viele zusätzliche schwache Banden auf anderen Chr.
		kein signifikanter Treffer		ja	
L208B1/1-24	K10/d-Lac	kein signifikanter Treffer		ja	Single-copy-Signal in Chr. 3 Arm F (SDR)
		kein signifikanter Treffer		ja	
L208B8/3-6	K10	kein signifikanter Treffer		ja	Single-copy-Signal in Chr. 3 Arm F (SDR)
		<i>Aedes aegypti dLacDH 2 partial mRNA</i> (ref XM_001651657.1)	4e ⁻²⁴	ja	

4.1.1.1 KLONE AUS DER SDR VON *C. PIGER*

Insgesamt wurden 6 Klone in der SDR von *C. piger* lokalisiert und vollständig sequenziert (Abbildung 8). Für die Sequenzierung wurden bereits vorhandene Primer aus der SDR im Bereich des jeweiligen Klons verwendet. Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm SeqMan (Lasergene 8, Madison USA) assembliert. Lücken bzw. schlecht abgedeckte Bereiche wurden durch Sequenzierungen mit zusätzlichen Primern geschlossen und abgesichert. Listen der jeweils verwendeten Oligonukleotide befinden sich im Anhang.

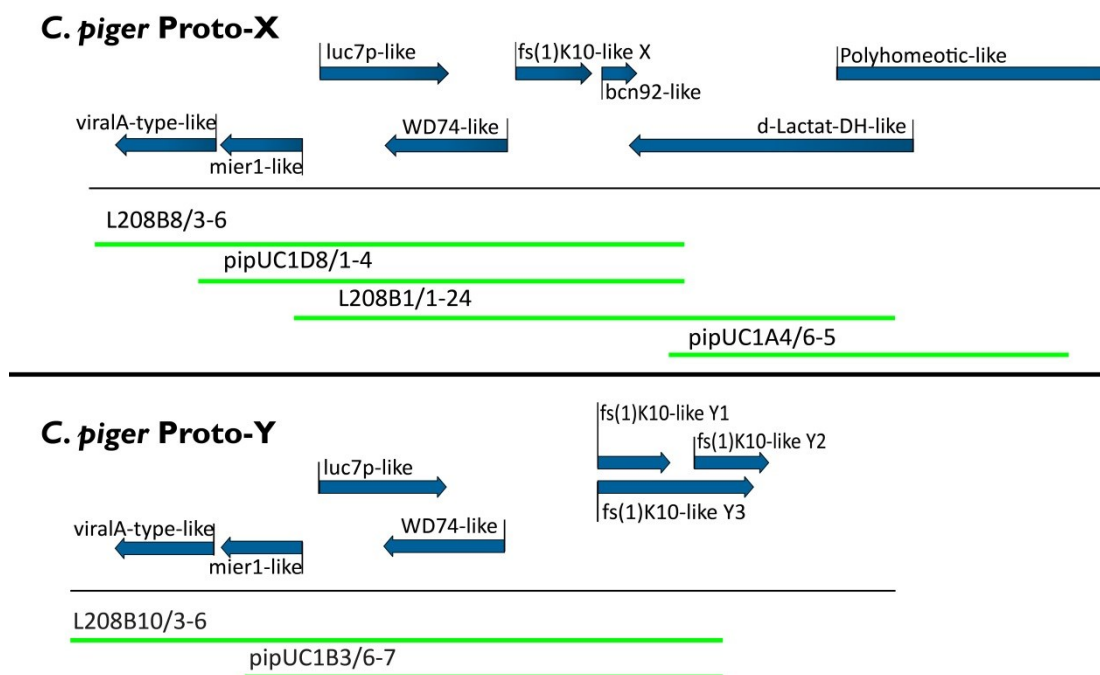


Abbildung 8: Lage der Klone L208B1/1-24, L208B8/3-6, pipUC1D8/1-4 und pipUC1A4/6-5 auf dem Proto-X-Chromosom sowie der Klone L208B10/3-6 und pipUC1B3/6-7 auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger*.

Die blauen Pfeile zeigen die Lage und Orientierung der Gene in den Referenzsequenzen.

Ergebnisse

Die Zuordnung der Klone erfolgte über den Vergleich mit der bereits bekannten proto-X- bzw. proto-Y-chromosomalen Sequenz. Dabei zeichnet sich das Proto-Y-Chromosom durch eine Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* aus. Drei der Klone lassen sich dadurch eindeutig dem Proto-X-Chromosom zuordnen (L208B1/1-24, L208B8/3-6 und pipUC1D8/1-4), zwei Klone stammen vom Proto-Y-Chromosom (L208B10/3-6 und pipUC1B3/6-7). Da der Klon pipUC1A4/6-5 den Bereich der Duplikation nicht überspannt, konnte er zunächst nicht eindeutig zugeordnet werden. Zur Veranschaulichung seiner Lage wurde er in Abbildung 8 dem Proto-X-Chromosom zugeordnet.

4.1.1.2 FISH DER AUS DER SDR STAMMENDEN KLONE AN POLYTÄNCHROMOSOMEN VON *C. THUMMI*

Um Aussagen über die chromosomale Lage der Klone treffen zu können, wurde die Plasmid-DNA Biotin-markiert und durch FISH an Polytänchromosomen aus Speicheldrüsenzellen von *C. thummi* ♂ hybridisiert. Die Hybridisierung wurde an *C. thummi* ♂ durchgeführt, da die Position der SDR hier eindeutig über die gleichzeitige Hybridisierung fluoreszenzmarkierter *Cla-Elemente* am hemizygoten *Cla-Element-Cluster* bestimmt werden kann. Abbildung 9 zeigt die Hybridisierung der 6 in der SDR lokalisierten Klone. Die Klone pipUC1D8/1-4, L208 B10/3-6, pipUC1B3/6-7, L208B1/1-24, L208B8/3-6 und pipUC1A4/6-5 hybridisieren alle eindeutig in direkter Nähe zum hemizygoten *Cla-Element-Cluster*. Die beiden vom Proto-Y-Chromosom stammenden Klone L208B10/3-6 und pipUC1B3/6-7 zeigen zusätzlich weitere Hybridisierung an anderen chromosomalen Positionen (Abbildung 10).

Ergebnisse

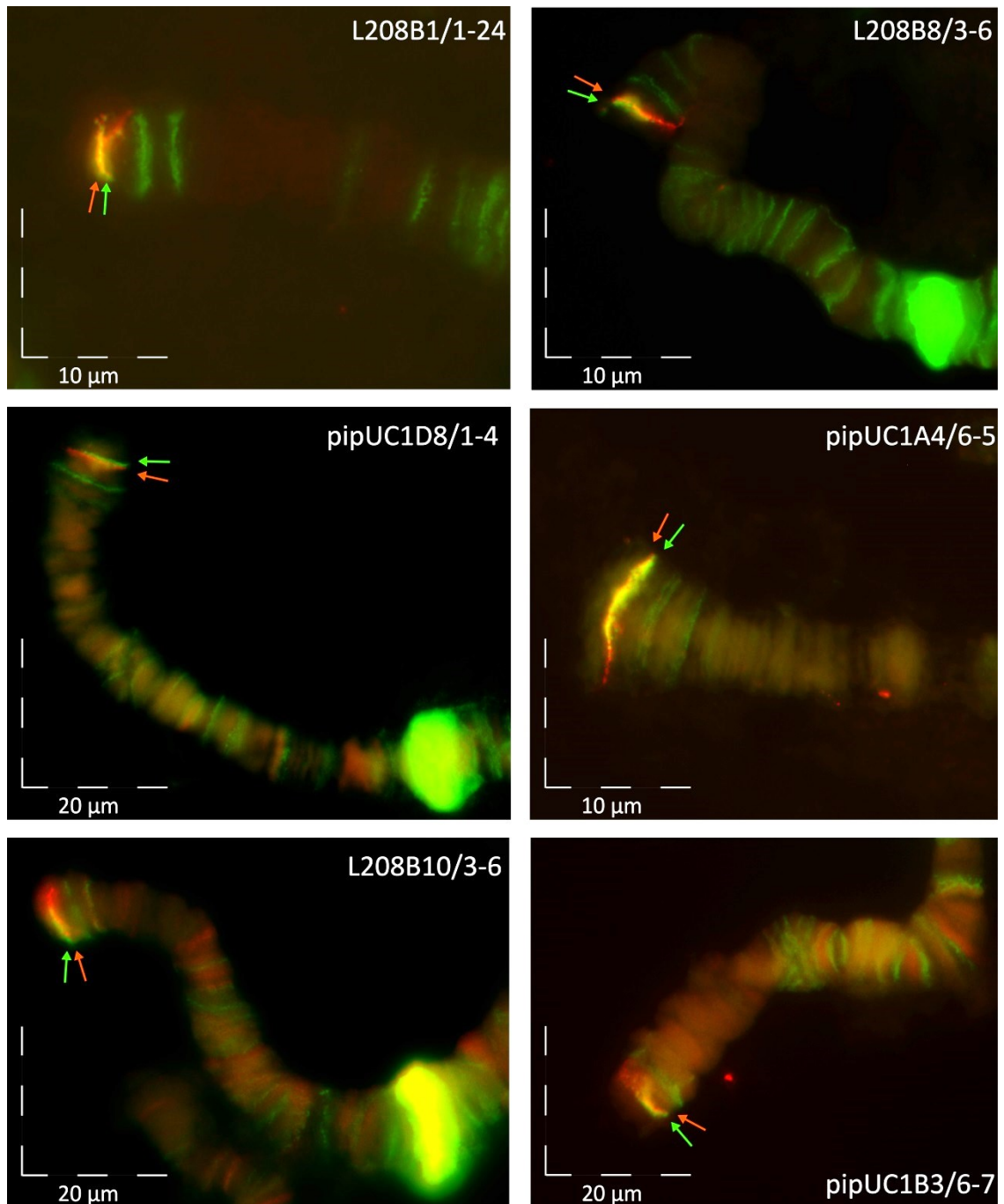


Abbildung 9: FISH von Klonen aus der SDR aus dem "screening" der beiden pUC-Bibliotheken pipUC1 und L208 zusammen mit synthetischen *Cla*-Elementen an Riesenchromosomen von *C. thummi* Männchen.

Gezeigt ist die Hybridisierung der Positiv-Klone aus der SDR (rote Signale), wobei L208B1/1-24, L208B8/3-6, pipUC1D8/1-4 und pipUC1A4/6-5 vom Proto-X-Chromosom und L208B10/3-6 sowie pipUC1B3/6-7 vom Proto-Y-Chromosom stammen. Zusätzlich wurden synthetische *Cla*-Elemente hybridisiert (grüne Signale), welche u.a. die Lage des hemizygoten *Cla*-Element-Clusters auf dem Proto-Y-Chromosom zeigen (grüne Pfeile).

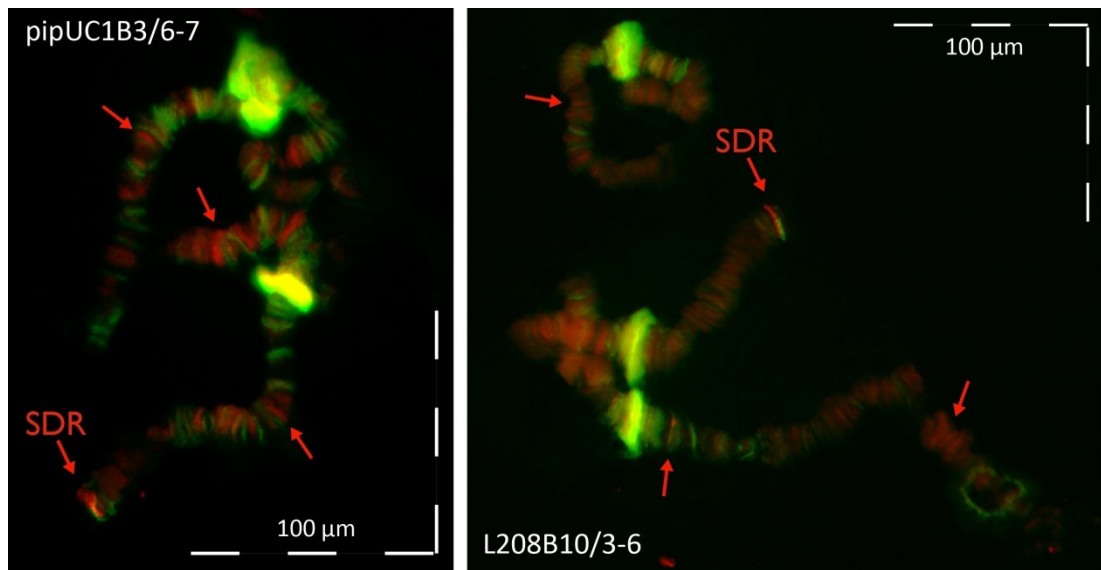


Abbildung 10: FISH von den beiden vom Proto-Y-Chromosom stammenden Klonen pipUC1B3/6-7 und L208B10/3-6 an Riesenchromosomen von *C. thummi*

Die beiden Klone zeigen neben der Hybridisierung in der SDR weitere schwächere Signale verteilt auf unterschiedlichen Chromosomenarmen (rote Pfeile). Zusätzlich wurden synthetische *Cla*-Elemente hybridisiert (grün).

Ergebnisse

4.1.1.3 KLON L208B1/1-24

Der Klon L208B1/1-24 hat eine Gesamtlänge von 14.426 bp und deckt den Bereich zwischen den Genen *luc7p-like* und *dLacDH-like* ab (Abbildung 8). Mittels FISH konnte der Klon im Bereich der *SDR* lokalisiert werden und hybridisiert bei Präparaten von *C. thummi* Männchen proximal des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters (Abbildung 9). Der Sequenzvergleich mit der über die Sequenzierung von PCR-Produkten erstellten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von *C. piger* ergibt eine Sequenzidentität von 98,7 %. Da die Laborstämme zwischenzeitlich durch neue Wildfänge erweitert wurden, ist es möglich, dass sie relative hohe Sequenzabweichung von 1,3 % darauf zurückzuführen ist. Abbildung 11 gibt einen Überblick über die Lage von Indels und SNPs des Klons im Vergleich zur Referenzsequenz. Insgesamt sind 132 Positionen gegenüber der Referenzsequenz verändert. In 104 Fällen handelt es sich um einen Basenaustausch. Von den 15 Austauschen innerhalb proteinkodierender Abschnitte haben 5 einen Aminosäureaustausch zur Folge. Es liegen sowohl konservative (Y-F, S-T, R-K) als auch nicht konservative Austausche (S-I, G-S) vor. Des Weiteren sind 28 kleine Indels (bis 11 bp) vorhanden. Die einzige im kodierenden Bereich liegende Insertion ist 9 bp lang und codiert für drei zusätzliche Aminosäuren (V-S-V) im 3'-Bereich von *fs(1)K10-like-X*.

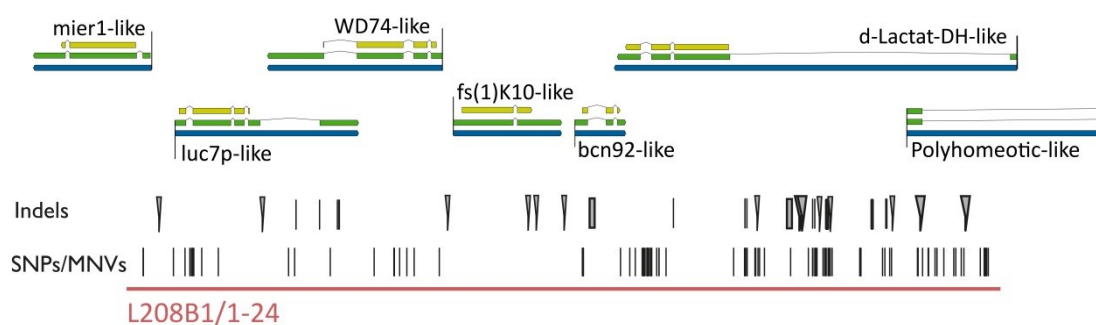


Abbildung 11: Indels und SNPs des Klons L208B1/1-24 im Vergleich zur bereits bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von *C. piger*.

Der Klon L208B1/1-24 weist gegenüber der Referenzsequenz 28 Indels und 104 Basenaustausche auf. Die blauen Pfeile zeigen die Lage und Orientierung der Gene. Die transkribierten Bereiche sind durch grüne Pfeile, die kodierenden Sequenzen durch gelbe Pfeile angezeigt.

Ergebnisse

4.1.1.4 KLON L208B8/3-6

Klon L208B8/3-6 konnte mittels FISH an Speicheldrüsenchromosomen von *C. thummi* Männchen proximal des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters in der *SDR* lokalisiert werden (Abbildung 9). Die Sequenzierung des Klons ergab eine Gesamtlänge von 14.200 bp. Durch den Vergleich mit der bereits bekannten Sequenz aus *C. piger* konnte gezeigt werden, dass der Klon den Bereich zwischen den Genen *viral-A-Type-like* und *dLacDH-like* abdeckt (Abbildung 8) und eine Sequenzidentität von 99,4 % mit der Referenzsequenz des Proto-X-Chromosoms von *C. piger* aufweist. Insgesamt liegen 80 Mutationen vor, von welchen sich 36 in kodierenden Bereichen befinden. Von den 31 Basenaustauschen in kodierenden Bereichen führen 18 zu einem Aminosäureaustausch. Ein Großteil dieser Austausche (14) beschränkt sich auf das Gen *viral-A-Type-like* (Abbildung 12), in welchem zusätzlich ein Indel von 20 bp zu einer Verschiebung des Leserasters und in der Folge zu einer *non-sense*-Mutation führt. Das bereits bei Klon L208B1/1-24 beschriebene Indel von 9 bp im 3'-Bereich der *CDS* von *fs(1)K10-like-X* ist in Klon L208B8/3-6 ebenfalls vorhanden.

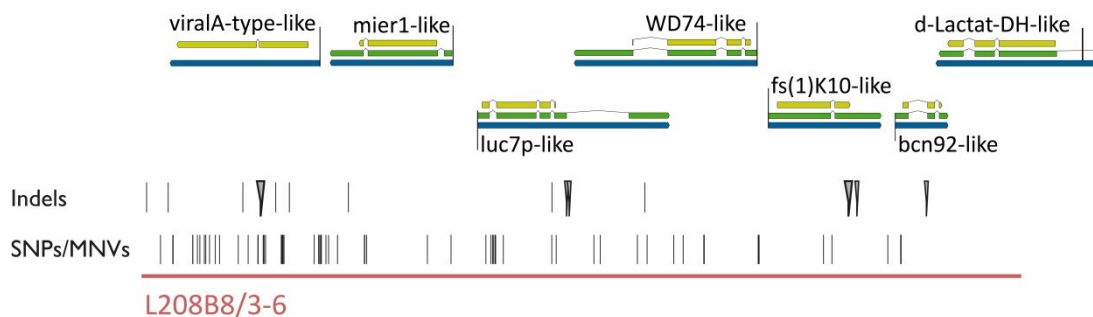


Abbildung 12: Lage der Indels und „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) des Klons L208B8/3-6 im Vergleich zur bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von *C. piger*.

Die blauen Pfeile zeigen die Lage und Orientierung der Gene. Die transkribierten Bereiche sind durch grüne Pfeile, die kodierenden Sequenzen durch gelbe Pfeile angezeigt.

Ergebnisse

4.1.1.5 KLON PIPUC1D8/1-4

Der Klon pipUC1D8/1-4 kann über seine Randsequenzen eindeutig in der SDR lokalisiert werden (s. Tabelle 6). Auch die FISH zeigt eindeutig seine Lage proximal des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters an Speicheldrüsenchromosomen von *C. thummi* (Abbildung 9). Insgesamt hat der Klon eine Größe von 11.715 bp und ist eindeutig dem Proto-X-Chromosom zuzuordnen, da ihm die Proto-Y-spezifische Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* fehlt. Mit der bereits bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms weist der Klon eine Identität von 99,6 % auf. Es konnten 50 Mutationen gefunden werden. Dabei handelt es sich in 12 Fällen um Indels und in 38 Fällen um Basenaustausche (Abbildung 13). Das einzige Indel in einem kodierenden Bereich ist schon in den Klonen L208 B1/1-24 und L208B8/3-6 gezeigt worden. Es codiert für die zusätzlichen Aminosäuren Valin – Serin - Valin in Exon 2 des Gens *fs(1)K10-like*. Von 8 Basenaustauschen in kodierenden Bereichen liegen die einzigen beiden, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führen, in Exon 2 des Gens *luc7p-like* (Glycin - Serin, Histidin - Tyrosin).

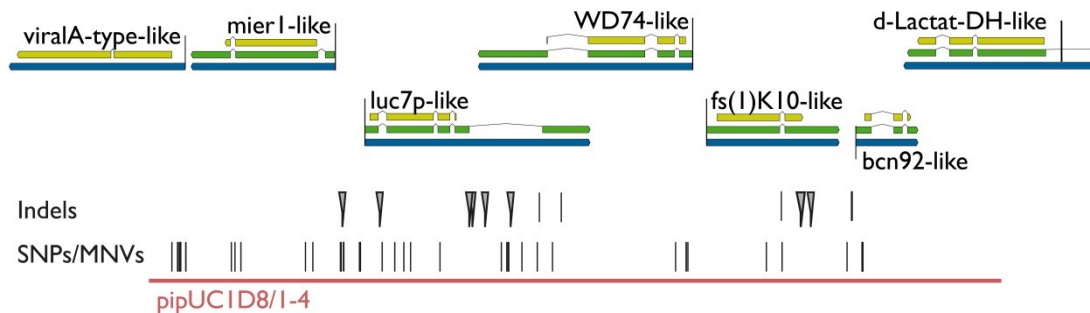


Abbildung 13: Übersicht über Indels und SNPs des Klons pipUC1D8/1-4 in Bezug auf die bekannte Referenz des Proto-X-Chromosoms von *C. piger*.

Der Klon weist gegenüber der Referenzsequenz 12 Indels und 38 Basenaustausche auf. Die blauen Pfeile zeigen die Lage und Orientierung der Gene. Die transkribierten Bereiche sind durch grüne Pfeile, die kodierenden Abschnitte in Gelb dargestellt.

Ergebnisse

4.1.1.6 KLON pipUC1A4/6-5

Klon pipUC1A4/6-5 konnte über FISH an Speicheldrüsenchromosomen von *C. thummi* Männchen distal des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters lokalisiert werden. Die Sequenz des 9.590 bp langen Klons zeigt eine Identität zu der bereits bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von 98,4 %. Insgesamt konnten 149 Mutationen detektiert werden, welche alle außerhalb von kodierenden Bereichen liegen. In 57 Fällen liegen Indels von 1-12 bp Länge vor, in 92 Fällen kam es zu Basenaustauschen (Abbildung 14). Die im Vergleich zu den anderen Klonen relativ hohe Rate von Austausch könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Klon hauptsächlich Intronbereiche abdeckt. Es könnte jedoch auch ein Hinweis für eine Proto-Y-chromosomale Herkunft sein. Diese kann jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden, da der Klon außerhalb der bekannten Sequenz des Proto-Y-Chromosoms liegt.

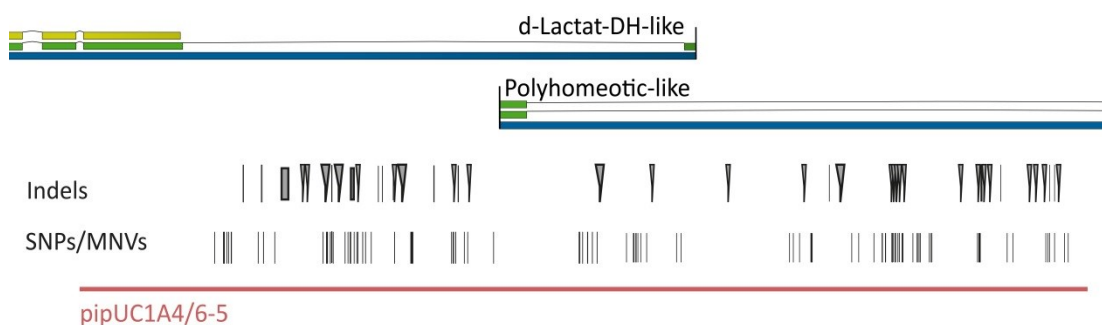


Abbildung 14: Lage der Indels und SNPs des Klons pipUC1A4/6-5 im Vergleich zur bereits bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von *C. piger*.

Der Klon zeigt gegenüber der Referenzsequenz 57 Indels und 92 Basenaustausche. Die blauen Balken zeigen die Lage und Orientierung der Gene. Die transkribierten Bereiche sind durch grüne Pfeile, die kodierenden Sequenzen durch gelbe Balken angezeigt.

Um die Herkunft des Klons abzuklären, wurde eine PCR mit genomischer DNA von *C. piger* Männchen und Weibchen durchgeführt. Die für die PCR verwendeten Primer pipUC1A4/6-5-XY-for und pipUC1A4/6-5-XY-rev amplifizieren einen Bereich, der im Vergleich zwischen dem Klon und der Referenz aus dem Proto-X-Chromosom zwei

Ergebnisse

Indels aufweist. Bei einer PCR mit der klonspezifischen Sequenz als Matrize sollte ein Produkt von 246 bp, mit der aus dem Proto-X-Chromosom bekannten Referenzsequenz ein Produkt von 226 bp entstehen (Abbildung 15).

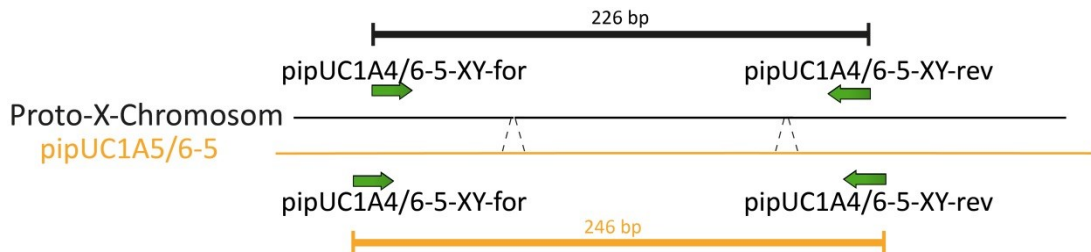


Abbildung 15: Ausschnitt des Klons pipUC1A4/6-5 im Vergleich mit der bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von *C. piger*.

Durch zwei Insertionen (gestrichelte Linien) in der Sequenz des Klons entsteht bei einer Amplifikation mit dem Primerpaar pipUC1A4/6-5-for und -rev mit dem Klon als Referenz ein Produkt von 246 bp, wohingegen bei der Amplifikation des Proto-X-Chromosoms ein Produkt von 226 bp erwartet wird.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation genomischer DNA aus acht (4 x ♂, 4 x ♀) Einzellarven zeigt sowohl in Männchen als auch in Weibchen je eine Bande auf etwa gleicher Höhe (Abbildung 16). Im Vergleich zum PCR-Produkt aus der Amplifikation der DNA des Klons pipUC1A4/6-5 weisen die Produkte aus den Einzellarven ein etwas geringeres Molekulargewicht auf. Die Sequenzierung der PCR Produkte zeigt, dass das erste Indel von 10 bp in allen Sequenzen fehlt, wohingegen das 2. Indel in allen Sequenzen vorhanden ist. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Indels nicht gekoppelt zu sein scheinen, sondern auch unabhängig voneinander auftreten. Eine eindeutige Zuordnung des Klons zum Proto-X- oder Proto-Y-Chromosom ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht möglich.

Ergebnisse

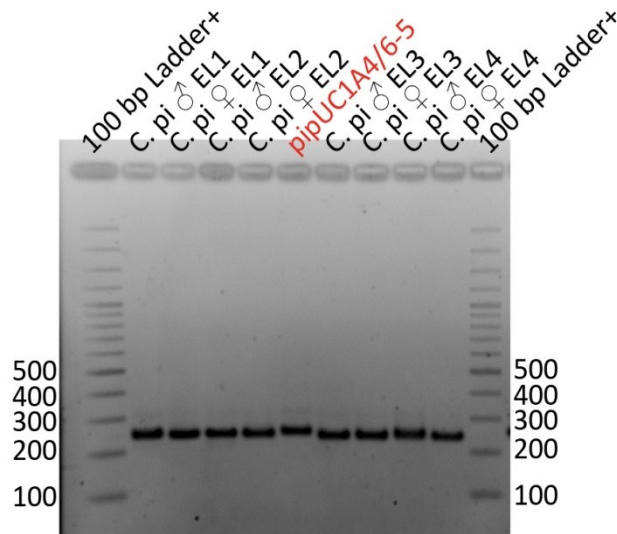


Abbildung 16: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Bestimmung der Herkunft des Klons pipUC1A46-5 zum Proto-Y- bzw. Proto-X-Chromosom

Als Matrize für die PCR wurde genomische DNA von einzelnen Larven (4 *C. piger* ♀ und 4 *C. piger* ♂) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit den in Abbildung 15 gezeigten Primern, welche in der bekannten Proto-X-Referenz zu einem Amplifikat von 226 bp führen. Amplifiziert man den entsprechenden Abschnitt des Klons, entsteht ein 246 bp langes Fragment (Spur 6: pipUC1A4/6-5). Sowohl die PCR-Produkte aus Männchen als auch aus Weibchen haben ein geringeres Molekulargewicht als das aus dem Klon. Die Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte, dass diese alle nur das 2. Indel aufweisen, wohingegen das erste fehlt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die 100 bp Ladder+ der Fa. Fermentas verwendet.

4.1.1.7 KLON L208 B10/3-6

Der 13.511 bp lange Klon L208 B10/3-6 ist eindeutig Proto-Y-chromosomaler Herkunft. Ca. ab Base 11.000 erkennt man im Dotplot einen duplizierten Abschnitt im Bereich des Gens *fs(1)K10-like*. Diese bekannte Duplikation ist Proto-Y-spezifisch und wurde vollständig sequenziert (siehe Abschnitt 4.1.7).

Ergebnisse

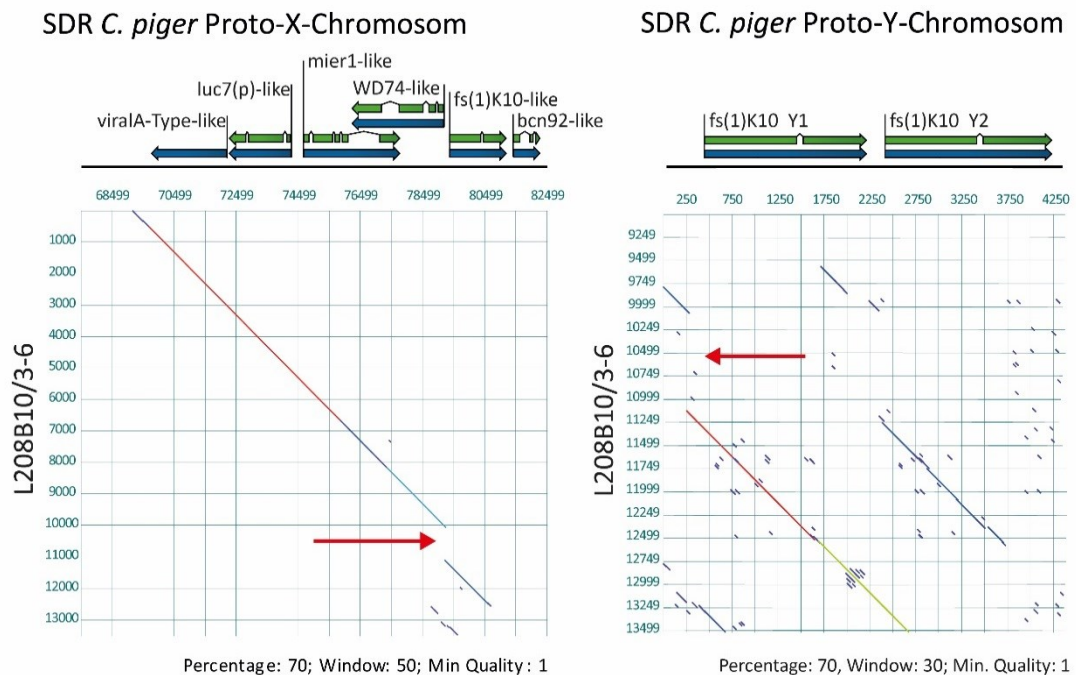


Abbildung 17: Dotplot der Sequenz des Klons L208B10/3-6 gegen die Referenzsequenz des Proto-X-Chromosoms und des Proto-Y-Chromosoms von *C. piger*.

Auf der horizontalen Achse ist die Organisation der beiden Referenzsequenzen aus dem Proto-X- und Proto-Y-Chromosom von *C. piger* dargestellt. Die blauen Pfeile zeigen die Lage der Gene und die grünen Pfeile die entsprechenden mRNAs. Bei beiden Dotplots fällt ein ca. 1 kb großer Abschnitt in der Sequenz des Klons auf, welcher weder auf dem Proto-Y- noch auf dem Proto-X-Chromosom eine Entsprechung findet (rote Pfeile).

Abbildung 17 (rechts) zeigt den Dotplot der Sequenz des Klons gegen die Proto-Y-spezifische Duplikation. Da bisher keine Proto-Y-chromosomale Sequenzinformationen proximal der Duplikation vorliegen, wurde der Klon im Bereich der ersten 10 kb mit der Proto-X-chromosomalen Sequenz verglichen. Es zeigt sich eine hohe Sequenzübereinstimmung von 99,6 % (Abbildung 17, links). Eine besonders auffällige Variation befindet sich in einem Abschnitt von ca. 45 bp im 2. Exon von *fs(1)K10-like Y1*. Verschiedene Basenaustausche führen zu drei AS-Austauschen und Deletionen zu einem Verlust von acht Aminosäuren (Abbildung 18). In den beiden Dotplots aus Abbildung 17 fällt des Weiteren ein Sequenzabschnitt von ca. 1 kb auf, der weder auf der Proto-X- noch auf der Proto-Y-Sequenz vorhanden ist. Weitere Analysen dieses Abschnittes zeigten, dass es sich hierbei um repetitive *Cla-adjacent-*

Ergebnisse

DNA handelt (siehe Abschnitt 4.1.2). Durch die Sequenz des Klons L208B10/3-6 wurde die bereits bekannte Proto-Y-spezifische Sequenz im Bereich der Duplikation von *fs(1)K10-like* proximal um die Sequenz des Klons auf einen 17 kb großen Abschnitt erweitert.

C. piger Proto-Y-Chromosom

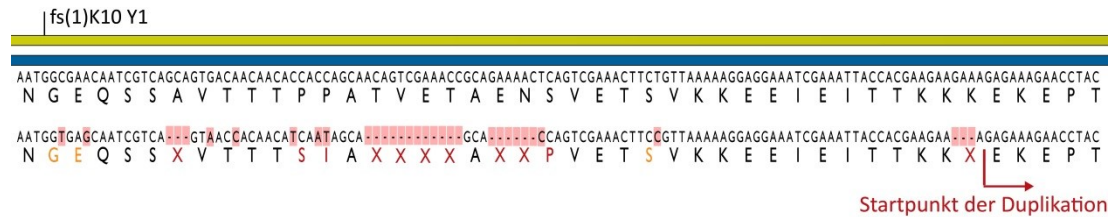


Abbildung 18: Vergleich zwischen der bekannten Sequenz des Proto-Y- Chromosoms aus *C. piger* und dem Klon L208B10/3-6 im Bereich des Gens *fs(1)K10-like Y1*.

Im Abschnitt vor dem Startpunkt der Proto-Y-spezifischen Duplikation in Exon 2 des Gens *fs(1)K10-like Y1* treten einige Mutationen auf, die insgesamt zu einem Verlust von 8 AS (X) und zu 3 AS-Austauschen führen.

4.1.1.8 PIPUC1B3/6-7

Klon pipUC1B3/6-7 stammt wie L208B10/3-6 vom Proto-Y-Chromosom und hat eine ähnliche chromosomale Lage (Abbildung 8). Er konnte per FISH in der SDR proximal des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters lokalisiert werden (Abbildung 9). Er ist mit 9.887 bp ca. 4.300 bp kleiner als L208B10/3-6, beide Klone stimmen aber in den sich überlappenden Bereichen zu 99,8 % überein. Auch pipUC1B3/6-7 enthält den vorher nicht bekannten Abschnitt mit *Cla-adjacent-DNA* zwischen den beiden Genen *WD74-like* und *fs(1)K10-like-Y1*. Er unterstützt damit die Ergebnisse, welche durch die Analyse des Klon L208/B1073-6 erhalten wurden, liefert aber keine neuen Erkenntnisse.

Ergebnisse

4.1.2 ANALYSE EINER EIN KB GROßEN INSERTION AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM VON *C. PIGER*

Die beiden vom Proto-Y-Chromosom stammenden Klone L208B10/3-6 und pipUC1B3/6-7 zeigen proximal des Gens *fs(1)K10-like Y1* ein ca. 1 kb großes Indel. Eine NCBI-Datenbanksuche mittels BLAST ergab für die entsprechende Sequenz einen Treffer mit *Cla-adjacent-DNA* aus dem *non-transcribed spacer (NTS)* der ribosomalen DNA von *C. thummi* (emb|X01841.1). Bei der *Cla-adjacent-DNA* handelt es sich um eine repetitive Sequenz, welche häufig flankierend zu *Cla-Element*-Clustern vorkommt. Um die Sequenz auch auf genomischer Ebene zu überprüfen, wurden mehrere Southern Blots restringierter genomischer DNA von Männchen und Weibchen der beiden Spezies *C. piger* und *C. thummi* angefertigt. Abbildung 19 zeigt die Autoradiogramme von zwei Southern Blots mit *HindIII*- (A) und *HincII*-restringierter genomischer DNA (B). Blot A wurde mit einer PCR-Sonde im Bereich des Gens *fs(1)K10-like* hybridisiert, Blot B mit einer PCR-Sonde aus dem Bereich des Gens *WD74-like*. Abbildung 20 gibt einen Überblick über die Lage der Sonden sowie die zu erwartenden Restriktionsfragmente. Autoradiogramm A zeigt sowohl bei *C. thummi* als auch bei *C. piger* in Männchen neben der auch beim Weibchen vorkommenden Proto-X-chromosomalen Bande bei ca. 1.700 bp zwei zusätzliche Banden (Abbildung 19). Diese entstehen durch die Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* auf dem Proto-Y-Chromosom. Jedoch ist die obere Bande bei *C. piger* Männchen mit 2.400 kb ca. 500 bp größer als bei *C. thummi* Männchen. Dies lässt sich auf die Insertion der ca. 1 kb großen *Cla-adjacent-DNA* auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* zurückführen (Abbildung 20), welche bei *C. thummi* fehlt.

Da sich in der *Cla-adjacent-DNA* eine weitere *HindIII*-Schnittstelle findet, umfasst die zusätzliche Bande nur einen Teil des Indels. Das verhältnismäßig starke Signal bei Weibchen beider Spezies entsteht durch das Vorhandensein von zwei gleich großen Fragmenten aus beiden X-Allelen, wohingegen sich bei Männchen die Signalintensität auf drei Banden unterschiedlicher Größe verteilt. In Autoradiogramm B tritt bei *C. piger* Männchen neben den beiden Proto-X-chromosomalen Banden, die auch bei Weibchen beider Spezies zu sehen sind, eine zusätzliche Bande bei ca. 2.200 bp auf.

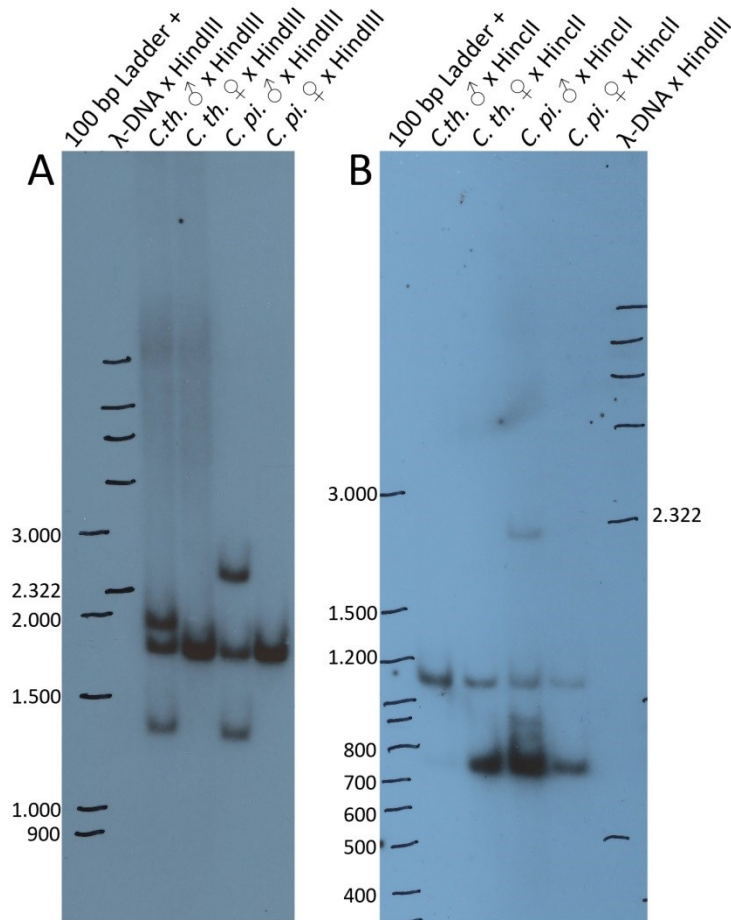


Abbildung 19: Autoradiogramme von Southern Blots mit restringierter genomischer DNA von *C. thummi* sowie *C. piger* Männchen und Weibchen zur Verifizierung der auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* identifizierten *Cla*-adjacent-DNA.

A: Der Southern Blot mit *HindIII* restringierter DNA wurde mit einer Sonde aus dem Bereich des Gens *fs(1)K10-like* hybridisiert. Sowohl *C. thummi* als auch *C. piger* weisen je zwei Männchen-spezifische Banden auf. In *C. piger* ist die obere Männchen-spezifische Bande ca. 500 bp größer als in *C. thummi*, was das Vorkommen von *Cla*-adjacent DNA zwischen *WD74-like* und *fs(1)K10-like Y1* auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* bestätigt.

B: Der Southern Blot mit *HincII* restringierter genomischer DNA wurde mit einer Sonde aus dem Gen *WD74-like* hybridisiert. Bei *C. piger* Männchen hybridisieren gegenüber den Weibchen mehrere zusätzliche Banden, wobei die Bande bei 2.200 bp auf die Anwesenheit von *Cla*-adjacent-DNA zurückzuführen ist. In *C. thummi* Männchen zeigt die auch bei Weibchen vorkommende Bande bei 1.100 bp eine stärkere Hybridisierung, wohingegen eine Bande bei ca. 700 bp wesentlich schwächer hybridisiert. In beiden Blots wurden die Molekulargewichtsstandards 100 bp-Ladder+ und λ -DNA x *HindIII* der Fa. Fermentas eingesetzt.

Ergebnisse

Diese ist etwa 1.150 bp größer als die Bande bei *C. piger* Weibchen und bestätigt die Insertion der *Cla-adjacent-DNA* zwischen *WD74-like* und *fs(1)K10-like* in *C. piger* Männchen. Des Weiteren treten bei *C. piger* Männchen zwei zusätzliche schwache Banden bei ca. 830 bp und 900 bp auf. Ähnlich wie bei der Sonde für Blot A hybridisieren durch die im Männchen vorkommende Duplikation auch andere Restriktionsfragmente mit Teilen der Sonde (Abbildung 20). Bei *C. thummi* Männchen ist das Signal der Bande bei ca. 1.050 bp verhältnismäßig stark. Dagegen ist die Hybridisierung an der 750 bp-Bande relativ schwach. Dabei könnte es sich um ein technisches Problem handeln, welches bei der Übertragung der DNA auf die Nitrocellulosen entstanden ist. Eine genaue Erklärung konnte nicht gefunden werden. Tabelle 7 listet die erwarteten und tatsächlich hybridisierenden Fragmente aus der Southern Analyse auf.

Tabelle 7: Erwartete und tatsächlich hybridisierende Fragmente auf den Autoradiogrammen aus Abbildung 19.

Fragmente, die auf die Anwesenheit der *Cla-adjacent-DNA* zwischen den Genen *WD74-like* und *fs(1)K10-like* auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* zurückzuführen sind, sind in Rot dargestellt. Banden, die eine schwache Hybridisierung gezeigt haben, sind in Grau dargestellt, besonders stark hybridisierende Banden fett.

	<i>C. thummi</i> ♂		<i>C. thummi</i> ♀		<i>C. piger</i> ♂		<i>C. piger</i> ♀	
	erwartet	tatsächlich	erwartet	tatsächlich	erwartet	tatsächlich	erwartet	tatsächlich
<i>HindIII</i> (<i>K10</i>)	1.893 bp	1.900 bp			2.391 bp	2.400 bp		
	1.712 bp	1.700 bp	1.712 bp	1.700 bp	1.699 bp	1.700 bp	1.699 bp	1.700 bp
	1.299 bp	1.300 bp			1.276 bp	1.250 bp		
<i>HincII</i> (<i>WD 74</i>)					2.137 bp	2.200 bp		
	1.063 bp	1.050 bp	1.063 bp	1.050 bp	1.058 bp	1.050 bp	1.058 bp	1.050 bp
	748 bp	750 bp	748 bp	750 bp	745 bp	900 bp 830 bp 750 bp	745 bp	750 bp

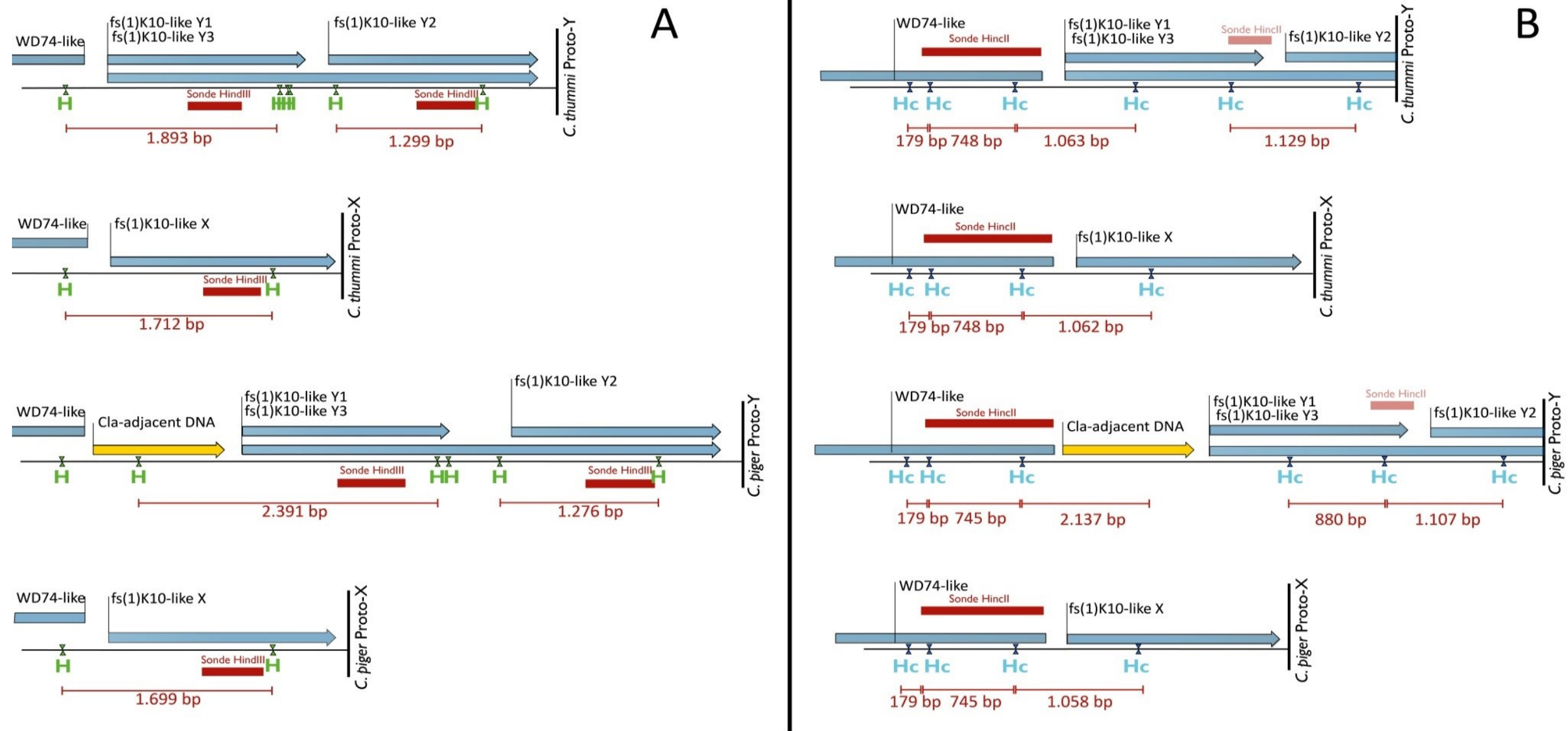


Abbildung 20: Erwartete Fragmente aus Proto-X- und Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* und *C. piger* bei Southern-Hybridisierungen mit Sonden distal und proximal der *Cla*-adjacent-DNA

Gezeigt sind Ausschnitte aus dem Proto-X- bzw. Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* und *C. piger* mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme *HindIII* (A) bzw. *HincII* (B). Die Sonden und die mit ihnen hybridisierenden Restriktionsfragmente sind in Rot dargestellt. Da Teile des auf dem Proto-Y-Chromosom duplizierten Gens *fs(1)K10-like* bei den beiden Kopien Y1 und Y2 hohe Homologien aufweisen, binden die verwendeten Sonden mehrfach.

Ergebnisse

Um das hemizygote Vorkommen der *Cla-adjacent-DNA* auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* nachzuweisen und um weitere chromosomale Positionen von *Cla-adjacent-DNA* zu identifizieren wurden Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen an Riesenchromosomen aus den Speicheldrüsenzellen von *C. piger* und *C. thummi* durchgeführt (s. Abschnitt 4.1.2.1).

4.1.2.1 LOKALISIERUNG VON *CLA-ADJACENT-DNA* BEI *C. PIGER* UND *C. THUMMI* MITTELS FISH

Der hochrepetitive Charakter von *Cla-adjacent-DNA* konnte mittels Southern Analysen gezeigt werden (Hankeln und Schmidt 1987). Die ihrem Namen nach zuerst angrenzend zu *Cla-Elementen* identifizierte *Cla-adjacent-DNA* kommt auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* unabhängig von *Cla-Elementen* vor. Um die Verteilung von *Cla-adjacent-DNA* auf den Chromosomen von *C. piger* bzw. *C. thummi* zu zeigen, wurden Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen an Riesenchromosomen aus Speicheldrüsenzellen beider Spezies durchgeführt. Als Sonde wurde hierfür ein in den Vektor pGEM[®]-T Easy (Promega, Mannheim) kloniertes PCR-Produkt aus einer Amplifikation genomischer DNA im Bereich der *Cla-adjacent-DNA* verwendet.

Bei Präparaten von *C. piger* sind überaus viele Hybridisierungen auf allen Chromosomen zu erkennen (Abbildung 21 A-C). Dabei treten sowohl klar abgegrenzte stark hybridisierende Banden, als auch schwächere unscharfe Banden auf. Bei *C. thummi* hingegen treten wesentlich weniger Hybridisierungen verteilt auf allen Chromosomenarmen auf (Abbildung 21 D, E). Die zu beobachtenden Banden zeigen ein scharfes und starkes Signal. Aufgrund der vielen Signale bei *C. piger* ist die zu erwartende hemizygote Hybridisierung auf dem Proto-Y-Chromosom nicht zu identifizieren. Schon bei der Hybridisierung der beiden Proto-Y-chromosomalen Klone L208B10/3-6 und pipUC1B3/6-7 fielen neben der Hybridisierung in der *SDR* mehrere zusätzliche Signale auf allen Chromosomen auf. Diese zeigen höchstwahrscheinlich Positionen für *Cla-adjacent DNA*.

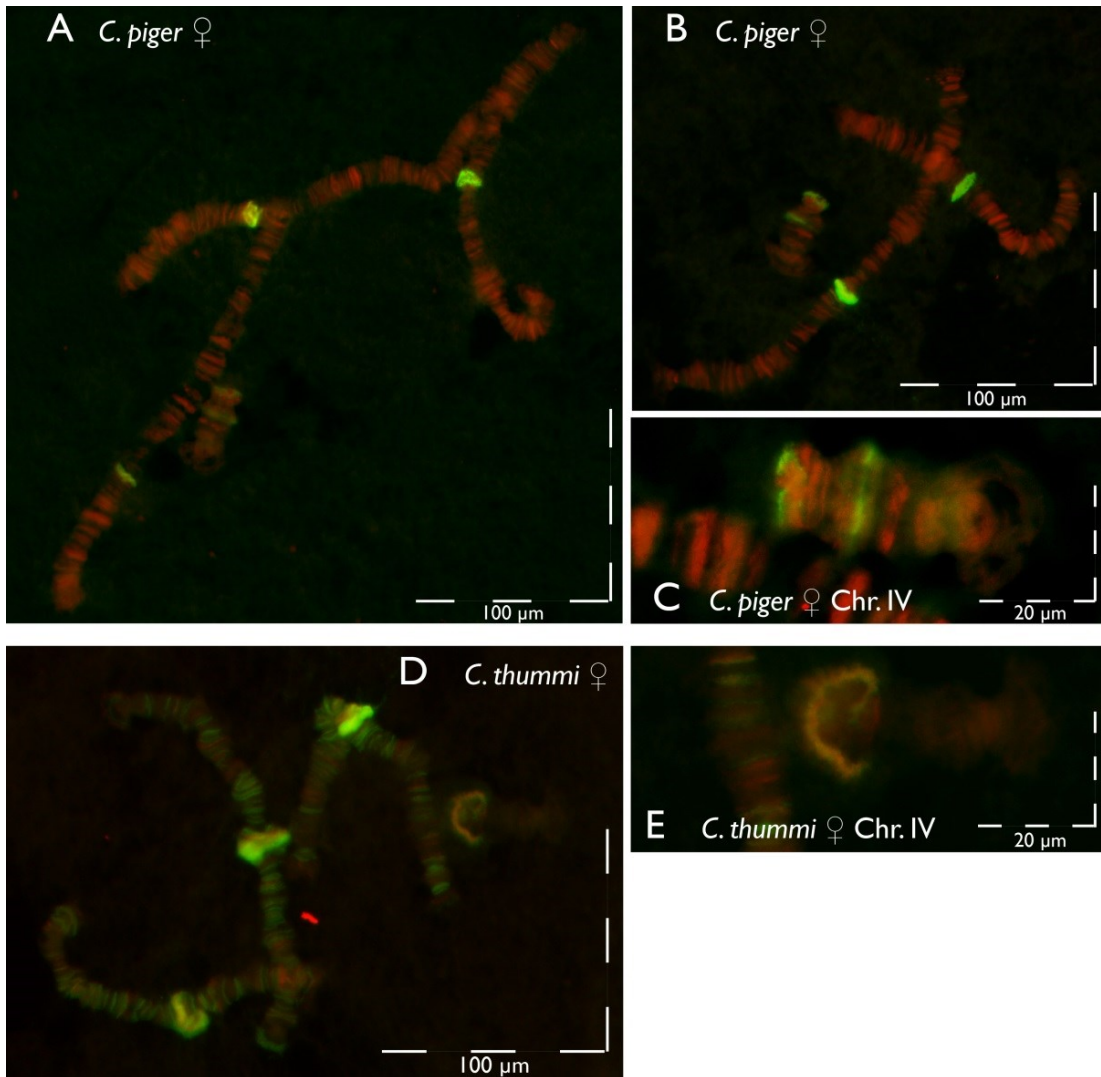


Abbildung 21: Hybridisierung von *Cladjacent-DNA* (rot) aus dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* zusammen mit synthetischen *Cl-Elementen* (grün) an Riesenchromosomen von *C. piger* (A-C) und *C. thummi* Weibchen (D, E).

Riesenchromosomen von *C. thummi* zeigen im Verhältnis zu *C. piger* relativ wenige Hybridisierungen mit *Cladjacent-DNA*. Während bei *C. piger* auf allen 4 Chromosomen starke Signale zu erkennen sind (A + B), treten bei *C. thummi* deutlich weniger und dünnere Banden auf (D). Auf dem vergrößert dargestellten Chromosom IV sind bei *C. piger* mehrere stark hybridisierende Banden zu erkennen, jedoch zeigt der Balbiani-Ring allenfalls ein schwaches Signal (C). Bei *C. thummi* hingegen hybridisiert der Balbiani-Ring sowohl mit *Cladjacent-DNA* als auch mit den synthetischen *Cl-Elementen* (E).

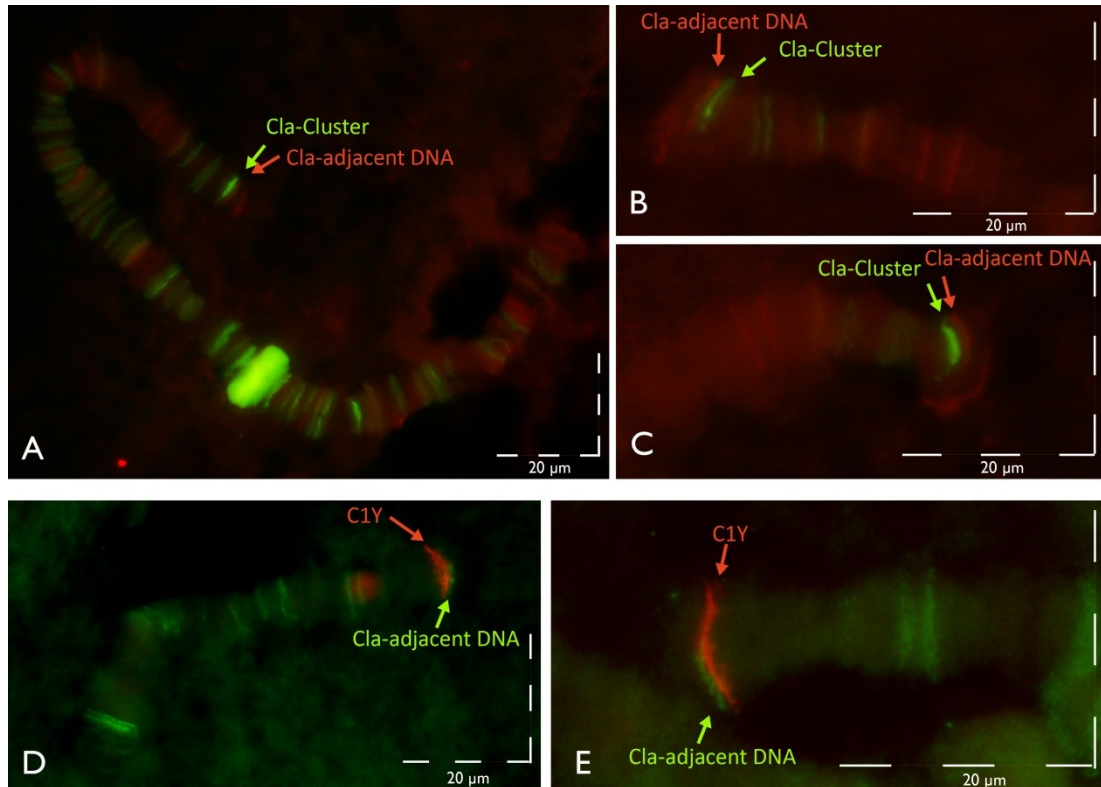


Abbildung 22: Die FISH zeigt hemizygoter *Cla-adjacent-DNA* in der SDR von *C. thummi* Männchen (Wildfänge) distal des ebenfalls hemizygot vorliegenden *Cla-Element*-Clusters.

Bei der Hybridisierung von einer *Cla-adjacent-DNA*-Sonde gemeinsam mit synthetischen *Cla-Elementen* an die Riesenchromosomen von *C. thummi* Männchen fiel eine hemizygoter Bande distal des ebenfalls hemizygot vorliegenden *Cla-Element*-Clusters auf (A-C). Zur näheren Lokalisation der *Cla-adjacent-DNA* wurde eine Hybridisierung mit dem distal des *Cla-Element*-Clusters liegenden Klon C1Y vorgenommen (D, E). So konnte der Abstand zwischen dem hemizygoten *Cla-Element*-Cluster und der *Cla-adjacent DNA* auf ca. 100 kb geschätzt werden.

Jedoch konnte auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* eine hemizygoter Bande distal des ebenfalls hemizygot vorliegenden *Cla-Element*-Clusters identifiziert werden. Diese Bande kommt bei männlichen Individuen hemizygot vor, während sie bei Weibchen fehlt. Für eine exaktere Lokalisierung wurde die *Cla-adjacent-DNA*-Sonde gemeinsam mit Klonen bekannter Position in der SDR hybridisiert. Die Abbildung 22 D und E zeigen, dass die hemizygoter Bande mit *Cla-adjacent-DNA* distal des Klons C1Y liegt. Aufgrund dieses Befundes wurde der Abstand zwischen dem *Cla-*

Ergebnisse

Element-Cluster und der hemizygoten *Cla-adjacent-DNA* auf mindestens 100 kb geschätzt. Da für diesen Versuch Präparate von Wildfängen der Art *C. thummi* verwendet wurden, sollte auch für die ständige Laborzucht die Anwesenheit einer hemizygoten Bande der *Cla-adjacent-DNA* gezeigt werden. Jedoch konnte distal des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters kein Signal detektiert werden (Abbildung 23). Auf Chromosom 4 konnte bei *C. thummi* eine eindeutige Hybridisierung der *Cla-adjacent-DNA* im Balbiani-Ring identifiziert werden. Im Vergleich dazu hybridisiert die Sonde in *C. piger* nur sehr schwach mit dem Balbiani Ring (Abbildung 21 C, E).

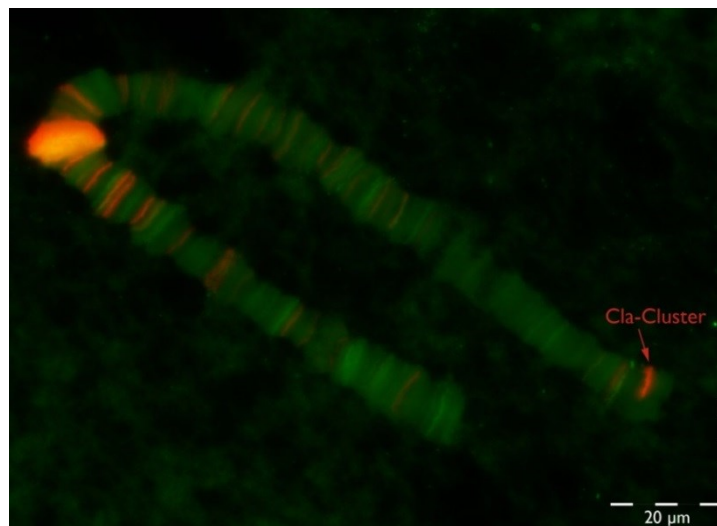


Abbildung 23: FISH von *Cla-adjacent-DNA* (grün) und synthetischen *Cla-Elementen* (rot) an Chromosomenpräparaten von *C. thummi* (Laborzucht)

Die bei Wildfängen der Art *C. thummi* gezeigte hemizygoten Bande *Cla-adjacent-DNA* distal des ebenfalls bei Männchen hemizygot vorliegenden *Cla-Element*-Clusters konnte bei Tieren aus der ständigen Laborzucht nicht identifiziert werden.

4.1.3 MOLEKULARE LOKALISATION DES HEMIZYGOTEN *CLA-ELEMENT*-CLUSTERS AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM VON *C. THUMMI*

In Männchen der Spezies *C. thummi* konnte eine hemizygoten heterochromatische Bande auf Chromosom 3 Arm F identifiziert werden, welche nur in Männchen auftritt (Hägele 1985). An derselben chromosomalen Position konnte später ein hemizygoten

Ergebnisse

Cla-Element-Cluster nachgewiesen werden, welches in Weibchen immer fehlt (Kraemer und Schmidt 1993). Es ist daher von einer engen Kopplung des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters mit dem Männchenbestimmer M auszugehen. Trotz der engen Kopplung des *Cla-Element*-Clusters mit M ist eine entscheidende Rolle der *Cla-Elemente* bei der Geschlechtsbestimmung eher unwahrscheinlich, da das Cluster nur bei Männchen der Spezies *C. thummi* vorkommt, jedoch in *C. piger* bei beiden Geschlechtern fehlt. Für die Suche nach dem dominanten Männchenbestimmer M und für eine tiefere Einsicht in die Evolution von Geschlechtschromosomen ist es dennoch von großem Interesse, die Struktur des Clusters und die Übergänge zu *single-copy*-Bereichen molekular aufzuklären. Durch gleichzeitige Hybridisierung von Klonen aus der SDR mit synthetischen *Cla-Elementen* konnte das hemizygoten *Cla-Element*-Cluster im Bereich der Gene *bcn92-like*, *d-Lactat-DH-like* und *polyhomeotic-like* lokalisiert werden (Herold 2012). Um das *Cla-Element*-Cluster bzw. seine flankierenden Sequenzabschnitte auch auf molekularer Ebene zu identifizieren, wurde versucht, die entsprechenden Bereiche über PCRs zu amplifizieren.

Proto-Y-Chromosom *C. thummi*

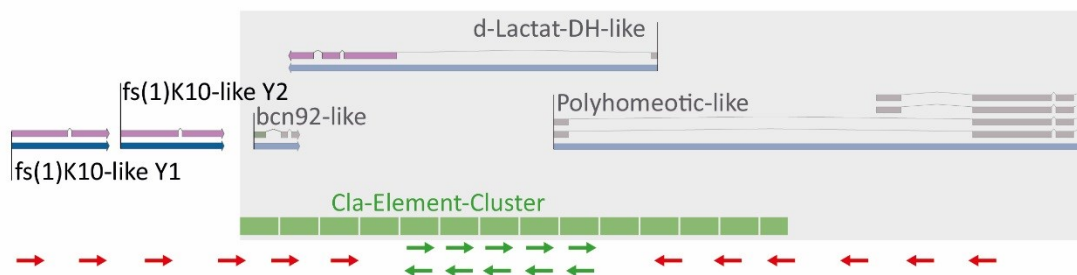


Abbildung 24: Molekulare Lokalisation des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* durch PCR.

Es ist unklar, ob die molekulare Struktur des Proto-Y-Chromosoms distal der Duplikation (grau hinterlegt), wie in der Abbildung angedeutet, der des Proto-X-Chromosoms entspricht. Fluoreszenz-*In situ*-Hybridisierungen zeigen jedoch, dass sich in diesem Bereich ein hemizygoten *Cla-Element*-Cluster befindet. Zur molekularen Aufklärung der Lage des Clusters und der Sequenz der flankierenden Bereiche wurden verschiedene Primer aus der SDR (rote Pfeile) mit Primern aus konservierten Bereichen von *Cla-Elementen* (grüne Pfeile) kombiniert.

Ergebnisse

Zur Erstellung passender Primer wurden bekannte Sequenzen von *Cla-Elementen* unterschiedlicher Herkunft miteinander verglichen, um konservierte Bereiche zu identifizieren. Da die Orientierung der *Cla-Elemente* im Cluster unklar war, wurden in die konservierten Abschnitte Primer beider Orientierungen verwendet. Die *Cla-Element*-spezifischen Primer wurden mit mehreren Primern aus der SDR kombiniert und PCRs mit genomischer DNA von *C. thummi* Männchen durchgeführt (Abbildung 24).

4.1.3.1 PROXIMALES ENDE DES HEMIZYGOTEN *CLA-ELEMENT*-CLUSTERS AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM VON *C. THUMMI*

Abbildung 26 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, für deren Amplifikation proximal des *Cla-Element*-Clusters liegende Primer mit dem *Cla*-for-Primer kombiniert wurden. In vielen Spuren sind häufig leiterartig angeordnete Banden zu erkennen. Eine besonders starke Bande von ca. 2 kb tritt bei der Primerkombination ZY122-for und *Cla*-for auf. Um abzuklären, ob es sich tatsächlich um eine Proto-Y-spezifische Bande handelt, wurde die PCR erneut mit genomischer DNA von *C. thummi* Weibchen bzw. Männchen durchgeführt. Des Weiteren wurde zusätzlich der Primer ZY123-for verwendet, welcher ca. 1 kb distal von ZY122-for liegt. Abbildung 25 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung dieser PCR-Produkte. Die bei Primer ZY122-for beobachtete Bande von ca. 2 kb tritt tatsächlich nur bei Verwendung männlicher DNA auf und fehlt bei weiblicher DNA. Die schwächeren Banden zwischen 200 bp und 1.000 bp treten sowohl im Männchen als auch im Weibchen auf. Bei Primer ZY123-for lässt sich bei Männchen ein leiterförmiges Muster erkennen, welches bei Weibchen nicht auftritt. Hierbei fluoresziert die untere Bande bei ca. 650 bp am stärksten und die Fluoreszenz nimmt mit aufsteigender Größe der Fragmente kontinuierlich ab. Auf dem Gelbild lassen sich mindestens 9 Banden oberhalb der 650 bp-Bande erkennen. Auch bei dieser Primer-Kombination treten bei beiden Geschlechtern kleinere schwache Banden zwischen 200 bp und 600 bp auf.

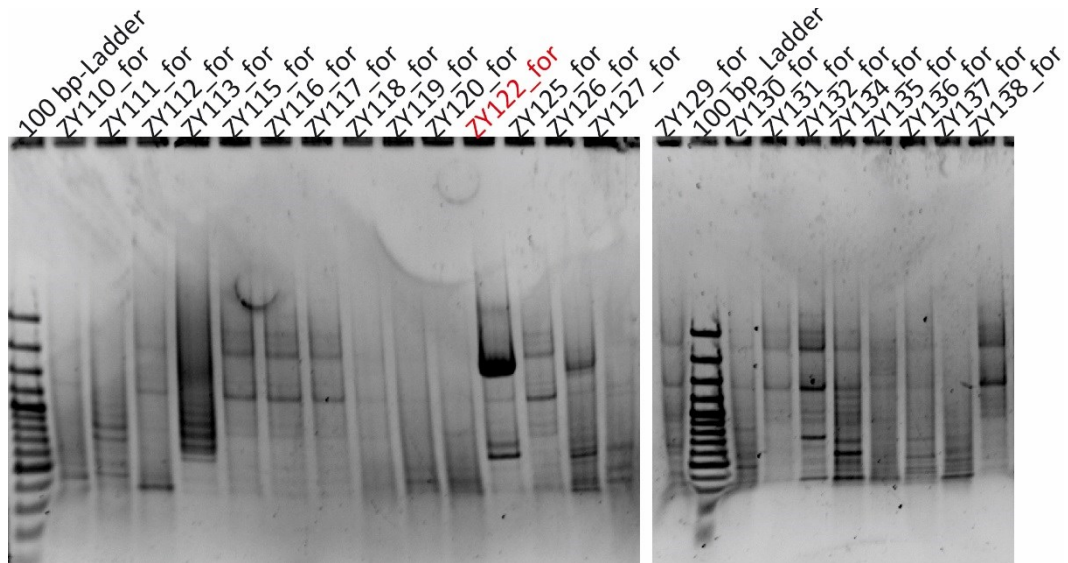


Abbildung 26: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten aus der Amplifikation genomischer DNA von *C. thummi* Männchen zur molekularen Lokalisation des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters

Es wurden Primer aus dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* mit dem *Cla-Element*-spezifischen Primer *Cla-for* kombiniert. Bei vielen Primerkombinationen ist es zu einer Amplifikation gekommen, wobei häufig ein leiterförmiges Muster zu erkennen ist (z.B. ZY113-for). Eine besonders starke Bande von ca. 2 kb ist bei Primer ZY122-for zu erkennen (rot). Als Molekulargewichtsstandard wurde die *100 bp-Ladder plus* der Fa. Fermentas verwendet.

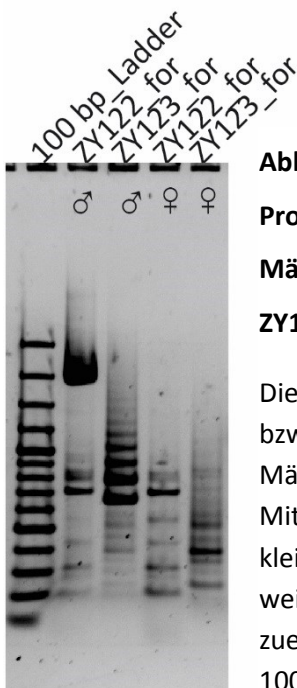


Abbildung 25: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation genomischer DNA von *C. thummi* Männchen im Vergleich mit Weibchen mit den Primerpaaren ZY122-for/*Cla-for* bzw. ZY123-for/*Cla-for*.

Die PCRs wurden mit genomischer DNA von *C. thummi* Männchen bzw. Weibchen durchgeführt. Mit dem Primer ZY122-for entsteht im Männchen ein ca. 2 kb großes Produkt, welches bei Weibchen fehlt. Mit Primer ZY123-for entsteht ein leiterförmiges Muster, wobei das kleinste Amplifikat ca. 650 bp groß ist. Darüber sind mindestens 9 weitere Banden erkennbar, welche je einen Abstand von ca. 120 bp zueinander haben. Als Molekulargewichtsstandard wurde die *100 bp-Ladder plus* der Fa. Fermentas verwendet.

Ergebnisse

Zur weiteren Analyse der PCR-Produkte wurde ein präparatives Gel angefertigt und die 2 kb Bande (ZY122-for/ Cla-for) sowie die unteren 4 Banden der Leiter (ZY123-for/ Cla-for) wiedergewonnen, kloniert und sequenziert. Abbildung 27 zeigt im Dotplot den Vergleich zwischen den Sequenzen des 650 bp-Produkts und des 1 kb-Produkts (4. Bande der Leiter) aus der PCR mit ZY123-for und Cla-for. Beide Sequenzen stimmen über die ersten 650 bp überein. Bei den zusätzlichen 350 bp des längeren Produktes handelt es sich um Wiederholungseinheiten der letzten 115 bp des 650 bp-Produktes.

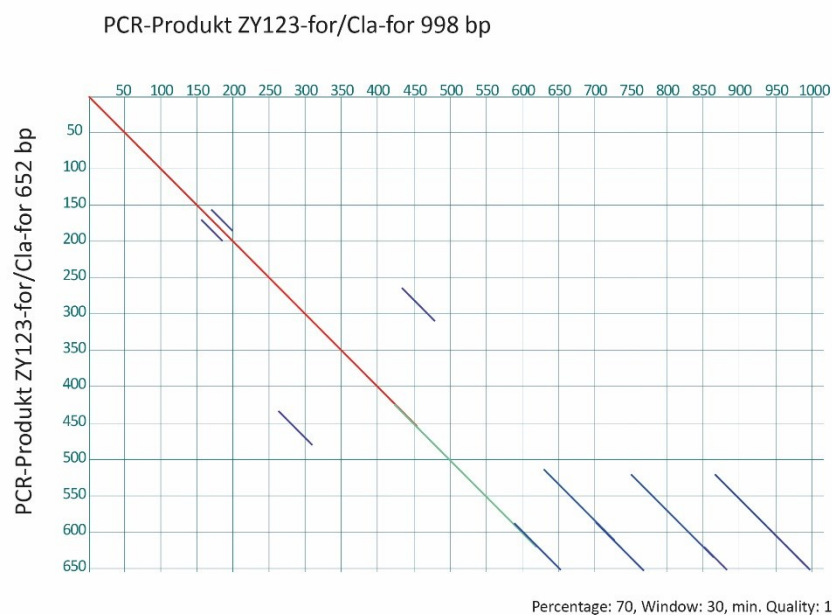


Abbildung 27: Dotplot der Sequenzen zweier PCR-Produkte aus der Amplifikation des proximalen *Cla*-Element-Clusters mit dem Primerpaar ZY123-for/ Cla-for.

Beide Produkte stimmen in ihrer Sequenz in einem Bereich von 650 bp überein. Der hintere Abschnitt der 998 bp langen Sequenz besteht aus ca. 120 bp langen Wiederholungseinheiten. Eine Datenbanksuche über NCBI zeigte, dass es sich dabei um *Cla*-Elemente handelt.

Eine Datenbanksuche über NCBI mittels BLASTn zeigt, dass es sich bei diesen Wiederholungseinheiten um *Cla*-Elemente handelt. Dies erklärt auch das leiterförmige Muster nach der Gelelektrophorese. Da sich *Cla*-Element-Cluster durch eine tandemartige Anordnung von *Cla*-Elementen auszeichnen, kann der *Cla*-

Ergebnisse

Element-spezifische Primer mehrfach binden und gemeinsam mit dem Primer aus der SDR zu einer Amplifikation führen. Da jedes *Cla-Element* ca. 120 bp groß ist, entstehen mehrere Fragmente, wobei jedes 120 bp größer als das nächst Kleinere ist. Da die Amplifikation kleinerer Produkte erfolgreicher ist, nimmt der Anteil der PCR-Produkte mit steigender Größe ab. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit dem Proto-X-Chromosom zeigt über die ersten 100 bp eine relativ hohe Identität von ca. 99 %. Die folgenden 450 bp bis zum ersten *Cla-Element* weisen hingegen keine Übereinstimmung mit der bekannten Sequenz auf. Bei einer Datenbanksuche über NCBI konnte jedoch eine Ähnlichkeit zu *Hinf(lur)-Elementen* aus *C. luridus* gezeigt werden. Dabei handelt es sich ebenfalls um tandem-repetitive Elemente, welche eine andere Organisationsform von *Cla-Elementen* bei *C. luridus* darstellen (Ross et al. 1997). In *C. luridus* liegen die *Cla-Elemente* eingebettet in *Hinf(lur)-Elementen* vor. Durch die Sequenzierung des PCR-Produktes aus der Amplifikation mit dem Primerpaar ZY122-for/ *Cla*-for konnte die Y-chromosomale Sequenz proximal des *Cla-Element*-Clusters um weitere 1.000 bp erweitert werden. Dabei weist der Bereich bis zum *Hinf(lur)-Element* eine Sequenzidentität zum Proto-X-Chromosom von 99,6 % auf. Es treten 5 Mutationen auf, von welchen sich 3 in Intronbereichen und 2 in kodierenden Abschnitten des Gens *d-Lactat-DH-like* befinden. Bei den beiden Basenaustauschen in der CDS handelt es sich um stille Mutationen. Allerdings liegt, wie in Abbildung 28 dargestellt, das proximale Ende des *Cla-Element*-Clusters mit seiner flankierenden Sequenz im 5'-Bereich der CDS des Gens *d-Lactat-DH-like*.

Eine Kartierung transkriptomischer NGS-Daten von *C. thummi* Männchen gegen die Referenzsequenz aus dem Proto-Y-Chromosom zeigt im Bereich des *Cla-Element*-Clusters und des davor liegenden *Hinf(lur)-Elements* eine mit den benachbarten Genen vergleichbar hohe Abdeckung an "reads". Diese weisen jedoch eine große Anzahl an SNPs auf. Da es keine perfekten "reads" in diesem Bereich gibt, ist davon auszugehen, dass das hemizygoten *Cla-Element*-Cluster aus der SDR nicht transkribiert wird, es jedoch grundsätzlich zur Transkription von *Cla-Elementen* anderer chromosomaler Lage kommen kann.

Ergebnisse

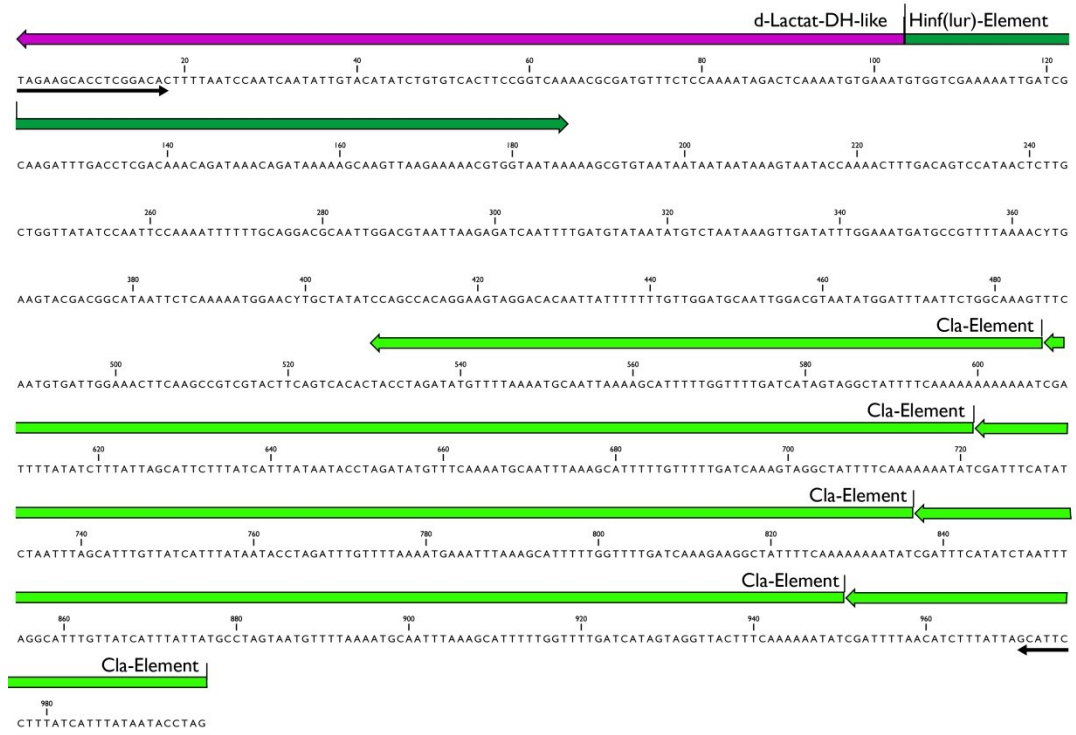


Abbildung 28: Sequenz eines 1.015 bp langen PCR-Produktes im proximalen Bereich des hemizygoten *Cla*-Element-Clusters (Primerpaar ZY123-for/ *Cla*-for)

Während die ersten 100 bp eine hohe Ähnlichkeit mit dem Proto-X-Chromosom im 5'-Bereich des Gens *d-Lactat-DH-like* (violett) aufweisen, zeigt die Sequenz ab da keinerlei Homologie mit dem Proto-X-Chromosom. Ein etwa 100 bp langer Abschnitt zeigt Ähnlichkeiten zu *Hinf(lur)-Elementen* aus *C. luridus* (dunkelgrün). Die folgenden 270 bp weisen keine Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Sequenzen auf. Der hintere Teil der Sequenz besteht aus tandemartig hintereinander gereihten *Cla*-Elementen (hellgrün), wobei viereinhalb *Cla*-Elemente sequenziert werden konnten. Definiert man Anfang und Ender der repetitiven Untereinheiten wie in der Abbildung dargestellt, sind die drei kompletten *Cla*-Elemente 114 bp bzw. 115 bp lang. Die schwarzen Pfeile zeigen die Lage der für die Amplifikation verwendeten Primer.

Ergebnisse

4.1.4 DISTALES ENDE DES HEMIZYGOTEN *CLA-ELEMENT*-CLUSTERS AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM VON *C. THUMMI*

Um das distale Ende des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters zu identifizieren, wurden, wie in Abbildung 24 dargestellt, in Richtung Zentromer orientierte Primer im Bereich der Gene *d-Lactat-DH-like* und *polyhomeotic-like* mit den Primern *Cla-for* und *Cla-rev* kombiniert und PCRs auf genomische DNA von *C. thummi* Männchen angefertigt. Dabei zeigte sich in keinem der PCR-Produkte das erwartete Leiter-Muster. Aufgrund der parallel erfolgten Identifikation des proximalen Endes des *Cla-Element*-Clusters mit den Primern ZY122-for bzw. ZY123-for (siehe Abschnitt 4.1.3.1) wurde die PCR

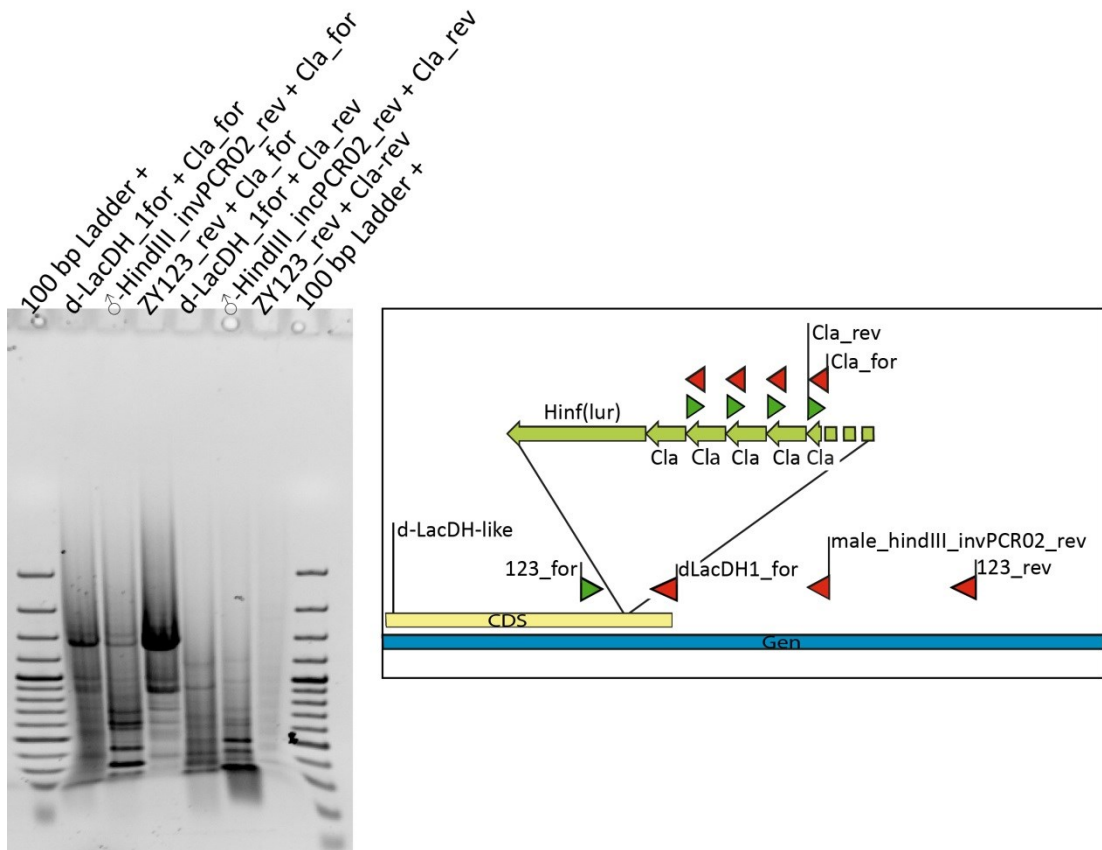


Abbildung 29: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus einer Amplifikation mit weiteren distal der Integrationsstelle des *Cla-Element*-Clusters liegenden Primern.

Die oben dargestellte Grafik veranschaulicht die Lage der Primer relativ zum auf dem Proto-Y-Chromosom integrierten Cluster.

Ergebnisse

mit dem Primer ZY123-rev und zwei zusätzlichen Primern (dLacDH-1for, male-HindIII-invPCR02rev), welche direkt distal der Integrationsstelle des *Cla-Element*-Clusters liegen sollten, wiederholt. Geht man davon aus, dass die Orientierung der *Cla-Elemente* im gesamten Cluster konstant ist, sollte eine Amplifikation im distalen Bereich mit dem Primer Cla-rev erfolgreich sein. Allerdings können innerhalb eines Clusters auch verschieden orientierte Elemente vorkommen. Um auszuschließen, dass dies der Grund für eine nicht erfolgreiche Amplifikation ist, wurde der Primer Cla-for ebenfalls eingesetzt. Die in Abbildung 29 gezeigten PCR-Produkte wurden teilweise sequenziert, wiesen jedoch keinerlei Homologien zu bekannten Bereichen der SDR auf. Es wird daher davon ausgegangen, dass es sich nicht um PCR-Produkte aus dem distalen Bereich des hemizygoten *Cla-Element-Clusters* handelt.

4.1.4.1 INVERSE PCR ZUR AUFKLÄRUNG DER SEQUENZ DISTAL DES HEMIZYGOTEN *CLA-ELEMENT-CLUSTERS*

Da die im proximalen Bereich des *Cla-Element-Clusters* angewandte Strategie zur Identifizierung der Integrationsstelle des Clusters am distalen Ende offenbar nicht erfolgreich war, wurde ein weiterer Ansatz mittels einer inverse PCR versucht. Hierbei wurde genomische DNA von *C. thummi* Männchen mit *HincII* restringiert, welches in der bekannten Sequenz des *Cla-Element-Clusters* nicht schneidet, so dass ein Restriktionsfragment entsteht, welches das *Cla-Element-Cluster* enthält. Dieses wurde daraufhin religiert und mit *DraI* restringiert. Dieses Enzym besitzt eine Schnittstelle im *Cla-Element*, so dass nach der Restriktion ein Fragment mit je einem halben *Cla-Element* an den Enden entsteht. Nach einer erneuten Religation erfolgte mit dem *Cla-Element*-spezifischen Primer Cla-rev und dem Primer dLacDH2-for aus der SDR (proximal des Clusters) eine Amplifikation über die *HincII*-Schnittstelle hinweg. Abbildung 30 stellt die Vorgehensweise zusammenfassend dar. Die Amplifikation war mit der standardmäßig verwendeten GoTaq-Polymerase (Promega, Madison USA) nicht erfolgreich, so dass die Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase der Fa. NEB (Ipswich, USA) verwendet wurde. Die durch die Amplifikation entstandenen PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert, zeigten in der

Ergebnisse

bioinformatischen Auswertung zwar Ähnlichkeiten zu *Cla-Elementen*, jedoch nicht zu Bereichen der SDR. Es ist wahrscheinlich, dass während einer der PCRs ein SDR-spezifischer Primer an einer anderen Stelle nahe eines *Cla-Element-Clusters* hybridisiert hat und es somit zu einer Amplifikation eines anderen Abschnittes kommen konnte.

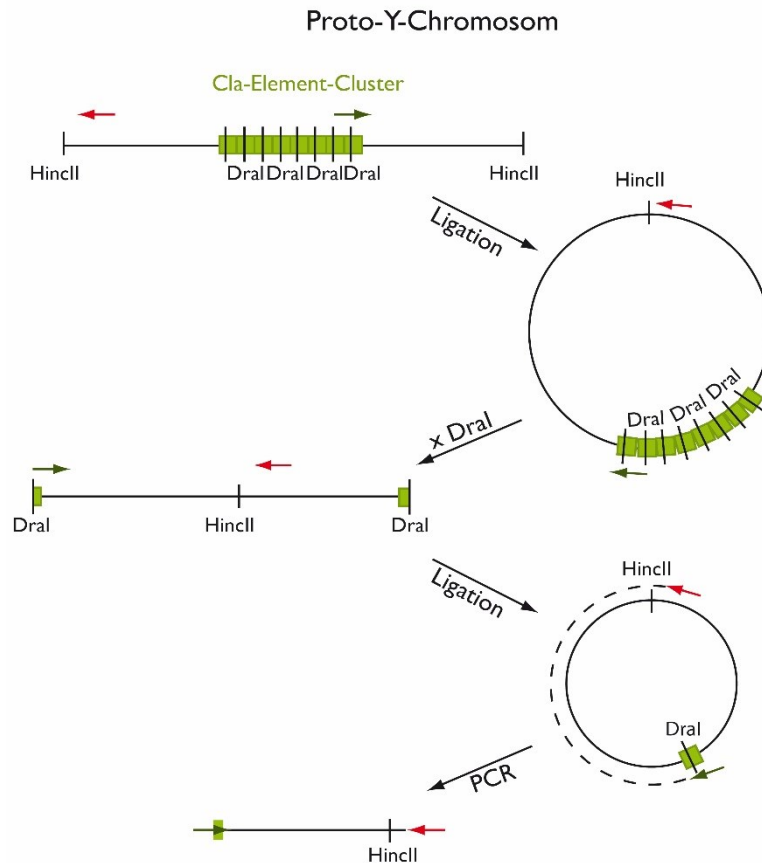


Abbildung 30: Grafische Darstellung der Durchführung einer Inversen PCR im Bereich des hemizygoten *Cla-Element-Clusters* bei *C. thummi* Männchen.

Um die Sequenz des distalen Endes des *Cla-Element-Clusters* zu erhalten, wurde ein Fragment, das das Cluster enthält, mit *HincII* herausgeschnitten. Nach einer Religation und der Restriktion mit *DraI* erhält man ein Fragment mit je einem halben *Cla-Element* an den Enden. Dieses wurde erneut religiert und mit den Primern *Cla-rev* und *dLacDH2-for* amplifiziert.

4.1.5 GRÖßENBESTIMMUNG FÜR DAS HEMIZYGOTE *CLA-ELEMENT*-CLUSTER AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM VON *C. THUMMI* MITTELS SOUTHERN ANALYSE

Da es bisher nicht gelungen ist, das gesamte hemizygote *Cla-Element*-Cluster aus dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* zu klonieren, ist nicht bekannt, aus wie vielen *Cla-Elementen* das Cluster aufgebaut ist. Um eine grobe Schätzung der Anzahl an *Cla-Elementen* vorzunehmen, wurde ein Southern Blot aus restringierter genomischer DNA von *C. thummi* und *C. piger* Männchen und Weibchen angefertigt. Dabei wurde ein Enzym gewählt, welches relativ nah am bekannten proximalen Ende des *Cla-Element*-Clusters schneidet, dabei aber keine Schnittstelle in den bereits sequenzierten Abschnitten des Clusters aufweist. Da keine Informationen über die Sequenz des distalen Endes des *Cla-Element*-Clusters vorlagen, konnte die Wahl des Restriktionsenzym hier nicht angepasst werden. Für die Restriktion wurde das Enzym *HincII* verwendet, welches etwa 1,4 kb vor dem ersten *Cla-Element* im Gen *d-Lactat-DH-like* schneidet (Abbildung 31). Für die spätere Berechnung der Größe des *Cla-Element*-Clusters wurde die Position der nächsten *HincII*-Schnittstelle distal des *Cla-Element*-Clusters statistisch ermittelt. Dabei wurde der durchschnittliche AT-Gehalt der bekannten Referenzsequenz der SDR von 67 % mit einbezogen, wobei sich ergab, dass die Erkennungssequenz GTYRAC etwa alle 1.390 bp auftritt. Die für die Hybridisierung des Southern Blots verwendete Sonde liegt ebenfalls proximal des *Cla-Element*-Clusters im Gen *dLacDH-like*.

Das Autoradiogramm des Southern Blots (Abbildung 32) zeigt in allen vier Spuren eine Bande bei ca. 1.100 bp, wobei es sich um die Proto-X-chromosomale Bande handelt. Zusätzlich treten in der Spur mit restringierter DNA aus *C. thummi* Männchen zwei Banden auf, welche weder bei *C. thummi* Weibchen noch in beiden Geschlechtern von *C. piger* zu erkennen sind. Die obere Bande liegt bei etwa 9,4 kb, die untere bei ca. 8 kb. Eine weitere Bande, welche nur in *C. thummi* Männchen auftritt, liegt bei etwa 1.300 bp. Eine Bande bei ca. 2.200 bp kommt in Männchen beider Spezies vor, fehlt aber bei Weibchen. Es ist zu erkennen, dass in *C. thummi* sowohl bei Weibchen als auch bei Männchen einige weitere Banden mit der Sonde hybridisieren,

Ergebnisse

wohingegen es bei *C. piger* in beiden Geschlechtern neben den erwarteten Proto-X-chromosomalen Banden kaum Hybridisierungen gibt. Die das *Cla*-Element-Cluster flankierenden Bereiche bis zu den jeweiligen *HincII*-Schnittstellen sind zusammen ca. 2.770 bp groß. Somit enthalten am wahrscheinlichsten die beiden nur bei *C. thummi* Männchen auftretenden Banden mit 9,4 kb bzw. 8 kb das *Cla*-Element-Cluster. Bei einer durchschnittlichen Größe eines *Cla*-Elementes von 115 bp und unter Berücksichtigung der flankierenden Bereiche errechnen sich für die 9,4 kb-Bande eine Anzahl von ca. 58 Elementen und für die 8 kb-Bande eine Anzahl von ca. 45 Elementen.

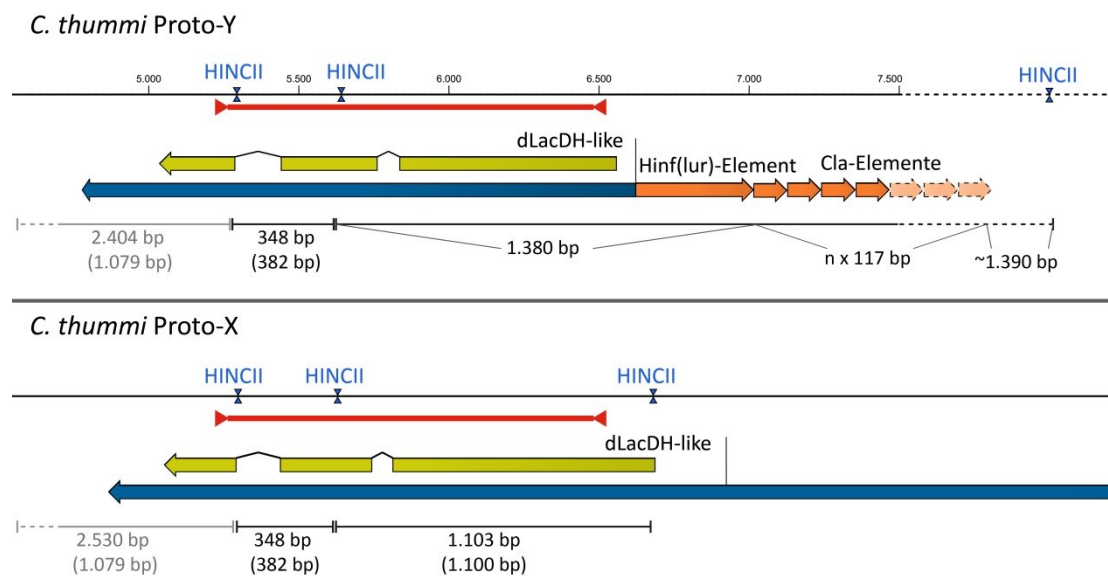


Abbildung 31: Erwartete Fragmente bei Hybridisierung eines Southern Blots mit *HincII*-restringierter genomischer DNA von *C. thummi* Männchen und Weibchen mit einer Sonde aus dem Bereich des Gens *dLac-DH-like* (rot).

Dargestellt ist der proximale Bereich des *Cla*-Element-Clusters auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* und der entsprechende Bereich auf dem Proto-X-Chromosom. In diesem Bereich liegt die verwendete Sonde (rot). Hellgrau dargestellt sind Fragmente, welche nur schwach mit der Sonde hybridisieren, in Klammern stehen die erwarteten Fragmentgrößen für *C. piger*. Die flankierende Sequenz distal des *Cla*-Element-Clusters ist nicht bekannt, weshalb die Lage der nächsten *HincII*-Schnittstelle über die Wahrscheinlichkeit ihres Vorkommens in der Sequenz statistisch ermittelt wurde.

Ergebnisse

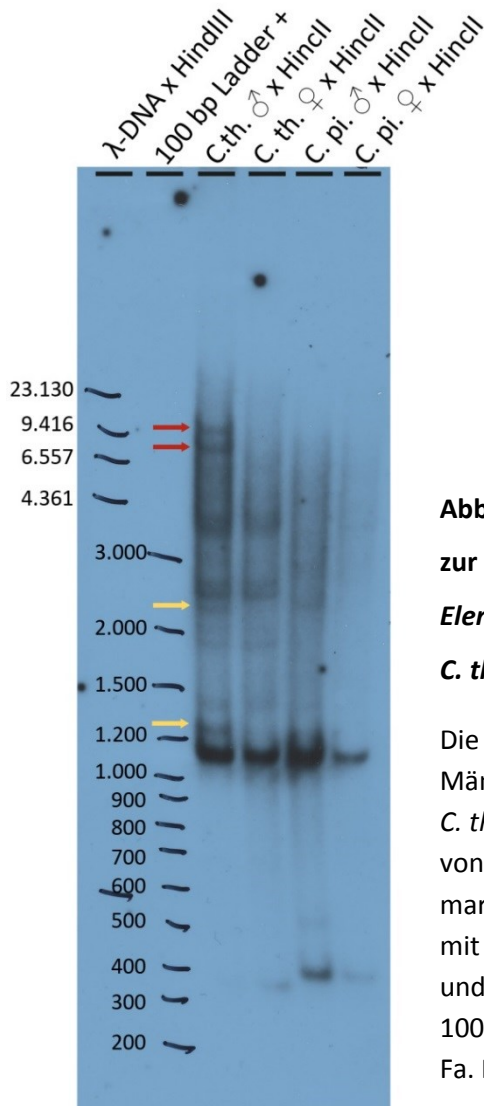


Abbildung 32: Autoradiogramm eines Southern Blots zur Größenbestimmung des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi*.

Die Spur mit HincII-restringierter DNA aus *C. thummi* Männchen zeigt 4 Banden, welche weder bei *C. thummi* Weibchen noch in beiden Geschlechtern von *C. piger* zu sehen sind. Die beiden mit roten Pfeilen markierten Banden liegen bei etwa 9,4 kb und 8 kb, die mit gelben Pfeilen markierten Banden bei ca. 2,2 kb und 1,3 kb. Als Molekulargewichtsstandard wurden die 100 bp Ladder + und der Lambda x *HindIII*-Marker der Fa. Fermentas verwendet.

4.1.6 LONG-RANGE-PCR ZUR AMPLIFIKATION UND SEQUENZIERUNG DES PROTO-Y-CHROMOSOMS VON *C. THUMMI* ZWISCHEN *FS(1)K10-LIKE Y2* UND DEM PROXIMALEN ENDE DES HEMIZYGOTEN *CLA-ELEMENT-CLUSTERS*

Mit der Duplikation im Bereich des Gens *fs(1)K10-like* und dem proximalen Ende des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters sind auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* zwei relativ dicht beieinander liegende Sequenzabschnitte bekannt. Diese Informationen wurden genutzt, um den dazwischen liegenden Abschnitt durch eine Long-Range-PCR zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren. Für die Amplifikation wurden die Primer K10-forTM und A-Border-Hinf-Cla-rev eingesetzt.

Ergebnisse

Abbildung 33 zeigt einen schematischen Überblick sowie die gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes. Trotz der großen Unterschiede zwischen dem Proto-Y-Chromosom und dem Proto-X-Chromosom im Bereich der Duplikation und des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters zeigt die dazwischen liegende Sequenz nur wenige Basenaustausche und zwei kurze Indels in nicht kodierenden Bereichen.

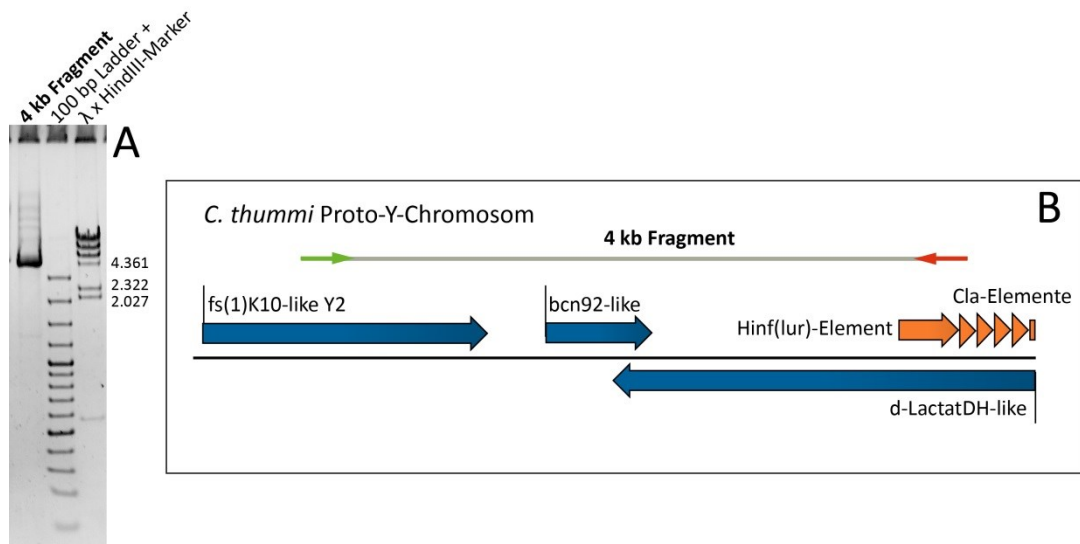


Abbildung 33: Schematische Darstellung einer Long-Range-PCR zur Amplifikation Proto-Y-chromosomaler Sequenzen zwischen dem Gen *fs(1)K10-like Y2* und dem hemizygoten *Cla-Element*-Cluster (B) sowie gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes (A)

Die Primer K10-forTM und A-Border-Hinf-Cla-rev wurden für eine Amplifikation männlicher genomischer DNA eingesetzt. Das ca. 4 kb große PCR-Produkt wurde vollständig sequenziert. Als Molekulargewichtsstandard wurden die 100bp Ladder+ sowie der λ-DNA x HindII-Marker der Fa. Fermentas eingesetzt.

4.1.7 ÜBERBLICK ÜBER DIE STRUKTUR DER SDR DER BEIDEN SPEZIES *C. THUMMI* UND *C. PIGER*

Im Laufe der Arbeit konnten durch verschiedene Analysen weitere Proto-Y-chromosomale Bereiche sequenziert werden. U.a. wurde das proximale Ende des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters bei *C. thummi* in der Sequenz lokalisiert. Darüber hinaus wurde auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* ein weiteres repetitives Element identifiziert. Abbildung 34 gibt einen Überblick über die zum Ende der Arbeit sequenzierten vorliegenden Abschnitte der SDR der beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger*.

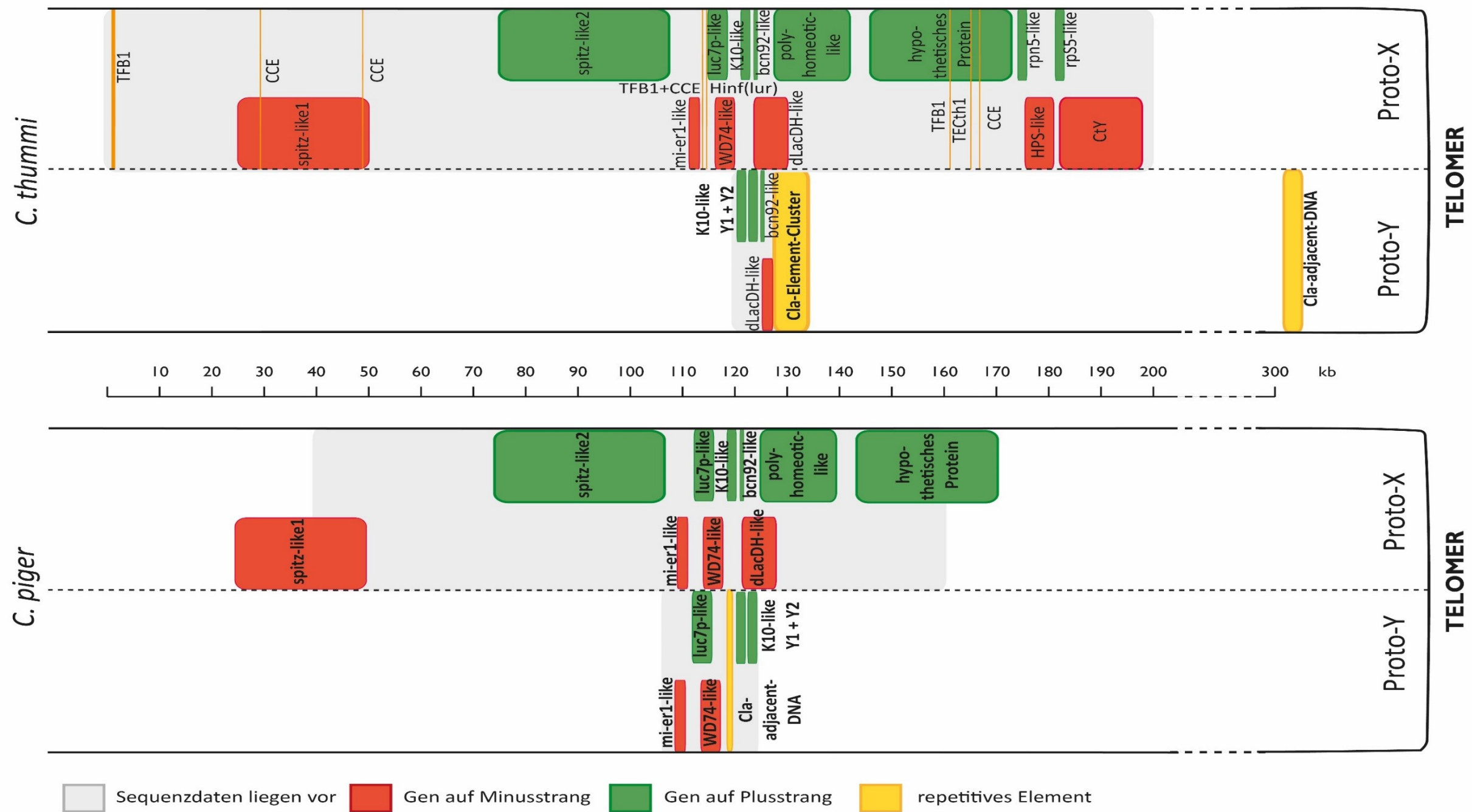


Abbildung 34: Überblick über die Struktur der SDR auf dem Proto-X- und Proto-Y-Chromosom der beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger*

Dargestellt ist der schematische Überblick über die SDR auf Chromosom 3 Arm F. Das Chromosom ist in Proto-X- und Proto-Y-Chromatide unterteilt. Bereits sequenzierte Abschnitte sind grau hinterlegt. Auf dem Plusstrang liegende Gene sind grün, auf dem Minusstrang liegende Gene sind rot dargestellt. Repetitive Elemente sind in orange zu erkennen. Die auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* richtung Telomer liegende Cla-adjacent DNA wurde über FISH-Analysen lokalisiert

4.2 TRANSKRIPT-ANALYSE DES AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM DUPLIZIERT VORLIEGENDEN GENS *FS(1)K10-LIKE*

Auf den Proto-Y-Chromosomen der beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger* konnte die Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* gezeigt werden. Während auf dem Proto-X-Chromosom lediglich eine Kopie des Gens vorliegt (X), gibt es auf dem Proto-Y-Chromosom zwei direkt hintereinander liegende Genkopien (Y1 und Y2). Im Bereich der Duplikation liegt das Proto-Y-Chromosom vollständig kloniert und sequenziert vor, so dass insgesamt zu Beginn dieser Arbeit für *C. thummi* ein 4.684 bp großer und für *C. piger* ein 4.555 bp großer Abschnitt des Proto-Y-Chromosoms bekannt war (Stiehl 2009, persönliche Mitteilung Kaemer). Zur weiteren Analyse der verschiedenen *fs(1)K10-like*-Duplikate Y1, Y2 und X wurden transkriptomische NGS-Datensätze gegen die Referenzsequenzen kartiert und RNASeq-Analysen durchgeführt. Des Weiteren wurde ein Northern Blot angefertigt, um die verschiedenen Transkriptvarianten darzustellen.

4.2.1 DARSTELLUNG VERSCHIEDENER TRANSKRIPTVARIANTEN VON *FS(1)K10-LIKE* MITTELS NORTHERN BLOT

Es wurde eine NGS-Analyse mit transkriptomischen Daten aus *C. thummi* und *C. piger* Männchen und Weibchen sowie Embryonen beider Spezies durchgeführt (siehe Abschnitt 5.3.1). Bei einem „*large gap read mapping*“ der Daten gegen die Referenzsequenzen des Proto-Y-Chromosoms der beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger* kartierten auch zwischen den beiden Kopien des Gens *fs(1)K10-like* Y1 und Y2 relativ viele „*reads*“, so dass vermutlich auch der Bereich zwischen den beiden proto-Y-chromosomalen Genen transkribiert wird (Abbildung 35). In diesem Bereich sind keine „*spliced reads*“ zu erkennen, jedoch befinden sich in der Sequenz zwischen den beiden Genkopien mehrere Stopp-Kodons.

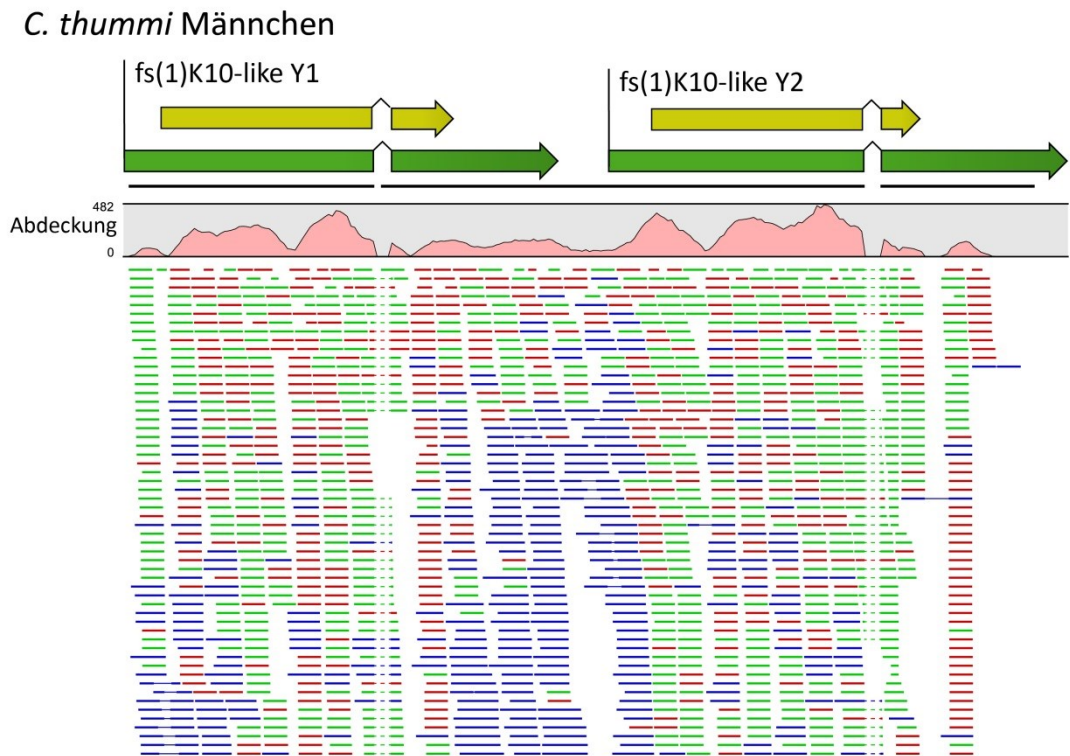


Abbildung 35: RNA-Seq-Analyse für das auf dem Proto-Y-Chromosom dupliziert vorliegende Gen *fs(1)K10-like*.

Dier Kartierung transkriptomischer NGS-Daten aus Männchen der Spezies *C. thummi* gegen die beiden Genkopien *fs(1)K10-like Y1* und *fs(1)K10-like Y2* zeigt auch im Bereich zwischen den beiden Genen eine relativ hohe Abdeckung mit „reads“. „Paired reads“ sind in Blau, „reads“ auf dem Plusstrang in Grün und „reads“ auf dem Minusstrang in Rot dargestellt.

Um die verschiedenen Transkriptvarianten des im Männchen dupliziert vorliegenden Gens *fs(1)K10-like* darzustellen, wurde ein Northern Blot mit RNA aus Larven von *C. thummi* und *C. piger* Männchen und Weibchen angefertigt. RNA beider Arten wurde über die GTC-Methode aus Larven isoliert. Zur Anreicherung von mRNA wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Bei *C. piger* erfolgte die Anreicherung standardmäßig über mehrere polyA+-Aufreinigungen, wohingegen bei *C. thummi* eine spezifische Anreicherung von *fs(1)K10-like*-Transkripten über magnetische „beads“ versucht wurde. Hierfür wurden zwei 26 bp lange biotinylierte Oligonukleotide erstellt, welche komplementär zu einem männchenspezifischen

Ergebnisse

Bereich im 3'UTR der Y1-Kopie bzw. zu einem Bereich im 1. Exon aller drei *fs(1)K10-like*-Kopien sind. Die so an mit Streptavidin umhüllte magnetische *Beads* gekoppelten Oligonukleotide konnten mit den *fs(1)K10-like*-Transkripten hybridisieren. Die mit beiden Methoden isolierte mRNA wurde auf denaturierenden Agarosegelen gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Der Northern Blot wurde mit einer spezifischen DNA-Sonde aus einem allen Genkopien von *fs(1)K10-like* gemeinsamen Bereich hybridisiert. Schon bei der gelelektrophoretischen Auftrennung war zu erkennen, dass die polyA+-aufgereinigte mRNA noch einen hohen Anteil ribosomaler RNA aufweist. Dahingegen zeigte das Agarosegel der mit magnetischen „beads“ aufgereinigten RNA keine Verunreinigungen. Auch der Northern Blot weist bei der mit „beads“ aufgereinigten RNA deutlich hybridisierende Banden und nur eine schwache unspezifische Hybridisierung im Hintergrund auf. Auf dem Blot mit polyA+-aufgereinigter mRNA von *C. piger* sind mehrere Banden und vor allem beim Männchen eine stärkere unspezifische Hybridisierung zu erkennen. Der Blot mit mRNA aus *C. thummi* zeigt beim Weibchen nur eine einzelne hybridisierende Bande bei etwa 2.200 Basen. Die durch transkriptomische NGS-Daten und RACE-Analysen ermittelte Länge der X-Kopie der mRNA von *fs(1)K10-like* beträgt 1.788 Basen. Im Männchen sind zwei Banden erkennbar, eine bei ca. 2.000 Basen und eine bei ca. 4.100 Basen, wobei es sich bei der unteren Bande auch um eine Doppelbande handeln könnte. Hier liegen die zuvor ermittelten Transkriptlängen für Y1 bei 1.685 Basen und für Y2 bei 1.787 Basen. Beide Transkripte zusammen mit dem dazwischen liegenden Bereich haben eine Größe von 3.670 Basen. Die X-chromosomale Bande ist offenbar nicht vorhanden. Bei der Gesamt-mRNA von *C. piger* ergibt sich sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen ein anderes Bild. Zwar tritt auch hier nur beim Männchen eine zusätzliche stark hybridisierende Bande bei etwa 5.500 Basen auf. Beide Geschlechter zeigen eine Bande bei etwa 2.800 bp und eine etwas schwächere undeutliche Bande bei 2 kb. Zusätzlich sind hier gegenüber *C. thummi* bei Weibchen zwei etwas schwächere Banden bei etwa 500 Basen und 1.000 Basen erkennbar.

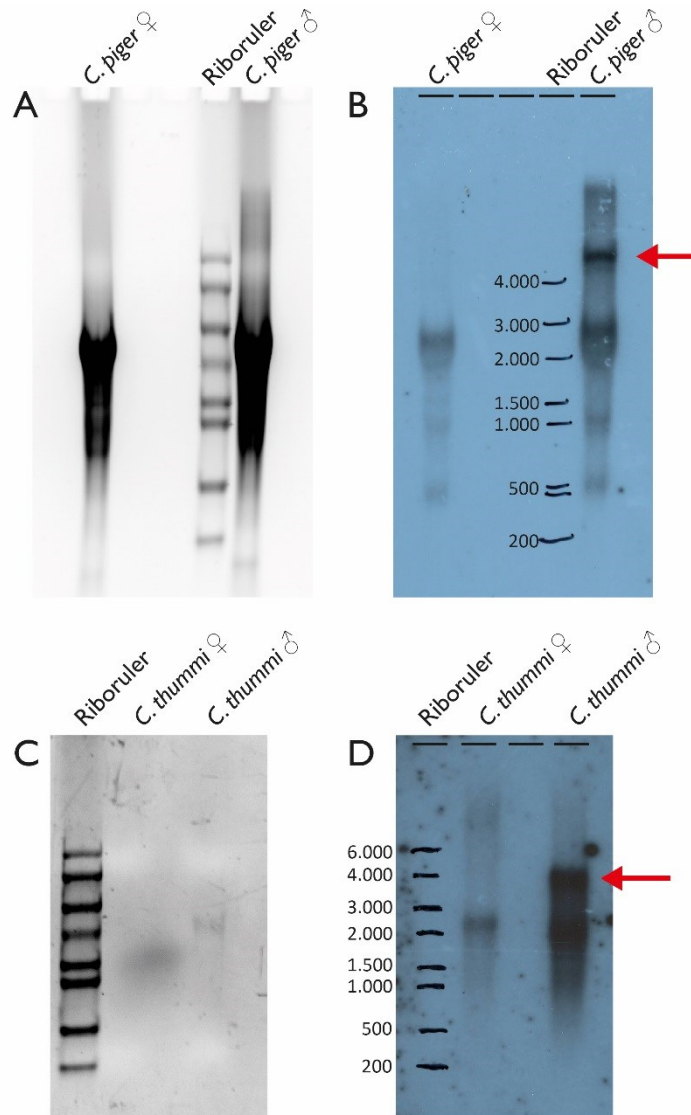


Abbildung 36: Denaturierende RNA-Gele und die dazu gehörenden Autoradiogramm von Northern Blots mit mRNA aus *C. thummi* und *C. piger* Männchen und Weibchen zum Nachweis verschiedener Transkriptvarianten des Gens *fs(1)K10-like*.

In A und B sind ein RNA-Gel (A) und das Autoradiogramm des entsprechenden Northern Blots (B) mit PolyA⁺-aufgereinigter mRNA aus *C. piger* Männchen und Weibchen zu sehen. Das untere RNA-Gel (C) zeigt „*bead*“-aufgereinigte RNA aus *C. thummi* Männchen und Weibchen und rechts daneben ist das entsprechende Autoradiogramm (D) zu sehen. Beide Blots wurden mit einer DNA-Sonde aus dem Bereich des Gens *fs(1)K10-like* hybridisiert. Jeweils im Männchen tritt eine zusätzliche Bande bei 4,1 kb (B) bzw. 5,5 kb (D) auf (rote Pfeile), welche wahrscheinlich auf ein gemeinsames Transkript der beiden auf dem Proto-Y-Chromosom hintereinander liegenden Kopien von *fs(1)K10-like Y1* und *Y2* zurückzuführen ist. Als Molekulargewichtsstandard wurde die RiboRuler High Range RNA Ladder 200 bis 6000 bases der Fa, Thermo scientific verwendet.

Ergebnisse

Eine weitere dünne Bande liegt bei etwa 1.600 Basen. Die beiden Banden bei 500 und 1.000 Basen sind beim Männchen ebenfalls vorhanden. Die bekannten Transkriptgrößen liegen für die X-Kopie bei 1.771 Basen, für Y1 bei 1.718 Basen, für Y2 bei 1.772 Basen und für beide Y-Kopien mit dem dazwischen liegenden Bereich bei 3.689 Basen.

In beiden Spezies konnte gezeigt werden, dass in Männchen ein großes Transkript aus dem Bereich der duplizierten Gene *fs(1)K10-like Y1* und *Y2* exprimiert wird. Dieses wird im weiteren Verlauf *Y3*-Transkript genannt. Auch der Northern Blot zeigt nicht eindeutig, ob das *Y3*-Transkript *Y1* und *Y2* vollständig abdeckt.

Ergebnisse

4.3 EXPRESSIONSANALYSE DER GENE AUS DER SDR VON *C. THUMMI* UND *C. PIGER* MÄNNCHEN UND WEIBCHEN

Um eine Aussage über die Expressionslevel der in der SDR von *C. thummi* bzw. *C. piger* identifizierten Gene treffen zu können, wurden transkriptomische Illumina-Datensätze für RNASeq-Analysen verwendet. Die Datensätze stammen aus verschiedenen Ansätzen und wurden aus unterschiedlichen Illumina-Bibliotheken generiert. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die zur Verfügung stehenden Datensätze, die Anzahl der „reads“ und die Qualität der Daten.

Tabelle 8: Illumina Sequenz Datensätze aus *C. thummi* und *C. piger*

Die in den RNA-Bibliotheken enthaltenen Fragmente wurden entweder von einer Seite („single“) oder von beiden Seiten („paired end“ = PE) sequenziert. Die einzelnen Sequenzen wurden einem Qualitäts-Trimming unterzogen. Dabei wurden Sequenzen mit einer Qualität („Phred-Score“) von unter 33 entfernt. Außerdem wurde am 5´-Ende 6 Basen und am 3´-Ende 1 Base entfernt.

Organismus	Entwicklungs- stadium	Bibliothek/ High-Seq-Lauf	„reads“ Rohdaten	„reads“ gefiltert	Sequenz- länge Ø	Qualität Ø
<i>C.thummi</i> ♂	Larve	50er single	46.557.991	45.262.363	43,48	36,19
<i>C.thummi</i> ♀	Larve	50er single	34.987.537	33.891.630	43,43	36,06
<i>C. piger</i> ♂	Larve	50er single	34.963.496	29.216.831	41,34	33,72
<i>C. piger</i> ♀	Larve	50er single	38.026.354	31.542.608	41,29	33,62
<i>C.thummi</i> ♂	Larve	100er PE	197.899.590	195.470.711	91,63	36,69
<i>C.thummi</i> ♀	Larve	100er PE	105.429.480	104.321.748	91,92	36,98
<i>C. piger</i> ♂	Larve	100er PE	158.581.126	156.153.798	91,59	36,63
<i>C. piger</i> ♀	Larve	100er PE	132.698.924	130.023.242	91,45	36,67
<i>C. thummi</i>	Embryo	100er PE	102.858.198	101.445.800	106,52	37,27
<i>C. thummi</i>	Embryo	100er PE	91.995.326	90.583.130	106,65	37,19
<i>C. piger</i>	Embryo	100er PE	108.424.592	106.208.148	106,63	37,10
<i>C. piger</i>	Embryo	100er PE	45.083.214	44.297.074	106,60	37,10

Ergebnisse

4.3.1 „FOLDCHANGE“-ANALYSEN: EXPRESSIONSVERGLEICH DER GENE IN DER SDR ZWISCHEN UNTERSCHIEDLICHEN GESCHLECHTERN UND ENTWICKLUNGSSTADIEN

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Sequenz-Datensätze aus Larven-RNA als biologische Replikate zu erreichen, wurden die 100er „PE-reads“ in „reads“ mit einer Länge ≤ 50 bp zerlegt. Die Kartierung der gefilterten Daten mittels RNASeq erfolgte mit dem Programm CLC Genomics Workbench 6.5.1 (CLCbio Aarhus, Dänemark) gegen die annotierten Referenzsequenzen des Proto-X- bzw.- Proto-Y-Chromosoms der beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger*. Dabei ist die Proto-X-Referenzsequenz bei *C. thummi* 32 kb groß und beinhaltet 7 Gene, wohingegen die Proto-Y-Referenz mit 7,5 kb nur einen Teil der homologen Proto-X-Sequenz abdeckt und 4 Gene trägt. Bei *C. piger* steht als Proto-Y-Referenz ein etwas größerer Abschnitt von ca. 17 kb mit 5 Genannotationen zur Verfügung. Die Proto-X-Referenz ist 28 kb groß und beinhaltet wie bei *C. thummi* 7 Gene.

Da die Anzahl der vergleichbaren Gene zwischen Männchen und Weibchen mit 4 bzw. 5 gering ist und kein annotiertes Referenzgenom zur Verfügung steht, wurden verschiedene Haushaltsgene als Vergleichsprobe ausgewählt. Da keine entsprechenden Gene aus Chironomiden bekannt sind, wurden Gene verwendet, welche sich in Expressionsstudien an unterschiedlichen Insektenspezies zur Identifizierung geeigneter Referenzgene für RT-qPCRs als nicht differenziell exprimiert erwiesen haben. In *Locusta* konnten bei den Genen *EF1alpha*, *EF1beta* und *RPL32* sehr geringe Variationen im Expressionslevel festgestellt werden (Yang et al. 2014). Die Gene *GAPDH*, *RPS18* und *Pros54* erwiesen sich bei Untersuchungen an der Honigbiene als nicht differenziell exprimiert (Cameron et al. 2013; Scharlaken et al. 2008). Um die Sequenzen der entsprechenden Gene aus *C. thummi* bzw. *C. piger* zu erhalten, wurden BLAST-Suchen gegen assemblierte genomische Daten aus beiden Spezies durchgeführt. Durch Sequenzalignments konnten die stark konservierten Gene annotiert werden.

Die Datensätze wurden per RNASeq gegen die Referenzen kartiert, wobei die Parameter relativ stringent gewählt wurden („*similarity fraction*“: 0,99, „*length*

Ergebnisse

fraction“: 0,99). Kurze “*reads*” bis 55 bp durften maximal eine falsche Base enthalten. “*reads*” mit einer Länge von 56 bp oder mehr wurden nur dann gegen die Referenz kartiert, wenn mindestens 99 % der Basen mit dieser übereinstimmten. Weitere Parameter für die Kartierungen sind im Anhang aufgeführt. Für den Vergleich der Datensätze miteinander wurden die von der CLC Genomics Workbench erstellten normalisierten Expressionswerte verwendet. Die Daten für die Kartierung stammen bei Larven aus verschiedenen Datensätzen für Männchen und Weibchen, wohingegen aus technischen Gründen bei Embryonen nur zwei Datensätze aus gemischter männlicher und weiblicher DNA zur Verfügung standen. Durch Unterschiede in der Referenzsequenz können jedoch auch in diesem Stadium Expressionsunterschiede zwischen Männchen und Weibchen festgestellt werden, wenn gemischte Daten kartiert werden. Innerhalb einer Spezies wurden die Expressionswerte aus der Kartierung gegen das Proto-Y-Chromosom mit denen gegen das Proto-X-Chromosom sowohl in Larven als auch im Embryo miteinander verglichen. Außerdem erfolgte bei *C. thummi* auch ein Vergleich der Expression zwischen Embryo und Larve. In beiden Fällen wurden die Expressionswerte für die beiden Kartierungen gegen das Proto-Y-Chromosom mit denen gegen das Proto-X-Chromosom verglichen, wodurch sich jeweils vier Werte für die “*foldchanges*” ergaben. Die mittlere Schwankung der Expression wurde durch die Kartierung der Daten gegen die oben aufgeführten Haushaltsgene ermittelt. Die “*foldchanges*” für die Gene aus der SDR wurden auf diese Schwankung normiert. Aus den normierten “*foldchanges*” wurden ein Mittelwert und eine Standardabweichung errechnet. Im Vergleich Männchen gegen Weibchen wurden die Werte für die beiden Proto-Y-spezifischen Kopien des Gens *fs(1)K10-like* zusammen gerechnet.

Zunächst wurde bei beiden Spezies, *C. thummi* und *C. piger*, die Expression der Gene aus der SDR zwischen Männchen und Weibchen im larvalen Stadium miteinander verglichen (Abbildung 37 und Abbildung 38). Dabei zeigen die Gene *bcn92-like* und *d-Lactat-DH-like* bei *C. thummi* und die Gene *mier1-like*, *luc7-like* und *wd74-like* bei *C. piger* keine unterschiedliche Regulation im Vergleich zwischen Männchen und Weibchen.

Ergebnisse

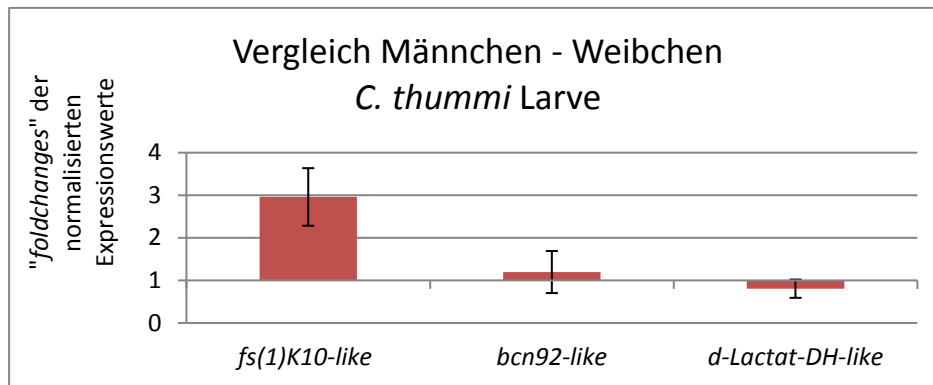


Abbildung 37: "foldchanges" der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Männchen - Weibchen bei *C. thummi* Larven

Die "foldchanges" der drei auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* bekannten Gene wurden auf die bei Haushaltsgenen beobachteten Schwankungen normiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus dem Vergleich von zwei Datensätzen aus Männchen mit zwei Datensätzen aus Weibchen. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist ebenfalls angegeben. Mit einer 3-fach höheren Expression im Männchen gegenüber dem Weibchen ist das Gen *fs(1)K10-like* das einzige, das eine Regulation zeigt. Hier wurden die Expressionswerte für beide proto-Y-spezifische Kopien (*Y1* und *Y2*) gemeinsam mit denen der Proto-X-spezifischen Kopie verglichen.

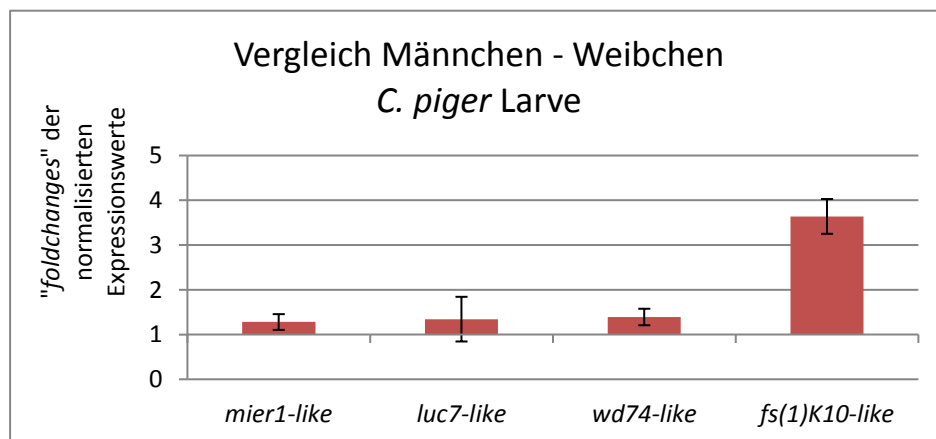


Abbildung 38: "foldchanges" der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Männchen - Weibchen bei *C. piger* Larven

Die "foldchanges" der vier auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* bekannten Gene wurden auf die bei Haushaltsgenen beobachteten Schwankungen normiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus dem Vergleich von zwei Datensätzen aus Männchen mit zwei Datensätzen aus Weibchen. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist ebenfalls angegeben. Wie bei *C. thummi* zeigt das Gen *fs(1)K10-like* als einziges eine signifikant höhere Expression im Männchen gegenüber dem Weibchen. Auch hier wurden die Expressionswerte für beide proto-Y-spezifische Kopien (*Y1* und *Y2*) gemeinsam mit denen der Proto-X-spezifischen Kopie verglichen.

Ergebnisse

Das Gen *fs(1)K10-like* hingegen scheint in beiden Geschlechtern unterschiedlich reguliert zu sein. Bei *C. thummi* konnten etwa 3-mal mehr Transkripte für die beiden proto-Y-chromosomalen Kopien des Gens im Männchen als für die beiden Allele der proto-X-chromosomalen Kopie im Weibchen detektiert werden (Abbildung 37). Bei *C. piger* lag der Wert bei ca. 3,5 (Abbildung 38).

Im Vergleich zwischen Männchen und Weibchen mit embryonalen Daten von *C. thummi* konnte die bei Larven gezeigte differenzielle Regulation von *fs(1)K10-like* nicht beobachtet werden (Abbildung 39). Auch die Gene *bcn92-like* und *d-Lactat-DH-like* zeigen keine signifikanten Expressionsunterschiede. Ein entsprechender Vergleich mit embryonalen Daten aus *C. piger* wird hier nicht gezeigt, da die beiden biologischen Replikate aus Embryonen stark voneinander abweichende Ergebnisse zeigen. Weitere Analysen der Daten weisen darauf hin, dass sich die verwendeten Embryonen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befanden (siehe Abschnitt 0 und 4.3.3).

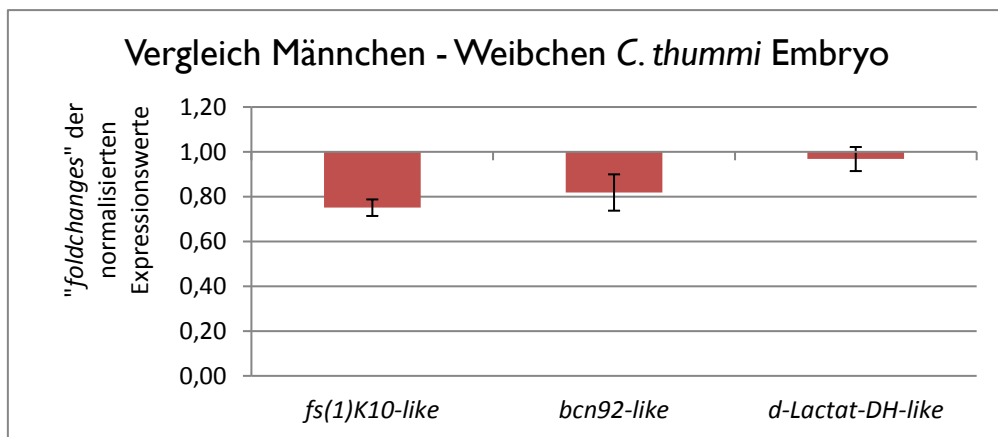


Abbildung 39: „foldchanges“ der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Männchen - Weibchen bei *C. thummi* Embryonen

Die „foldchanges“ der drei auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* bekannten Gene wurden auf die bei Haushaltsgenen beobachteten Schwankungen normiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus dem Vergleich von zwei Datensätzen aus Männchen mit zwei Datensätzen aus Weibchen. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist ebenfalls angegeben. Bei Embryonen zeigt keines der Gene eine signifikant differenzielle Regulation zwischen Männchen und Weibchen.

Ergebnisse

Vergleicht man die embryonale und larvale Expression bei *C. thummi* fällt auf, dass im Männchen beide Kopien des Gens *fs(1)K10-like* gleich stark transkribiert zu sein scheinen (Abbildung 40), wohingegen die proto-X-chromosomale Kopie bei Weibchen im Embryo um das 5-fache höher exprimiert ist als in der Larve (Abbildung 41). Des Weiteren zeigt *polyhomeotic-like* im Weibchen eine etwa 9-fach höhere Expression im Embryo gegenüber der Larve. *Mier1-like* weist im Weibchen nur eine leichte Hochregulation im Embryo gegenüber der Larve auf und die Expression von *luc7-like* sowie *WD74-like* ist in beiden Stadien in etwa gleich. Für das Proto-Y-Chromosom lag im Bereich dieser Gene keine Referenzsequenz vor.

Das Gen *d-Lactat-DH-like* ist in beiden Geschlechtern als einziges im Embryo schwächer exprimiert als in der Larve. Die Expression ist in Larven etwa 4-mal höher als in Embryonen. *Bcn92-like* wird in beiden Stadien gleich stark exprimiert.

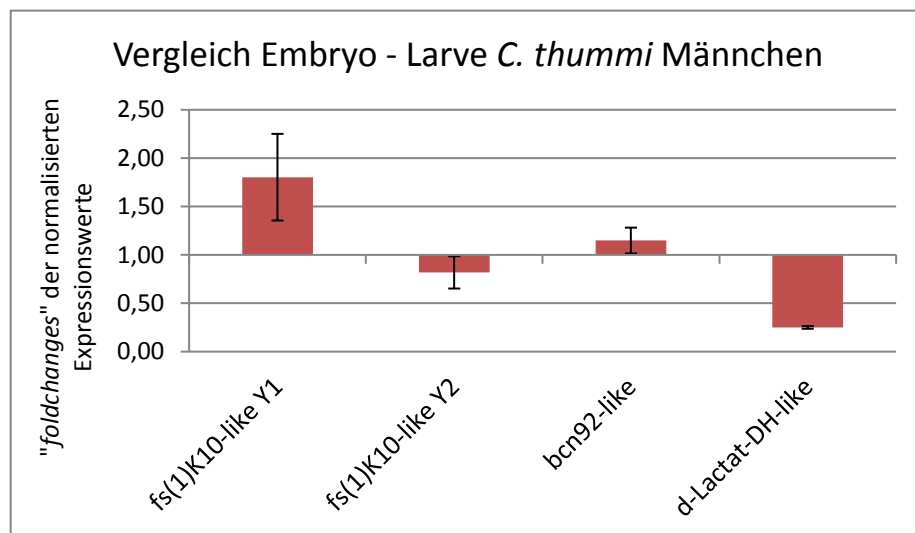


Abbildung 40: "foldchanges" der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Embryo - Larve bei *C. thummi* Männchen

Im Vergleich Embryo - Larve wurden für das Proto-Y-Chromosom die beiden Kopien des Gens *fs(1)K10-like* getrennt voneinander analysiert. Auch hier wurden die "foldchanges" der SDR-Gene auf die bei Haushaltsgenen beobachteten Schwankungen normiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus dem Vergleich von zwei Datensätzen aus Embryonen mit zwei Datensätzen aus männlichen Larven. Die Standardabweichung des Mittelwertes ist angegeben. Eine signifikante differenzielle Regulation zeigt lediglich das Gen *d-LactatDH-like*, welches im Embryo etwa 4-mal schwächer exprimiert wird als in der Larve.

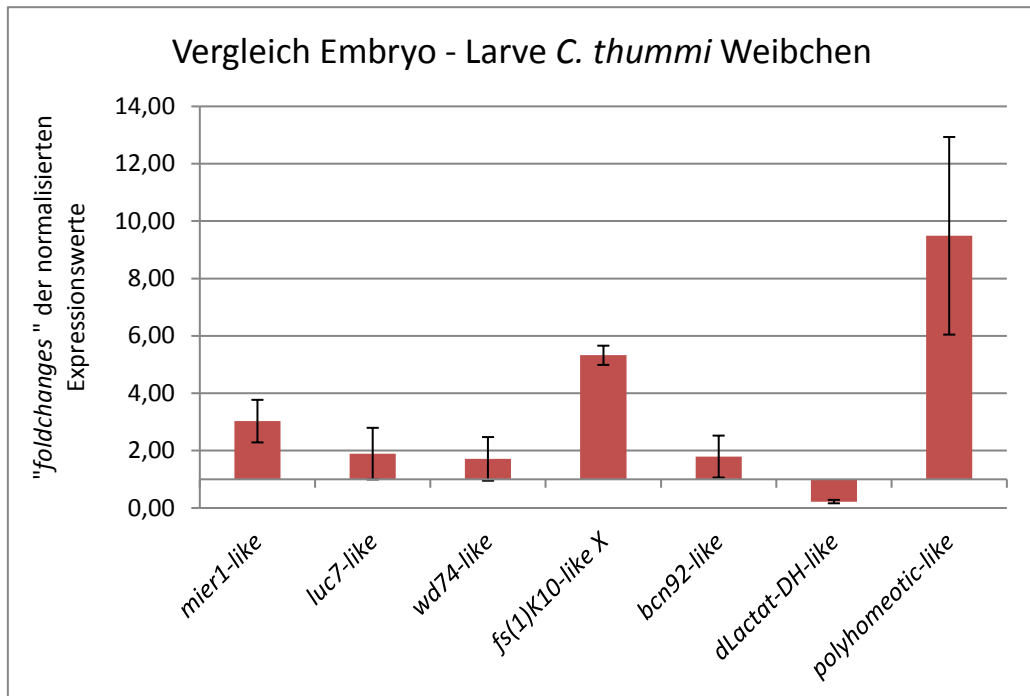


Abbildung 41: "foldchanges" der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Embryo - Larve bei *C. thummi* Weibchen

Für den Vergleich Embryo - Larve stehen bei *C. thummi* Weibchen 7 Gene zur Verfügung. Auch hier wurden die "foldchanges" der SDR-Gene auf die bei Haushaltsgenen beobachteten Schwankungen normiert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus dem Vergleich zweier Datensätzen aus Embryonen mit zwei Datensätzen aus weiblichen Larven. Eine Standardabweichung des Mittelwertes ist angegeben. Wie bei Männchen zeigt das Gen *d-Lactat-DH-like* im Embryo eine Herunterregulation um das 4-fache. Des Weiteren zeigen die beiden Gene *fs(1)K10-like X* und *polyhomeotic-like* eine starke Hochregulation um das 5-fache bzw. 9-fache.

4.3.2 EXPRESSION ZWEIER INTRONLOSER GENE AUS DER SDR

Die Kartierung der Daten gegen die gesamte SDR beider Spezies zeigte in dem zuvor als *viral-A-type-like* bezeichneten Gen zwei Bereiche eine geschlechtsspezifische Expression in Larven. Da BLAST-Suchen keine signifikanten Treffer zu bekannten Genen geliefert haben, werden die Bereiche als Domäne 1 und Domäne 2 bezeichnet. In dem zwischen beiden Domänen liegenden Bereich konnten mit den gewählten Parametern keine "reads" kartieren. Beide Domänen weisen keine Introns auf. Es konnten jedoch offene Leserahmen mit einer Länge von 1.227 bp (Domäne 1) und 1.035 bp (Domäne 2) identifiziert werden. Zur weiteren Auswertung wurden die RPKM-Werte aus der Kartierung der transkriptomischen Daten aus Embryonen sowie männlichen und weiblichen Daten direkt miteinander verglichen.

Abbildung 42 zeigt die Expression beider Domänen in *C. thummi*. Für die zwei Domänen ist in beiden embryonalen Datensätzen eine geringe Expression zu beobachten. Während die Anzahl an Transkripten in männlichen Larven zunimmt, ist sie in weiblichen Larven nahezu Null.

Bei *C. piger* Embryonen weichen die RPKM-Werte für beide Domänen stark voneinander ab (Abbildung 43). Dies konnte auch schon bei der Kartierung der embryonalen Daten gegen die übrigen Gene der SDR beobachtet werden, weshalb die Daten aus weiteren Analysen ausgeschlossen wurden. In Sequenzdatensatz 1 ist die Expression der beiden Domänen sehr gering, wohingegen sie in Sequenzdatensatz 2 wesentlich höher liegt. Die Kartierung der larvalen Daten zeigt auch hier eine männchenspezifische Expression für beide Domänen. Geht man davon aus, dass die Expression der Domänen mit fortschreitendem Entwicklungsstadium der Embryonen in Männchen stark zunimmt, könnte der Anstieg der Anzahl von Transkripten im embryonalen Sequenzdatensatz 2 dafür sprechen, dass es sich um ein späteres Entwicklungsstadium handelt.

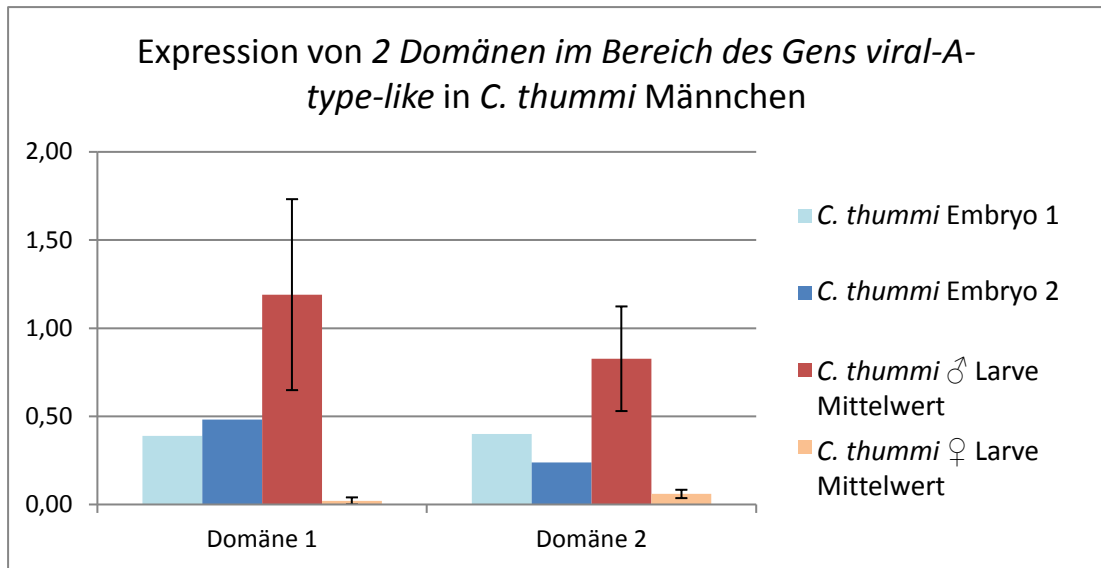


Abbildung 42: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen zwei Domänen im Bereich des Gens *viral-A-type-like* aus *C. thummi*

Die Expression der beiden Domänen ist in beiden embryonalen Datensätzen etwa gleich hoch. Während die Zahl der Transkripte in männlichen Larven ansteigt, können in weiblichen Larven nur sehr wenige Transkripte nachgewiesen werden.

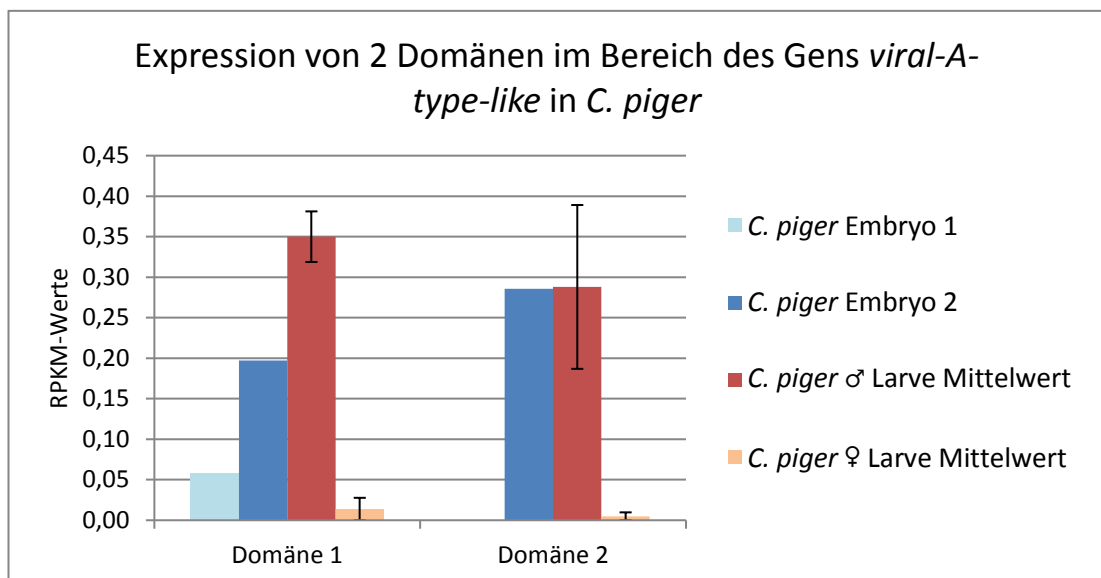


Abbildung 43: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen zwei Domänen im Bereich des Gens *viral-A-type-like* aus *C. piger*

Die RPKM-Werte zeigen eine männchenspezifische Expression der beiden Domänen in Larven. Außerdem ist ein starker Anstieg der Expression im 2. embryonalen Sequenzdatensatz zu beobachten. Dies könnte wiederum dafür sprechen, dass es sich hier um ein späteres embryonales Entwicklungsstadium handelt.

4.3.3 EXPRESSION VON *DSX* IN UNTERSCHIEDLICHEN ENTWICKLUNGSSTADIEN

Bei der Kartierung der Daten wurde auch das auf Chromosom III Arm E liegende Gen *dsx1b* mit einbezogen. Dieses ist das *C. thummi* bzw. *C. piger* homologe Gen zu *dsx* aus *Drosophila*. Die Expression von *dsx* beginnt bei *Drosophila* in einem frühen Embryonalstadium (10-16 h, Hempel und Oliver 2007) und könnte auch bei *Chironomus* Anhaltspunkte über das Entwicklungsstadium der verwendeten Embryonen liefern.

Abbildung 45 zeigt die RPKM-Werte für die männliche und weibliche Spleißvariante im Vergleich zwischen beiden embryonalen Datensätzen und den larvalen Datensätzen aus *C. thummi* Männchen. Die Expression ist in beiden embryonalen Datensätzen sowohl für die weibliche als auch für die männliche Spleißvariante sehr gering. In den männlichen larvalen Datensätzen ist vor allem der RPKM-Wert für die männliche Spleißvariante vergleichsweise hoch, wohingegen der Wert für die weibliche Spleißvariante gegenüber der embryonalen Expression nur schwach zunimmt.

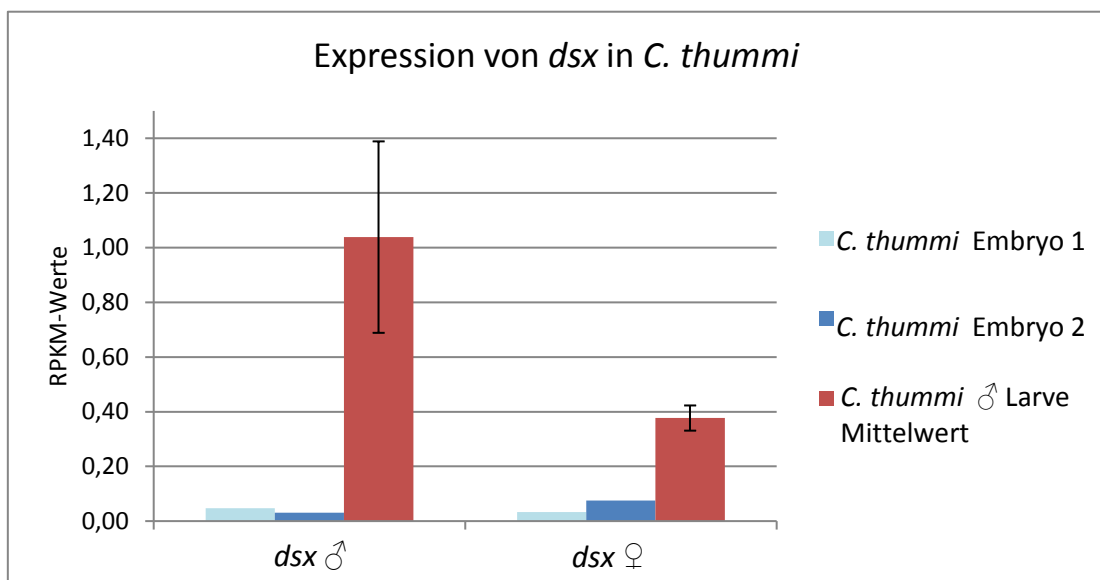


Abbildung 44: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen die beiden geschlechtsspezifischen Spleißvarianten des Gens *dsx* aus *C. thummi*

In den untersuchten Datensätzen aus Embryonen konnte nur eine sehr schwache Transkription für *dsx* gezeigt werden. Dies spricht dafür, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine Geschlechtsdetermination stattgefunden hat.

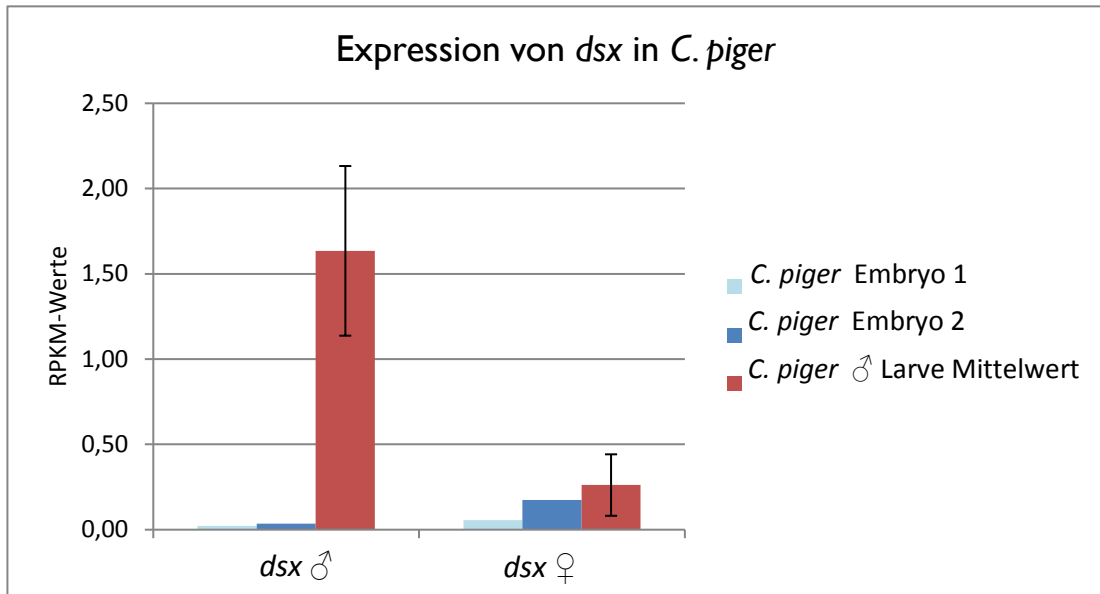


Abbildung 45: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen die beiden geschlechtsspezifischen Spleißvarianten des Gens *dsx* aus *C. piger*

In den für die erste Sequenzierung verwendeten Embryonen konnten nur sehr wenige Transkripte für *dsx* nachgewiesen werden. In den für die 2. Sequenzierung verwendeten Embryonen ist jedoch ein leichter Anstieg der Expression zu beobachten.

4.3.4 EXPRESSION DER UNTERSCHIEDLICHEN KOPIEN VON *FS(1)K10-LIKE*

Von besonderem Interesse im Hinblick auf die Identifikation des Männchenbestimmers M sind die unterschiedlichen Genkopien von *fs(1)K10-like* auf Proto-X- und Proto-Y-Chromosom. Um eventuelle Expressionsunterschiede zwischen beiden proto-Y-chromosomalen Kopien zu berücksichtigen, wurde eine weitere Expressionsanalyse durchgeführt, bei welcher die RPKM-Werte getrennt für beide Kopien ermittelt und ausgewertet wurden. Außerdem wurden die Daten aus der Sequenzierung männlicher Larven ebenfalls gegen die Proto-X-chromosomale Kopie kartiert, da diese ebenfalls in männlichen Individuen vorhanden ist. Auch das sich über Y1 und Y2 erstreckende lange Y3-Transkript wurde bisher nicht in die Analysen mit einbezogen. Um für Y3 eine Aussage über die Expression treffen zu können,

Ergebnisse

wurde für die Berechnung des RPKM-Wertes nur der Y3-spezifische Abschnitt zwischen Y1 und Y2 genutzt.

Abbildung 46 zeigt die RPKM-Werte aus der Kartierung transkriptomischer Daten aus *C. thummi* Embryonen und männlichen Larven gegen die unterschiedlichen *fs(1)K10-like*-Kopien im Vergleich. Die Proto-X-chromosomale Kopie zeigt im Embryo eine vielfach höhere Expression als in der Larve. Dies konnte auch schon bei der „Foldchange“-Analyse mit weiblichen Datensätzen beobachtet werden (Abbildung 41). Die Zahl der Transkripte liegt für Y1 und Y2 im Embryo nur geringfügig höher als in der männlichen Larve. Die Expression von Y3 ist im Vergleich zu den anderen Kopien am niedrigsten und ist in Embryonen und Larven etwa gleich hoch.

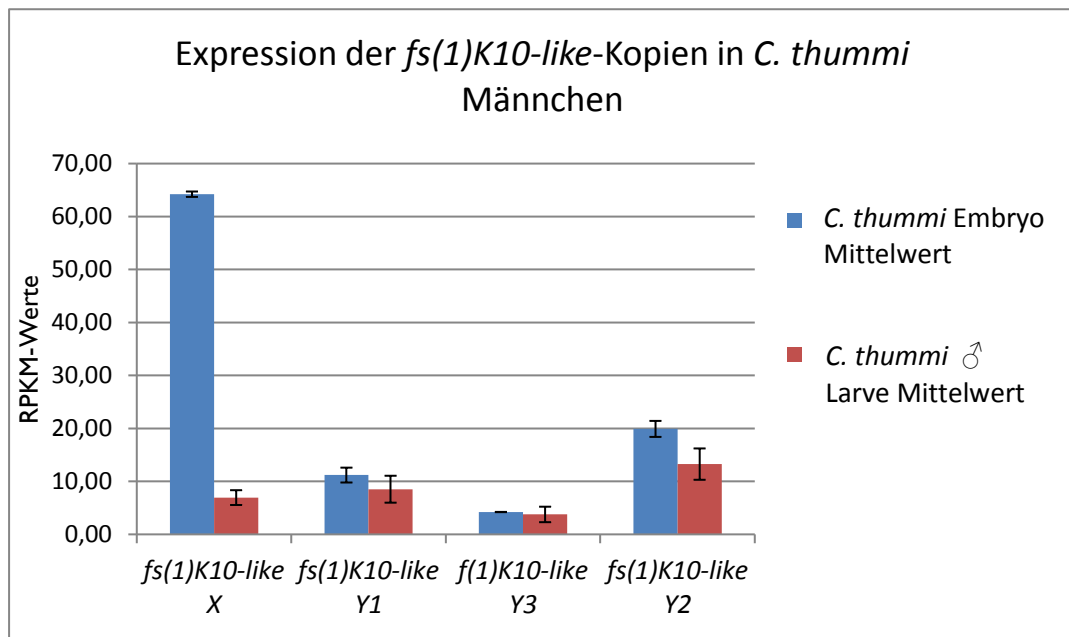


Abbildung 46: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen die Referenzsequenzen der vier *fs(1)K10-like* Transkripte aus *C. thummi* Männchen

Die embryonalen Daten stammen sowohl aus männlichen als auch weiblichen Individuen während die larvalen Daten nur aus männlichen Individuen stammen. Es wurden jeweils Mittelwerte aus je 2 biologischen Replikaten gebildet und eine Standardabweichung des Mittelwertes mit angegeben.

Ergebnisse

Bei der Analyse der Daten aus *C. piger* wurden hier ebenfalls die beiden embryonalen Datensätze mit einbezogen. Auch hier fallen starke Unterschiede in der Expression zwischen beiden embryonalen Datensätzen auf, wobei diese für alle *fs(1)K10-like*-Kopien im 2. Sequenzdatensatz höher ist als im ersten. Besonders auffällig ist dieser Unterschied bei Y1. Die Expression liegt im 2. embryonalen Sequenzdatensatz ein Vielfaches über der in männlichen Larven. Für Y2 können im 2. embryonalen Sequenzdatensatz etwa doppelt so viele Transkripte gezählt werden als in Larven. Bei Y3 ist die Expression in beiden Entwicklungsstadien nahezu gleich hoch. Die bereits bei *C. thummi* geschilderte erhöhte Anzahl proto-X-chromosomaler Transkripte in Embryonen ist auch hier zu beobachten.

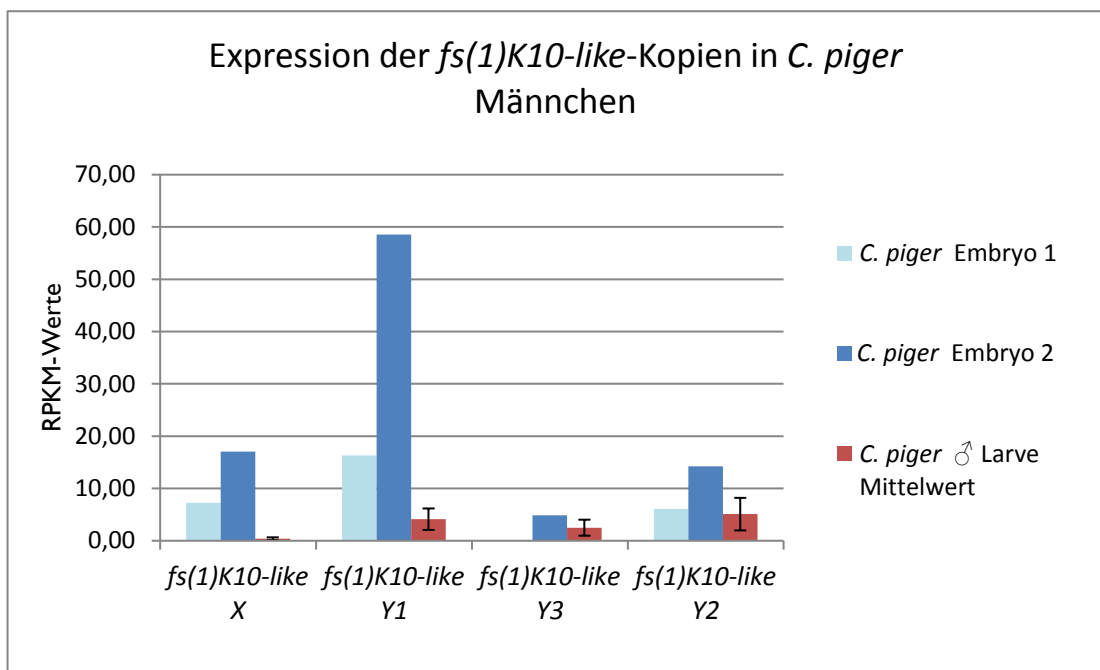


Abbildung 47: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen die Referenzsequenzen der verschiedenen *fs(1)K10-like* Transkripte aus *C. piger* Männchen

Die embryonalen Daten stammen sowohl aus männlichen als auch weiblichen Individuen während die larvalen Daten nur aus männlichen Individuen stammen. Die beiden embryonalen biologischen Replikate wurden getrennt voneinander dargestellt. Für die larvalen Datensätze wurde ein Mittelwert gebildet und eine Standardabweichung angegeben.

5 DISKUSSION

5.1 IDENTIFIKATION Y-CHROMOSOMALER SEQUENZEN

Obwohl das Y-Chromosom in unterschiedlichen Dipteren-Spezies teilweise schon vor langer Zeit identifiziert werden konnte, gestaltet sich die molekulare Identifikation des Männchenbestimmers M oft schwierig. Die häufig repetitiven Strukturen und das hemizygote Auftreten des Y-Chromosoms erschweren die Assemblierung bzw. Kartierung von NGS-Daten (Vicoso und Bachtrog 2015). Erst kürzlich gelang es erstmals bei einer Insektenart einen männchenbestimmenden Faktor M zu identifizieren. In der Spezies *Aedes aegypti* wurden genomische NGS-Datensätze von weiblichen und männlichen Individuen erstellt und Alignments an eine Referenzsequenz durchgeführt (Hall et al. 2015). Der Faktor M konnte hier über das Verhältnis kartierter Sequenzen im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Daten gefunden werden.

Um den männchenbestimmenden Faktor M identifizieren zu können, ist es zunächst nötig, einen molekularen Zugang zur Sequenz des Proto-Y-Chromosoms zu erhalten. Grundlage hierfür war bei *C. thummi* die Lokalisation des Proto-Y-Chromosoms durch eine hemizygote heterochromatische Bande auf Chromosom 3 Arm F, welche immer nur in männlichen Individuen zu erkennen ist (Hägele 1985), sowie die Identifizierung eines hemizygoten Clusters repetitiver *Cla-Elemente* in diesem Bereich (Kraemer und Schmidt 1993). Kreuzungsversuche mit der nah verwandten Schwesternart *C. piger* zeigten, dass sich das Proto-Y-Chromosom hier ebenfalls auf Chromosom 3 Arm F befindet. Eine Möglichkeit, Sequenzen aus der geschlechtsbestimmenden Region zu erhalten, ist das „screening“ genomischer DNA-Bibliotheken. Von *C. thummi* konnte auf diese Weise eine ca. 200 kb große Referenzsequenz der SDR erstellt werden (Kraemer und Schmidt 1993; Funke 2011). Hierfür wurde zunächst eine DNA-Bibliothek mit *Cla-Elementen* als Sonde durchsucht und hybridisierende Klone mittels FISH auf ihre Lage in der SDR hin untersucht. Zwei so in der SDR lokalisierte Klone (*Cla* 1.1 und *Cla* 1.8) bildeten die Startpunkte für einen „chromosomal walk“. Für

Diskussion

C. piger wurden auf Grundlage der aus *C. thummi* bekannten Sequenz genomische PCR's durchgeführt und durch die Sequenzierung der PCR-Produkte ein 120 kb großer „Contig“ assembliert (Blumensatt 2009). Bei beiden Referenzen handelt es sich wahrscheinlich größtenteils um Sequenzen X-chromosomaler Herkunft (Funke 2011), wobei die Zuordnung zu Proto-X- bzw. Proto-Y-Chromosom in sehr ähnlichen Abschnitten grundsätzlich schwierig ist.

Um Unterschiede in der Organisation von Proto-X- und Proto-Y-chromosomaler DNA zu identifizieren, wurden Restriktionsfragmentanalysen durchgeführt. Bei einer solchen Analyse mit genomischer DNA aus beiden Geschlechtern von *C. thummi* konnte ein zusätzliches Fragment in Männchen identifiziert werden, welches mit einer Sonde aus dem Bereich des Gens *fs(1)K10-like* hybridisiert. Durch eine inverse PCR wurde das vom Proto-Y-Chromosom stammende Fragment erfolgreich amplifiziert und anschließend sequenziert. Durch eine „genome-walk“-Strategie konnte für *C. thummi* ein 4.684 bp und für *C. piger* ein 4.555 bp langer Proto-Y-chromosomaler Abschnitt sequenziert werden. In beiden Spezies weist das Proto-Y-Chromosom eine Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* auf, welche Sequenzabschnitte aus dem Gen *WD74-like* einschließt (Abbildung 50).

Bei der etwas entfernter verwandten Spezies *C. annularius* lassen sich Proto-X- und Proto-Y-Chromosom anhand einer Inversionsschleife, welche bei den gepaarten Riesenchromosomen der Speicheldrüsenzellen sichtbar ist, morphologisch erkennen (Acton 1957). Im Rahmen einer Bachelorarbeit konnte ein Klon aus einer pUC-Bibliothek von *C. luridus* identifiziert und sequenziert werden, welcher ebenfalls die Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* aufweist (Binder 2015). Der Klon ist höchstwahrscheinlich Proto-Y-chromosomalen Ursprungs.

Abbildung 48 gibt einen Überblick über die am Ende dieser Arbeit vorliegenden Sequenzinformationen aus Proto-X- und Proto-Y-Chromosom der drei Spezies *C. thummi*, *C. piger* und *C. luridus*.

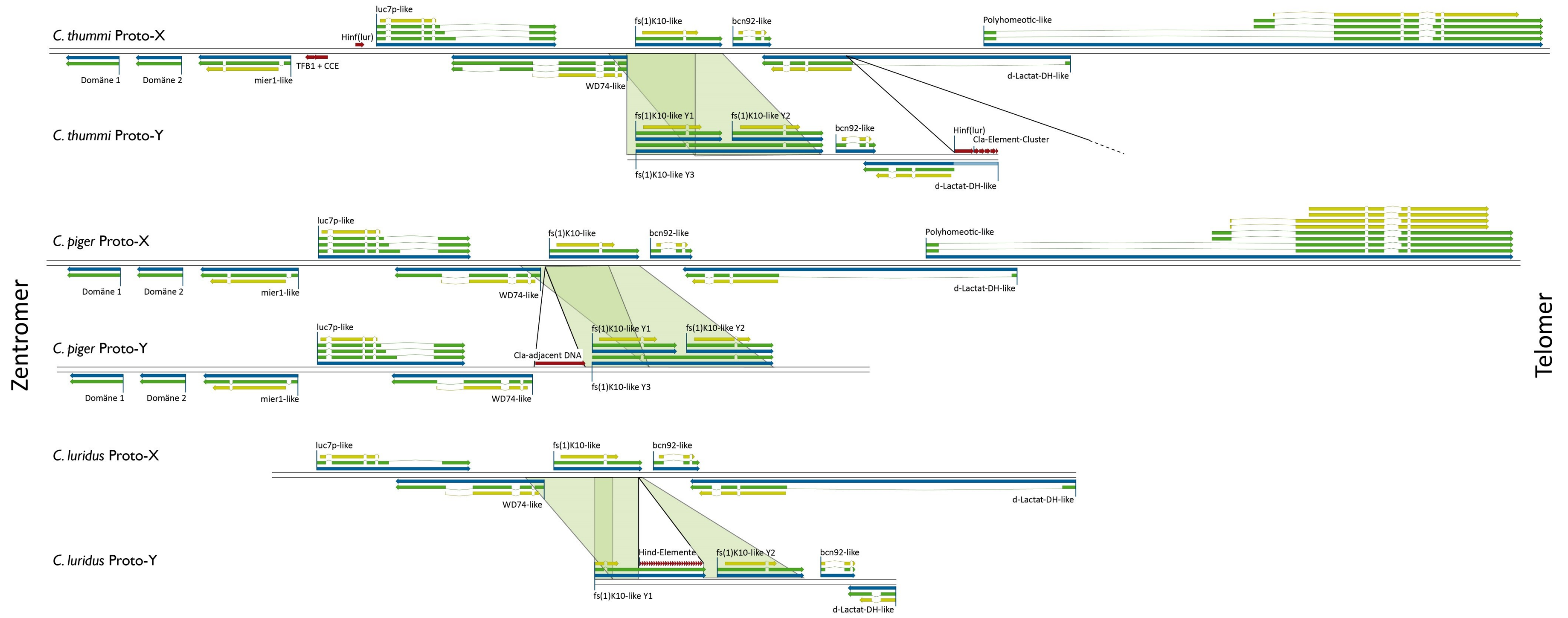


Abbildung 48: Detailansicht der Geschlechtsbestimmenden Region von *C. thummi*, *C. piger* und *C. luridus* im Bereich des auf dem Proto-Y-Chromosoms dupliziert vorliegenden Gens *fs(1)K10-like*

Dargestellt sind getrennt voneinander Proto-X- und Proto-Y-Chromosom. Blaue Pfeile stellen Gene dar, grüne Pfeile dazu gehörige mRNAs und gelbe Pfeile die wahrscheinlich kodierende Sequenz. Repetitive Sequenzen sind in Rot dargestellt. Die hellgrünen Flächen zeigen die auf dem Proto-Y-Chromosom dupliziert vorliegenden Bereiche.

5.1.1 GENOMISCHE pUC-BIBLIOTHEKEN VON *C. PIGER* MÄNNCHEN

Das "screening" der beiden pUC-Bibliotheken piPUC1 und L208 ergab nach zwei Hybridisierungsrounds insgesamt 41 positive Klone. Sieben der Klone konnten eindeutig der SDR zugeordnet werden, wobei die beiden Klone pipUC1D8/1-4 und pipUC1D8/1-2 identisch sind. 15 der Klone liegen im Bereich des Gens *dsx* und werden in dieser Arbeit nicht weiter besprochen. 19 Klone erwiesen sich als falschpositiv. Diese relativ hohe Zahl lässt sich durch verschiedene Ursachen erklären. Zum einen wurden die pUC-Bibliotheken mit PCR-Sonden hybridisiert. Die PCR wurde zwar mit cDNA als Matrize durchgeführt, so dass eine Amplifikation möglicherweise repetitiver Intronbereiche vermieden wird. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich auch innerhalb der kodierenden Bereiche repetitive Elemente befinden, wie die im 3'UTR identifizierten *Hind*-Elemente zeigen. Auch kann es durch fehlerhaftes Binden der Primer zur Amplifikation ungewollter Nebenprodukte kommen, welche wegen ihrer geringen Konzentration auf einem Agarosegel nicht nachweisbar sind. Bei der radioaktiven Markierung werden diese Produkte ebenfalls markiert. Durch die Klonierung der PCR-Produkte und eine Markierung der Sonde von einem einzelnen Klon können ungewollte Nebenprodukte vermieden werden. Des Weiteren wurden relativ relaxierte Hybridisierungsbedingungen (60 °C, 3x SSC) gewählt, welche auch bei nicht exakt passenden Sequenzen eine Hybridisierung zulassen. Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Bewertung der positiven Signale. Es wurden auch schwach hybridisierende Klone ausgewählt, um möglichst keine positiven Klone zu übersehen, welche eventuell nur einen Teilbereich der Sonde enthalten.

Die positiven Klone aus der SDR wurden sequenziert und mit den bereits bekannten Sequenzen des Proto-X- und Proto-Y-Chromosoms von *C. piger* verglichen. Grundsätzlich war hier zu beobachten, dass es eine Anhäufung von Mutationen in nicht kodierenden Bereichen gibt bzw. dass es sich bei Mutationen in kodierenden Abschnitten häufig um synonyme Austausche handelt. Bezogen auf die Klone aus dem Proto-X-Chromosom liegen durchschnittlich ca. 11 % der Mutationen in

Diskussion

kodierenden Bereichen, von welchen etwa 40 % zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz führen. Dass in 60 % der Fälle ein Basenaustausch nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führt, lässt sich mit der Redundanz des genetischen Kodes erklären (Lagerkvist 1978). Doch auch synonyme Austausche können die Translation eines Proteins beeinflussen. Nicht alle Kodons des degenerierten Kodes werden in einer Spezies gleich häufig verwendet. Durch einen synonymen Austausch kann ein seltenes Kodon entstehen, was dann eventuell zu einer geringeren Translation führt (Grantham et al. 1980; Sharp und Li 1989; Akashi 1994). Demzufolge können alle Mutationen in kodierenden Bereichen der Selektion unterliegen.

Das auf dem Proto-Y-Chromosom dupliziert vorliegende Gen *fs(1)K10-like* zeigte bei der Auswertung der Klonsequenzen besonders auffällige Veränderungen der Aminosäuresequenz und wird daher separat besprochen (siehe Abschnitt 5.4). Des Weiteren zeigen zwei Klone, welche aus dem Proto-Y-Chromosom stammen, ein männchenspezifisches repetitives Element zwischen den Genen *WD74-like* und *fs(1)K10-like Y1* (siehe Abschnitt 5.2.1).

5.2 REPETITIVE ELEMENTE AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM VON *C. PIGER* UND *C. THUMMI*

5.2.1 *CLA-ADJACENT DNA* AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM VON *C. PIGER*

Zwischen den Genen *WD74-like* und *fs(1)K10-like Y1* konnte auf den Proto-Y-chromosomalen Klonen L208B10/3-6 und pipUC1B8/3-7 ein ca. 1 kb großer Sequenzabschnitt identifiziert werden, welcher auf dem Proto-X-Chromosom fehlt. Eine BLASTn-Suche mit der entsprechenden Sequenz zeigte hohe Ähnlichkeiten zu *Cla-adjacent DNA*. Wie der Name nahelegt, handelt es sich hierbei um eine ca. 500 bp lange Sequenz, welche direkt angrenzend zu *Cla-Element*-Clustern vorkommt. Sie konnte bei der Sequenzierung des *Cla-Element*-Clusters aus dem *NTS* der rDNA von *C. thummi* erstmals identifiziert werden (Israelewski und Schmidt 1982; Schmidt und Godwin 1983; Hankeln und Schmidt 1987). Sowohl das *Cla-Element*-Cluster als auch die *Cla-adjacent-DNA* fehlen im *NTS* von *C. piger*. Geht man davon aus, dass es sich bei *Cla-Elementen* um transposable Elemente handelt, gibt es folglich für die Organisation des *NTS* bei *C. thummi* zwei mögliche Erklärungen. Entweder ist das *Cla-Element*-Cluster gemeinsam mit der *Cla-adjacent-DNA* in den *NTS* von *C. thummi* integriert worden oder es haben zwei aufeinander folgende Transpositionereignisse stattgefunden, wobei die *Cla-adjacent DNA* eventuell als „*target-site*“ für die Integration der *Cla-Elemente* gedient hat. Bei *C. piger* konnte ein Klon isoliert werden, welcher ein einzelnes *Cla-Element* mit benachbarten Sequenzen enthält (Hankeln und Schmidt 1987). Es konnte gezeigt werden, dass jeweils im 3'-Bereich des einzelnen *Cla-Elements* bei *C. piger* und des *Cla-Element*-Clusters im *NTS* von *C. thummi* in der *Cla-adjacent DNA* ein 32 bp großes imperfektes „*inverted repeat*“ nahezu identisch ist. Dieser Befund legt nahe, dass zumindest diese 32 Basenpaare der zu *Cla-Elementen* benachbart vorkommenden Sequenzen gemeinsam mit diesen transponieren. Auch in der Proto-Y-spezifischen *Cla-adjacent-DNA* in *C. piger* konnte dieser 32 bp große Bereich identifiziert werden (Abbildung 49).

Cla-adjacent DNA aus Proto-Y-Chromosom von *C. piger*

```
AGGGACTTAAGCGCATTTTTGTGTTAGCGATCAGTATATGATTATCTATTTATTTTGC GTTCATTTACAGA
TCATTAGAAGATCATCAATTAGCAAATATTTATAATGAATGCTTATATAGAAAGGCTTTATTATTTAACGG
TCAATAAATAATTTGAAATTTTCCCGCTAAAAGTTGCACTTCAAAAACATTAACATAGTATAATTAATAA
TTTGTAATGATTTATCATTAAACGTTTTTTGGAATTCAAATTTTTTAACGGTTAATAAATAATTTGAAATT
TTTCCCGCTTAAAGTTGCACTACGAAAACATTACTTATTATTTGAGATTCAAATTTTCTAACGGTCAGTAA
GTTTCTGAAAGCTTCCCGCCAAAAGATACACAAAAAATCATTAAATTATAGTAAATTTAACAAATTTAATATC
TTTCATTCTCATATATAAATTGTTTATCATTTAACGATTTTTTTGAGATTCAAATTTTCAAACGGTCAGAAA
GTTTTTGAAAGCTCCCGCTAAAAGATATACAAAAAATCATTAAATTAAGTATATTTATCAATTTAATATCT
TTCATTCTCCTATATAAATTGTTTATCATTTAACGGTTTTTCTGAAGTTCAAATTTTGTAAAGGTCGTATGC
ATTTGAAAGTATGTTGCCAAAATTGCAGTAAAAGCATTAAATTATAGTATAAATAACAGTCTGTTGCAAAA
AAAAATTTTCATATAAAAAGGCTTGGAATTTAACGGTTTTTTGAAATTCAAATTATTGGTCTGACAGTGTA
GAAGTTCCCATCAAATGTTCCGGATAGGTAGAGAAGTTCGAAGTGTAGAATTCTAATTTTTTTAGAAAATTCA
TTAATTATAGCATAAATACACTGTTTAGATTTTTAAATGTGGCAGCCAATAACTCGATATAACGGAACTAA
TGCAAAAAACTAGAACTCTCTACGATGTCTAGATTAAAAGTTTTTCTTAGCGGCCGACCAGCCGACCAGCC
GACCAGCCGACCAAAGTGCGTTATTAAGC TACCTTTTTGAAACAAGTTTCAAAAATGCGC
```

32 bp Inverted Repeat

Abbildung 49: Sequenz der *Cla-adjacent DNA* aus dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger*.

Das rot markierte 32 bp große „*inverted repeat*“ am Ende der Sequenz wurde sowohl im *NTS* von *C. thummi* als auch bei einem aus *C. piger* isolierten *Cla-Element* in der direkt benachbart liegenden *Cla-adjacent DNA* identifiziert.

Wie die Abbildung zeigt, liegen die 32 Basenpaare direkt am Anfang der Proto-Y-spezifischen *Cla-adjacent-DNA*-Sequenz. Allerdings konnten durch Sequenzanalysen keine *Cla-Elemente* oder Fragmente davon in angrenzenden Bereichen gefunden werden. Da die Klon-Sequenz im Bereich der *Cla-adjacent-DNA* auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. piger* sowohl durch Southern Blots als auch durch PCRs überprüft wurde, ist davon auszugehen, dass hier tatsächlich nur *Cla-adjacent DNA* ohne ein oder mehrere *Cla-Elemente* vorliegt. Es ist denkbar, dass dieser 32 bp-Abschnitt bei der Transposition der *Cla-Elemente* eine Rolle spielt und die Integration dieser in die *Cla-adjacent-DNA* begünstigt.

Diskussion

Dass neben den *Cla-Elementen* selbst auch die *Cla-adjacent DNA* hochrepetitiv ist, konnte durch Southern-Hybridisierungen gezeigt werden (Hankeln und Schmidt 1987). FISH mit der 1 kb großen *Cla-adjacent-DNA* aus dem Proto-Y-Chromosom als Sonde zeigt ebenfalls, dass es sich hierbei um eine hochrepetitive Sequenz handelt, welche sowohl bei *C. thummi* als auch bei *C. piger* interspergiert auf allen Chromosomen vorkommt. Erstaunlich ist, dass die Anzahl der Loci in *C. piger* offenbar höher ist als in *C. thummi*. Dies steht im Gegensatz zu der weit höheren Verbreitung von *Cla-Elementen* im Genom von *C. thummi*. Das Vorkommen von *Cla-adjacent DNA* ohne *Cla-Elemente* in *C. piger* und deren in beiden Spezies durch FISH gezeigte starke Verbreitung auf allen Chromosomenarmen könnten Indizien für eine Funktion der *Cla-adjacent DNA* als „*targetsites*“ für die Transposition von *Cla-Elementen* sein. Nimmt man an, dass es sich bei *C. thummi* um die phylogenetisch jüngere Art handelt (Keyl 1965), könnte die etwa 6x höhere Zahl an *Cla-Elementen* während der Evolution durch eine Vervielfältigung dieser in *C. thummi* entstanden sein. Möglicherweise zeigen die *Cla-Elemente* bei der Transposition eine hohe „*targetsites*“-Spezifität, so dass eine Integration häufig in die schon vorhandene hochrepetitive *Cla-adjacent DNA* stattfindet. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass ein gemeinsamer Vorfahr beider Schwesternarten *C. thummi* und *C. piger* bereits eine hohe Kopienzahl an *Cla-Elementen* aufwies und diese während der Artbildung von *C. piger* eliminiert wurden. In diesem Fall wäre es denkbar, dass in *C. piger* *Cla-adjacent DNA* als leere „*targetsites*“ zurück geblieben ist.

Bei der Analyse des hemizygoten *Cla-Element-Clusters* auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* wurde in den proximal angrenzenden Bereichen keine Homologie zu *Cla-adjacent DNA* gefunden. Es konnte jedoch das Fragment eines *Hinf(lur)-Elements* identifiziert werden. Dabei handelt es sich ebenfalls um ein repetitives Element, welches eine andere Organisationsform von *Cla-Elementen* in der Spezies *C. luridus* darstellt (Ross et al. 1997). Auch hier stellt sich die Frage, ob die *Cla-Elemente* in *C. thummi* gemeinsam mit dem *Hinf(lur)-Element* in das Proto-Y-Chromosom integriert wurden, oder ob es sich um zwei unabhängige Transpositions-Ereignisse

handelt. Im letzten Fall könnte das *Hinf(lur)*-Element ähnlich wie *Cla-adjacent DNA* als „*targetsites*“ für die *Cla*-Elemente gedient haben.

5.2.2 HEMIZYGOTES *CLA-ELEMENT*-CLUSTER AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM VON *C. THUMMI*

Das *Cla*-Element-Cluster auf dem Proto-Y-Chromosom befindet sich weiter distal als die Proto-Y-spezifische *Cla-adjacent DNA* in *C. piger* im 5'-Bereich des Gens *d-Lactat-DH-like*. Da das distale Ende des *Cla*-Element-Clusters nicht molekular aufgeklärt werden konnte, ist nicht klar, ob sich in diesem Bereich der 5'UTR weiter fortsetzt, oder ob es auf dem Proto-Y-Chromosom zur Transkription eines verkürzten Produktes des Gens *d-Lactat-DH-like* kommt. Dies könnte mit Hilfe eines Northern Blots im Vergleich mit dem weiblichen Transkript von *d-Lactat-DH-like* aus *C. thummi* bzw. den Transkripten aus *C. piger* Männchen, in denen das *Cla*-Element-Cluster fehlt, erfolgen. In jedem Fall ist es denkbar, dass das *Cla*-Element-Cluster Einfluss auf die Expression benachbarter Gene nimmt, auch wenn die Genstruktur selbst nicht betroffen ist. So beeinflusst z. B. die Chromatinstruktur die Expression von Genen. Gelangen Gene in die Nähe von konstitutivem Heterochromatin kommt es teilweise zu einer Heterochromatisierung und somit Stilllegung des Gens (Positionseffekt-Variegation, PEV, Dimitri und Pisano 1989; Elgin und Reuter 2013). Im Bereich der SDR konnte eine Heterochromatisierung des Proto-Y-Chromosoms beobachtet werden (Hägele 1985), welche durch das hochrepetitive *Cla*-Element-Cluster ausgelöst worden sein könnte und möglicherweise die Expression der benachbarten Gene beeinflusst. Es konnte auch gezeigt werden, dass cis-regulatorische Elemente über die Integration repetitiver Elemente in die Nähe von Genen gelangen und diese so beeinflussen (Capy 1997). Dies konnte unter anderem für *P-Elemente* aus *Drosophila* gezeigt werden (Miller et al. 1997). In transgenen *Drosophila*-Stämmen konnte gezeigt werden, dass die Integration eines *Cla*-Element-Clusters zu einer gesteigerten Expression eines *miniwhite*-Reportergens führt (Schrank 2000). Dabei war die Steigerung der Expression abhängig von der Orientierung des Clusters. Es wurde die Vermutung angestellt, dass TATA-Box-ähnliche Strukturen in den *Cla*-

Diskussion

Elementen die verstärkte Rekrutierung von TBP (TATA-Box-Bindeproteinen) verursachen könnte. Expressionsanalysen haben eine erhöhte Transkription im Bereich des hemizygoten *Cla-Element*-Clusters bei *C. thummi* Männchen jedoch nur für die *fs(1)K10-like*-Kopien gezeigt. Diese werden jedoch auch in *C. piger* stärker exprimiert, wo das hemizygote *Cla-Element*-Cluster fehlt.

Auch könnte das *Cla-Element*-Cluster alleine durch seine geschätzte Größe von ca. 9 kb den Abstand zu vorhandenen regulatorischen Bereichen so vergrößert haben, dass es zu einer Beeinflussung der Genexpression kommt.

Der zur Größenbestimmung angefertigte Southern Blot zeigt bei *C. thummi* Männchen zwei zusätzliche Banden gegenüber dem Weibchen im hochmolekularen Bereich bei ca. 8 kb und 9,4 kb. Es ist möglich, dass diese beiden Banden einen Dimorphismus der Anzahl an *Cla-Element*-Kopien in unterschiedlichen Individuen darstellen, da der Blot mit genomischer DNA von über 50 Tieren angefertigt wurde. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass es zu einem Duplikationsereignis gekommen ist und es sich eigentlich um zwei aneinander angrenzende Cluster handelt, wobei der vor dem ersten Cluster liegende Bereich aus dem Gen *d-Lactat-DH-like*, welcher als Sonde verwendet wurde, mit dupliziert wurde. In diesem Fall würde die verwendete Sonde ebenfalls mit dem zwischen beiden Clustern liegenden Bereich hybridisieren und bei einer vorhandenen Restriktionsschnittstelle für das verwendete Enzym *HincII* zum Nachweis von zwei Fragmenten führen. In diesem Fall wären beide Cluster zusammen ca. 17 kb groß. Das Vorkommen von zwei sehr dicht beieinander liegenden Clustern mit eventuell unbekanntem angrenzenden Sequenzen ist ebenfalls als mögliche Ursache für den mangelnden Erfolg bei der Amplifikation des distalen Endes des Clusters zu sehen. Ähnlich wie im proximalen Bereich könnten sich auch am distalen Übergang des Clusters zur bekannten Sequenz der SDR weitere repetitive Elemente unbekannter Art und Länge befinden. Das im proximalen Bereich identifizierte *Hinf(Iur)-Element* ist mit ca. 400 bp kurz genug, um eine Amplifikation nicht zu stören. Es ist jedoch denkbar, dass sich im distalen Bereich angrenzend zum *Cla-Element*-Cluster noch unbekannte DNA-Sequenzen befinden, welche zu groß sind, um eine Amplifikation mit den verwendeten Primern zu

Diskussion

erlauben. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die verwendeten Primer auf Grund von Sequenzvariationen zwischen Proto-X- und Proto-Y-Chromosom nicht binden können. Auch in diesem Fall wäre eine Amplifikation nicht erfolgreich.

Um dennoch über eine Amplifikation neue Sequenzinformationen zu erhalten, wurde die Methode der inversen PCR angewandt. Hierbei entsteht mit Hilfe von Restriktionsenzymen ein Fragment aus dem gewünschten Bereich mit bekannten und unbekanntem Abschnitten. Dieses wird rezirkularisiert und im Anschluss eine Amplifikation mit Primern aus dem bekannten Bereich durchgeführt. Auf Grund der vielen Arbeitsschritte ist diese Methode recht fehleranfällig. So kommt es bei den Restriktionen und Ligationen mit anschließenden DNA-Fällungen immer zu DNA-Verlusten. Des Weiteren werden die Restriktionsenzyme anhand der statistischen Verteilung der Schnittstellen ausgewählt. Dies kann gegebenenfalls auch zu sehr großen Fragmenten im gewünschten Bereich führen, welche nicht amplifiziert werden können. Bei der hier durchgeführten inversen PCR konnte das gewünschte Fragment distal des hemizygoten *Cla-Element-Clusters* nicht amplifiziert werden. Dennoch wäre es lohnenswert weitere Versuche mit anderen Restriktionsenzymen durchzuführen.

5.2.3 HIND-ELEMENT-CLUSTER AUF DEM PROTO-Y-CHROMOSOM VON *C. LURIDUS*

Durch die Sequenzierung eines proto-Y-chromosomal Klon aus der Chironomidenspezies *C. luridus* konnte ein weiterer Typ repetitiver Elemente auf einem Proto-Y-Chromosom identifiziert werden. Im 3'UTR des Gens *fs(1)K10-like Y1* liegt ein Cluster von 24 *Hind-Elementen* (Binder 2015). Durch einen Sequenzvergleich mit den beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger* konnte gezeigt werden, dass sich hier an gleicher Position zwei *Hind-Elemente* befinden. Wahrscheinlich ist, dass es bei der phylogenetisch älteren Art *C. luridus* zu einer Amplifikation der Repeat-Untereinheiten gekommen ist. Eine Eliminierung von Repeats bei *C. thummi* und *C. piger* bzw. einem gemeinsamen Vorfahr ist eher unwahrscheinlich. Es bleibt zu klären, ob die Transkription des 3'UTR durch das ca. 1 kb große Cluster abgebrochen

Diskussion

wird, oder ob die *Hind-Elemente* Bestandteil des *Y1*-Transkripts sind. In beiden Fällen ist eine Beeinflussung der Genfunktion, wie weiter oben beim *Cla-Element-Cluster* diskutiert, denkbar.

In allen bisher bekannten Sequenzen des Proto-Y-Chromosoms aus Chironomiden konnte ein bestimmter Typ repetitiver Elemente in relativer Nähe zu der männchenspezifischen Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* identifiziert werden. Die gefundenen Elemente könnten die Regulation des Gens beeinflussen (Clemens 1987; Wu et al. 1990; Schrank 2000) oder lediglich die Folge einer unterdrückten Rekombination zwischen Proto-X- und Proto-Y-Chromosom sein. Die Anhäufung repetitiver Sequenzen, vor allem von transposablen Elementen, ist ein bekanntes Phänomen bei der Entstehung und Etablierung von Heterosomen (Ohno 1967; Steinemann und Steinemann 2001; Kaiser und Bachtrog 2010; Cortez et al. 2014). Die starke Kopplung der repetitiven Elemente mit dem männlichen Geschlecht spricht für eine räumliche Nähe zum männchenbestimmenden Faktor und macht die beiden Gene *fs(1)K10-like Y1* und *fs(1)K10-like Y2* zu besonders interessanten Kandidaten für M.

5.3 GENE IN DER SDR VON *C. THUMMI* UND *C. PIGER*

5.3.1 EXPRESSION DER GENE AUS DER SDR VON *C. THUMMI* UND *C. PIGER* IM VERGLEICH ZWISCHEN MÄNNCHEN UND WEIBCHEN

Um Aussagen über die Expression der in der SDR vorliegenden Gene machen zu können, wurden transkriptomische NGS-Daten gegen die unterschiedlichen Referenzen von Proto-Y- und Proto-X-Chromosom der beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger* kartiert. Die Vergleichbarkeit der Daten war insgesamt eher schlecht. Zum einen wurden im Fall der Larven zwei unterschiedliche Typen von Bibliotheken (50er „single end“ und 100er „paired end“) hergestellt. Zum anderen standen je Zeitpunkt,

Diskussion

Organismus und Geschlecht jeweils nur zwei biologische Replikate zur Verfügung. Dies erschwert die Interpretation von abweichenden Ergebnissen. So wurde für die „*foldchange*“-Analysen die embryonalen Daten von *C. piger* nicht berücksichtigt, da sie stark voneinander abweichende RPKM-Werte aufweisen. Weitere Analysen zeigten, dass dies eventuell im Zusammenhang mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien der für die Sequenzierung genutzten Embryonen steht (siehe Abschnitt 5.3.1.2).

Im Vergleich zwischen Männchen und Weibchen wurden bei *C. thummi* die Gene *fs(1)K10-like*, *bcn92-like* und *d-Lactat-DH-like* analysiert. Dabei wiesen *bcn92-like* und *d-Lactat-DH-like* weder im embryonalen noch im larvalen Stadium eine geschlechtsspezifisch differenzielle Expression auf. Da diese beiden Gene auch auf molekularer Ebene kaum Unterschiede zwischen Proto-X- und Proto-Y-Chromosom zeigen, ist eine Beteiligung dieser an der Geschlechtsdetermination unwahrscheinlich. Lediglich *fs(1)K10-like*, welches durch die Duplikation auf dem Proto-Y-Chromosom auch einen der wenigen strukturellen Unterschiede zwischen Proto-X- und Proto-Y-Chromosom darstellt, weist Expressionsunterschiede zwischen Männchen und Weibchen auf. Die Y-spezifischen Kopien des Gens sind besonders interessante Kandidaten für M und werden daher im Abschnitt 5.3.1.3 separat besprochen.

Bei *C. piger* wurde die Expression der Gene *mier1-like*, *luc7-like*, *WD74-like* und *fs(1)K10-like* in Männchen und Weibchen analysiert. Auch hier konnte nur bei *fs(1)K10-like* eine geschlechtsspezifisch differenzielle Regulation der Expression gezeigt werden.

Bei *C. thummi* wurde zusätzlich die entwicklungspezifischen Expressionsunterschiede zwischen Embryo und Larve innerhalb der Geschlechter untersucht. Hierbei zeigte das Gen *d-Lactat-DH-like* in Männchen und Weibchen eine schwächere Expression im Embryo als in der Larve. *d-Lactat-DH* codiert in *Saccharomyces cerevisiae* für eine Oxidoreduktase, welche in der Milchsäuregärung die Reduktion von Pyruvat zu Lactat katalysiert (Lodi und Ferrero 1993; Lodi et al. 1994). Geht man von der gleichen Funktion bei Chironomus aus, ergibt sich daraus eine mögliche Erklärung für die Expressionsunterschiede. Die Larven bewegen sich schlängelnd in

Diskussion

relativ sauerstoffarmem Sediment. Die für diese Muskelarbeit notwendige Energie könnte zumindest teilweise durch Milchsäuregärung bereitgestellt werden.

Eine erhöhte Anzahl von Transkripten im Embryo gegenüber der Larve zeigen die beiden Gene *mier1-like* und *polyhomeotic-like*. Für *mier1* konnte in *Xenopus* ein Anstieg der Expression während der Differenzierung embryonaler Zellen zu mesodermalem Gewebe nachgewiesen werden. MIER1 fungiert hier als Transkriptionsrepressor für unterschiedliche Gene (Paterno et al. 1997; Paterno et al. 1998). Der in *Chironomus* beobachtete Anstieg der Anzahl von Transkripten könnte für eine ähnliche Funktion in der Embryogenese sprechen. Das in *Drosophila* identifizierte Gen *polyhomeotic* gehört zur *Polycomb*-Gruppe, deren Vertreter über eine Modifikation der Chromatinstruktur die Expression verschiedener Gene epigenetisch reprimieren. Sie regulieren u.a. die differenzielle Expression des *Antennapedia*- und des *Bitorax*-Komplexes und steuern die Aufrechterhaltung der segmentalen Identität (Dura et al. 1987; Deatrick et al. 1991; DeCamillis et al. 1992; Kim et al. 2005). Die vergleichsweise hohe Expression von *polyhomeotic-like* in *Chironomus*-Embryonen könnte für eine ähnliche Funktion in der Entwicklung zur Larve sprechen.

5.3.1.1 EXPRESSION ZWEIER INTRONLOSER GENE AUS DER SDR

Wie in Abschnitt 4.1.1.4 beschrieben, treten in dem ursprünglich proximal von *mier1-like* annotierten Gen *viral-A-Type-like* einige Varianten auf, welche den Leserahmen zerstören. Dies führte zu der Vermutung, dass dieses Gen keine Funktion erfüllt und nicht transkribiert wird. Die getrennte Kartierung embryonaler und larvaler Datensätze aus Männchen und Weibchen konnte jedoch zeigen, dass zwei distal und proximal der Varianten liegende Bereiche in Embryonen recht gering und in späteren Entwicklungsphasen geschlechtsspezifisch nur in männlichen Larven exprimiert werden. Der beobachtete Anstieg der Expression im 2. embryonalen Sequenzdatensatz bei *C. piger* deutet auf ein fortgeschrittenes Entwicklungsstadium bei den hier verwendeten Embryonen hin. Die männchenspezifische Expression in Larven könnte

Diskussion

für eine Funktion der Domänen in der Geschlechtsdetermination sprechen. Um weitere Informationen über eine eventuelle Funktion der gezeigten Transkripte zu erhalten, ist eine genauere Analyse der Expression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien sowie eventuell „*knock-down*“-Versuche mittels RNAi von großem Interesse.

5.3.1.2 EXPRESSION VON *DSX* IN UNTERSCHIEDLICHEN ENTWICKLUNGSSTADIEN

Das Gen *dsx* spielt in vielen Organismen eine Rolle in der Geschlechtsdetermination. Die Expression beginnt im frühen Embryonalstadium und geschlechtsspezifische Spleißprodukte können als Indikator für den Beginn der Entwicklung zu Männchen und Weibchen genutzt werden (Kiuchi et al. 2014). Das geschlechtsspezifische Spleißen von *dsx* wird durch eine Genkaskade reguliert, an deren oberen Ende der primäre geschlechtsbestimmende Faktor steht. Dieser muss also ebenfalls exprimiert werden, sobald geschlechtsspezifische Spleißprodukte von *dsx* nachgewiesen werden können. Im 2. embryonalen Sequenzdatensatz aus *C. piger* konnte ein Anstieg der geschlechtsspezifischen Spleißprodukte von *dsx* gezeigt werden. Dies spricht für ein späteres Entwicklungsstadium des für den 2. Sequenzdatensatz verwendeten Geleges. Für die beiden Domänen konnte ebenfalls ein Anstieg der Anzahl von Transkripten im 2. embryonalen Sequenzdatensatz gezeigt werden, was auf einen Zusammenhang zwischen diesen und dem geschlechtsspezifischen Spleißen von *dsx* hindeuten könnte. Bei knock-down-Versuchen mit den beiden Domänen könnte in diesem Zusammenhang die Anzahl von Transkripten von männchen- bzw. weibchenspezifischen *dsx*-Transkripten mittels RT-qPCR überprüft werden. Auch eine mögliche Funktion in der Geschlechtsdetermination von *fs(1)K10-like Y1* oder *Y2* könnte auf diese Weise überprüft werden.

5.3.1.3 EXPRESSION DER UNTERSCHIEDLICHEN TRANSKRIPTEN VON *fs(1)K10-LIKE*

Besonders interessant im Hinblick auf die Identifikation des männchenbestimmenden Faktors M ist das auf dem Proto-Y-Chromosom dupliziert vorliegende Gen *fs(1)K10-like*. Auch hier zeigten sich während der Kartierung der transkriptomischen Daten einige Schwierigkeiten. Durch die teilweise ähnlichen Abschnitte zwischen den Duplikaten auf dem Proto-Y-Chromosom und der Proto-X-chromosomalen Kopie kartieren einige "reads" mehrfach und können nicht eindeutig zugeordnet werden. In der „foldchange“-Analyse wurden die RPKM-Werte für beide Y-Kopien im Männchen gemeinsam mit den RPKM-Werten für die X-Kopie von *fs(1)K10-like* im Weibchen verglichen. Es zeigte sich eine 3-fach (*C. thummi*) bzw. 3,5-fach (*C. piger*) höhere Expression im Männchen als im Weibchen, was die allein durch die Duplikation erwartete Erhöhung der Expression sogar übersteigt. Dies könnte dafür sprechen, dass eine eventuelle Funktion von *fs(1)K10-like* in der Geschlechtsdetermination über einen Dosiseffekt eintritt. Ein ähnlicher Effekt tritt in der Geschlechtsdetermination von *Drosophila* auf. Bei ausreichend hoher Dosis können die X-chromosomalen Numeratoren als Transkriptionsfaktoren die Expression von *Sxl* aktivieren, welches dann über die Aktivierung von *tra^F* ein weibchenspezifisches Spleißen von *dsx* bewirkt (Sánchez und Nöthiger 1983; Abe et al. 2000; Keyes et al. 1992). Bei dem gemeinsamen Vergleich beider Y-chromosomaler Kopien des Gens *fs(1)K10-like* mit der Expression der X-chromosomalen Kopie im Weibchen wird jedoch eine eventuelle Sub- bzw. Neofunktionalisierung von *Y1* und *Y2* nicht berücksichtigt. Daher wurde die Expression der einzelnen Transkripte im Vergleich zwischen Embryonen und Larven ebenfalls miteinander verglichen. Hier wurde auch das *Y3*-Transkript in die Auswertung mit einbezogen. Außerdem erfolgte die Kartierung der Transkriptomdaten aus Männchen auch gegen die X-chromosomale Kopie von *fs(1)K10-like*. Sowohl bei *C. thummi* als auch bei *C. piger* fällt dabei die relativ hohe Expression der X-chromosomalen Kopie im Embryo gegenüber der Larve auf. Dies lässt sich durch maternale Transkripte erklären. Diese konnten ebenfalls durch FISH an Ovarien von *C. thummi* und *C. piger* nachgewiesen werden (Bierwirth 2015). Wie weiter oben

geschildert, unterschieden sich die embryonalen Daten von *C. piger* stark voneinander, weswegen sie getrennt ausgewertet wurden. Während die Expression der unterschiedlichen Y-Kopien des Gens *fs(1)K10-like* bei *C. thummi* in Embryonen nur schwach erhöht ist, fällt bei *C. piger* im 2. embryonalen Sequenzdatensatz bei *Y1* und *Y2* eine starke Erhöhung der Expression auf. Geht man, wie oben beschrieben, davon aus, dass es sich bei den für den 2. Embryonalen Sequenzdatensatz verwendeten Gelegen um ein fortgeschrittenes Entwicklungsstadium handelt, könnte dies für eine entwicklungspezifische Funktion von *Y1* und *Y2* in der Geschlechtsdetermination sprechen. Die gleichzeitige Kartierung der Daten gegen *dsx* zeigt, dass die in den *C. thummi* Embryonen noch keine geschlechtsspezifischen Spleißprodukte vorliegen, wohingegen im 2. embryonalen Sequenzdatensatz von *C. piger* bereits ein leichter Anstieg zu beobachten ist. Dies könnte für einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Transkription von *fs(1)K10-like Y1* und *Y2* und dem geschlechtsspezifischen Spleißen von *dsx* sprechen. Im Gegensatz zu *Y1* und *Y2* scheint die Expression von *Y3* im Laufe der Entwicklung eher konstant zu sein. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass alle 3 männchenspezifischen Transkripte unterschiedlich reguliert sind und demzufolge eventuell auch unterschiedliche Funktionen einnehmen. Um genauere Informationen über die Expression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien zu erhalten, wäre die Durchführung einer qPCR von mehreren embryonalen und larvalen Stadien sinnvoll.

5.4 DUPLIKATION DES GENS *FS(1)K10-LIKE* AUF DEN PROTO-Y-CHROMOSOMEN VON *C. THUMMI*, *C. PIGER* UND *C. LURIDUS*

Wie oben beschrieben, konnte auf den Proto-Y-Chromosomen der Spezies *C. thummi*, *C. piger* und *C. luridus* eine Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* identifiziert werden. Neben verschiedenen männchenspezifischen repetitiven Elementen ist die Duplikation bisher der einzige maßgebliche Unterschied, der zwischen Proto-X- und Proto-Y-Chromosom gezeigt werden konnte. Duplikationen sind generell häufig vorkommende Ereignisse und gelten als ein Grundbaustein evolutiver Prozesse (Zhang 2003).

Diskussion

Es gibt mehrere mögliche Ursachen für Duplikationsereignisse. Direkt hintereinander an derselben chromosomalen Position liegende duplizierte Gene, wie die hier vorliegenden, sind häufig durch ein ungleiches Crossing-Over während der Mitose oder Meiose entstanden. Weitere Ursachen sind genomweite Duplikationen oder Retrotranspositionsereignisse. Bei letzteren entstehen jedoch intronlose Genduplikate. Für die Duplikation im Bereich des Gens *fs(1)K10-like*, ist ein ungleiches „crossing-over“ als wahrscheinlichste Ursache zu sehen (Abbildung 50).

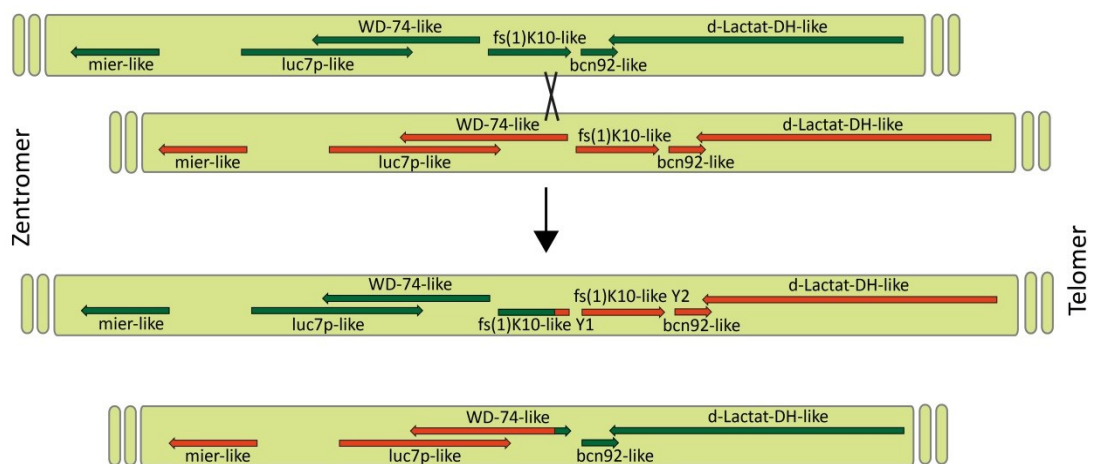


Abbildung 50: Mögliche Entstehung der Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi* bzw. *C. piger* durch ungleiches Crossing-over.

Durch ein ungleiches *Crossing-over* zwischen den beiden gepaarten Homologen im Bereich der SDR könnte es zu der Duplikation des Gens *fs(1)K10-like* auf dem Proto-Y-Chromosom gekommen sein.

Generell stellt sich die Frage, ob die im Bereich des Gens *fs(1)K10-like* gezeigten Variationen eine besonders hohe Mutationsrate widerspiegeln oder die Mutationen lediglich häufiger fixiert wurden als in anderen Bereichen. Geschlechtschromosomen nehmen in ihrer Evolution eine besondere Stellung ein. Dies beruht zum einen auf der unausgewogenen Weitergabe von Proto-Y- und Proto-X-Chromosom. Während das Proto-Y-Chromosom nur in Männchen und dort immer hemizygot auftritt, wird das Proto-X-Chromosom zu $\frac{2}{3}$ über das weibliche Geschlecht weitergegeben. Dies

Diskussion

liefert gemeinsam mit der unterdrückten Rekombination den Nährboden für eine geschlechtsspezifische Selektion von Mutationen, welche Vorteile für das eine oder andere Geschlecht liefern (Kaiser und Bachtrog 2010). Daher ist auf Geschlechtschromosomen besonders oft eine Anhäufung von Mutationen zu beobachten. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass in *fs(1)K10-like* vermehrt sogenannte „*mutation hotspots*“ vorkommen. Dies sind Sequenzabschnitte, welche häufiger von Mutationsereignissen betroffen sind, als statistisch zu erwarten. Liegt die Ursache für diese Häufung von Mutationen in der Sequenz selbst, so spricht man von intrinsischen „*hotspots*“. So zeigen z.B. repetitive Sequenzen („*direct repeats*“, „*inverted repeats*“, Oligomere) eine erhöhte Anfälligkeit für Mutationen (Rogozin und Pavlov 2003). Sowohl der Startpunkt der Duplikation auf dem Proto-Y-Chromosom, als auch der Bereich um das Indel auf den Proto-X-chromosomalen Klonen zeigen kurze repetitive Sequenzen (Abbildung 51).

Die meisten durch Duplikationen entstandenen Gene bleiben nicht erhalten. Für diejenigen Gene, welche durch evolutive Prozesse fixiert werden, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Entwicklung. Kommt es durch Mutationen zu einem Funktionsverlust, entstehen sogenannte Pseudogene. Diese zeigen häufig nur noch geringe Ähnlichkeiten zu dem Ursprungsgen und werden im Laufe der Zeit eliminiert. Bringt die erhöhte Gendosis, die mit einer Duplikation einhergeht, einen Vorteil, kann es auch zum Erhalt beider Genkopien kommen. Dies ist zum Beispiel bei *rDNA* und *Histongenen* der Fall. Um die gleichgerichtete Evolution der Genkopien zu gewährleisten, spielt der Mechanismus der Genkonversion eine entscheidende Rolle. Wäre dies bei *fs(1)K10-like* der Fall, würde man einen höheren Grad der Konservierung zwischen den unterschiedlichen Kopien erwarten. Es kann auch eine Subfunktionalisierung stattfinden, bei der es z. B. zu einer gewebsspezifischen Expression des duplizierten Gens kommt. Ein Beispiel hierfür sind die Gene *engrailed-1* und *engrailed-1b* beim Zebrafisch (Force et al. 1999). Entwickelt das duplizierte Gen eine gänzlich neue Funktion spricht man von einer Neofunktionalisierung.

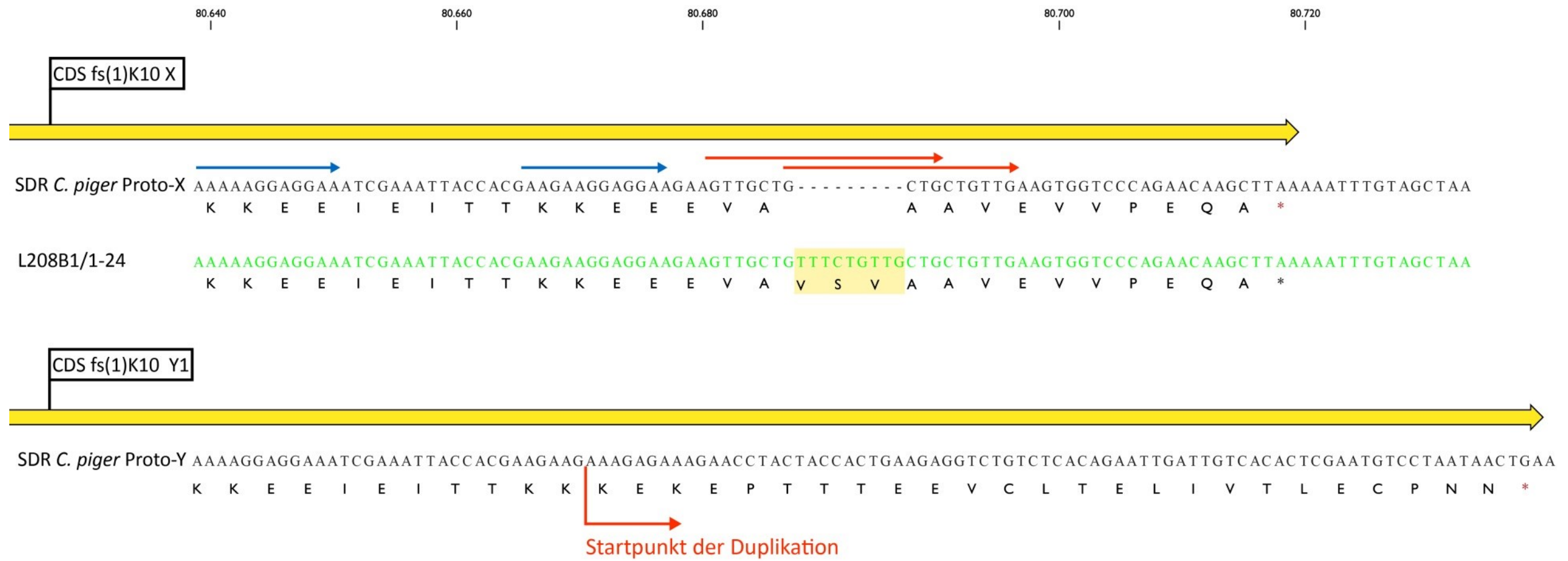


Abbildung 51: „short direct repeats“ in Exon 2 des Gens *fs(1)K10-like X* von *C. piger*.

Eine Anhäufung von Mutationen in diesem Bereich deutet darauf hin, dass es sich um „mutation hotspots“ handeln könnte. Im Bereich der rot dargestellten „repeats“ tritt das in allen X-chromosomalen Klonen beobachtete 9 bp Indel auf. Auch der Startpunkt der proto-Y-spezifischen Duplikation ist von kurzen „direct repeats“ gekennzeichnet (rote und blaue Pfeile).

Diskussion

Auch bei der Evolution geschlechtsbestimmender Mechanismen haben Duplikationen bei verschiedenen Organismen eine Rolle gespielt. So ist der primäre geschlechtsdeterminierende Faktor bei *Medaka* (japanischer Reisfisch) das Gen *DMRT-1Y*, welches ein Duplikat des autosomalen Gens *DMRT-1* darstellt und wie *dsx* zur Familie der Gene mit einer DM-Domäne gehört (Nanda et al. 2002). Bei der Honigbiene sind durch die Duplikation eines *tra*-Orthologs die beiden Gene *csd* und *fem* entstanden, wobei *csd* die Rolle des primären geschlechtsdeterminierenden Faktors einnimmt und FEM, wie TRA bei *Drosophila*, Spleißfaktor von *dsx* ist (Beye et al. 2003; Beye 2004; Koch et al. 2014). In beiden Fällen kam es zu einer Neofunktionalisierung des duplizierten Gens. Ein ähnlicher Funktionsgewinn ist auch für die unterschiedlichen Kopien des Gens *fs(1)K10-like* denkbar.

Ein Alignment der verschiedenen FS(1)K10-LIKE AS-Sequenzen aus den drei Spezies *C. thummi*, *C. piger* und *C. luridus* zeigt über weite Strecken einen hohen Grad an Konservierung, sowohl zwischen den verschiedenen Genkopien als auch speziesübergreifend. Besonders die DNA-bindende Zinkfinger-Domäne ist stark konserviert. Während sich die Y1-Kopien hauptsächlich in ihren N-Termini von den X-Kopien unterscheiden, weisen die Y2-Kopien des Weiteren 17 bzw. 18 zusätzliche Aminosäuren kurz nach der DNA-Bindedomäne auf. Es ist also denkbar, dass sowohl Y1 als auch Y2 jeweils neue Funktionen gegenüber dem X-chromosomalen Protein einnehmen. Vergleicht man die verschiedenen *fs(1)K10-like*-Kopien sowohl auf Nukleotid- als auch auf Proteinebene im Dotplot miteinander, fällt auf, dass die Übereinstimmungen auf Nukleotidebene im 3'-Bereich wesentlich geringer sind als auf Proteinebene. Dies zeigt, dass es hauptsächlich zu stillen Mutationen gekommen ist, welche keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz haben. Im Bereich der Y1-Kopie liegen bei *C. piger* zwei verschiedene Sequenzen unterschiedlicher Herkunft vor. Die für das AS-Alignment verwendete Sequenz stammt aus einem „*chromosomal walk*“ und weist ab der Position 351 stärkere Ähnlichkeiten zu den X-Kopien von *C. piger* und *C. luridus*, als zu den Y1-Kopien der anderen Spezies auf. Die aus dem proto-Y-chromosomalen pUC-Klon L208B10/3-6 stammende Sequenz jedoch zeigt im entsprechenden Bereich die Y1-typische Struktur (s. Abschnitt 4.1.1.7). Es besteht die

Diskussion

Möglichkeit, dass es sich hier um einen variablen Bereich handelt, in welchem häufiger Mutationen auftreten. Dafür spricht, dass die proto-X-chromosomale Kopie aus *C. luridus* im entsprechenden Abschnitt wiederum eher die Y1-spezifische AS-Sequenz zeigt. Da die Sequenzdaten für die Y1-Kopie aus *C. piger* aus „genome-walk“-Sequenzen stammt, ist es jedoch auch denkbar, dass es zu einem methodischen Fehler gekommen ist. In diesem Fall wäre einer der verwendeten „walk“-Primer nicht spezifisch genug und es wäre ebenfalls zu einer Amplifikation des Proto-X-chromosomalen Produktes gekommen. Dieses wäre dann fälschlicherweise als Proto-Y-chromosomales Produkt interpretiert worden. Eine Überprüfung der tatsächlichen genomischen Struktur könnte mittels Southern Blot oder über eine Amplifikation des entsprechenden Bereiches erfolgen.

Aus dem in Abbildung 52 dargestellten AS-Alignment lässt sich ein Stammbaum ableiten, welcher Hinweise auf die Entstehungsgeschichte der Duplikation liefert. Man kann davon ausgehen, dass das Duplikationsereignis in einem gemeinsamen Vorfahr der drei Spezies *C. thummi*, *C. piger* und *C. luridus* stattgefunden hat. Des Weiteren zeigt der Stammbaum, dass die Y2-Kopie stärkere evolutive Veränderungen erfahren hat, wohingegen sich die X-Kopie und die Y1-Kopie noch ähnlicher sind. Aus dieser Beobachtung lässt sich besonders für die Y2-Kopie des Gens *fs(1)K10-like* eine eventuelle Neofunktionalisierung als männchenbestimmender Faktor M ableiten. Um diese These zu überprüfen, könnten „knock-down“ Versuche mittels RNAi durchgeführt werden. Neben eventuellen phänotypischen Auswirkungen, z. B. auf die Genitalimaginalscheibenentwicklung, könnte das Vorkommen männchen- bzw. weibchenspezifischer Spleißvarianten des Gens *dsx* untersucht werden. Diese Vorgehensweise wurde u.a. bei der Identifikation des weibchenbestimmenden Faktors *fem* in *Bombyx mori* gewählt (Kiuchi et al. 2014).

Diskussion

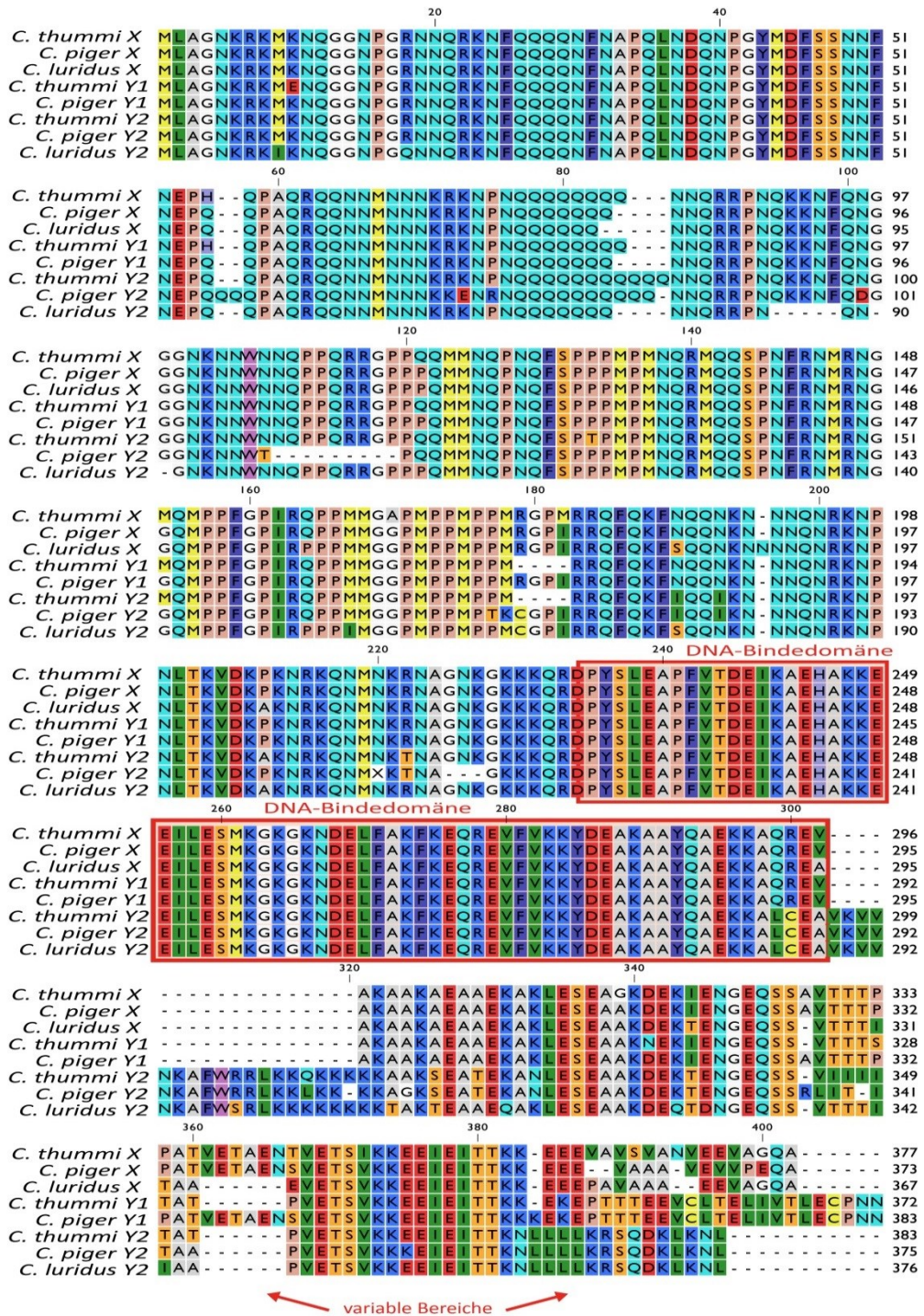


Abbildung 52: AS-Alignment der unterschiedlichen *fs(1)K10-like*-Kopien aus den drei Spezies *C. thummi*, *C. piger* und *C. luridus*

Die AS-Sequenzen der Proto-X-chromosomalen und der beiden Proto-Y-chromosomalen Kopien des Gens *fs(1)K10-like* wurden mit Hilfe des Online-Tools Clustal Omega aligniert und das Alignment mit der CLC Genomics Workbench grafisch dargestellt. Die nur teilweise bekannte Sequenz der Y1-Kopie aus *C. luridus* wurde nicht mit einbezogen. Die durch Homologien zum Gen *fs(1)K10* aus *Drosophila* identifizierte DNA-Bindedomäne ist rot umrandet. Besonders im C-terminalen Bereich gibt es variable Abschnitte.

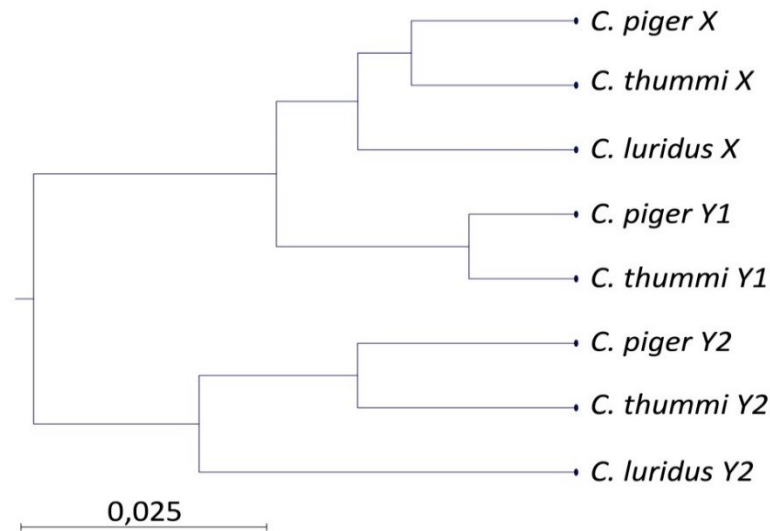


Abbildung 53: Stammbaum der unterschiedlichen Kopien des Gens *fs(1)K10-like*, abgeleitet aus dem in Abbildung 52 dargestellten Clustal Omega AS-Alignment.

Die nur teilweise bekannte Sequenz der Y1-Kopie aus *C. luridus* wurde nicht mit einbezogen. Der Stammbaum legt nahe, dass es vor der Aufspaltung der drei Spezies *C. thummi*, *C. piger* und *C. luridus* zu dem Duplikationsereignis gekommen ist. Die Y1-Kopie zeigt größere Ähnlichkeiten zur X-Kopie als Y2.

(verwendete Parameter: „algorithm“ = UPGMA, „distance measure“ = Jukes-Cantor, Bootstrap = 100)

5.4.1 MÖGLICHE FUNKTION VON *fs(1)K10-LIKE Y3*

Die Kartierung transkriptomischer NGS-Daten aus *C. thummi* und *C. piger* Männchen gegen den duplizierten Bereich der Gene *fs(1)K10 Y1* und *Y2* mittels „large gap read mapping“ und RNASeq zeigt eine relativ hohe Transkription des zwischen beiden Genen liegenden Abschnitts. Eine RT-PCR über diesen Abschnitt hinaus konnte zeigen, dass ein Transkript existiert, welches mindestens von der Mitte des ersten Exons von *Y1* bis nach dem Intron von *Y2* reicht, wobei beide Introns aus dem reifen Transkript heraus gespleißt sind. Obwohl der offene Leserahmen im mittleren Bereich zwischen *Y1* und *Y2* durch Stopp-Kodons unterbrochen wird, konnten dort keine „spliced reads“ kartiert werden. Durch die Anfertigung eines Northern Blots

Diskussion

wurde die Anwesenheit eines ca. 4.100 Basen (*C. thummi*) bzw. 5.500 Basen (*C. piger*) großen Y3-Transkriptes nachgewiesen. Die starken Größenunterschiede zwischen den beiden Spezies könnten auf die unterschiedlichen RNA-Mengen zurückzuführen sein, welche die Laufeigenschaften bei der gelelektrophoretischen Auftrennung beeinflussen. Aber auch das Vorhandensein unterschiedlich langer „poly-A-tails“ ist denkbar (Weill et al. 2012). Da für die Hybridisierung der Blots eine DNA-Sonde verwendet wurde, kann nicht bestimmt werden, ob es sich bei dem großen Transkript um ein „sense“- oder ein „antisense“-Transkript handelt. Eine weitere Hybridisierung des Blots mit einer „sense“ RNA-Sonde zeigte ein Signal auf Höhe des Y3-Produktes, was dafür sprechen könnte, dass es sich um ein „antisense“-Produkt handelt. Allerdings hybridisierten die kleineren RNAs ebenfalls mit der Sonde. Es ist möglich, dass hier ebenfalls anteilig „antisense“-Transkripte vorhanden sind. Dieses Hybridisierungsmuster lässt sich jedoch auch durch die Anwesenheit von ebenfalls radioaktiv markierten „antisense“-Abschnitten erklären. Diese könnten durch Rückfaltungsprozesse während der reversen Transkription entstanden sein. Es konnten sowohl für ein „sense“- als auch für ein mögliches „antisense“-Transkript Polyadenylierungssignale gefunden werden, welche den bei anderen Genen identifizierten konservierten Signalen entsprechen (Gerbracht 2014; Retelska et al. 2006). Chironomiden-spezifische Promotor-Elemente sind bisher nicht bekannt. Es konnte jedoch eine TATA-Box etwa 60 bp „upstream“ eines möglichen „antisense“-Transkriptes identifiziert werden. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann nicht entschieden werden, ob es sich bei Y3 um ein „sense“- oder „antisense“-Transkript handelt. Um die Orientierung der Transkripte endgültig zu klären, müssten weitere Hybridisierungen durchgeführt werden. Ebenfalls sinnvoll wäre die Durchführung einer strangspezifischen Transkriptomsequenzierung mittels NGS (Vivancos et al. 2010; Mills et al. 2013).

„Antisense“-Transkripte werden vom Gegenstrang bereits bekannter Gene transkribiert und können eine Vielzahl regulatorischer Funktionen erfüllen (Tufarelli et al. 2003; Hongay et al. 2006; Osato et al. 2007; Beltran et al. 2008; Werner 2013). Neben den weitaus bekannteren kurzen nicht-kodierenden RNAs (ncRNAs), wie

Diskussion

small interfering RNAs, micro RNAs und PIWI-interacting RNAs (Moazed 2009), existieren auch lange ncRNAs mit einer Länge von >200 bp. Auch für diese langen ncRNAs konnten regulatorische Funktionen gezeigt werden. So können sie ihre revers komplementäre Sequenz auf RNA- oder DNA-Ebene erkennen. Manche entfalten ihre regulatorische Funktion sogar über Protein-Bindedomänen (Rinn et al. 2007; Yap et al. 2010). Eine der bekanntesten langen ncRNAs ist XIST, welches eine entscheidende Rolle in der Dosiskompensation beim Menschen hat (Pontier und Gribnau 2011). Es ist denkbar, dass auch das Y3-Transkript von *fs(1)K10-like* eine regulatorische Funktion einnimmt und damit eine Rolle in der Geschlechtsdetermination spielt.

Handelt es sich bei dem Y3-Transkript nicht um ein *antisense*-Transkript, stellt dieses eventuell ein dicistronisches Transkript dar. Lange wurde davon ausgegangen, dass polycistronische Transkripte auf Bakterien und Archeen begrenzt sind. Es ist heute bekannt, dass auch einige Eukaryoten Operons besitzen (Blumenthal 2004, 2005). In *C. elegans* konnten polycistronische pre-mRNAs nachgewiesen werden, welche zu monocistronischen reifen mRNAs gespleißt und anschließend polyadenyliert werden (Spieth et al. 1993). In *Drosophila* konnte ein anderer Mechanismus gezeigt werden, bei welchem eine reife dicistronische mRNA zu den Ribosomen transportiert und dort in zwei Proteine translatiert wird (Brognia und Ashburner 1997; Misra et al. 2002). Ähnliche Mechanismen sind auch für das Y3-Transkript in *Chironomus* denkbar.

5.4.2 MÖGLICHE FUNKTIONEN FÜR Y1 UND Y2

Abbildung 54 gibt einen Überblick über drei mögliche Mechanismen, durch die Y1 oder Y2 eine Funktion als M ausüben könnten. Das Vorkommen einer DNA-Bindedomäne in allen drei Kopien des Gens spricht für eine Funktion als Transkriptionsfaktor. In dieser Funktion wäre eine Regulation der Expression des in vielen Insektenarten identifizierten Gens *tra* denkbar (Geuverink und Beukeboom 2014). Dieses nimmt während der Geschlechtsdetermination in *Drosophila* eine entscheidende Rolle als Spleißfaktor für weibchenspezifisches *dsx* ein. Während das Gen *dsx* bei *C. thummi*, *C. piger* und *C. luridus* bereits gefunden und weibchen- bzw.

Diskussion

männchenspezifische Spleißvarianten gezeigt werden konnten, ist die Identifikation eines *tra*-Homologs in Chironomiden bisher nicht erfolgt. Lediglich *tra2* konnte in *C. piger* nachgewiesen werden (Gerbracht 2014). Aufgrund der weiten Verbreitung von *tra* in Verbindung mit *dsx* in den Geschlechtsbestimmungskaskaden vieler Insektenpezies, ist auch in Chironomiden eine Funktion von *tra* in der Geschlechtsbestimmung wahrscheinlich. Geht man davon aus, dass die X-chromosomale Kopie des Gens *fs(1)K10-like* keine Funktion innerhalb der Geschlechtsdetermination einnimmt, hat eine Neofunktionalisierung von *Y1* oder *Y2* zu einer vollständig neuen Aufgabe geführt. So könnten die Proteine die Transkription von weibchenspezifischem *tra* verhindern und somit die Entstehung der männchenspezifischen Spleißvariante von *dsx* hervorrufen (Abbildung 54 a). Auch bei *M. domestica* bewirkt der männchenbestimmende Faktor M eine Unterbrechung der autoregulatorischen Schleife von Md-TRA^F (Hediger et al. 2004; Burghardt et al. 2005). Allerdings ist die molekulare Ursache hierfür noch nicht bekannt. Es ist jedoch auch möglich, dass in weiblichen Organismen Homodimere aus FS(1)K10-like X die weibchenspezifische Expression von *tra* auslösen, wie dies z.B. bei der Regulation von SXL in *Drosophila* bekannt ist. In Männchen hingegen würden sich bevorzugt Heterodimere aus einem X- und einem Y1- bzw. Y2-Protein bilden. Durch Heterodimere wäre eine Aktivierung der Transkription von *tra* nicht möglich (Abbildung 54 b). Ohne aktives weibchenspezifisches TRA käme es folglich zum männchenspezifischen Spleißen von *dsx*-mRNA. Eine Analyse der Proteinsequenzen der verschiedenen *fs(1)K10-like*-Varianten konnte jedoch keine Ähnlichkeiten zu bekannten Dimerisierungs-Domänen zeigen. Es besteht des Weiteren die Möglichkeit, dass durch die Erhöhung der Gendosis selbst, welche durch die Duplikation im Männchen erreicht wird, eine männchenspezifische Entwicklung stattfindet. In diesem Falle würde erst durch die erhöhte Anzahl von Transkripten und damit verbunden der aktiven Transkriptionsfaktoren im Männchen eine Inaktivierung von *tra* stattfinden (Abbildung 54 c). Die Ergebnisse der RNASeq-Analyse zeigen in Larven der beiden Spezies *C. thummi* und *C. piger* bezogen auf alle *fs(1)K10-like*-Transkripte tatsächlich eine 3-4-fach höhere Expression im Männchen. Dieser Wert liegt sogar

Diskussion

höher, als man alleine durch die Anzahl an Genkopien erwarten würde. In diesem Fall würden im Männchen 1,5 x so viele Transkripte erwartet wie im Weibchen (s. Abschnitt 5.3.1).

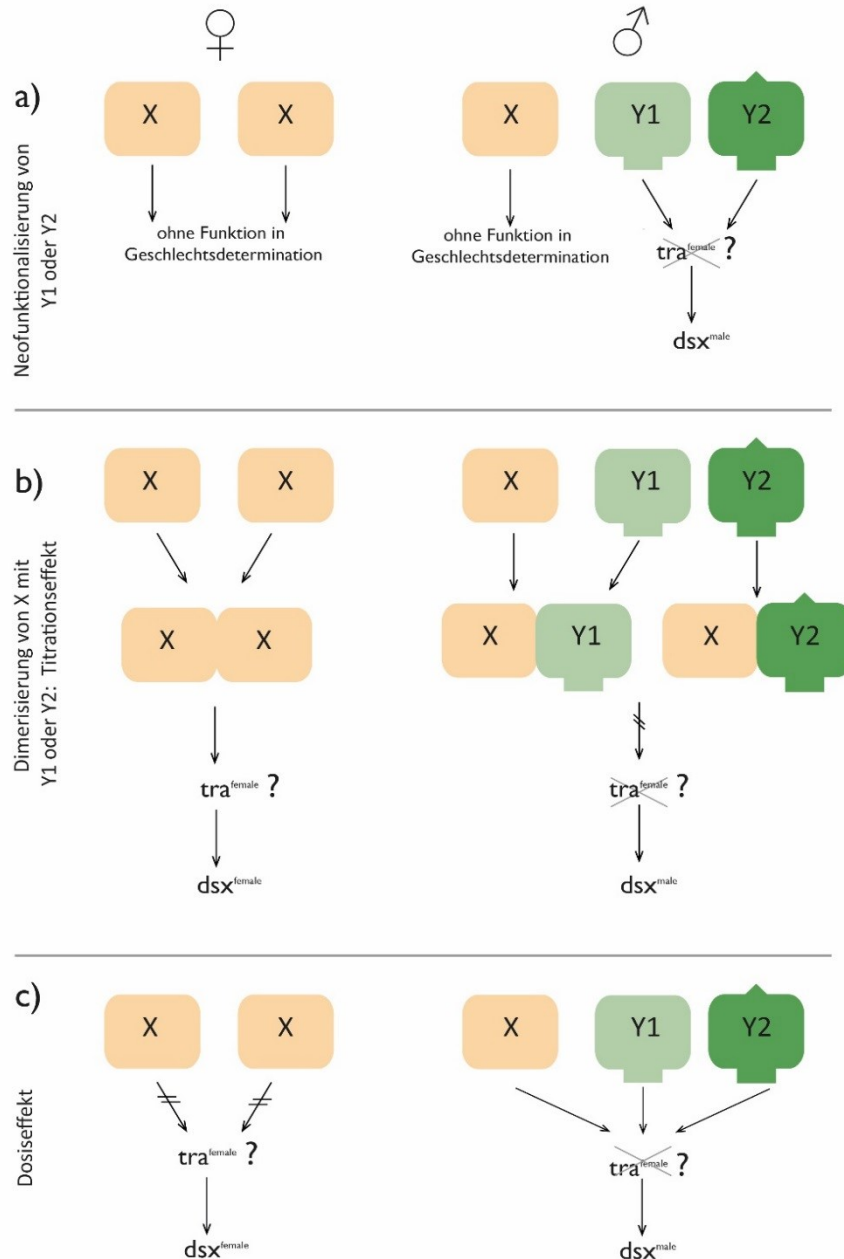


Abbildung 54: Mögliche Funktionen für die unterschiedlichen Kopien des Gens *fs(1)K10-like* in der Geschlechtsdetermination.

Die aus einem Duplikationsereignis entstandenen Proto-Y-chromosomalen Kopien des Gens *fs(1)K10-like* könnten durch evolutionäre Veränderungen eine Funktion als geschlechtsdeterminierender Faktor M erlangt haben. Die Abbildung zeigt 3 mögliche Mechanismen, durch welche diese Funktion als M erfüllt werden könnte.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bei Chironomus dient als geschlechtsbestimmender Mechanismus das Prinzip der männlichen Heterogametrie, bei welcher ein dominanter Männchenbestimmer M zur Ausbildung des männlichen Geschlechts führt. Obwohl die meisten Chironomidenarten keine morphologisch unterscheidbaren Geschlechtschromosomen aufweisen, konnten anhand cytogenetischer Analysen die funktionellen Gonosomen in einigen Spezies identifiziert werden. So wurde die geschlechtsbestimmende Region, welche den Faktor M enthält, in *C. thummi* und *C. piger* auf Chromosom 3 Arm F lokalisiert. In *C. thummi* ist der Faktor M eng mit einem Cluster tandem-repetitiver Elemente, den so genannten *Cla-Elementen* 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 wurden Abschnitte des Proto-Y-Chromosoms von *C. thummi* und *C. piger* sequenziert und auf Unterschiede zum Proto-X-Chromosom untersucht. Hierbei konnte bei *C. thummi* das in Männchen hemizygot vorliegende *Cla-Element-Cluster* molekular lokalisiert werden. In *C. piger* konnte mit der *Cla-adjacent-DNA* ebenfalls ein Proto-Y-spezifisches repetitives Element gefunden werden. Diese Befunde können als Indiz für die in der Evolution von Y-Chromosomen typische Anhäufung repetitiver Elemente gewertet werden. Es ist durchaus denkbar, dass die repetitiven Elemente die Genfunktion benachbarter Gene beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurden darüber hinaus transkriptomische NGS-Daten von *C. piger* und *C. thummi* analysiert. Hierdurch konnte für zwei intronlose Gene unbekannter Funktion eine männchenspezifische Expression in Larven beider Spezies bewiesen werden. Für die meisten bereits bekannten Gene in der SDR konnte dagegen keine geschlechtsspezifische Expression gezeigt werden. Eine Ausnahme bildet das auf dem Proto-Y-Chromosom von *C. thummi*, *C. piger* und *C. luridus* dupliziert vorliegende Gen *fs(1)K10-like*. Diese Duplikation stellt in den bisher

Zusammenfassung

bekanntesten Abschnitten des Proto-Y-Chromosoms den größten Unterschied zwischen beiden Geschlechtschromosomen dar. Durch die Expressionsanalyse konnte ein Transkript nachgewiesen werden, welches sich über beide Proto-Y-spezifischen Kopien des Gens erstreckt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression der unterschiedlichen Kopien *Y1*, *Y2* und *Y3* auf dem Proto-Y-Chromosom und *X* auf dem Proto-X-Chromosom in der Entwicklung vom Embryo zur Larve unterschiedlich reguliert wird. Dies spricht für eine Funktion einer oder mehrerer Proto-Y-chromosomaler Kopien in der Geschlechtsdetermination. Es wurden verschiedene Modelle zu möglichen Funktionen dieses Gens als geschlechtsbestimmender Faktor *M* vorgestellt.

Um mehr Informationen über die Funktion der Proto-Y-chromosomalen Kopien von *fs(1)K10-like* sowie über die beiden intronlosen Gene zu erhalten, sollten *knock-down*-Experimente durchgeführt werden und die Auswirkungen der Herunterregulation auf die Expression von *tra*, auf die Transkripte des Doppelschaltergens *dsx* sowie auf die Entwicklung der Geschlechtsdimorphismen der behandelten Tiere untersucht werden. Des Weiteren ist es von großem Interesse die vollständige Sequenz des Proto-Y-Chromosoms der unterschiedlichen Spezies zu erhalten.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

° C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
AS	Aminosäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
C.	<i>Caenorhabditis</i>
C.	<i>Chironomus</i>
<i>cds</i>	<i>complementary sex determination</i>
CI	Chloroform-Isoamylalkohol
cm	Centimeter
D.	<i>Drosophila</i>
<i>da</i>	DAUGHTERLESS
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
<i>dLacDH-like</i>	<i>d-Lactat-Dehydrogenase-like</i>
<i>dpa</i>	<i>deadpan</i>
<i>dsx</i>	<i>Doublesex</i>
<i>E. coli</i>	<i>Echericha coli</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FEM	FEMINIZER
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierungen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>fs(1)K10-like</i>	<i>female-sterile(1)-K10-like</i>
GTC	Guanidinthiocyanat
h	Stunden
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
M	Molar
mA	Milliampere
<i>mas</i>	<i>masculinizer</i>
<i>mier1-like</i>	<i>mesodermal-induction-early-response1-like</i>
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NCBI	National Center of Biotechnology Information
ng	Nanogramm

Verzeichnisse

NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
NTS	Non-transcribed Spacer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RT	Raumtemperatur
SDR	<i>Sex Determining Region</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sisA	<i>sisterlessA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSC	Standard-Salz-Citratlösung
<i>Sxl</i>	<i>Sex-lethal</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
<i>tra</i>	<i>Transformer</i>
TRITC	Rhodaminisothiocyanat
U	Units
ü.N.	über Nacht
UPM	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die Geschlechtsbestimmungskaskaden von <i>D. melanogaster</i> , <i>M. domestica</i> und <i>A. mellifera</i> im Vergleich.....	12
Abbildung 2: Lage der Gene in den bekannten Sequenzen der SDR aus <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i>	17
Abbildung 3: Genitalimaginalscheiben von <i>C. thummi</i> im Vergleich zwischen Weibchen und Männchen.....	22
Abbildung 4: Verwendete Molekulargewichtsstandards der Fa. Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).....	28
Abbildung 5: Aufbau eines unidirektionalen Blots	39
Abbildung 6: Lage der für das “screening” der pUC-Banken L208 und pipUC1 verwendeten Sonden K10 und dLacDH (rot) in der SDR von <i>C. thummi</i> Weibchen	41
Abbildung 7: Analytisches Agarosegel mit EcoRI- und HindIII-restringierte Plasmid-DNA vom positiven Klonen der pUC-Bibliothek L208 (links). Rechts ist das entsprechende Autoradiogramm nach Hybridisierung mit der Sonde K10 gezeigt.	50
Abbildung 8: Lage der Klone L208B1/1-24, L208B8/3-6, pipUC1D8/1-4 und pipUC1A4/6-5 auf dem Proto-X-Chromosom sowie der Klone L208B10/3-6 und pipUC1B3/6-7 auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. piger</i>	53
Abbildung 9: FISH von Klonen aus der SDR aus dem “screening” der beiden pUC-Bibliotheken pipUC1 und L208 zusammen mit synthetischen <i>Cl</i> - <i>Elementen</i> an Riesenchromosomen von <i>C. thummi</i> Männchen.	55
Abbildung 10: FISH von den beiden vom Proto-Y-Chromosom stammenden Klonen pipUC1B3/6-7 und L208B10/3-6 an Riesenchromosomen von <i>C. thummi</i>	56

Verzeichnisse

Abbildung 11: Indels und SNPs des Klons L208B1/1-24 im Vergleich zur bereits bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von <i>C. piger</i>	57
Abbildung 12: Lage der Indels und „ <i>single nucleotide polymorphisms</i> “ (SNPs) des Klons L208B8/3-6 im Vergleich zur bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von <i>C. piger</i>	58
Abbildung 13: Übersicht über Indels und SNPs des Klons pipUC1D8/1-4 in Bezug auf die bekannte Referenz des Proto-X-Chromosoms von <i>C. piger</i>	59
Abbildung 14: Lage der Indels und SNPs des Klons pipUC1A4/6-5 im Vergleich zur bereits bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von <i>C. piger</i>	60
Abbildung 15: Ausschnitt des Klons pipUC1A4/6-5 im Vergleich mit der bekannten Sequenz des Proto-X-Chromosoms von <i>C. piger</i>	61
Abbildung 16: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zur Bestimmung der Herkunft des Klons pipUC1A4/6-5 zum Proto-Y- bzw. Proto-X-Chromosom.....	62
Abbildung 17: Dotplot der Sequenz des Klons L208B10/3-6 gegen die Referenzsequenz des Proto-X-Chromosoms und des Proto-Y-Chromosoms von <i>C. piger</i>	63
Abbildung 18: Vergleich zwischen der bekannten Sequenz des Proto-Y-Chromosoms aus <i>C. piger</i> und dem Klon L208B10/3-6 im Bereich des Gens <i>fs(1)K10-like Y1</i>	64
Abbildung 19: Autoradiogramme von Southern Blots mit restringierter genomischer DNA von <i>C. thummi</i> sowie <i>C. piger</i> Männchen und Weibchen zur Verifizierung der auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. piger</i> identifizierten <i>Cla-adjacent-DNA</i>	66
Abbildung 20: Erwartete Fragmente aus Proto-X- und Proto-Y-Chromosom von <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i> bei Southern-Hybridisierungen mit Sonden distal und proximal der <i>Cla-adjacent-DNA</i>	68

Verzeichnisse

Abbildung 21: Hybridisierung von <i>Cla-adjacent-DNA</i> (rot) aus dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. piger</i> zusammen mit synthetischen <i>Cla-Elementen</i> (grün) an Riesenchromosomen von <i>C. piger</i> (A-C) und <i>C. thummi</i> Weibchen (D, E).....	70
Abbildung 22: Die FISH zeigt hemizygote <i>Cla-adjacent-DNA</i> in der SDR von <i>C. thummi</i> Männchen (Wildfänge) distal des ebenfalls hemizygot vorliegenden <i>Cla-Element-Clusters</i>	71
Abbildung 23: FISH von <i>Cla-adjacent-DNA</i> (grün) und synthetischen <i>Cla-Elementen</i> (rot) an Chromosomenpräparaten von <i>C. thummi</i> (Laborzucht)	72
Abbildung 24: Molekulare Lokalisation des hemizygoten <i>Cla-Element-Clusters</i> auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. thummi</i> durch PCR.	73
Abbildung 25: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus der Amplifikation genomischer DNA von <i>C. thummi</i> Männchen im Vergleich mit Weibchen mit den Primerpaaren ZY122-for/ <i>Cla</i> -for bzw. ZY123-for/ <i>Cla</i> -for.....	75
Abbildung 26: Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten aus der Amplifikation genomischer DNA von <i>C. thummi</i> Männchen zur molekularen Lokalisation des hemizygoten <i>Cla-Element-Clusters</i>	75
Abbildung 27: Dotplot der Sequenzen zweier PCR-Produkte aus der Amplifikation des proximalen <i>Cla-Element-Clusters</i> mit dem Primerpaar ZY123-for/ <i>Cla</i> -for.	76
Abbildung 28: Sequenz eines 1.015 bp langen PCR-Produktes im proximalen Bereich des hemizygoten <i>Cla-Element-Clusters</i> (Primerpaar ZY123-for/ <i>Cla</i> -for).....	78
Abbildung 29: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus einer Amplifikation mit weiteren distal der Integrationsstelle des <i>Cla-Element-Clusters</i> liegenden Primern.	79
Abbildung 30: Grafische Darstellung der Durchführung einer Inversen PCR im Bereich des hemizygoten <i>Cla-Element-Clusters</i> bei <i>C. thummi</i> Männchen.	81

Verzeichnisse

Abbildung 31: Erwartete Fragmente bei Hybridisierung eines Southern Blots mit HincII-restringierter genomischer DNA von <i>C. thummi</i> Männchen und Weibchen mit einer Sonde aus dem Bereich des Gens <i>dLac-DH-like</i> (rot).....	83
Abbildung 32: Autoradiogramm eines Southern Blots zur Größenbestimmung des hemizygoten <i>Cla-Element</i> -Clusters auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. thummi</i>	84
Abbildung 33: Schematische Darstellung einer Long-Range-PCR zur Amplifikation Proto-Y-chromosomaler Sequenzen zwischen dem Gen <i>fs(1)K10-like Y2</i> und dem hemizygoten <i>Cla-Element</i> -Cluster (B) sowie gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes (A)	85
Abbildung 34: Überblick über die Struktur der SDR auf dem Proto-X- und Proto-Y-Chromosom der beiden Spezies <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i>	86
Abbildung 35: RNA-Seq-Analyse für das auf dem Proto-Y-Chromosom dupliziert vorliegende Gen <i>fs(1)K10-like</i>	88
Abbildung 36: Denaturierende RNA-Gele und die dazu gehörenden Autoradiogramm von Northern Blots mit mRNA aus <i>C. thummi</i> und <i>C. piger</i> Männchen und Weibchen zum Nachweis verschiedener Transkriptvarianten des Gens <i>fs(1)K10-like</i>	90
Abbildung 37: “ <i>foldchanges</i> ” der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Männchen - Weibchen bei <i>C. thummi</i> Larven	95
Abbildung 38: “ <i>foldchanges</i> ” der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Männchen - Weibchen bei <i>C. piger</i> Larven.....	95
Abbildung 39: “ <i>foldchanges</i> ” der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Männchen - Weibchen bei <i>C. thummi</i> Embryonen.....	96
Abbildung 40: “ <i>foldchanges</i> ” der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Embryo - Larve bei <i>C. thummi</i> Männchen	97
Abbildung 41: “ <i>foldchanges</i> ” der normalisierten Expressionswerte für den Vergleich Embryo - Larve bei <i>C. thummi</i> Weibchen	98

Verzeichnisse

Abbildung 43: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen zwei Domänen im Bereich des Gens <i>viral-A-type-like</i> aus <i>C. thummi</i>	100
Abbildung 42: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen zwei Domänen im Bereich des Gens <i>viral-A-type-like</i> aus <i>C. piger</i>	100
Abbildung 44: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen die beiden geschlechtsspezifischen Spleißvarianten des Gens <i>dsx</i> aus <i>C. thummi</i>	101
Abbildung 45: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen die beiden geschlechtsspezifischen Spleißvarianten des Gens <i>dsx</i> aus <i>C. piger</i>	102
Abbildung 46: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen die Referenzsequenzen der vier <i>fs(1)K10-like</i> Transkripte aus <i>C. thummi</i> Männchen.....	103
Abbildung 47: RPKM-Werte der Kartierung embryonaler und larvaler Daten gegen die Referenzsequenzen der verschiedenen <i>fs(1)K10-like</i> Transkripte aus <i>C. piger</i> Männchen.....	104
Abbildung 48: Detailansicht der Geschlechtsbestimmenden Region von <i>C. thummi</i> , <i>C. piger</i> und <i>C. luridus</i> im Bereich des auf dem Proto-Y-Chromosoms dupliziert vorliegenden Gens <i>fs(1)K10-like</i>	107
Abbildung 49: Sequenz der <i>Cla-adjacent DNA</i> aus dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. piger</i>	111
Abbildung 50: Mögliche Entstehung der Duplikation des Gens <i>fs(1)K10-like</i> auf dem Proto-Y-Chromosom von <i>C. thummi</i> bzw. <i>C. piger</i> durch ungleiches Crossing-over.....	122
Abbildung 51: „ <i>short direct repeats</i> “ in Exon 2 des Gens <i>fs(1)K10-like X</i> von <i>C. piger</i>	124
Abbildung 52: AS-Alignment der unterschiedlichen <i>fs(1)K10-like</i> -Kopien aus den drei Spezies <i>C. thummi</i> , <i>C. piger</i> und <i>C. luridus</i>	127

Verzeichnisse

Abbildung 53: Stammbaum der unterschiedlichen Kopien des Gens <i>fs(1)K10-like</i> , abgeleitet aus dem in Abbildung 52 dargestellten Clustal Omega AS-Alignment.	128
Abbildung 54: Mögliche Funktionen für die unterschiedlichen Kopien des Gens <i>fs(1)K10-like</i> in der Geschlechtsdetermination.	132

9 LITERATURVERZEICHNIS

Abe, H.; Kanehara, M.; Terada, T.; Ohbayashi, F.; Shimada, T.; Kawai, S. et al. (1998): Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. In: *Genes & genetic systems* 73 (4), S. 243–254.

Abe, H.; Mita, K.; Yasukochi, Y.; Oshiki, T.; Shimada, T. (2005): Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. In: *Cytogenetic and genome research* 110 (1-4), S. 144–151. DOI: 10.1159/000084946.

Abe, H.; Ohbayashi, F.; Shimada, T.; Sugasaki, T.; Kawai, S.; Mita, K.; Oshiki, T. (2000): Molecular structure of a novel gypsy-Ty3-like retrotransposon (Kabuki) and nested retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm *Bombyx mori*. In: *Molecular & general genetics : MGG* 263 (6), S. 916–924.

Acton, A. B. (1957): Sex-Chromosome Inversions in *Chironomus*. In: *The American Naturalist* (91), S. 57–59.

Acton, A. B. (1959): A Study of the Differences between Widely Separated Populations of *Chironomus* (= *Tendipes*) tentans (Diptera). In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 151 (943), S. 277–296. DOI: 10.1098/rspb.1959.0064.

Akashi, H. (1994): Synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster*: natural selection and translational accuracy. In: *Genetics* 136 (3), S. 927–935.

Armitage, P. (Hg.) (1995): *The Chironomidae. The biology and ecology of non-biting midges*. London: Chapman & Hall.

Atchley, William R.; Martin, Jon (1971): A morphometric analysis of differential sexual dimorphism in larvae of *Chironomus* (Diptera). In: *Can Entomol* 103 (03), S. 319–327. DOI: 10.4039/Ent103319-3.

Balbani, E. G. (1881): Sur la structure du noyau des cellules salivaires chez les larves de *Chironomus*. In: *Zoologischer Anzeiger*, 1881 (4), S. 637–641.

Verzeichnisse

Barton, N. H.; Charlesworth, B. (1998): Why sex and recombination? In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5385), S. 1986–1990.

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

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

Beltran, M.; Puig, I.; Pena, C.; Garcia, J. M.; Alvarez, A. B.; Pena, R. et al. (2008): A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. In: *Genes & development* 22 (6), S. 756–769. DOI: 10.1101/gad.455708.

Bergero, R.; Charlesworth, D. (2009): The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. In: *Trends in Ecology & Evolution* 24 (2), S. 94–102. DOI: 10.1016/j.tree.2008.09.010.

Bernstein, M.; Cline, T. W. (1994): Differential effects of Sex-lethal mutations on dosage compensation early in *Drosophila* development. In: *Genetics* 136 (3), S. 1051–1061.

Beye, M. (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, M.; Hasselmann, M.; Fondrk, M. K.; Page, R. E.; Omholt, S. 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.

Bierwirth, Sandra (2015): Transkriptanalyse von Entwicklungsgenen mittels in situ-Hybridisierung bei *Chironomus*. Masterarbeit. Johannes-Gutenberg Universität, Mainz. IMSB.

Verzeichnisse

- Binder, Theresa (2015): Die molekulare Analyse eines DNA-Abschnittes aus der geschlechtsbestimmenden Region von *Chironomus luridus*. Bachelorarbeit. Johannes-Gutenberg Universität, Mainz. IMSB.
- Blumensatt, Marcel (2009): Klonierung und Analyse der geschlechtsbestimmenden Region von *Chironomus piger* durch in vitro Amplifikation. Diplomarbeit. Johannes-Gutenberg Universität, Mainz. IMSB.
- Blumenthal, Thomas (2004): Operons in eukaryotes. In: *Briefings in functional genomics & proteomics* 3 (3), S. 199–211.
- Blumenthal, Thomas (2005): Trans-splicing and operons. In: *WormBook : the online review of C. elegans biology*, S. 1–9. DOI: 10.1895/wormbook.1.5.1.
- Brenner, S. (1974): The genetics of *Caenorhabditis elegans*. In: *Genetics* 77 (1), S. 71–94.
- Bridges, C. B. (1921): Genetical and Cytological Proof of Non-disjunction of the Fourth Chromosome of *Drosophila Melanogaster*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 7 (7), S. 186–192.
- Bridges, Calvin B. (1916): Non-Disjunction as Proof of the Chromosome Theory of Heredity. In: *Genetics*, 1916 (1 (1)), S. 1–52.
- Brogna, S.; Ashburner, M. (1997): The Adh-related gene of *Drosophila melanogaster* is expressed as a functional dicistronic messenger RNA: multigenic transcription in higher organisms. In: *The EMBO journal* 16 (8), S. 2023–2031. DOI: 10.1093/emboj/16.8.2023.
- Bull, J.; Vogt, R. (1979): Temperature-dependent sex determination in turtles. In: *Science* 206 (4423), S. 1186–1188. DOI: 10.1126/science.505003.
- Bull, J. J. (1987): Temperature-sensitive periods of sex determination in a lizard. Similarities with turtles and crocodilians. In: *J. Exp. Zool.* 241 (1), S. 143–148. DOI: 10.1002/jez.1402410118.

Verzeichnisse

Bull, J. J.; Vogt, R. C. (1981): Temperature-sensitive periods of sex determination in Emydid turtles. In: *The Journal of experimental zoology* 218 (3), S. 435–440. DOI: 10.1002/jez.1402180315.

Bull, James J. (1983): Evolution of sex determining mechanisms. Menlo Park, Calif.: Benjamin/Cummings (Evolution series, 1).

Bulnheim, Hans-Peter (1965): Untersuchungen über Intersexualität bei *Gammarus duebeni* (Crustacea, Amphipoda). In: *Helgolander Wiss. Meeresunters* 12 (4), S. 349–394. DOI: 10.1007/BF01612560.

Burghardt, G.; Hediger, M.; Siegenthaler, C.; Moser, M.; Dübendorfer, A.; Bopp, D. (2005): The transformer2 gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. In: *Development genes and evolution* 215 (4), S. 165–176. DOI: 10.1007/s00427-004-0464-7.

Burmester, Thorsten; Hankeln, Thomas (2007): The respiratory proteins of insects. In: *Journal of insect physiology* 53 (4), S. 285–294. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2006.12.006.

Cameron, Rosannah C.; Duncan, Elizabeth J.; Dearden, Peter K. (2013): Stable reference genes for the measurement of transcript abundance during larval caste development in the honeybee. In: *Apidologie* 44 (4), S. 357–366. DOI: 10.1007/s13592-012-0187-0.

Capy, Pierre (1997): Evolution and Impact of Transposable Elements. Dordrecht: Springer Netherlands; Imprint; Springer (Contemporary Issues in Genetics and Evolution, 0929-712X, 6).

Charlesworth, B. (1989): The evolution of sex and recombination. In: *Trends in Ecology & Evolution* 4 (9), S. 264–267. DOI: 10.1016/0169-5347(89)90196-1.

Charlesworth, B. (1996): The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. In: *Current biology : CB* 6 (2), S. 149–162.

Verzeichnisse

- Charlesworth, B.; Betancourt, A. J.; Kaiser, V. B.; Gordo, I. (2009): Genetic recombination and molecular evolution. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 74, S. 177–186. DOI: 10.1101/sqb.2009.74.015.
- Charlesworth, B.; Charlesworth, D. (2000): The degeneration of Y chromosomes. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 355 (1403), S. 1563–1572. DOI: 10.1098/rstb.2000.0717.
- Charlesworth, D.; Charlesworth, B.; Marais, G. (2005): Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. In: *Heredity* 95 (2), S. 118–128. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800697.
- Charnier, M. (1966): Action de la température sur la sex-ratio chez l'embryon d'Agama agama (Agamidae, Lacertilien). In: *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales* 160 (3), S. 620–622.
- Cho, S.; Huang, Z. Y.; Zhang, J. (2007): Sex-specific splicing of the honeybee doublesex gene reveals 300 million years of evolution at the bottom of the insect sex-determination pathway. In: *Genetics* 177 (3), S. 1733–1741. DOI: 10.1534/genetics.107.078980.
- Clemens, M. (1987): Translational control. Developments in development. In: *Nature* 330 (6150), S. 699–700. DOI: 10.1038/330699a0.
- Cline, T. W. (1978): Two closely linked mutations in *Drosophila melanogaster* that are lethal to opposite sexes and interact with daughterless. In: *Genetics* 90 (4), S. 683–698.
- Cline, T. W. (1983): The interaction between daughterless and sex-lethal in triploids: a lethal sex-transforming maternal effect linking sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*. In: *Developmental biology* 95 (2), S. 260–274.
- Cline, T. W. (1984): Autoregulatory functioning of a *Drosophila* gene product that establishes and maintains the sexually determined state. In: *Genetics* 107 (2), S. 231–277.

Cline, T. W. (1993): The *Drosophila* sex determination signal: how do flies count to two? In: *Trends in genetics : TIG* 9 (11), S. 385–390.

Comeron, J. M.; Williford, A.; Kliman, R. M. (2008): The Hill-Robertson effect: evolutionary consequences of weak selection and linkage in finite populations. In: *Heredity* 100 (1), S. 19–31. DOI: 10.1038/sj.hdy.6801059.

Concha, C.; Scott, M. 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.

Cortez, D.; Marin, R.; Toledo-Flores, D.; Froidevaux, L.; Liechti, A.; Waters, P. D. et al. (2014): Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. In: *Nature* 508 (7497), S. 488–493. DOI: 10.1038/nature13151.

Credland, Peter F. (1973): The taxonomic status of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus thummi* Kieffer (Diptera: Chironomidae). In: *Journal of Natural History*, 1973 (7/2).

Cristino, A. S.; Am Nascimento; Costa, Lda F.; Simoes, Z. L. (2006): A comparative analysis of highly conserved sex-determining genes between *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. In: *Genetics and molecular research : GMR* 5 (1), S. 154–168.

Deatrick, J.; Daly, M.; Randsholt, N. B.; Brock, H. W. (1991): The complex genetic locus polyhomeotic in *Drosophila melanogaster* potentially encodes two homologous zinc-finger proteins. In: *Gene* 105 (2), S. 185–195.

DeCamillis, M.; Cheng, N. S.; Pierre, D.; Brock, H. W. (1992): The polyhomeotic gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with Polycomb. In: *Genes & development* 6 (2), S. 223–232.

Denhardt, D. T. (1966): A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. In: *Biochemical and biophysical research communications* 23 (5), S. 641–646.

Verzeichnisse

Denholm, I.; Franco, M. G.; Rubini, P. G.; Vecchi, M. (1983): Identification of a male determinant on the X chromosome of housefly (*Musca domestica* L.) populations in South-East England. In: *Genet. Res.* 42 (03), S. 311. DOI: 10.1017/S0016672300021790.

Dimitri, P.; Pisano, C. (1989): Position effect variegation in *Drosophila melanogaster*: relationship between suppression effect and the amount of Y chromosome. In: *Genetics* 122 (4), S. 793–800.

Dower, W. J.; Miller, J. F.; Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. In: *Nucleic acids research* 16 (13), S. 6127–6145.

Dübendorfer, A.; Hediger, M. (1998): The female-determining gene F of the housefly, *Musca domestica*, acts maternally to regulate its own zygotic activity. In: *Genetics* 150 (1), S. 221–226.

Dübendorfer, A.; Hediger, M.; Burghardt, G.; Bopp, D. (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.

Dura, J. M.; Randsholt, N. B.; Deatrick, J.; Erk, I.; Santamaria, P.; Freeman, J. D. et al. (1987): A complex genetic locus, polyhomeotic, is required for segmental specification and epidermal development in *D. melanogaster*. In: *Cell* 51 (5), S. 829–839.

Elgin, Sarah C. R.; Reuter, Gunter (2013): Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (8), S. a017780. DOI: 10.1101/cshperspect.a017780.

Ellegren, H.; Parsch, J. (2007): The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. In: *Nature reviews. Genetics* 8 (9), S. 689–698. DOI: 10.1038/nrg2167.

Verzeichnisse

Ennis, T. J.; Sohi, S. S. (1976): Chromosomal characterisation of five lepidopteran cell lines of *Malacosoma disstria* (Lasiocampidae) and *Christoneura fumiferana* (Tortricidae). In: *Canadian journal of genetics and cytology. Journal canadien de génétique et de cytologie* 18 (3), S. 471–477.

Feinberg, A. P.; Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. In: *Analytical biochemistry* 132 (1), S. 6–13.

Force, A.; Lynch, M.; Pickett, F. B.; Amores, A.; Yan, Y. L.; Postlethwait, J. (1999): Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. In: *Genetics* 151 (4), S. 1531–1545.

Funke, Elisabeth (2011): Charakterisierung und Analse der geschlechtsbestimmenden Region von *Chironomus riparius*. Dissertation. Johannes-Gutenberg Universität, Mainz. IMSB.

Gempe, T.; Hasselmann, M.; Schiott, M.; Hause, G.; Otte, M.; Beye, M. (2009): Sex determination in honeybees: two separate mechanisms induce and maintain the female pathway. In: *PLoS biology* 7 (10), S. e1000222. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000222.

Gerbracht, Jennifer (2014): Molekulare Analse des transformer-2 Gens in *Chironomus*. Bachelorarbeit. Johannes-Gutenberg Universität, Mainz. IMSB.

Geuverink, E.; Beukeboom, L. W. (2014): Phylogenetic distribution and evolutionary dynamics of the sex determination genes doublesex and transformer in insects. In: *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation* 8 (1-3), S. 38–49. DOI: 10.1159/000357056.

Grant, S. G.; Jessee, J.; Bloom, F. R.; Hanahan, D. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12), S. 4645–4649.

Verzeichnisse

Grantham, R.; Gautier, C.; Gouy, M.; Mercier, R.; Pavé, A. (1980): Codon catalog usage and the genome hypothesis. In: *Nucleic acids research* 8 (1), S. r49-r62.

Green, M. M. (1980): Transposable elements in *Drosophila* and other Diptera. In: *Annual review of genetics* 14, S. 109–120. DOI: 10.1146/annurev.ge.14.120180.000545.

Grunstein, M.; Hogness, D. S. (1975): Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (10), S. 3961–3965.

Hägele, K. (1985): Identification of a polytene chromosome band containing a male sex determiner of *Chironomus thummi thummi*. In: *Chromosoma* 91 (3-4), S. 167–171.

Hall, A. B.; Basu, S.; Jiang, X.; Qi, Y.; Timoshevskiy, V. A.; Biedler, J. K. et al. (2015): 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.

Hankeln, T.; Rozynek, P.; Schmidt, E. R. (1988): The nucleotide sequence and in situ localization of a gene for a dimeric haemoglobin from the midge *Chironomus thummi piger*. In: *Gene* 64 (2), S. 297–304.

Hankeln, T.; Schmidt, E. R. (1987): Cotransposition of a highly repetitive DNA element with flanking sequences in the genome of the midge *Chironomus thummi*. In: *Journal of molecular evolution* 26 (4), S. 311–319.

Hasselmann, M.; Beye, M. (2004): Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (14), S. 4888–4893. DOI: 10.1073/pnas.0307147101.

Hasselmann, M.; Gempe, T.; Schiott, M.; Nunes-Silva, C. G.; Otte, M.; Beye, M. (2008): Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. In: *Nature* 454 (7203), S. 519–522. DOI: 10.1038/nature07052.

Verzeichnisse

Hediger, M.; Burghardt, G.; Siegenthaler, C.; Buser, N.; Hilfiker-Kleiner, D.; Dübendorfer, A.; Bopp, D. (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, M.; Henggeler, C.; Meier, N.; Perez, R.; Saccone, G.; Bopp, D. (2010): Molecular characterization of the key switch F provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. In: *Genetics* 184 (1), S. 155–170. DOI: 10.1534/genetics.109.109249.

Hediger, M.; Niessen, M.; Muller-Navia, J.; Nothiger, R.; Dübendorfer, A. (1998): Distribution of heterochromatin on the mitotic chromosomes of *Musca domestica* L. in relation to the activity of male-determining factors. In: *Chromosoma* 107 (4), S. 267–271.

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.

Hempel, Leonie U.; Oliver, Brian (2007): Sex-specific DoublesexM expression in subsets of *Drosophila* somatic gonad cells. In: *BMC developmental biology* 7, S. 113. DOI: 10.1186/1471-213X-7-113.

Herold, Thomas (2012): Vergleichende Analyse der Gene und der Genomstruktur der geschlechtsbestimmenden Chromosomenregion von *Chironomus* und *Camptochironomus*. Dissertation. Johannes-Gutenberg Universität, Mainz. IMSB.

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

Hodgkin, J. (1992): Genetic sex determination mechanisms and evolution. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 14 (4), S. 253–261. DOI: 10.1002/bies.950140409.

Verzeichnisse

Hodgkin, Jonathan (1983): Two types of sex determination in a nematode. In: *Nature* 304 (5923), S. 267–268. DOI: 10.1038/304267a0.

Hodgkin, Jonathan (2002): The remarkable ubiquity of DM domain factors as regulators of sexual phenotype: ancestry or aptitude? In: *Genes & development* 16 (18), S. 2322–2326. DOI: 10.1101/gad.1025502.

Hongay, Cintia F.; Grisafi, Paula L.; Galitski, Timothy; Fink, Gerald R. (2006): Antisense transcription controls cell fate in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Cell* 127 (4), S. 735–745. DOI: 10.1016/j.cell.2006.09.038.

Hurst, L. D.; Peck, J. R. (1996): Recent advances in understanding of the evolution and maintenance of sex. In: *Trends in Ecology & Evolution* 11 (2), S. 46–52.

Inoue, H.; Hiroyoshi, T. (1986): A Maternal-Effect Sex-Transformation Mutant of the Housefly, *MUSCA DOMESTICA* L. In: *Genetics* 112 (3), S. 469–482.

Israelewski, N.; Schmidt, E. R. (1982): Spacer size heterogeneity in ribosomal DNA of *Chironomus thummi* is due to a 120 bp repeat homologous to a predominantly centromeric repeated sequence. In: *Nucleic acids research* 10 (23), S. 7689–7700.

Janzen, F. J.; Paukstis, G. L. (1991): Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. In: *The Quarterly review of biology* 66 (2), S. 149–179.

Kaiser, Vera B.; Bachtrog, Doris (2010): Evolution of sex chromosomes in insects. In: *Annual review of genetics* 44, S. 91–112. DOI: 10.1146/annurev-genet-102209-163600.

Kawaoka, Shinpei; Kadota, Koji; Arai, Yuji; Suzuki, Yutaka; Fujii, Tsuguru; Abe, Hiroaki et al. (2011): The silkworm W chromosome is a source of female-enriched piRNAs. In: *RNA (New York, N.Y.)* 17 (12), S. 2144–2151. DOI: 10.1261/rna.027565.111.

Verzeichnisse

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, S. 4611. DOI: 10.1038/ncomms5611.

Keyes, L. N.; Cline, T. W.; Schedl, P. (1992): The primary sex determination signal of *Drosophila* acts at the level of transcription. In: *Cell* 68 (5), S. 933–943.

Keyl, H.-G. (1959): Die cytologische Diagnostik der Chironomiden. I. Bestimmungstabelle für die Gattung *Chironomus* auf Grund der Speicheldrüsen-Chromosomen. In: *Arch. f. Hydrobiol.* 1959, 1959 (56), S. 43–57.

Keyl, H.-G. (1961): Chromosomenevolution bei *Chironomus* I. In: *Chromosoma* 12 (1), S. 26–47. DOI: 10.1007/BF00328912.

Keyl, H.-G. (1962): Chromosomenevolution bei *Chironomus* II. 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.

Kieffer, J.-J.: Nouvelles descriptions de Chironomides obtenus d'éclosion: P. Even.

Kim, Chongwoo A.; Sawaya, Michael R.; Cascio, Duilio; Kim, Woojae; Bowie, James U. (2005): Structural organization of a Sex-comb-on-midleg/polyhomeotic copolymer. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (30), S. 27769–27775. DOI: 10.1074/jbc.M503055200.

Kiuchi, Takashi; Koga, Hikaru; Kawamoto, Munetaka; Shoji, Keisuke; Sakai, Hiroki; Arai, Yuji et al. (2014): A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. In: *Nature* 509 (7502), S. 633–636. DOI: 10.1038/nature13315.

Koch, Vasco; Nissen, Inga; Schmitt, Bjorn D.; Beye, Martin (2014): Independent evolutionary origin of fem paralogous genes and complementary sex determination in hymenopteran insects. In: *PloS one* 9 (4), S. e91883. DOI: 10.1371/journal.pone.0091883.

Kraemer, Christiane; Schmidt, Erwin 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. DOI: 10.1007/BF00368348.

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, S. 819. DOI: 10.1186/1471-2164-15-819.

Lagerkvist, U. (1978): "Two out of three": an alternative method for codon reading. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (4), S. 1759–1762.

Lagos, D.; Koukidou, M.; Savakis, C.; Komitopoulou, K. (2007): The transformer gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. In: *Insect molecular biology* 16 (2), S. 221–230. DOI: 10.1111/j.1365-2583.2006.00717.x.

Liu, Guiqing; Wu, Qiang; Li, Jianwei; Zhang, Guifen; Wan, Fanghao (2015): RNAi-Mediated Knock-Down of transformer and transformer 2 to Generate Male-Only Progeny in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). In: *PloS one* 10 (6), S. e0128892. DOI: 10.1371/journal.pone.0128892.

Lodi, T.; Ferrero, I. (1993): Isolation of the DLD gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. In: *Molecular & general genetics : MGG* 238 (3), S. 315–324.

Lodi, T.; O'Connor, D.; Goffrini, P.; Ferrero, I. (1994): Carbon catabolite repression in *Kluyveromyces lactis*: isolation and characterization of the KIDL gene encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. In: *Molecular & general genetics : MGG* 244 (6), S. 622–629.

Mackensen, Otto (1955): Further studies on a lethal series in the honey bee. In: *Journal of heredity*, 1955.

Verzeichnisse

- Marin, I.; Siegal, M. L.; Baker, B. S. (2000): The evolution of dosage-compensation mechanisms. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 22 (12), S. 1106–1114. DOI: 10.1002/1521-1878(200012)22:12<1106::AID-BIES8>3.0.CO;2-W.
- Martin, J.; Lee, B. T.O.; Conner, E. (1978): Apparent Incipient speciation in the midge *Chironomus oppositus* Walker (Diptera, Chironomidae). In: *Aust. J. Zool.* 26 (2), S. 323. DOI: 10.1071/ZO9780323.
- Martin, Jon (1974): A review of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae). In: *Chromosoma* 45 (1). DOI: 10.1007/BF00283832.
- 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. (1984): A phylogenetic study of sex determiner location in a group of Australasian *Chironomus* species (Diptera, Chironomidae). In: *Chromosoma* 90 (3), S. 190–197. DOI: 10.1007/BF00292396.
- Martin, Jon; Wülker, W. (1971): Inversion polymorphism in *Chironomus staegeri* Lundbeck. In: *Can. J. Genet. Cytol.* 13 (2), S. 306–321. DOI: 10.1139/g71-050.
- Maynard Smith, John (1978): *The evolution of sex*. Cambridge: Univ. Press. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy1407/77085689-d.html>.
- 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. DOI: 10.1093/aesa/71.5.692.
- Meigen, J. W. (1804): *Klassifikation und Beschreibung der europäischen zweiflügeligen Insekten* (Diptera, Linn.). Braunschweig: K. Reichard (1).
- Mesa, A.; Mesa, R. S. de (1967): Complex sex-determining mechanisms in three species of South American grasshoppers (Orthoptera, Acridoidea). In: *Chromosoma* 21 (2), S. 163–180. DOI: 10.1007/BF00343642.

Verzeichnisse

Miller, W. J.; McDonald, J. F.; Pinsker, W. (1997): Molecular domestication of mobile elements. In: *Genetica* 100 (1-3), S. 261–270.

Mills, James Dominic; Kawahara, Yoshihiro; Janitz, Michael (2013): Strand-Specific RNA-Seq Provides Greater Resolution of Transcriptome Profiling. In: *Current genomics* 14 (3), S. 173–181. DOI: 10.2174/1389202911314030003.

Misra, Sima; Crosby, Madeline A.; Mungall, Christopher J.; Matthews, Beverley B.; Campbell, Kathryn S.; Hradecky, Pavel et al. (2002): Annotation of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome. A systematic review. In: *Genome Biol* 3 (12), S. research0083.1. DOI: 10.1186/gb-2002-3-12-research0083.

Moazed, Danesh (2009): Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. In: *Nature* 457 (7228), S. 413–420. DOI: 10.1038/nature07756.

Mortazavi, Ali; Williams, Brian A.; McCue, Kenneth; Schaeffer, Lorian; Wold, Barbara (2008): Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. In: *Nature methods* 5 (7), S. 621–628. DOI: 10.1038/nmeth.1226.

Muller, H.-J. (1918): Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids, in a case of balanced lethal factors. In: *Genetics*, 1918.

Nanda, Indrajit; Kondo, Mariko; Hornung, Ute; Asakawa, Shuichi; Winkler, Christoph; Shimizu, Atsushi et al. (2002): A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (18), S. 11778–11783. DOI: 10.1073/pnas.182314699.

Nei, M. (1969): Linkage modifications and sex difference in recombination. In: *Genetics* 63 (3), S. 681–699.

Nowak, Carsten; Hankeln, Thomas; Schmidt, Erwin R.; Schwenk, Klaus (2006): Development and localization of microsatellite markers for the sibling species *Chironomus riparius* and *Chironomus piger* (Diptera Chironomidae). In: *Mol Ecol Notes* 6 (3), S. 915–917. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2006.01398.x.

Ohno, Susumu (1967): Sex chromosomes and sex-linked genes. Berlin, New York: Springer (Monographs on endocrinology, v. 1).

Oliver, D. R. (1971): Life History of the Chironomidae. In: *Annu. Rev. Entomol.* 16 (1), S. 211–230. DOI: 10.1146/annurev.en.16.010171.001235.

Osato, Naoki; Suzuki, Yoshiyuki; Ikeo, Kazuho; Gojobori, Takashi (2007): Transcriptional interferences in cis natural antisense transcripts of humans and mice. In: *Genetics* 176 (2), S. 1299–1306. DOI: 10.1534/genetics.106.069484.

Pane, Attilio; Salvemini, Marco; Delli Bovi, Pasquale; Polito, Catello; Saccone, Giuseppe (2002): The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. In: *Development (Cambridge, England)* 129 (15), S. 3715–3725.

Parkhurst, S. M.; Ish-Horowicz, D. (1992): Common denominators for sex. In: *Current biology : CB* 2 (12), S. 629–631.

Paterno, G. D.; Li, Y.; Luchman, H. A.; Ryan, P. J.; Gillespie, L. L. (1997): cDNA cloning of a novel, developmentally regulated immediate early gene activated by fibroblast growth factor and encoding a nuclear protein. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (41), S. 25591–25595.

Paterno, G. D.; Mercer, F. C.; Chayter, J. J.; Yang, X.; Robb, J. D.; Gillespie, L. L. (1998): Molecular cloning of human er1 cDNA and its differential expression in breast tumours and tumour-derived cell lines. In: *Gene* 222 (1), S. 77–82.

Pinder, L. C. V. (1986): Biology of Freshwater Chironomidae. In: *Annu. Rev. Entomol.* 31 (1), S. 1–23. DOI: 10.1146/annurev.en.31.010186.000245.

Pontier, Daphne B.; Gribnau, Joost (2011): Xist regulation and function explored. In: *Human genetics* 130 (2), S. 223–236. DOI: 10.1007/s00439-011-1008-7.

Radder, Rajkumar S.; Pike, David A.; Quinn, Alexander E.; Shine, Richard (2009): Offspring sex in a lizard depends on egg size. In: *Current biology : CB* 19 (13), S. 1102–1105. DOI: 10.1016/j.cub.2009.05.027.

- Raymond, C. S.; Shamu, C. E.; Shen, M. M.; Seifert, K. J.; Hirsch, B.; Hodgkin, J.; Zarkower, D. (1998): Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. In: *Nature* 391 (6668), S. 691–695. DOI: 10.1038/35618.
- Rempel, J. G.; Naylor, J. M.; Rothfels, K.; Otonen, B. (1962): The sex chromosome constitution of chironomid intersexes parasitized by nematodes. In: *Canadian journal of genetics and cytology. Journal canadien de genetique et de cytologie* 4, S. 92–96.
- Retelska, Dorota; Iseli, Christian; Bucher, Philipp; Jongeneel, C. Victor; Naef, Felix (2006): Similarities and differences of polyadenylation signals in human and fly. In: *BMC genomics* 7, S. 176. DOI: 10.1186/1471-2164-7-176.
- Rinn, John L.; Kertesz, Michael; Wang, Jordon K.; Squazzo, Sharon L.; Xu, Xiao; Bruggmann, Samantha A. et al. (2007): Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. In: *Cell* 129 (7), S. 1311–1323. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.022.
- Rogozin, Igor B.; Pavlov, Youri I. (2003): Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. In: *Mutation research* 544 (1), S. 65–85.
- Rosin, S.; Fischer, J. (1972): Polymorphism of male realization in Chironomus. In: *Revue suisse de zoologie; annales de la Societe zoologique suisse et du Museum d'histoire naturelle de Geneve*, S. Suppl:119-41.
- 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.
- Ryner, L. C.; Baker, B. S. (1991): Regulation of doublesex pre-mRNA processing occurs by 3'-splice site activation. In: *Genes & development* 5 (11), S. 2071–2085.
- Sahara, Ken; Yoshido, Atsuo; Traut, Walther (2012): Sex chromosome evolution in moths and butterflies. In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 20 (1), S. 83–94. DOI: 10.1007/s10577-011-9262-z.

Verzeichnisse

- 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.
- Schaefer, J.; Schmidt, E. R. (1981): Different repetition frequencies of a 120 base-pair DNA-element and its arrangement in *Chironomus thummi thummi* and *Chironomus thummi piger*. In: *Chromosoma* 84 (1), S. 61–66.
- Scharlaken, Bieke; Graaf, Dirk C. de; Goossens, Karen; Brunain, Marleen; Peelman, Luc J.; Jacobs, Frans J. (2008): Reference Gene Selection for Insect Expression Studies Using Quantitative Real-Time PCR. The Head of the Honeybee, *Apis mellifera*, After a Bacterial Challenge. In: *Journal of Insect Science* 8 (33), S. 1–10. DOI: 10.1673/031.008.3301.
- 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.; Godwin, E. A. (1983): The nucleotide sequence of an unusual non-transcribed spacer and its ancestor in the rDNA in *Chironomus thummi*. In: *The EMBO journal* 2 (7), S. 1177–1183.
- 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, R.; Hediger, M.; Roth, S.; Nothiger, R.; Dübendorfer, A. (1997): The Y-chromosomal and autosomal male-determining M factors of *Musca domestica* are equivalent. In: *Genetics* 147 (1), S. 271–280.
- Schrank, Ralf (2000): Tandem repetitive DNA: Stabilität und Wirkung auf die Genexpression im transgenen System. Dissertation. Johannes-Gutenberg Universität, Mainz. IMSB. Online verfügbar unter <http://ubm.opus.hbz-nrw.de/volltexte/2000/19/>.

Verzeichnisse

Schütt, C.; Nöthiger, R. (2000): Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. In: *Development (Cambridge, England)* 127 (4), S. 667–677.

Sharp, P. M.; Li, W. H. (1989): On the rate of DNA sequence evolution in *Drosophila*. In: *Journal of molecular evolution* 28 (5), S. 398–402.

Shen, M. M.; Hodgkin, J. (1988): *mab-3*, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. In: *Cell* 54 (7), S. 1019–1031.

Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *Journal of molecular biology* 98 (3), S. 503–517. DOI: 10.1016/S0022-2836(75)80083-0.

Spieth, J.; Brooke, G.; Kuersten, S.; Lea, K.; Blumenthal, T. (1993): Operons in *C. elegans*: polycistronic mRNA precursors are processed by trans-splicing of SL2 to downstream coding regions. In: *Cell* 73 (3), S. 521–532.

Steinemann, S.; Steinemann, M. (2001): Biased distribution of repetitive elements: a landmark for neo-Y chromosome evolution in *Drosophila miranda*. In: *Cytogenetics and cell genetics* 93 (3-4), S. 228–233.

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

Suzuki, M. G.; Ohbayashi, F.; Mita, K.; Shimada, T. (2001): The mechanism of sex-specific splicing at the doublesex gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. In: *Insect biochemistry and molecular biology* 31 (12), S. 1201–1211.

Suzuki, Masataka G.; Funaguma, Shunsuke; Kanda, Toshio; Tamura, Toshiki; Shimada, Toru (2003): Analysis of the biological functions of a doublesex homologue in *Bombyx mori*. In: *Development genes and evolution* 213 (7), S. 345–354. DOI: 10.1007/s00427-003-0334-8.

Taenzler, Verena; Bruns, Eric; Dorgerloh, Michael; Pfeifle, Verena; Weltje, Lennart (2007): Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. In: *Ecotoxicology (London, England)* 16 (1), S. 221–230. DOI: 10.1007/s10646-006-0117-x.

Thompson, P. E.; Bowen, J. S. (1972): Interactions of differentiated primary sex factors in *Chironomus tentans*. In: *Genetics* 70 (3), S. 491–493.

Thompson, Peter E. (1971): Male and female heterogamety in populations of *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae). In: *Can Entomol* 103 (03), S. 369–372. DOI: 10.4039/Ent103369-3.

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.

Tufarelli, Cristina; Stanley, Jackie A. Sloane; Garrick, David; Sharpe, Jackie A.; Ayyub, Helena; Wood, William G.; Higgs, Douglas R. (2003): Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. In: *Nature genetics* 34 (2), S. 157–165. DOI: 10.1038/ng1157.

Ullerich, Fritz-Helmut (1975): Identifizierung der genetischen Geschlechtschromosomen bei der monogenen Schmeißfliege *Chrysomya rufifacies* (Calliphoridae, Diptera). In: *Chromosoma* 50 (4), S. 393–419. DOI: 10.1007/BF00327076.

Valcárcel, J.; Singh, R.; Zamore, P. D.; Green, M. R. (1993): The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of transformer pre-mRNA. In: *Nature* 362 (6416), S. 171–175. DOI: 10.1038/362171a0.

Verhulst, Eveline C.; Beukeboom, Leo W.; van de Zande, Louis (2010a): Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. In: *Science (New York, N.Y.)* 328 (5978), S. 620–623. DOI: 10.1126/science.1185805.

Verzeichnisse

Verhulst, Eveline C.; van de Zande, Louis; Beukeboom, Leo W. (2010b): 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.

Vicoso, Beatriz; Bachtrog, Doris (2015): Numerous transitions of sex chromosomes in Diptera. In: *PLoS biology* 13 (4), S. e1002078. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002078.

Vivancos, Ana P.; Guell, Marc; Dohm, Juliane C.; Serrano, Luis; Himmelbauer, Heinz (2010): Strand-specific deep sequencing of the transcriptome. In: *Genome research* 20 (7), S. 989–999. DOI: 10.1101/gr.094318.109.

Wagoner, Dale E. (1969): Presence of Male Determining Factors found on Three Autosomes in the House Fly, *Musca domestica*. In: *Nature* 223 (5202), S. 187–188. DOI: 10.1038/223187a0.

Warner, Daniel A.; Radder, Rajkumar S.; Shine, Richard (2009): Corticosterone exposure during embryonic development affects offspring growth and sex ratios in opposing directions in two lizard species with environmental sex determination. In: *Physiological and biochemical zoology : PBZ* 82 (4), S. 363–371. DOI: 10.1086/588491.

Weber, R. E.; Braunitzer, G.; Kleinschmidt, T. (1985): Functional multiplicity and structural correlations in the hemoglobin system of larvae of *Chironomus thummi thummi* (Insecta, Diptera): Hb components CTT I, CTT II beta, CTT III, CTT IV, CTT VI, CTT VIIB, CTT IX and CTT X. In: *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 80 (4), S. 747–753.

Weill, Laure; Belloc, Eulalia; Bava, Felice-Alessio; Mendez, Raul (2012): Translational control by changes in poly(A) tail length: recycling mRNAs. In: *Nature structural & molecular biology* 19 (6), S. 577–585. DOI: 10.1038/nsmb.2311.

Werner, Andreas (2013): Biological functions of natural antisense transcripts. In: *BMC biology* 11, S. 31. DOI: 10.1186/1741-7007-11-31.

White, M. J. D. (1977): *Animal cytology and evolution*. 3. ed. Cambridge: Univ. Press.

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.

Wu, J.; Grindlay, G. J.; Bushel, P.; Mendelsohn, L.; Allan, M. (1990): Negative regulation of the human epsilon-globin gene by transcriptional interference: role of an Alu repetitive element. In: *Molecular and cellular biology* 10 (3), S. 1209–1216.

Wülker, W.; Götz, P. (1968): Die Verwendung der Imaginalscheiben zur Bestimmung des Entwicklungszustandes von Chironomus-Larven. In: *Zeitschrift für Morphologie der Tiere*, 1968.

Wülker, W.; Klötzli, A. M. (1973): Revision der Gattung *Chironomus* Meig. IV. Arten des *Lacunarius*-(*commutatus*-) Komplexes. *Archiv für Hydrobiologie*. *Arch Hydrobiol* Oct 1973, 72 (4) p. 474-489. In: *Archiv für Hydrobiologie* 72 (4), 1973, S. 474–489.

Yang, Qingpo; Li, Zhen; Cao, Jinjun; Zhang, Songdou; Zhang, Huaijiang; Wu, Xiaoyun et al. (2014): Selection and assessment of reference genes for quantitative PCR normalization in migratory locust *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). In: *PloS one* 9 (6), S. e98164. DOI: 10.1371/journal.pone.0098164.

Yap, Kyoko L.; Li, Side; Munoz-Cabello, Ana M.; Raguz, Selina; Zeng, Lei; Mujtaba, Shiraz et al. (2010): Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of *INK4a*. In: *Molecular cell* 38 (5), S. 662–674. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.021.

Zhang, Jianzhi (2003): Evolution by gene duplication. An update. In: *Trends in Ecology & Evolution* 18 (6), S. 292–298. DOI: 10.1016/S0169-5347(03)00033-8.

10 SUPPORTING INFORMATION

Alle hier angegebenen und beschriebenen Dateien befinden sich im beigefügten elektronischen Anhang.

- Alle Bilddateien
- Referenzsequenzen der SDR von *C. thummi*, *C. piger*, und *C. luridus* (jeweils Proto-X- und Proto-Y-Chromosom) als GBK- und fasta-Datei
- Auswertung aller pUC-Klone als Excel-Tabelle
- Auswertung der „*foldchange*“- und Expressionsanalyse als Excel-Tabelle
- Liste aller verwendeten Primer als Excel-Tabelle
- Sequenz aller Primer als fasta-Datei
- Liste der verwendeten Sonden als Excel-Tabelle
- Digitale Version dieser Arbeit als Word- und pdf-Datei

