

Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
6500 Mainz

DR. HEINZ SASS

REGELMECHANISMEN UND DETERMINANTEN  
DER  
TRANSKRIPTION IN POLYTÄNCHROMOSOMEN  
VON  
CHIRONOMUS UND DROSOPHILA

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

## Teil I

Seite

Regelmechanismen und Determinanten der  
Transkription in Polytänchromosomen von  
Chironomus und Drosophila

Zusammenfassung zur kumulativen  
Habilitationseistung

1 - 51

## Teil II

Veröffentlichte Schriften zum Thema:

Regelmechanismen und Determinanten der  
Transkription in Polytänchromosomen von  
Chironomus und Drosophila

1. RNA polymerase in polytene chromo-  
somes: immunofluorescent and autora-  
diographic analysis during stimulated  
and repressed RNA synthesis

Sass, H. (1982) Cell **28**: 269-278

52

2. Gene identification in polytene  
chromosomes: some Balbiani ring 2  
gene sequences are located in an  
interband-like region of  
Chironomus tentans

Sass, H. (1984) Chromosoma **90**: 20-25

62

3. Transcription-dependent localization of U1 and U2 small nuclear ribonucleo-proteins at major sites of gene activity in polytene chromosomes  
Sass, H., and Pederson, T. (1984)  
*J. Mol. Biol.* 180: 911-926 68
4. Hsp82-neo transposition vectors to study insertional mutagenesis in Drosophila melanogaster and tissue culture cells  
Sass, H. (1989)  
*Nucleic Acids Res.* 17: 10508 85
5. P-transposable vectors expressing a constitutive and thermoinducible hsp82-neo fusion gene for Drosophila germline transformation and tissue-culture transfection  
Sass, H. (1990) *Gene* 89: 179-186 86
6. Dosage compensation of the pseudoobscura hsp82 gene and the melanogaster Adh gene at ectopic sites in Drosophila melanogaster  
Sass, H., and Meselson, M. (1991)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Im Druck) 94
- Teil III Liste aller veröffentlichten Schriften 120

## **Habilitationsschrift: Originalveröffentlichung (Druckversion) versus Online-Netzpublikation**

**Teil I** und **Teil III** der Habilitationsschrift „Regelmechanismen und Determinanten der Transkription in Polytänchromosomen von Chironomus und Drosophila“ sind in beiden Veröffentlichungen identisch. Abweichend von der Originalveröffentlichung wurden in **Teil II** für die Online-Netzpublikation der Habilitationsschrift die 6 veröffentlichten Schriften auf den Seiten 52-119 entfernt, da die jeweiligen Verlage die Verbreitungsrechte für die Publikationen besitzen.

Daher sind die Angaben für **Teil II** in der Online-Netzpublikation der Habilitationsschrift dahingehend modifiziert, dass die URLs dieser Publikationen im Internet als Zugriffsadresse für ihre Identifikation und Referenzierung aufgenommen wurden. Somit sind die 6 veröffentlichten Schriften online sofort recherchierbar und benutzbar:

[Sass, H. (1982), Cell 28: 269-278]. *RNA polymerase B in polytene chromosomes: Immunofluorescent and autoradiographic analysis during stimulated and repressed RNA synthesis* <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867482903452>

[Sass, H. (1984), Chromosoma 90: 20-25]. *Gene identification in polytene chromosomes: some Balbiani ring 2 gene sequences are located in an interband-like region of Chironomus tentans* <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF00352274>

[Sass, H. and Pederson, T. (1984), J. Mol. Biol. 180: 911-926]. *Transcription-dependent localization of U1 and U2 small nuclear ribonucleoproteins at major sites of gene activity in polytene chromosomes* <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283684902638>

[Sass, H. (1989), Nucleic Acids Research 17: 10508]. *Hsp82-neo transposition vectors to study insertional mutagenesis in Drosophila melanogaster and tissue culture cells* <http://nar.oxfordjournals.org/content/17/24/10508.full.pdf>

[Sass, H. (1990), Gene 89: 179-186]. *P-transposable vectors expressing a constitutive and thermoinducible hsp82-neo fusion gene for Drosophila germline transformation and tissue-culture transfection* <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/03781199090004B>

[Sass, H. and Meselson, M. (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6795-6799]. *Dosage compensation of the Drosophila pseudoobscura Hsp82 gene and the Drosophila melanogaster Adh gene at ectopic sites in D. melanogaster* <http://www.pnas.org/content/88/15/6795.full.pdf>

## **Habilitationsurkunde**

Abweichend von der Druckausgabe der Originalversion der Habilitationsschrift „Regelmechanismen und Determinanten der Transkription in Polytänchromosomen von Chironomus und Drosophila“ wurde die Habilitationsurkunde in die Online-Netzpublikation zur Vervollständigung der Habilitationsdaten und für den Dokumentzugriff aufgenommen. Die Habilitationsurkunde als digitales Objekt erschließt die letzte verfügbare Seite der Online-Netzpublikation.

REGELMECHANISMEN UND DETERMINANTEN  
DER  
TRANSKRIPTION IN POLYTÄNCHROMOSOMEN  
VON  
CHIRONOMUS UND DROSOPHILA

VON

DR. HEINZ SASS

ZUSAMMENFASSUNG  
ZUR KUMULATIVEN HABILITATIONSLEISTUNG

15. JANUAR 1991

## Teil I

Regelmechanismen und Determinanten der  
Transkription in Polytänchromosomen  
von Chironomus und Drosophila

Zusammenfassung zur kumulativen Habilitationsleistung

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
Einleitung	5
 <u>UNTERSUCHUNGEN AM FORSCHUNGSOBJEKT <u>CHIRONOMUS</u></u>	
RNA-Polymerase in Polytänchromosomen: Immuno- fluoreszenzoptische und autoradiographische Analysen während der stimulierten und repri- mierten RNA-Synthese	9
Gen-Identifikation in Polytänchromosomen: Einige Balbianiring 2-Gensequenzen von <u>Chironomus tentans</u> liegen in einer Inter- banden-ähnlichen Region	12
Transkriptions-abhängige Präsenz von U1- und U2-Ribonukleoproteinen an besonders aktiven Genorten in Polytänchromosomen	14

UNTERSUCHUNGEN AM FORSCHUNGSOBJEKT DROSOPHILA

	Seite
Vorstellung der Thematik	16
1. Bau eines konstitutiv exprimierten und thermo-induzierbaren Hybridgens ( <u>hsp82-neo</u> ) durch Fusion des <u>hsp82</u> -Gens von <u>D. pseudoobscura</u> mit einem bakteriellen Neomycin-Resistenz-Gen	16
a) Genauswahl: <u>hsp82</u> und <u>neo</u>	16
<u>hsp82</u>	16
<u>neo</u>	19
b) Das Fusionsgen <u>hsp82-neo</u>	20
=====	
2. Entwicklung und Anwendung von P-Element transponierbaren Expressionsvektoren für die Genübertragung von <u>hsp82-neo</u> und anderen Sequenzen in das <u>Drosophila</u> -Erbgut durch Keimbahn-Transformation von Präblastoderm-Embryonen	21
Einleitung	21

	Seite
a) <u>hsp82-neo/Adh</u> -Transpositionsvektoren pHS22 und pHS24	22
b) Etablierung von 13 transgenen <u>D. melanogaster</u> - Stämmen durch Einschleusung von Transposons pHS22 und pHS24 in die Keimbahn von Embryonen	25
c) Zytogenetische Kartierung der Insertionsorte von Transposons pHS22 und pHS24 im Genom von <u>D. melanogaster</u>	26
d) Molekulare Charakterisierung der <u>hsp82-neo</u> - Transkripte durch Northern (RNA-Blotting)- Analysen und RNA-Proben-Protektion	27
e) "Heilung" der <u>Adh</u> <sup>null</sup> -Mutante vom Gendefekt durch <u>Adh</u> -Gentransfer	29
f) Schlußfolgerungen	30

=====

3. <u>Hsp82-neo</u> Transpositionsvektor pHS85: Ein viel- seitig verwendbarer Überträger von Genen und an- derer DNA in eukaryotische Zellen	32
--	----

=====

4. pHS103 und pHS104: Ausgangsvektoren für Untersuchungen der Mechanismen wie Retrotransposons und anti-sense RNA in <u>D. melanogaster</u> die Transkription beeinflussen	34
--	----

=====

5. Dosis-Kompensation des X-chromosomalen <u>hsp82</u> -Gens von <u>D. pseudoobscura</u> und des cotransformierten, autosomalen <u>Adh</u> -Gens von <u>D. melanogaster</u> an ectopischen Chromosomenorten in transgenen <u>D. melanogaster</u>	36
--	----

Einleitung	36
------------	----

a) Dosis-Kompensation des endogenen <u>hsp82</u> -Gens in <u>D. pseudoobscura</u>	40
b) Kompensation/Nicht-Kompensation der cotransformierten Gene <u>hsp82-neo</u> und <u>Adh</u> in transgenen <u>D. melanogaster</u>	41

=====

6. Literatur	43
--------------	----

## Einleitung

Eines der zentralen Probleme der Biologie von höheren Organismen ist die Expression von Genen und ihre Regulation. Viele Faktoren können auf die Genaktivität regulativ einwirken: die Spezifität der RNA-Polymerasen und die Synthese- und Abbauraten sowie das Spleißen der RNA, die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen und nichthomologe Rekombinations-Ereignisse durch Insertion mobiler, genetischer Elemente wie Retrotransposons, P-Elemente und anderen.

Ziel meiner Forschungsarbeit ist es Regelmechanismen und Determinanten, welche die Transkription in Eukaryonten steuern, auf molekularer und zellulärer Ebene verstehen zu lernen. Als Modellsystem verwende ich Polytänchromosomen von Insekten, vor allem der Dipteren Drosophila und Chironomus.

Die hohe Vervielfachung identischer DNA durch wiederholte Verdopplungen (Endomitosen) der synaptisch gepaarten Homologen macht Polytänchromosomen von Drosophila und Chironomus zu einem einzigartig vorteilhaften Objekt, die Lage von Genen und die räumlichen und zeitlichen Muster aktiver und inaktiver Genorte in Interphasekernen zu untersuchen. Seitdem die Pioniere der Polytänchromosomen-Forschung, zum Beispiel Kostoff (1930); Koltzoff (1930); Painter (1933, 1934); Bridges (1935); Muller und Prokofjeva (1936) und andere mit der "attack on the gene" (Painter, 1934) begannen, wurde spekuliert, ob Gene in Banden oder Interbanden oder in beiden vorkommen. In den 50er Jahren entdeckte man, daß verschiedene Banden nach Aktivierung sich entfalten und vorübergehend zu einem Puff aufblähen. Puffbildung wurde von Beermann (1952) als morphologisch sichtbarer Ausdruck der Genaktivität gedeutet. Im Prinzip gibt

es zwei Modelle zur Lokalisation und Regulation von Genen im Banden/Interbanden-Muster. Nach Vorstellungen von Francis Crick (1971) befindet sich die Polypeptid-kodierende DNA vor allem in Interbanden, während Banden regulative Elemente und/oder nicht-kodierende DNA enthalten. Das andere von Paul (1972) entwickelte Modell besagt, daß Interbanden Bindungs-orte für RNA-Polymerasen sind. Das Modell von Paul basiert auf der Annahme, daß RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren schwerlich an die DNA in kompakten Banden binden können, während die DNA im aufgelockerten Interbandenchromatin eher für das Transkriptionsenzym und andere Faktoren zugänglich ist. Ergebnisse, die das eine oder andere Modell stützten wurden publiziert (eine Zusammenfassung gibt Sorsa, 1988). Kontrovers blieb dennoch, ob Gene in Banden oder Interbanden oder in beiden vorkommen, letzteres etwa indem aktive Genkopien in der Interbande und transkriptionell inaktive Kopien desselben Gens in der kondensierten Bande existieren. Diskutiert wird auch, Interbanden könnten transkriptionell aktive Sequenzen wie "housekeeping"-Gene enthalten (Zhimulev et al., 1981).

Ein weiterer Schwerpunkt der Polytänchromosomenforschung ist der Prozeß des Puffing, also die örtlich begrenzte Dekondensation chromosomaler Teilabschnitte. Die Bildung von Puffs zeigt, daß es einen Zusammenhang zwischen der Struktur des genetischen Materials und seiner Transkriptionsaktivität gibt. Nach Aktivierung, zum Beispiel durch das die Larven/Adult-Metamorphose steuernde Steroidhormon Ecdyson und andere Faktoren kommt es zur Umgestaltung mancher Banden zu Puffs. Die Puffbildung ist gewebespezifisch, wechselt während der Entwicklung und ist ein optisches Merkmal von Genaktivität (Beermann, 1962, 1972; Ashburner und Berendes, 1978). Untersuchungen des Puffing sind von großem Wert für die Identifikation der am Transkriptionsapparat beteiligten Komponenten. Man nimmt an, daß das Puffing

Vorgänge widerspiegelt, die analog in gewöhnlichem Interphasechromatin von Eukaryonten geschehen. Derzeitig wird hauptsächlich mittels Immunlokalisation untersucht: (i) welche Faktoren in cis an spezifische Sequenzen stromaufwärts (5') von Zielpromotoren binden und dadurch regulativ wirken, (ii) welche Faktoren mit der RNA Polymerase B (II) einen Initiationskomplex aufbauen, (iii) welche Faktoren die Transkription von Gengruppen (Hitzeschockgenen, Homeoboxgenen und anderen) regulieren. Von großem Interesse sind Proteine, die die Funktion des Puffing (mit)steuern. Erst kürzlich wurde von der Hogness-Gruppe (Stanford-Universität) und von Urness und Thummel (Howard Hughes Medical Institute in Salt Lake City) gezeigt, daß die Proteinprodukte durch Ekdyson induzierter Puffs andere Puffs durch sequenzspezifische Bindung an DNA regulieren (Burtis et al., 1990; Urness und Thummel, 1990).

Das Studium von Genregulation, Genlokalisierung und Puffing erfuhr in den vergangenen Jahren eine revolutionäre Entwicklung durch (1) das Aufkommen der rekombinanten DNA-Technologie und (2) die Entdeckung mittels P-transponierbaren Elementen als Vektoren spezifische DNA in die Keimbahn von Drosophila melanogaster einzuführen (Rubin und Spradling, 1982). Diese Verfahren erlauben Regelmechanismen und Determinanten der Transkription/Genexpression und die Lokalisation von gezielt ausgesuchten Genen in Polytänchromosomen wirkungsvoll zu untersuchen und revolutionierten die Untersuchungsweise konventioneller Genetik und Biochemie.

Die hier vorliegende Zusammenfassung zur kumulativen Habilitationseleistung beschreibt einen Teil meiner Forschungsarbeit. Gemeinsame Thematik aller meiner Arbeiten ist die Frage, welche Mechanismen und Determinanten die Transkription in Polytänchromosomen des Insektensystems kontrollieren. Zunächst stehen meine Untersuchungen bei der Diptere Chironomus im Mittelpunkt, die in situ-Transkription chromosomaler Sequenzen durch RNA Polymerase B (II) während Phasen stimulierter und reprimierter

RNA-Synthese durch Einsatz von Cytogenetik, chromosomaler Transkriptionsautoradiographie und mono- und polyklonaler Antikörper zu klären. Im thematischen Zusammenhang damit stehen meine Studien über die Topographie und Dynamik der **kleinen Kern RNAs** (small nuclear RNAs), die mit den von RNA Polymerase B (II) gebildeten Primärtranskripten für die RNA-Reifung (z.B. Spleissen) eng assoziiert sind.

Thema meiner letzten Forschungsarbeiten ist die Untersuchung von Regulation der Transkription des natürlichen Hitzeschock/Streß-Protein kodierenden hsp82-Gens und von mir geschaffener, rekombinanter hsp82-Gene in transgenen Drosophila melanogaster. Um für diese Untersuchungen die aktuellen wissenschaftlichen Möglichkeiten der Biologie auszuschöpfen, erweiterte ich meine bisherige cytologische und genetische Expertise um Methoden der Molekularbiologie. Das hsp82-Gen von Drosophila wählte ich deshalb als Untersuchungsobjekt, da es in der Evolution, von Escherichia coli bis zum Menschen, weitgehend konserviert blieb und deshalb für den Organismus von großer Wichtigkeit ist. Zudem ist es in allen Geweben ständig tätig und zusätzlich durch Hitzestreß induzierbar. Aufgrund dieser Eigenschaften des hsp82-Gens und durch die experimentellen Möglichkeiten in Drosophila - in vitro engineering → Gentransfer in Chromosomen → Funktionstest in vivo - durchführen zu können, betrachte ich dieses single copy gene in Drosophila als ein besonders geeignetes Modellsystem. Es ermöglicht cis-regulatorische Signale für Transkription, Puffing und Gendosis-Kompensation und die entsprechenden in trans wirkenden Faktoren zu entschlüsseln.

## UNTERSUCHUNGEN AM FORSCHUNGSOBJEKT CHIRONOMUS

### **RNA Polymerase in Polytänchromosomen: Immunfluoreszenzoptische und autoradiographische Analysen während der stimulierten und reprimierten RNA-Synthese**

(veröffentlicht in CELL, 1982)

Um die Mechanismen zu verstehen, die die Genexpression auf der Transkriptionsebene kontrollieren, ist es wichtig, die am Transkriptionsapparat beteiligten Komponenten zu analysieren. Für die Transkription der meisten nicht-ribosomalen Gene ist RNA Polymerase B (II) verantwortlich. Dieses Transkriptionsenzym ist vierteilig aus individuellen Untereinheiten aufgebaut. Ein Weg, die Affinität des Enzyms zum chromosomalen Template und sein Verteilungsmuster während der stimulierten und reprimierten RNA-Synthese zu untersuchen, ist der Einsatz von monoklonalen und polyspezifischen anti-Pol B-Antikörpern, die das Enzym am Chromosom durch indirekte Immunfluoreszenz optisch sichtbar machen können.

Eine zentrale und lange Zeit unbeantwortete Frage war: in welchem Maß stimmen immunfluoreszenzmarkierte Regionen mit Regionen überein, die in Polytänchromosomen transkribiert werden? Die indirekte Immunfluoreszenz erlaubt lediglich eine Verteilungs- jedoch keine Funktionsanalyse von RNA Polymerase B. Die wichtige Frage der Korrelation von Verteilung und Aktivität der RNA Polymerase B blieb in allen von anderen Arbeitsgruppen bis dahin veröffentlichten Immunlokalisationsstudien des Enzyms unbeantwortet. Für mich galt es, immunfluoreszenzoptische und autoradiographische Studien zu koppeln und die Problematik zu untersuchen.

Für derartige Untersuchungen von chromosomaler Transkription, RNA Polymerase B (II)-Verteilung sowie des Puffing ist es wichtig einerseits Substanzen, andererseits Bedingungen (wie Temperaturshifts) zur Verfügung zu haben, die Genaktivität zu beeinflussen. Ich habe daher auch nach Möglichkeiten geforscht, die Genaktivität in vivo so abzuwandeln, daß es im Falle positiver transkriptioneller Regulation zur gesteigerten RNA-Synthese kommt und im Falle negativer transkriptioneller Regulation die Aktivität einzelner Gene hemmt. Besonders war ich an der Abwandlung der Genaktivität in den von mir als Modellsystem ausgewählten Riesenpuffs Balbianiring (BR) 1, BR2 und BR3 interessiert sowie einer anderen Gengruppe in den Hitzeschock-Puffs. Wie Abbildung 4 (in dem beigefügten Sonderdruck der CELL-Publikation) zeigt, eröffnet die in vivo Behandlung von Chironomus tentans-Larven mit Dimethylsulfoxid (DMSO) eine für diese Immunolokalisationsexperimente und andere Untersuchungen sehr nützliche Möglichkeit, die Puff-Induktions- und Repressions-Mechanismen sowie die Präsenz von RNA Polymerase B (II) in gepufften und nicht gepufften Loci von Polytänchromosomen zu studieren.

Die immunfluoreszenzoptischen/autoradiographischen Analysen der RNA Polymerase B-Verteilung ausgeführt an in situ fixierten und in vitro an nativ aus Speicheldrüsen isolierten Chromosomen zeigten, daß Puffs Genorte repräsentieren, die intensiv von diesem Enzym transkribiert werden. Ich bewies, daß Puffing keine obligatorische Voraussetzung für die RNA-Synthese ist. Viele potentiellen Genorte werden von Polymerase B transkribiert ohne Induktion sichtbaren Puffings. Der wichtigste Befund dieser Untersuchung war, daß überall dort, wo Immunfluoreszenz die Anwesenheit von Polymerase B im Chromosom anzeigt, katalysiert das Enzym den Einbau von  $^3\text{H}$ -Uridin oder  $^3\text{H}$ -UTP in nascente RNA. Ich demonstrierte, daß neben den Puffs auch die meisten anderen Regionen aufgelockerten Chromatins, also Interbanden und diffuse Banden,

transkriptionell aktive Strukturen sind und eine Permanentausstattung an RNA Polymerase B (II) besitzen. Diese Regionen betrachte ich als präaktive Stellen potentieller Puffs. Aufgrund ihrer Permanentausstattung mit dem Enzym, ist den meisten Interbanden und diffusen Banden polytärer Chromosomen eine transkriptionelle Grundaktivität zu eigen. Ob die Transkripte dieser präaktiven Chromosomenregionen für die Zelle biologisch bedeutungsvoll sind, blieb offen. Allem Anschein nach wird die Induktion und Regulation der Genaktivität erreicht durch Modulation der Bindung/Aktivität von gewebespezifischen, entwicklungspezifischen und/oder sexspezifischen Faktoren. In Abwesenheit der jeweiligen Transkriptionsfaktoren ist die Minimalmenge an Genprodukt wahrscheinlich für ihre Funktion irrelevant. Die wichtige Konsequenz der transkriptionellen Grundaktivität ist, daß Genloci ständig präaktiv sind, also im Zustand unterschwelliger transkriptioneller Bereitschaft.

Die Schlußfolgerungen aus dieser chromosomalen Analyse werden gestützt durch kürzlich veröffentlichte, molekulare Untersuchungen (nuclear run-on transcription assays), wonach (i) RNA Polymerase B (II) die hsp70-Gene und andere Gene von D. melanogaster auf niedrigem Niveau bereits im nicht-induzierten Zustand (25°C) transkribiert (Rougvie und Lis, 1988; 1990). (ii) Durch in vitro-Anreicherung von cDNAs über die (DNA) Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden mRNAs verschiedener gewebespezifischer Gene auch in Zellen nachgewiesen, die aus Geweben stammten, wo diese Gene nicht exprimiert werden ("illegimate transcription") (Chelly et al., 1989; Sarkar und Sommer, 1989). Demnach führt die transkriptionelle Grundaktivität (in Abwesenheit gewebespezifischer Transkriptionsfaktoren) zum Vorhandensein sehr geringer Mengen der meisten mRNAs in allen Geweben.

**Gen-Identifikation in Polytänchromosomen: Einige Balbianiring 2-Gensequenzen von Chironomus tentans liegen in einer Interbanden-ähnlichen Region**

(veröffentlicht in CHROMOSOMA, 1984)

Die autoradiographischen/immunfluoreszenzoptischen Befunde der RNA Polymerase B (II)-Verteilung in Polytänchromosomen während verschiedener Phasen transkriptioneller Aktivität zeigen, daß das Enzym in Puffs, diffusen Banden und Interbanden vorkommt. Ungeklärt blieben aber die wichtigen Fragen: Befinden sich die Gene in den Banden und/oder in den Interbanden? Werden Gene, die in Puffs aktiv sind, im Falle der Puffreprimierung in die Banden und/oder Interbanden rückgefaltet?

Mit den in dieser Veröffentlichung beschriebenen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob in Interbanden Gensequenzen oder DNA ohne Gencharakter von RNA Polymerase B (II) transkribiert werden.

Die Tatsache, daß Banden der Balbianiring-Bildungsorte durch Ekdyson oder Agentien wie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Banden anderer Chromosomenregionen durch Hitzestreß, zu hoher transkriptioneller Aktivität angeregt Puffs bilden, ist ein starker Hinweis, daß in Banden verpackte Gene nach Aktivierung dekondensieren. Ähnlich wird vermutet, daß Interbanden, da sie aufgelockerte Chromatinstrukturen sind und RNA Polymerase B (II) besitzen, transkriptionell aktive Sequenzen, wie housekeeping-Gene enthalten (Zhimulev et al., 1981). Nach Auffassung von E. K. F. Bautz und Mitarbeitern (Jamrich et al., 1977) enthält eine Interbande die aktiven Kopien und die angrenzende, kondensierte Bande die transkriptionell stillen Kopien eines Genlokus.

Um diese Fragestellung zu klären, reprimierte ich gezielt den Riesenpuff Balbianiring 2 in vivo durch Injektion der Droge DRB (dem Nukleosid-Analog 5,5-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazol) in Larven, wodurch sich der BR2-Puff in ein gut definiertes Bandenmuster umbildete. Mithilfe von Herbert Jäckle et al., (1982) klonierter BR2-DNA prüfte ich dann durch Hybridisierung in situ die Verteilung von BR2-Sequenzen im lokusspezifischen Banden/Interbanden-Muster. Das Ergebnis zeigte, daß (1) das reprimierte BR2-Gen offenbar aus zwei Segmenten mit unterschiedlicher Chromatin-Konformation besteht und (2) die regulative und transkriptionelle Einheit des BR2-Gens sich über die lokusspezifische Banden/Interbanden-Region erstreckt. Geht man davon aus, daß die kodierende BR2-DNA mit dem 3'-Ende in der kondensierten Bande liegt, so repräsentiert die transkriptionelle Aktivität von RNA Polymerase B (II) in der vorgelagerten (5')-Interbande eine Promotor-spezifische Initiation.

Nach meiner Ansicht enthalten Interbanden keine aktiven Kopien eines Genlokus, sondern lediglich die regulatorische Region eines Gens. In der offenen Chromatin-Konformation der Interbande werden die regulativen Sequenzen für RNA Polymerase B und andere Proteine zugänglich, wie es sich im Falle des durch DRB oder DMSO in seiner Syntheseleistung heruntergeschalteten BR2 zeigen ließ. Diese Interpretation der Daten gilt vermutlich auch für andere Gene. Kürzlich wurde für das Gen notch von Drosophila melanogaster gezeigt (Rykowski et al., 1988), daß die regulatorischen Sequenzen dieses Gens in der Interbande zwischen Banden 3C6 und 3C7 liegen. Die kodierenden Abschnitte und Introns (des in Speicheldrüsen nicht exprimierten Gens) befinden sich alle in der chromosomalen Bande 3C7.

**Transkriptions-abhängige Präsenz von U1- und U2- Ribonukleoproteinen an besonders aktiven Genorten in Polytänchromosomen**

(veröffentlicht im JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, 1984)

Die meisten messenger RNAs von Eukaryonten werden als lange Vorläufermoleküle (prä-mRNAs) gebildet und durch posttranskriptionelle Reaktionen in ihrer Sequenz und Größe zur jeweiligen mRNA abgewandelt. Die prä-mRNA ist assoziiert mit 100-300 Nukleotide umfassende RNAs (**small nuclear RNAs, snRNAs**), von denen verschiedene in Form von Ribonukleoprotein-Partikeln (**snRNPs**) als Katalysatoren am Spleißen der Vorläufertranskripte von Genen mit Exon-Intron-Bauweise beteiligt sind. Die folgenden Experimente über die Topographie und Dynamik von U-snRNPs in Polytänchromosomen waren von großem Interesse für das Verständnis des RNA-Prozessing und die Ortung transkriptionell aktiver Gene.

Die Untersuchungen beschreiben das Verteilungsmuster von Sm-, U1- und U2snRNP-spezifischen Antigenen in Polytänchromosomen aus Speicheldrüsen von Chironomiden. Identifiziert habe ich diese Antigene durch Einsatz humaner Autoantikörper von Patienten mit systemischem Lupus erythematosus und eines monoklonalen anti-U1snRNP-Antikörpers. Ich zeigte anhand von Zell-extrakten und Polytänchromosomen, daß die antigenen Determinanten (Proteine) der U-snRNPs von Chironomiden bis zum Menschen während der Evolution erhalten bleiben.

Die Verteilungsanalyse dieser Antikörper-bindenden UsnRNPs in Polytänchromosomen ergab, daß die Präsenz von UsnRNPs eng mit der lokalen Transkription verknüpft ist. Herauf- und Herunterschalten von Genaktivität mittels Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Hitzestreß in vivo zeigten, daß diese UsnRNPs nur an transkrip-

tionsaktiven Stellen vorkommen. Die Konzentration der UsnRNPs in einem Genlokus ist der Genaktivität proportional. Die meisten transkriptionsaktiven Chromosomenorte (Puffs, diffuse Banden, nicht aber die Interbanden) besitzen eine UsnRNP-Ausstattung. Wir interpretieren diese Befunde, daß snRNPs/snRNAs mit nascenter prä-mRNA assoziiert sind. Demnach ist die frühe Bildung von UsnRNA/prä-mRNA-Ribonukleoproteinkomplexen eine Voraussetzung für das Prozessing (Spleißen) in transkriptionsaktiven, aufgelockerten Banden und Puffs. Das Fehlen des UsnRNP-Signals in Interbanden und kondensierten Banden beweist, daß UsnRNPs keine strukturellen Bestandteile polytärer Chromosomen sind und darin nicht gespeichert werden.

Von ganz besonderem Interesse war das Ergebnis, daß beide, U1- und U2snRNPs in allen von RNA Polymerase B (II) transkribierten Puffs und diffusen Banden vorkommen. Dieser Befund gilt auch für chromosomale Loci, wie den Riesenpuff Balbianiring 2, die bekanntlich nur eine einzelne mRNA-Transkriptionseinheit aufweisen. Demzufolge sind U1- und U2snRNPs gleichzeitig an einem gegebenen prä-mRNA-Molekül präsent und beide am Spleißen beteiligt. Nach Feststellung von Mattaj (1988) handelt es sich bei unserer Veröffentlichung um die erste Studie, die das Vorkommen von snRNPs vom U-Typ mit Orten transkriptioneller Aktivität korreliert. Biochemische Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben später gezeigt, daß U1 und U2 zusammen mit anderen UsnRNPs einen Spleißosom-Komplex bilden, der als 40-60S Ribonukleoprotein-Einheit isolierbar ist (Birnstiel, 1988).

Das Fehlen von U1- und U2snRNPs in Interbanden spricht gegen die Hypothese, daß RNA Polymerase B (II) in Interbanden nascente prä-mRNA durch Transkription dekondensierter Kopien eines Genlokus bildet. Die Tatsache jedoch, daß ich in einer in situ-Hybridisierungsanalyse eine Interbanden-ähnliche Region mit einer Genprobe (BR2-DNA) markieren konnte (Sass, 1985), zeigt, daß diese Interbande einen kurzen Genabschnitt beinhaltet.

Wahrscheinlich beinhalten Interbanden die Bindungs- und Startstellen für RNA Polymerase B (II), während sich die Masse der Transkriptionseinheit in der 3'-gelegenen Bande befindet. Typische Interbanden sind keine signifikanten Syntheseorte von prä-mRNA.

-----

## UNTERSUCHUNGEN AM FORSCHUNGSOBJEKT DROSOPHILA

### Vorstellung der Thematik

Meine nachfolgenden Untersuchungen beschäftigen sich mit der Regulation der Transkription in Polytänchromosomen von transgenen Drosophila melanogaster. Dies geschieht anhand von mir konstruierter hsp82-neo-Fusionsgene, bestehend aus X-chromosomalen Drosophila-Regulationssequenzen, einem bakteriellen Resistenzgen und einem Polyadenylierungssignal wiederum von Drosophila. Ich benutze gentechnologische Methoden: Neukombination von DNA, sowie das Verfahren des Gentransfers, also die Übertragung fremder Gene in tierische Zellen, für meine Untersuchungen. Meine experimentelle Strategie basierte darauf, daß die enzymatische Aktivität des Fusionsgen hsp82-neo den Fliegen Antibiotikum (G418)-Resistenz verleiht, so daß transgene D. melanogaster nach Einführung von hsp82-neo unabhängig vom gegebenen genetischen Hintergrund selektio- niert werden können.

In transgenen Drosophila melanogaster untersuchte ich

- (1) die Lokalisation des Fusionsgens hsp82-neo im Banden/Interbanden-Muster von Polytänchromosomen und
- (2) die Transkription und Prozessierung (Spleißen) der Transgen-RNA unter Normalbedingungen und in Temperaturshift-Experimenten,
- (3) hsp82-neo gesteuertes Puffing und
- (4) das regulatorische Phänomen der Gendosis-Kompensation.
- (5) Für das Einführen von hsp82-neo und anderem, zusätzlichem Genmaterial über die Keimbahn von Präblastoderm-Embryonen in das Fliegen-Erbgut habe ich weiterhin P-Element-Vektoren (Transposons) entwickelt, die den Gentransfer mit hoher Effizienz gestatten. Auf diese Weise wurde hsp82-neo als Transgen in Polytänchromosomen einer strukturellen und funktionellen Analyse zugänglich.

Wie in der folgenden Zusammenfassung dargestellt, haben sich hsp82-neo und die P-Element-Vektoren (Transposons) als gut geeignete Instrumente für die Analyse der Genfunktion in D. melanogaster erwiesen.

**1. Bau eines konstitutiv exprimierten und thermoinduzierbaren Hybridgens (hsp82-neo) durch Fusion des hsp82-Gens von D. pseudoobscura mit einem bakteriellen Neomycin-Resistenz-Gen (neo)**

(veröffentlicht in GENE, 1990)

a) Genauswahl: hsp82 und neo

hsp82

Wird die Wachstumstemperatur (25<sup>0</sup>C) von D. melanogaster schockartig

auf 35<sup>o</sup>-37<sup>o</sup>C erhöht, führt das im Tier zur transkriptionellen Induktion von 8 verschiedenen, prominenten Hitzeschock (HS)-Genen und damit einhergehend zur Ausbildung von 6 prominenten Hitzeschock-Puffs. Die Synthese der meisten normalen Proteine kommt, durch den Hitzeschock induziert, plötzlich zum Erliegen. Von den 8 HS-Genen kodieren 7 für Hitzeschock (Streß)-Proteine (hsp): hsp82, hsp70, hsp68, hsp27, hsp26, hsp23 und hsp22. Für das im Hitzeschock-Puff 93D gelegene Gen konnte bisher kein Protein nachgewiesen werden (eine aktuelle Übersicht der "stress proteins in biology and medicine" (1990), geben R. Morimoto, A. Tissières und C. Georgopoulos).

Für meine Auswahl des hsp82-Gens für die Konstruktion des Fusionsgens hsp82-neo waren folgende Gesichtspunkte entscheidend:

- (i) Das hsp82-Gen besitzt einen in allen Geweben exprimierten Promotor, der durch Hitze und Streß induzierbar ist. Abweichend von dem Expressionsmuster aller anderen, prominenten Hitzeschock-Gene ist das hsp82-Gen von Drosophila schon unter Normalbedingungen (25<sup>o</sup>C) auf niedrigem "level" ständig (konstitutiv) tätig.
- (ii) Das hsp82-Gen kommt in nur einer Kopie im (haploiden) Drosophila-Genom vor. Die Singularität des hsp82-Gens war für die vorgesehenen quantitativen Untersuchungen der Gendosis-Kompensation (s. u.) unerläßlich; so konnte ich eindeutige Aussagen machen, ohne mögliche Fehlerquellen durch homologe Gene einer Familie.

- (iii) Abweichend von allen anderen Protein-kodierenden Hitze-schock-Genen bietet hsp82 den Vorteil, RNA-Prozessierungsstudien in Abhängigkeit von der Temperatur vorzunehmen, da das Gen eine Exon-Intron-Bauweise hat.
- (iv) Ich wählte das X-chromosomale hsp82-Gen von Drosophila pseudoobscura für den Bau des Fusionsgens, um damit in transgenen Drosophila melanogaster auch zu prüfen, durch welche Signale das als Gendosis-Kompensation bezeichnete, regulatorische Phänomen bestimmt wird. Das hsp82-Gen ist X-chromosomal in D. pseudoobscura, aber autosomal in D. melanogaster. Dennoch ist die Expression des hsp82-Gens in D. pseudoobscura in beiden Geschlechtern gleich, obwohl Männchen nur ein X und Weibchen zwei X-Chromosomen besitzen.

neo

Als die vom vorgeschalteten hsp82-Promotor von D. pseudoobscura zu exprimierende DNA habe ich ein bakterielles Neomycin-Resistenzgen (neo) gewählt. In der Literatur ist beschrieben worden (Southern und Berg, 1982; Reiss et al., 1984 und andere), daß das für Eukaryontenzellen giftige (Aminoglykosid-)Antibiotikum G418 durch Phosphotransferase-Aktivität des bakteriellen Neomycin(neo)-Resistenz-Gens entgiftet wird. Im Falle erfolgreicher Übertragung und enzymatischer Aktivität von hsp82-neo gäbe es transgene D. melanogaster mit G418-(Antibiotikum)Resistenz.

b) Das Fusionsgen hsp82-neo

Den Bauplan des Fusionsgens hsp82-neo zeigt Abbildung 1 (in dem beigefügten Sonderdruck der GENE-Publikation). Meine Strategie war, ein Fusionsgen zu bauen, ausgestattet mit einer 5.0 kb oder 0.86 kb langen, nicht-transkribierten 5'-Region, die den Promotor beinhaltet, gefolgt vom transkribierten aber nicht translatierten 137 bp-Exon 1 und dem 1063 bp-Intron mit funktionellen 5'- und 3'-Donor/Akzeptor-Spleißstellen. Exon 2 als kodierende Region wollte ich weitgehend entfernen und an den verbleibenden Rest von 58 bp mit dem ATG-(Translationsstart)Kodon das Promotor-freie neo-Gen fusionieren.

Für die Bildung einer polyadenylierten hsp82-neo mRNA wurde unmittelbar an das 3'-Ende von neo ein Segment des autosomalen hsp82-Gens von D. melanogaster mit dem für eukaryotische Transkriptionseinheiten typischen Polyadenylierungssignal gekoppelt.

Das Fusionsgen mit der 0.86 kb-Promotorregion hat gegenüber der 5.0 kb langen 5'-Region den Vorteil der vollständig bekannten Nukleotidsequenz (Abbildung 4 der GENE-Publikation). Dadurch kann die genaue Lage aller Schnittstellen für Restriktionsenzyme und anderer Sequenzen/Elemente/Boxen bestimmt werden. Zudem ist durch die DNA-Minderung der Anteil einmaliger Schnittstellen für Restriktionsenzyme im Fusionsgen hsp82-neo höher und die Transformationseffizienz gesteigert.

Das Fusionsgen hsp82-neo kodiert für ein neuartiges, chimäres Protein, zusammengesetzt aus den ersten 20 Aminosäuren des hsp82-Gens von D. pseudoobscura, 5 Linker-kodierten Aminosäuren und allen Aminosäuren

des bakteriellen Neomycin-Phosphotransferase-Gens außer den ersten vier.

Demnach standen die beiden hsp82-neo Fusionsgene  
(a) für den Bau von P-Element gesteuerten Vektoren  
(Transposons) für den Gentransfer in das Fliegen-Genom,  
(b) die Analyse der Regulation der Genaktivität und  
(c) der Gendosis-Kompensation zur Verfügung.

-----

## 2. Entwicklung und Anwendung von P-Element transponierbaren Expressions-Vektoren für die Genübertragung von hsp82-neo und anderen Sequenzen in das Drosophila-Erbgut durch Keimbahn-Transformation von Präblastoderm-Embryonen

### Einleitung

Die Versuchsfolge: in vitro Mutagenese eines Gens durch genetic engineering ---> Gentransfer und -einbau in Chromosomen ---> Funktionstest des Gens, hat sich für das Studium eukaryotischer Genfunktion als äußerst effizient erwiesen. Dabei ist eines der wesentlichen Elemente der Gentechnologie der sogenannte Vektor (Winnacker, 1984).

Ein Vektor ist ein in vitro abgewandeltes Empfänger-DNA-Molekül (Plasmid- oder Phagen-DNA), das ein Transgen wie hsp82-neo und/oder andere DNA-Sequenzen in das Genom eines Empfängerstammes (Mutante oder Wildtyp) einbringt. Dadurch wird ein neuer Stamm geschaffen, der sich im Fall von D. melanogaster nur in der Anwesenheit des Transgens hsp82-neo unterscheidet. Ansonsten sind beide Stämme isogen. Auf diese Weise gelingt es gezielt, Erkenntnisse über die Wirkung von hsp82-neo, seine Kontrollelemente, Transkription, funktionsstimulierende Faktoren (Hitze, Streß, Hormone und andere), sowie über seine Chromatin-Verpackung in Banden/Interbanden von Polytänchromosomen im komplexen tierischen Organismus zu gewinnen.

Wie kommt hsp82-neo in das Erbgut von Drosophila melanogaster? Rubin und Spradling fanden 1982, daß der Einbau von transponierbaren P-Elementen von D. melanogaster in Plasmide deren Einbau in das Fliegen-genom erlaubt. Dadurch wird der Gentransfer aus dem Reagenzglas in Chromosomen des Organismus vollzogen.

P-Elemente sind eine der 3 Klassen transponierbarer Elemente in D. melanogaster neben copia, foldback-(FB) und I-Elementen. Autonome P-Elemente haben die Fähigkeit unter bestimmten Bedingungen sich aus der DNA herauszuschneiden und können sich im Genom hin- und herbewegen (transponieren). In D. melanogaster kommen P-Elemente als intakte 2.9 kb lange Transposons oder defekte, daher nicht-autonome Elemente unterschiedlicher Größe vor. Jedes P-Element voller Länge besitzt 4 offene Leseraster und vollkommene direkte Sequenzwiederholungen (inverted repeats) an seinen Enden. P-Elemente transponieren nur in der Keimbahn, obwohl sie in beiden, Keimbahn und somatischem Gewebe transkribiert werden. Die Keimbahn-Spezifität folgt aus unterschiedlichem Spleißen der P-RNA in beiden Geweben (eine umfangreiche Übersicht findet sich bei Engels, 1989).

Im folgenden gebe ich eine zusammenfassende Darstellung meiner Entwicklungen von verschiedenen P-Element gesteuerten Gen-Transfer/Expressionsvektoren, die alle auf hsp82-neo basieren.

a) hsp82-neo/Adh-Transpositionsvektoren pHS22 und pHS24

(veröffentlicht in GENE 1990)

Der Bau von Vektor pHS22 geschah aus folgenden Überlegungen. Erstens wollte ich prüfen, ob das hsp82-neo Fusionsprotein im Tier enzymatisch aktiv ist. War auch die Transkription von hsp82-neo wahrscheinlich, könnte auf der Translationsebene

das Vorschalten von 25 fremden Aminosäuren und das Fehlen der eigenen ersten 4 Aminosäuren am NH<sub>2</sub>-Terminus von neo negative Auswirkungen auf die Neomycin-Phosphotransferase-Aktivität haben. Zweitens galt es auszuschließen, daß die Einführung als Fremdprotein hsp82-neo in das Tier, keine toxische Wirkung hat. Drittens, für die Analyse der Gendosis-Kompensation wollte ich neben dem X-chromosomalen Gen (hsp82 von D. pseudoobscura in Form von hsp82-neo) ein autosomales Gen, die Alkoholdehydrogenase (Adh) von D. melanogaster, in einem Vektor als Cointegrate vereint, in Embryonen einbringen.

Wie Abbildung 2 (der GENE-Publikation) zeigt, besteht der etwa 16 kb große Transpositionsvektor pHS22 aus einem kleinen prokaryotischen Teil (pUC9) und einem großen eukaryotischen Teil (P-Adh / hsp82-neo-Poly (A)-P). Der prokaryotische Teil, der nicht in das Fliegen-genom insertiert, gestattet die Massenvermehrung der DNA in Escherichia coli. Dafür trägt die bakterielle DNA einen Replikationsursprung sowie ein Antibiotikaresistenzgen (Ampicillin), um die Zellen mit dem Vektormolekül selektionieren zu können. Die bakterielle DNA wird an beiden Seiten begrenzt von P-Element-Sequenzen (P), deren Vorhandensein und Erkennung für den Transpositionsvorgang in D. melanogaster eine Voraussetzung ist und auf die das an der Transposition beteiligte Enzym, die Transposase, wirkt. Das 5'-Ende der P-Element-DNA mit der 5' 31-bp invertierten Sequenzwiederholung und der 5'-Transposase-Bindungsstelle, die mit dem P-Element-Promotor überlappt, ist stromabwärts (3') vom hsp82-neo Fusionsgen gelegen. Zwischen pUC9 und dem Melanogaster-Alkoholdehydrogenase (Adh)-Gen befindet sich das 3'-Ende von P-Element p $\bar{\mu}$  25.1 mit der endständigen 31-bp langen, invertierten Sequenzwiederholung sowie der 3'-Transposase-Bindungsstelle und anderen Sequenzen.

Dem ursprünglich autonomen P-Element geht die Fähigkeit zu transponieren verloren durch das Entfernen von internen P-Element-Sequenzen für den Einbau der Gene hsp82-neo und Adh.

Das nun nicht-autonome P-Element in Vektor pHS22 erlangt seine Transpositionsfähigkeit vorübergehend dadurch zurück, wird mit dem 16 kb-Vektor zusammen ein intaktes 2.9 kb P-Element, das Helferplasmid p $\pi$  25.7wc (wings clipped) in Präblastoderm-Embryonen injiziert. Das Helferplasmid liefert über sein intaktes Transposasegen das Enzym, kann selbst aber aufgrund der von Karess und Rubin (1984) entfernten, letzten 23 bp der 3' invertierten Sequenz nicht in das Fliegen-genom integrieren. Demnach werden nur die transponierten Sequenzen P-Adh / hsp82-neo-Poly (A)-P einschließlich der invertierten Sequenzwiederholungen in das Fliegen-genom eingeschleust.

Wie Abbildung 2 weiterhin zeigt, habe ich das 7.7 kb hsp82-neo Fusionsgen im Vektor pHS22 so angeordnet, daß es mit dem Adh-Gen in gleicher Orientierung transkribiert wird. Anhand der dadurch erzielten, größeren Abstandsweite der 5'-regulatorischen Sequenzen wollte ich mögliche Promotor-Interferenzen zwischen hsp82 und Adh ausschalten. Das autosomale Adh-Gen steht unter der Kontrolle seines eigenen Promotors. Das 3.2 kb lange Xba/Xba -Fragment beinhaltet 0.66 kb 5' und 0.64 kb 3' flankierender DNA, die alle cis-wirkenden, regulatorischen Sequenzen für die typische Adh-Expression aufweisen (Posakony et al., 1985).

Der hier nicht gezeigte Vektor pHS24 ist im Prinzip baugleich mit pHS22, enthält jedoch das 3.7 kb hsp82-neo Fusionsgen anstelle der in pHS22 verwendeten, 7.7 kb langen Funktionseinheit.

**b) Etablierung von 13 transgenen D. melanogaster-Stämmen durch Einschleusung von Transposons pHS22 und pHS24 in die Keimbahn von Embryonen**

Für die Keimbahn-Transformation habe ich zuerst pHS22 und in einer anderen Serie von Experimenten pHS24 in einer Konzentration von 300-500 µg/ml zusammen mit Helferplasmid p $\phi$  25.7wc (70-100 µg/ml) in 20-30 min alte Präblastoderm-Embryonen mikroinjiziert. Als Empfänger dienen Embryonen der Neomycin/Adh<sup>null</sup>-Mutante Adh<sup>fn4</sup> pr cn; das prune-Allel (pr) und das cinnabar-Allel (cn) sind Augenfarben-Marker.

Ich habe diese Mutante für die Keimbahn-Transformation gewählt, um zunächst über die Alkoholresistenz die durch das hsp82-neo-Fusionsprotein eventuell gegebene Neomycin (G418)-Resistenz zu eichen. Das Adh<sup>fn4</sup>-Allel im Empfängerstamm ist eine in Abwesenheit von Alkohol homozygot lebensfähige, durch Formaldehyd-Mutagenese entstandene Deletions-Mutante (Benyajati et al., 1982). Da den Tieren wegen eines RNA-splicing -Defektes enzymatisch aktive Alkoholdehydrogenase fehlt, sterben nicht-transformierte Adulte in Gegenwart von 6% Äthanol, hingegen über pHS22-Transformation gerettete Tiere überleben durch Aufnahme des intakten Adh-Gens.

Für die Selektion wurden Fliegen, die sich aus mit pHS22 oder pHS24 injizierten Embryonen entwickelten, mit dem entsprechenden Partner des nicht-transformierten Rezipientenstammes rückgekreuzt und die Transformanten unter den Nachkommen zuerst auf Resistenz gegenüber Äthanol (6%) und dann auf G418-Resistenz geprüft. Da nicht transformierte Larven in Gegenwart von 100 µg G418/ml überleben, geschah die Selektion echter hsp82-neo Transformanten über 1000 µg G418/ml. Das Neomycin-Analog G418 war von der Eiablage bis zur Adultentwicklung ständig im Instant-Futter vorhanden.

Elf individuelle, transgene Stämme von D. melanogaster wurden so über pHS22 und zwei Stämme über pHS24 etabliert. Die geringe Zahl an Transformanten mit pHS24 entspricht der in diesem Fall viel geringeren Zahl injizierter Embryonen. Die Transformationshäufigkeit dieser Vektoren liegt bei 25 Prozent. Alle 13 transgenen Stämme sind resistent gegen beide Drogen, G418 und Alkohol (6%) und werden nach Inzucht und G418-Selektion frei von Balancern homozygot auf Normalmedium gehalten.

c) Zytogenetische Kartierung der Insertionsorte von Transposons pHS22 und pHS24 im Genom von D. melanogaster

Der zytogenetische Nachweis der Aufnahme von rekombinanter DNA (pHS22/pHS24) in das Erbgut von D. melanogaster geschah durch in situ-Hybridisierung von Proben-DNA an Polytänchromosomen aus Speicheldrüsen. Zu diesem Zweck habe ich das 7.7 kb lange hsp82-neo Fusionsgen und in anderen Fällen den vollständigen Vektor pHS22 mit Biotin in vitro durch nick-translation markiert. Die Analyse der 13 transgenen Melanogaster-Stämme ergab, daß diese Transposons über Chromosomen 2R, 2L, X, 3R und 3L zufällig verteilt vorkommen, das kurze Chromosom 4 besitzt keine Insertion. Zudem wurden Transformanten mit unterschiedlicher Kopienzahl gefunden. Drei transgene Melanogaster-Stämme tragen eine einzelne Insertion von Transposon pHS22 im X-Chromosom; sieben Stämme haben je eine Insertion in den Autosomen. Ein weiterer autosomaler Stamm besitzt eine Doppelinsertion von pHS22. Transposon pHS24 kommt in einem Stamm autosomal einmalig und in einem anderen Stamm als zweimalige Insertion vor.

Ein typisches Beispiel deartiger in situ-Hybridisierungen zeigt Abbildung 5 (der GENE-Publikation). Wie solche Experi-

mente beweisen, gibt es keine hot spots für pHS22/pHS24-Insertionen. Eine sichtbare Kreuzhybridisierung zwischen Pseudoobscura\_hsp82 und Melanogaster\_hsp82-Sequenzen fehlt erwartungsgemäß, da ich die zwischen beiden Sequenzen etwa 90% konservierte Exon 2-Region (Blackman und Meselson, 1986) durch das bakterielle neo-Gen von Tn5 ersetzte. Andere hsp82-Regionen besitzen keine für ein optisch sichtbares Hybridisierungssignal ausreichende, vergleichbar hohe Sequenzhomologie. Alle 13 Transformanten-Stämme sind homozygot lebensfähig und zeigen keinen veränderten Phänotyp.

**d) Molekulare Charakterisierung der hsp82-neo Transkripte durch Northern (RNA-Blotting)-Analysen und RNA-Proben-Protektion**

Zum Nachweis der hsp82-neo Transkripte habe ich RNA aus nach Geschlecht getrennten Larven und Adulten der 13 transgenen Stämme isoliert. Ein typischer Northern-Blot (Abbildung 6 der GENE-Publikation) zeigt, daß die Transformanten unter Normalbedingungen (25°C) eine gespleißte 1.1 kb hsp82-neo mRNA bilden, die in dem nicht-transformierten Empfänger-Stamm fehlt. Diese reife, translatierbare hsp82-neo mRNA ist die Grundlage der Drogenresistenz und erlaubt den transgenen Tieren in allen Entwicklungsstadien, ohne durch Hitzestreß gesteigerte Transkription, das Antibiotikum G418 durch Phosphorylierung zu entgiften. Die 1.1 kb Transkriptgröße der hsp82-neo mRNA entspricht der Erwartung. Das ungefähr 2.1 kb lange ungespleißte Primärtranskript mit Intron-RNA ist wegen seiner raschen Prozessierung und der geringen Auftragsmenge von 2.5-5.0 µg Gesamt-RNA pro Gelspur im Northern nicht sichtbar.

Interessanterweise ist die hsp82-neo Transkriptmenge zwischen den einzelnen transgenen Stämmen relativ ähnlich. Lediglich

zwei Transformanten zeigen größere quantitative Abweichungen in der hsp82-neo Transkription, vermutlich aufgrund von Positionseffekten. Im allgemeinen beeinflussen Enhancer, also die Transkription steigernde DNA-Sequenzen und/oder Promotoren anderer Gene, das Verhalten von hsp82-neo wenn überhaupt nur wenig. Die Aktivität des ständig in allen Geweben exprimierten hsp82-Promotors ( von D. pseudoobscura in D. melanogaster) ist wahrscheinlich weitgehend unabhängig von der zufälligen chromosomalen Insertionsstelle aufgrund seiner Architektur als Promotor eines housekeeping-Gens und/oder wegen multipler Bindungsstellen für genspezifische regulatorische Faktoren stromaufwärts (5') des TATA-Motifs.

Die Deletion der 5'-flankierenden Region von Position -5000 auf -868 beeinträchtigt die hsp82-Transkription nicht wesentlich. Transformanten, die das verkürzte Fusionsgen tragen, zeigen wie in Abbildung 6 (der GENE-Publikation) keinen grossen Unterschied in der RNA-Menge. Infolgedessen müssen die entscheidenden Steuersequenzen für die konstitutive Expression und Hitzestreß-Reaktion stromabwärts (3') von Position -868 angesiedelt sein.

Das 1063 bp-Intron des D. pseudoobscura hsp82-Gens trennt das transkribierte, nicht-translatierte Exon 1 von der kodierenden Exon 2-neo-Fusion. Für die Quantifizierung des ungespleissten, Intron-haltigen Primärtranskriptes benutze ich die im Vergleich zur Northern-Hybridisierung (RNA-Blotting) empfindlichere und genauere RNA-Proben-Protektion. Diese Methode erlaubte mir die konstitutive Synthese des hsp82-neo, seine Transkription nach Temperatur-Shifts und das Intron-Spleißen im Tier zu untersuchen. Zu diesem Zweck habe ich Intron-DNA der Pseudoobscura-und Melanogaster-hsp82-Gene frei von Sequenzhomologie als molekulare Proben subkloniert. In vitro-Transkription dieser Intron-DNA durch bakterielle RNA-Polymerasen (SP6, T3 und T7) ergibt <sup>32</sup>P-markierte anti-sense RNA,

die mit komplementären hsp82-sense Transkripten in der Gesamt-RNA aus Transformanten doppelsträngige Hybride bildet, während später zugesetzte RNAsen (A und T1) ungepaarte Einzelstrang-RNA in der Lösung abbauen.

Wie die im Sequenzgel aufgetrennten RNA:RNA-Hybride in Abbildung 7 (der GENE-Publikation) zeigen, ergibt das bei 25°C entstandene, ungespleißte Primärtranskript aufgrund seiner geringen Menge eine relativ schwache Markierungsbande. Demgegenüber ist in hitzestrebten (36°C/20 min) Tieren die hsp82-neo Transkription fünffach höher und dementsprechend ist ein starkes Hybridisierungssignal vorhanden. Hitzestreb-induzierte Steigerung der hsp82-neo Transkription ist für alle 13 transgenen Melanogaster-Stämme charakteristisch. Die Tatsache, daß das Transgen in D. melanogaster 2-3-fach schwächer als das endogene hsp82-Gen transkribiert wird, entspricht den natürlichen Unterschieden in der Synthese dieses housekeeping-Gens. Offensichtlich folgt die Transkription von hsp82-neo in D. melanogaster den von der D. pseudoobscura-Promotorstruktur vorgegebenen Kontrollmechanismen. Vermutlich ist die geringere hsp82-Transkription in D. pseudoobscura die Konsequenz schwächerer cis-wirkender Faktoren wie der Promotorstärke.

e) "Heilung" der Adh<sup>null</sup>-Mutante vom Gendefekt durch Adh-Gentransfer

Beide, Transposons pHS22 und pHS24 tragen neben dem hsp82-neo Fusionsgen das Alkoholdehydrogenase (Adh)-Gen von D. melanogaster als Cointegrat. Durch Anwendung von RNA-Proben-Protektion habe ich auch das korrekte Funktionieren des durch Keimbahn-Transformation in den Ausgangsorganismus D. melanogaster zurückgebrachten "gesunden" Adh-Gens geprüft. Abbildung 8 (der GENE-Publikation) dokumentiert einen Vergleich der Adh-Tran-

skription in der nicht-transformierten Spleißing-Mutante Adh<sup>fn4</sup> mit der in Transformanten und dem Wildtyp. Wie die Gelspuren 1 und 2 verdeutlichen ist ungespleißte Adh-RNA instabil, weshalb die Mutante nur eine sehr geringe Menge (unter 5%) an Adh-Transkripten besitzt. Da diese Transkripte keine enzymatisch aktive Alkoholdehydrogenase ergeben, sterben die Tiere in Gegenwart von Alkohol. Das Ersetzen des mutierten Adh-Allels durch Transformation eines "gesunden" Gens über Adh / hsp82-neo-Konstrukte führte in sämtlichen 13 transgenen Stämmen der ursprünglichen Adh<sup>null</sup>-Mutante zur "Heilung" vom Gendefekt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß diese transgenen Stämme korrekt gespleißte Adh-mRNA in großer Menge bilden, vergleichbar der Adh-Expression im Wildtyp Oregon R (Abbildung 8).

#### f) SCHLUBFOLGERUNGEN

Die Ergebnisse der in Abschnitten 2a-e beschriebenen Experimente beweisen, daß

- pHS22 sowie pHS24 als funktionelle Transposons über die Keimbahn in das Fliegen-Genom einwandern und zu seinem natürlichen Inhalt Erbanlagen hinzufügen, die als Fremd-DNA in jeder Zelle präsent sind und mit den Chromosomen vererbt werden,
- das hsp82-neo Fusionsgen keine die Transkription inhibierenden DNA-Sequenzen enthält,
- die Transkription von hsp82-neo in transgenen D. melanogaster den von der D. pseudoobscura hsp82-Promotorstruktur vorgegebenen Kontrollmechanismen folgt,

- das Fusionsgen ständig angeschaltet ist und durch Hitzestreß (36<sup>0</sup>C) eine fünffache Steigerung seiner Syntheseleistung erfährt,
- das autosomale Adh-Cointegrat neben dem X-chromosomalen hsp82 exprimiert wird, dadurch den Gendefekt beseitigt und die Adh<sup>null</sup>-Mutante vor Alkoholvergiftung rettet,
- das Fusionsgen ein hsp82-neo Fusionsprotein exprimiert, dessen ständige Präsenz für D. melanogaster nicht cytotoxisch ist,
- die Phosphotransferase-Aktivität dieses Fusionsproteins den Tieren in allen Entwicklungsstadien (25<sup>0</sup>C) eine stabile Neomycin (G418)-Resistenz verleiht und das
- hsp82-neo keine phänotypischen Veränderungen der Transformatanten verursacht.

Weitere Studien ergaben, daß hsp82-neo-Konstrukte über Calciumphosphat/DNA-Niederschläge in Zellkulturen von Drosophila eingeführt, die Zellen Neomycin(G418)-resistent macht. Damit sind Voraussetzungen geschaffen, die Expression von hsp82-neo und anderer als nicht-selektionierbare Vektor-Cointegrate eingeschleuste Gene auch in Zellkulturen zu untersuchen. Das ist für manche Fragestellungen von großem Vorteil, sind die, in einigen Tagen durchführbaren Studien transienter Expression transformierter Gene in Zellkulturen, der langwierigen (etwa 6 Monate dauernden) Etablierung transgener Tiere vorzuziehen.

3) Hsp82-neo Transpositionsvektor pHS85: Ein vielseitig verwendbarer Überträger von Genen und anderer DNA in eukaryotische Zellen

(veröffentlicht in GENE, 1990)

Auf der Basis der Produktion des enzymatisch aktiven Fusionsproteins können hsp82-neo Vektoren auch als G418-resistente Überträger von Sequenzen von nicht selektionierbaren Drosophila-Genen sowie Fremd-DNA in D. melanogaster und in andere Organismen dienen. Hsp82-neo bietet Vorteile für den Vektorbau, (i) da es ein Fusionsgen geringer Größe ist, (ii) ständig exprimiert und thermoinduzierbar ist, (iii) für ein Protein kodiert das normal nicht in Drosophila und anderen Eukaryonten vorkommt, weshalb es dominant ist und (iv) die Verwendung von Mutanten nicht voraussetzt.

Ein Beispiel solcher Vektor-Entwicklung ist der in Abbildung 3 (der GENE-Publikation) vorgestellte pHS85. Dieser Vektortyp (ca. 9 kb groß) unterscheidet sich von Vektor pHS22 (ca. 16 kb) dadurch, daß er erheblich kleiner ist, daß das Adh-Gen fehlt und die 5' upstream-Region des hsp82-neo Gens nur 0.86 kb regulatorischer DNA beträgt. Für die Aufnahme anderer Nukleotidsequenzen wurde das 3'-Ende des Polyadenylierungs-Signals von hsp82-neo mit einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) ausgestattet. Diese Kasette besteht aus 20 Restriktionsstellen, von denen 8 in der gesamten Konstruktion (ca. 9 kb) nur einmal vorkommen. Dieser Vektor hat sich für effizientes Klonieren und die Keimbahn-Transformation großer genomischer DNA-Moleküle als besonders nützlich erwiesen. Entsprechende Versuche zeigten, daß pHS85 bis zu 17 kb Fremd-DNA aufnehmen kann, ohne als 26 kb-Plasmid instabil zu sein.

Ausgehend von dem im Maniatis-Labor von Dr. J. Posakony (Harvard) geschaffenen P-Element Plasmid pPL  $\Delta$ -1 (unveröffentlicht) habe ich hsp82-neo Vektor pHS85 in folgenden Teilschritten konstruiert. Zuerst wurde der synthetische Polylinker (MCS) aus Plasmid pKS+ (Stratagene, USA) als Kpn(5')-SacI(3') begrenztes 110 bp-Fragment gelisoliert und in den Zentralteil des P-Elementes pPL  $\Delta$ -1 umkloniert, was pHS82 ergab. Um die multiplen Klonierungsstellen später am 3'-Ende des Fusionsgens zu haben, bedurfte es jetzt einer Umlagerung der einmaligen KpnI-Stelle vom 5' an das 3'-Ende des Polylinkers. Die Zerstörung der 5'-KpnI-Stelle in pHS82 geschah über die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von T4-DNA Polymerase und Ligation der glatten Enden führte zu pHS83. Dieser Zwischenvektor wurde am 3'-Ende des MCS dann mit SacI aufgeschnitten, die überstehenden Enden mit Exonuklease "geglättet" und ein 8 bp KpnI-Linkermolekül eingesetzt, woraus pHS84 resultierte. Durch Klonierung der 3.73 kb langen hsp82-neo-Poly (A)-Funktionseinheit in BglII-KpnI aufgeschnittenes Plasmid pHS84 entstand letztlich der gewünschte Transpositionsvektor pHS85.

Inzwischen findet Transpositionsvektor pHS85 Anwendung an der Harvard-Universität, am California Institute of Technology (CalTech), am Institut Pasteur in Paris, bei CSIRO in Australien und anderen Instituten. Im Rahmen der Sequenzierung des Genoms von D. melanogaster versucht Prof. Waclaw Szybalski (Madison, Wisc. USA) über pHS85 einzigartige "Chromosomenscheren" in das etwa 150 Megabasen umfassende Fliegen-Genom einzuführen: "New scissors for cutting chromosomes", Science, 249, 127 (1990). In der Arbeitsgruppe von Prof. E. Gateff in Mainz wurden mittels pHS85 über 20 transgene Stämme einer temperatursensitiven Hirntumor-Mutante etabliert.

4) pHS103 und pHS104: Ausgangsvektoren für Untersuchungen der Mechanismen wie Retrotransposons und anti-sense RNA in Drosophila melanogaster die Transkription beeinflussen

(veröffentlicht in NUCLEIC ACIDS RESEARCH, 1989)

Viele Mutationen in D. melanogaster sind das Ergebnis der Insertion eines transponierbaren Elements, vor allem von Retrotransposons, in ein Intron. Für Untersuchungen der Mechanismen wie die Insertion von Retrotransposons die Expression (Transkription und/oder das RNA-Prozessing) eines Testgens (hsp82-neo) beeinflusst oder stört, habe ich P-Element Vektoren pHS103 und pHS104 konstruiert.

Die meisten Retrotransposons in Drosophila gehören zur Klasse der copia-ähnlichen Elemente, zum Beispiel copia, mdg, 412, B104 und gypsy (Rubin, 1983). Strukturell sind diese Elemente Retroviren sehr ähnlich. Sie besitzen zwei long terminal repeats (LTRs), die Start- und Terminations-Signale enthalten. Die interkalierte Region kodiert für Proteine, die der Endonuklease, Protease und Reversen Transkriptase von Retroviren in Wirbeltieren homolog sind. Nichts ist darüber bekannt, warum etwa 10 Prozent des Drosophila-Genoms Retrotransposons sind, welchen Ursprung sie haben und welche evolutionäre Verwandtschaft zwischen den verschiedenen Retrotransposons besteht. Bewiesen ist, daß Insertionen von Retrotransposons in Gene oder den Gensequenzen eng benachbarten Regionen Mutationen verursachen. Die Drosophila-Mutation white-apricot  $w^a$  basiert auf einer copia-Insertion im Intron des white-Gens, was anstelle weißer zu orange gefärbten Augen führt (Levis et al., 1984; Zachar et al.; 1985). Im forked-Gen ist ein gypsy-Element im Intron insertiert (Parkhurst und Corces, 1985). Untersuchungen bei Mammaliern und

und Hühnern zeigen, daß Insertionen von Retrotransposons zelluläre Onkogene aktivieren und dadurch Tumoren induzieren (Var-mus, 1984; Bishop, 1985). Viele Befunde der letzten Jahre las-sen vermuten, daß eine direkte Beziehung zwischen Mutagenität und transkriptionellen Eigenschaften der Retrotransposons be-steht. Es hat sich gezeigt, daß mutierte Phänotypen entstehen können durch abgewandelte Transkriptbildung.

Für die Insertions-Mutagenese habe ich in das 1063 bp-Intron des hsp82-neo Gens ein synthetisches Oligomer von 110 bp Länge mit 22 Klonierungsstellen eingefügt. Von diesen Stellen sind im binären Adh / hsp82-neo-Vektor pHS103 sechs und im hsp82-neo-Vektor pHS104 neun einmalige Orte für die Insertion von Retro-transposons oder anderer DNA geeignet.

Um beide Vektoren zu entwickeln, wurde zuerst die SmaI-Stelle im Plasmid pGEM-3 (Promega, USA) zerstört durch Einsetzen ei-nes 12 bp BglII-Linkers zwischen die glatten Enden. Danach wurde in dieses rekombinante pGEM-3 Plasmid das 110 bp Oligomer einkloniert was pHS98 ergab. Parallel dazu schnitt ich aus dem hsp82-Intron des hsp82-neo Fusionsgens in Transpositionsvek-toren pHS23 und pHS24 ein 219 bp BglII-SacI Fragment heraus, um an seine Stelle die Kasette multipler Klonierungsstellen aus pHS98 einzusetzen, wodurch letztlich pHS103 und pHS104 entstanden.

Die Verfügbarkeit dieser Vektoren erlaubt Retrotransposons zunächst als Ganzes in das Intron von hsp82-neo zu klonieren. Ratsam ist es das jeweilige Retrotransposon in beiden Orien-tierungen zur Transkriptionsrichtung des Testgens einzupassen. Zahlreiche Regulations-Signale für die virale RNA-Synthese und DNA-Replikation, die auch für die Mutationsbildung in Drosophila verantwortlich sein können, sind in und in der Nähe der LTRs gelegen. Deshalb sollten insbesondere diese Re-

gionen molekular "seziert" werden. Von besonderem Interesse sind Konstruktionen mit beiden LTRs versus einzelnes LTR (5' oder 3'), da Revertanten von durch Retrotransposons ausgelösten Mutationen häufig ein solo-LTR zurückbehalten.

Darüber hinaus sind Vektoren pHS103 und pHS104 auch dadurch attraktiv, daß sie eine vom hsp82-Promotor gesteuerte in vivo-Synthese von anti-sense RNA erlauben. Die Produktion von anti-sense RNA dient dazu, Gene zu identifizieren, die mit der Methodik der klassischen Genetik nur schwer oder gar nicht faßbar sind.

**5. Dosis-Kompensation des X-chromosomalen hsp82-Gens von D. pseudoobscura und des cotransformierten, autosomalen Adh-Gens von D. melanogaster an ectopischen Chromosomenorten in transgenen D. melanogaster**

PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1991); im Druck

Einleitung

Sex-Determinations-Mechanismen führen zu Unterschieden in der Zahl bestimmter Chromosomen und dadurch zu einem beträchtlichen Ungleichgewicht im Genom der Geschlechter. Verschiedene Mechanismen wurden von verschiedenen Organismen entwickelt, um den funktionellen Zustand der Chromosomen anzugleichen.

Dieses regulatorische Phänomen wird als Gendosis-Kompensation bezeichnet. Obwohl dieser Mechanismus gewöhnlich nur zu einer Änderung der Genexpression um Faktor 2 führt, sind Mutanten, die die Gendosis-Kompensation durchbrechen, lethal. Anscheinend führt der kumulative Effekt ungenauer Dosis vieler Gene zu einem Zustand ähnlich der Aneuploidie.

In Drosophila ist die Expression der meisten X-gekoppelten Allele in beiden Geschlechtern gleich, obwohl Männchen ein und Weibchen zwei aktive X-Chromosomen besitzen. Die Gendosis-Kompensation wurde systematisch erstmals von Muller (Muller, League und Offermann, 1931; Muller, 1950) untersucht. Die Kompensation wird nicht durch die Kopienzahl eines individuellen Gens bestimmt, sondern ist eine spezifische Response der Expression X-gekoppelter Gene auf das Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen (Baker und Belote, 1983; Jaffe and Laird, 1986; Lucchesi und Manning, 1987).

Daß Gendosis-Kompensation auf der Ebene der Transkription geschieht, wurde zuerst durch autoradiographische Studien des <sup>3</sup>H-Uridineinbaues in Polytänchromosomen nachgewiesen (Mukherjee und Beermann, 1966). Nachfolgende RNA-Studien anhand bestimmter X-chromosomaler Gene bestätigen die Erwartung, daß in Männchen die RNA-Menge pro Gen etwa zweimal so groß wie in Weibchen ist (Birchler et al., 1982; Ganguly et al., 1985; Breen und Lucchesi, 1986; Kaiser et al., 1986).

Obwohl der Mechanismus der Gendosis-Kompensation unbekannt ist, geht man davon aus, daß sehr wahrscheinlich cis-aktive Sequenzen in der X-chromosomalen DNA regulatorisch wirken. Prinzipiell stellt sich die Frage, ob Gen-spezifische Sequenzen jedem zu regulierenden Gen unmittelbar vorgeschaltet sind, ob Gen-unabhängige, nicht unbedingt benachbarte Sequenzen, oder beide Arten von Signalen die Kompensation steuern?

Die P-Element vermittelte Keimbahn-Transformation eröffnet einen Weg, diese Möglichkeiten zu prüfen. Einzelne, klonierte X-chromosomale Gene werden dafür in Autosomen insertiert oder umgekehrt, autosomale Gene in das X-Chromosom eingebracht. Als Beweis der Kompensation wird die Aktivität des Transgens in Männchen mit der in Weibchen verglichen. Derartige Vergleiche wurden für drei X-chromosomale Gene insertiert in

in Autosomen und vier autosomale Gene insertiert in X-Chromosomen veröffentlicht. Unbefriedigend ist bei allen derartigen Untersuchungen die große Variabilität der Ergebnisse:

1. Autosomale Insertionen des X-chromosomalen white-Gens ergaben größere Aktivität pro Gen in heterozygoten Männchen als in heterozygoten Weibchen, wurde die Augenpigmentmenge gemessen. Dieser für eine Kompensation erwartete Befund war nicht in Einklang mit dem Fehlen der Kompensation in für die white-Insertion homozygoten Weibchen. Solche Weibchen besaßen gewöhnlich 2-3 mal soviel Augenpigment wie für die gleiche Insertion heterozygote Männchen und hatten ungefähr die gleiche Pigmentmenge wie homozygote Männchen (Hazelrigg et al., 1984; Levis et al., 1985; Pirrotta et al., 1985).

2. Autosomale Insertionen des X-chromosomalen Speicheldrüsensekret-Gens sgs4 zeigten eine zwischen 1.3 - 1.9 mal höhere Aktivität pro Gen in Männchen als in Weibchen, wurde larvales Protein oder in einer anderen Linie larvale RNA mit dem endogenen autosomalen sgs3 als internem Standard verglichen. Jedoch schwankten die normalisierten Proteinwerte zwischen einzelnen Larven stark, sogar innerhalb derselben transformierten Linie und desselben Geschlechts (Krumm et al., 1985; Hofmann et al., 1987; McNabb und Beckendorf, 1986). Überraschenderweise wurden die Mehrzahl X-chromosomaler sgs4-Insertionen nur teilweise oder gar nicht kompensiert.

3. Insertionen des autosomalen Xdh-Gens in X-Chromosomen ergaben, wie für die Gendosis-Kompensation erwartet, ein höheres Männchen/Weibchen-Verhältnis an Xanthindehydrogenase-Aktivität pro Gen bezogen auf Gesamtprotein als autosomale Insertionen. Der durchschnittliche Wert lag bei 60% Kompensation (Spradling und Rubin, 1983; Laurie-Ahlberg und Stam, 1987).

4. Insertionen des autosomalen Adh-Gens führten nach Untersuchungen von Goldberg et al., (1983) in Larven und Adulten zu keiner geschlechtsspezifischen Kompensation an Alkoholdehydrogenase. Abweichend davon wies eine andere Studie larvaler Transformanten eine niedrige, aber beständige Kompensation von annähernd 30 Prozent nach (Laurie-Ahlberg und Stam, 1987)

5. Im Falle des autosomalen Ddc-Gens ergab die Insertion in das X-Chromosom ein höheres Männchen/Weibchen -Verhältnis an Dopadecarboxylase-Aktivität pro Gen, bezogen auf Gesamtprotein, als autosomale Insertionen. Jedoch trat dieser Effekt nur in Extrakten von alten Adulten auf und war schwach oder fehlte in Vorpuppen und frisch geschlüpften Adulten (Scholnick et al., 1983; Marsh et al., 1985).

6. Letztlich sei erwähnt, Northern-Analysen der Transkripte des autosomalen Speicheldrüsenprotein-Gens sgs3, verglichen mit der RNA einer gelelektrophoretischen Variante des endogenen Gens, ergaben mehr RNA-Menge pro Gen in Männchen als in Weibchen in nur einer von vier untersuchten X-chromosomalen Insertionslinien. Zudem gab es ungeklärte Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen mit autosomalen Insertionen (Bourouis und Richards, 1985).

Ziel meiner Experimente war es zu prüfen, (i) welche cis-gelegenen Sequenzen die Kompensation auf der Transkriptionsebene kontrollieren und (ii) inwieweit Gendosis-Kompensation der Hitzestress-Antwort und den entwicklungspezifischen Programmen ein übergeordneter Regulations-Mechanismus ist. Um die Bestimmungen der Transkriptmengen mit größtmöglicher Genauigkeit durchzuführen und den Faktor von 2 eindeutig zu messen, habe ich ungespleißte Primärtranskripte und/oder reife mRNAs mithilfe der RNA-Proben-Protektion quantifiziert.

Das Messen von Transkripten umgeht die Problematik von Sekundäreffekten auf der Proteinebene und die RNA-Proben-Protektion ist dem Northern (RNA)-Blotting in Genauigkeit und Empfindlichkeit überlegen. Im Folgenden wird das Kompensationsverhalten eines X-chromosomalen Gens (hsp82-neo) und eines autosomalen Gens (Adh) an einer und derselben Insertionsstelle geprüft. Beide Gene wurden in dem oben beschriebenen P-Element Transposon pHS22 in die chromosomale Umgebung transloziert und ihre Transkription in Weibchen und Männchen verglichen.

#### **Gendosis-Kompensation des endogenen hsp82-Gens in D. pseudoobscura**

Drosophila pseudoobscura hat sich von D. melanogaster vor ungefähr 40 Millionen Jahren getrennt. Im Gegensatz zu D. melanogaster ist das X-Chromosom von D. pseudoobscura metacentrisch, da ein Chromosomenarm, der im gemeinsamen Drosophila-Vorfahr autosomal war, als neuer Arm ( $X^R$ ) an das X von D. pseudoobscura transloziert wurde. Infolgedessen ist aus dem autosomalen hsp82-Gen in D. melanogaster ein X-chromosomales Gen in D. pseudoobscura geworden.

Zu Beginn meiner Untersuchungen habe ich mittels RNA-Proben-Protektion den früheren Befund chromosomaler Transkriptionsautoradiographie geprüft, daß hsp82-Gen sei in Pseudoobscura-Männchen kompensiert (Pierce und Lucchesi, 1980). Als interner Standard für die Quantifizierung dienten mir das autosomale Gart-Gen (Henikoff und Eghtedarzadeh, 1987) und in einer anderen, unabhängigen Serie von Experimenten, das autosomale alpha-Tubulin-Gen. Wie Abbildung 1 und Tabelle 1 (des PNAS-Manuskriptes) für Intron- und Exon-Proben des hsp82-Gens dokumentieren, ist das X-chromosomale hsp82-Gen in Pseudoobscura-Männchen ungefähr zweimal so aktiv pro Gen wie in Weibchen, was einer vollständigen Gendosis-Kompensation entspricht.

### Kompensation/Nicht-Kompensation der Transgene hsp82-neo und Adh in Drosophila melanogaster

Die Befunde meiner molekularen Analyse der Gendosis-Kompensation in transgenen D. melanogaster lassen sich so zusammenfassen:

1. Beide, das autosomale Melanogaster-Adh-Gen und das X-chromosomale hsp82-neo-Fusionsgen, werden vollständig kompensiert, insertierte Transposon pHS22 in euchromatische Regionen des Melanogaster-X-Chromosoms. Wie die RNA-Quantifizierung ergab, existieren in Männchen zweimal soviel hsp82-neo und Adh-Transkripte wie in Weibchen.
2. Allerdings sind die Mengen von hsp82-neo und Adh-RNA pro Gen unabhängig vom Sex, insertierte Transposon pHS22 in das beta-Heterochromatin in Region 20 an der Basis des X. In dieser Chromosomenregion sind beide Transgene nicht kompensiert.
3. Keine der 10 autosomalen Insertionen des Pseudoobscura-hp82-Gens ist in transgenen D. melanogaster dosis-kompensiert. Dieser Befund gilt für das hsp82-neo Gen, in dem das hsp82-Gen sich kurz über die Translationsstelle im Exon 2 erstreckt als auch für das vollständige hsp82-Gen von D. pseudoobscura. Die Prüfung von Befunden (Northern-Analyse und chromosomaler Transkriptionsautoradiographie), daß intakte Pseudoobscura-hsp82-Gen sei in 3 autosomalen Transformationslinien von D. melanogaster kompensiert (Jaffe und Laird, 1986; Jaffe, 1988), ergab bei meiner Quantifizierung mittels RNA-Proben-Protektion in denselben Linien eindeutig keine Kompensation des transponierten Gens.

4. Die Schlußfolgerungen aus den hier präsentierten Transformations-Experimenten sind: das Kompensations-Verhalten des hsp82-neo-Transgens wird nicht durch nahe zum Gen gelegene DNA-Sequenzen bestimmt, sondern reguliert durch das neue X-chromosomale Milieu, möglicherweise der örtlichen Struktur der DNA oder des Chromatins entsprechend. Der Befund, daß das co-transponierte, autosomale Adh-Gen zusammen mit hsp82-neo kompensiert wird, läßt vermuten, daß X-chromosomale regulatorische Sequenzen, die für die Verstärkung der Genaktivität im Männchen verantwortlich sind, gehäuft im X vorkommen, jedoch im beta-Heterochromatin fehlen.

Kürzlich wurde berichtet, daß Drosophila-Chromosomenarme, einschließlich der von D. pseudoobscura, die dosis-kompensiert sind, besitzen eine höhere Dichte an bestimmten Di- und Mononukleotidstrecken, nämlich  $(CA/TG)_n$ ,  $(CT/AG)_n$  und  $(C/G)_n$ . Diese Polynukleotide sind mengenmäßig in Autosomen erheblich geringer vorhanden und fehlen oder sind unterrepräsentiert im zentralen beta-Heterochromatin. Da jede dieser Sequenzen Nicht-B-Konformation der DNA-Struktur begünstigen kann, wurde vermutet, daß ihr vermehrtes Auftreten im X-Chromosom bei dem Mechanismus der Dosis-Kompensation eine Rolle spielt (Pardue et al., 1987; Huijser et al., 1987; Lowenhaupt et al., 1989). Mein Befund, daß die Transgene hsp82-neo und Adh in euchromatischen Stellen des X, aber nicht in Autosomen oder im beta-Heterochromatin an der X-Basis kompensiert werden, verstärkt die Assoziation von Dosis-Kompensation mit derartigen Nukleotidanhäufungen und die Möglichkeit, daß, zusätzlich zu einem durch das X-Autosomen-Verhältnis bestimmten Faktor, diese Polynukleotide lokale Änderungen der DNA oder der Chromatin-Struktur erzeugen wodurch Gendosis-Kompensation entsteht.

## Literatur

- Ashburner, M., and Berendes, H. D. (1978). Puffing of polytene chromosomes. In The genetics and biology of Drosophila, vol. 2d, (ed. M. Ashburner, and T. R. F. Wright, pp. 313-395. Academic Press, New York.
- Baker, B. S., and Belote, J. M. (1983). Sex determination and dosage compensation in Drosophila melanogaster. Ann. Rev. Genet. 17: 345-393.
- Beermann, W. (1952). Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von Chironomus tentans. Chromosoma, 5: 139-198.
- Beermann, W. (1962). Riesenschromosomen. Protoplasmatologia VI D. Springer-Verlag, Wien.
- Beermann, W. (1972). Chromomeres and genes. In Results and problems in cell differentiation, 4, (ed. W. Beermann, J. Reinert, and H. Ursprung), pp. 1-34. Springer-Verlag, New York.
- Benyajati, C., Place, A. R., Wang, N., Pentz, E., and Sofer, W. (1982). Deletions at intervening sequence splice sites in the alcohol dehydrogenase gene of Drosophila. Nucleic Acids Res. 10: 7261-7272.
- Birchler, J. A., Owenby, R. K., and Jacobsen, K. B. (1982). Dosage compensation of serine-4 transfer RNA in Drosophila melanogaster. Genetics, 102, 525-537.
- Bishop, J. M. (1985). Trends in oncogenes. Trends Genet. 1: 245-249.
- Birnstiel, M. (1988). Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles. (ed. M. Birnstiel), pp. 1-213. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.

- Blackman, R. K., and Meselson, M. (1986). Interspecific nucleotide sequence comparisons used to identify regulatory and structural features of the Drosophila hsp82 gene. J. Mol. Biol. 188: 499-515.
- Bourouis, M., and Richards, G. (1985). Remote regulatory sequences of the Drosophila glue gene sgs3 as revealed by P-element transformation. Cell 40, 349-357.
- Breen, T. R., and Lucchesi, J. C. (1986). Analysis of the dosage compensation of a specific transcript in Drosophila melanogaster. Genetics 112: 483-491.
- Bridges, C. B. (1935). Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of Drosophila melanogaster. J. Hered. 26: 60-64.
- Burtis, K. B., Thummel, C. S., Jones, C., W., Karim, F. D., and Hogness, D. S. (1990). The Drosophila 74EF puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. Cell 61: 85-99.
- Chelly, J., Concordet, J.-P., Kaplan, J.-C., and Kahn, A. (1989). Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2617-2621.
- Crick, F. (1971). General model for the chromosomes of higher organisms. Nature 234: 25-27.
- Engels, W. R. (1989). P Elements in Drosophila melanogaster. In Mobile DNA, (ed. D. E. Berg, and M. M. Howe), pp. 437-484. AMS Publications, Washington, D. C.
- Ganguly, R., Ganguly, N., and Manning, J. E. (1985). Isolation and characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene of Drosophila melanogaster. Gene 35: 91-101.

- Goldberg, D. A., Posakony, J. W., and Maniatis, T. (1983). Correct developmental expression of a cloned alcohol dehydrogenase gene transduced into the Drosophila germ line. Cell 34: 59-73.
- Hazelrigg, T., Levis, R., and Rubin, G. M. (1984). Transformation of white locus DNA in Drosophila: Dosage compensation, zeste interaction, and position effects. Cell 36, 469-481.
- Henikoff, S., and Eghtedarzadeh, M. K. (1987). Conserved arrangement of nested genes at the Drosophila gart locus. Genetics 117: 711-725.
- Hofmann, A., Keinhorst, A., Krumm, A., and Korge, G. (1987). Regulatory sequences of the sgs4 gene of Drosophila melanogaster analyzed by P-element transformation. Chromosoma 96: 8-17.
- Huijser, P., Hennig, W., and Dijkhof, R. (1987). Poly(dC-dA/dG-dT) repeats in the Drosophila genome. Chromosoma 95: 209-215.
- Jäckle, H., de Almeida, J. C., Galler, R., Kluding, H., Lehrach, H., and Edström, J.-E. (1982). Constant and variable parts in the Balbiani ring 2 repeat unit and the translation termination region. EMBO J. 1: 883-888.
- Jaffe, E. F. (1988). Dosage compensation and heat shock response of the Drosophila pseudoobscura hsp82 gene in Drosophila melanogaster. Ph.D. Thesis. University of Washington (USA).
- Jaffe, E., and Laird, C. (1986). Dosage compensation in Drosophila. Trends Genet. 2: 316-321.
- Jamrich, M., Greenleaf, A. L., and Bautz, E. K. F. (1977). Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2079-2083.

- Kahn, M., Kolter, R., Thomas, C., Figursky, D., Meyer, R., Remaut, D., and Helinski, D. R. (1979). Plasmid cloning vehicles derived from plasmids ColE1, F, R6K and RK2. *Methods Enzymol.* 68: 269-280.
- Kaiser, K., Furia, M., Glover, D. M. (1986). Dosage compensation at the sgs4 locus of Drosophila melanogaster. *J. Mol. Biol.* 187: 529-536.
- Karess, R. E., and Rubin, G. M. (1984). Analysis of P transposable element functions in Drosophila. *Cell* 38: 135-146.
- Koltzoff, N. K. (1934). The structure of the chromosomes in the salivary glands in Drosophila. *Science* 80: 312-313.
- Kostoff, D. (1930). Discoid structure of the spireme and irregular cell division in Drosophila melanogaster. *J. Hered.* 21: 323-324.
- Krumm, A., Roth, G. E., and Korge, G. (1985). Transformation of salivary gland secretion protein sgs-4 in Drosophila: Stage- and tissue-specific regulation, dosage compensation and position effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5055-5059.
- Laurie-Ahlberg, C. C., and Stam, L. F. (1987). Use of P-element-mediated transformation to identify the molecular basis of naturally occurring variants affecting Adh expression in Drosophila melanogaster. *Genetics* 115: 129-140.
- Levis, R., Hazelrigg, T., and Rubin, G. M. (1985). Separable cis-acting control elements for expression of the white gene of Drosophila. *EMBO J.* 4: 3489-3499.
- Lowenhaupt, K., Rich, A., and Pardue, M. L. (1989). Nonrandom distribution of long mono- and dinucleotide repeats in Drosophila chromosomes: Correlations with dosage compensation, heterochromatin and recombination. *Mol. Cell Biol.* 9: 1173-1182.

- Lucchesi, J. C., and Manning, J. E. (1987). Gene dosage compensation in Drosophila melanogaster. Advances in Genetics 24: 371-429.
- Marsh, J. L., Gibbs, P. D. L., and Timmons, P. M. (1985). Developmental control of transduced dopa decarboxylase genes in D. melanogaster. Mol. Gen. Genet. 198: 393-403.
- McNabb, S. L., and Beckendorf, S. K. (1986). Cis-acting sequences which regulate expression of the sgs-4 glue protein gene of Drosophila. EMBO J. 5: 2331-2340.
- Mattaj, I. W. (1988). UsnRNP assembly and transport. In Structures and function of major and small nuclear ribonucleoprotein particles. (ed. M. Birnstiel), pp. 100-114. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Morimoto, R. I., Tissières, A., and Georgopoulos, C. (1990). The stress response, function of the proteins, and perspectives. In Stress proteins in biology and medicine. pp. 1-36. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mukherjee, A. S., and Beermann, W. (1965). Synthesis of ribonucleic acid by the X-chromosomes of Drosophila melanogaster and the problem of dosage compensation. Nature (London) 207, 785-786.
- Muller, H. J. (1950). Evidence of the precision of genetic adaptation. Harvey Lect. Ser. XLIII, 165-229.
- Muller, H. J., League, B. B., and Offermann, C. A. (1931). Effects of dosage changes of sex-linked genes, and the compensatory effects of other gene differences between male and female. Anat. Rec. Suppl. 51: 110.
- Muller, H. J., and Prokofieva, A. A. (1935). The individual gene in relation to the chromomere and the chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 21: 1626.

- Painter, T. S. (1933). A new method for the study of the chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science* 78: 585-586.
- Painter, T. S. (1934). Salivary gland chromosomes and the attack on the gene. *J. Hered.* 25: 465-476.
- Paul, J. (1972). General theory of chromosome structure and gene activation in eukaryotes. *Nature* 238: 444-446.
- Pardue, M. L., Lowenhaupt, K., Rich, A., and Nordheim, A. (1987). (dC-dA)<sub>n</sub>·(dG-dT)<sub>n</sub> sequences have evolutionary conserved chromosomal locations in *Drosophila* with implications for roles in chromosome structure and function. *EMBO J.* 6: 1781-1789.
- Parkhurst, S. M., and Corces, V. G. (1985). forked, gypsies and suppressors in *Drosophila*. *Cell* 41: 429-437.
- Pierce, D. A., and Lucchesi, J. C. (1980). Dosage compensation of X-linked heat-shock puffs in *Drosophila pseudoobscura*. *Chromosoma* 76: 245-254.
- Pirrotta, V., Steller, H., and Bozzetti, M. P. (1985). Multiple upstream regulatory elements control the expression of the *Drosophila white* gene. *EMBO J.* 4: 3501-3508.
- Posakony, J. W., Fischer, J. A., and Maniatis, T. (1985). Identification of DNA sequences required for the regulation of *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene expression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 515-520.
- Reiss, B., Sprengel, R., and Schaller, H. (1984). Protein fusions with the kanamycin resistance gene from transposon Tn5. *EMBO J.* 3: 3317-3322.
- Rougvie, A. E., and Lis, J. T. (1988). The RNA polymerase II molecule at the 5' end of the uninduced hsp70 gene of *D. melanogaster* is transcriptionally engaged. *Cell* 54: 795-804.

- Rougvie, A. E., and Lis, J. T. (1990). Postinitiation transcriptional control in Drosophila melanogaster. Mol. Cell Biol. 10: 6041-6045.
- Rubin, G. M. (1983). Dispersed repetitive DNAs in Drosophila. In Mobile Genetic Elements, (ed. J. A. Shapiro), pp. 329-361. Academic Press, London.
- Rubin, G. M., and Spradling, A. C. (1982). Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. Science 218:348-353.
- Rykowski, M. C., Parmelee, S. J., Agard, D. A., and Sedat, J. W. (1988). Precise determination of the molecular limits of a polytene chromosome band: regulatory sequences for the Notch gene are in an interband. Cell 54: 461-472.
- Sarkar, G., and Sommer, S. S. (1989). Access to a messenger RNA sequence or its protein product is not limited by tissue or species specificity. Science 244: 331-334.
- Sass, H. (1984). Gene identification in polytene chromosomes: some Balbiani ring 2 gene sequences are located in an interband-like region of Chironomus tentans. Chromosoma 90: 20-25.
- Scholnick, S. B., Morgan, B. A., and Hirsh, J. (1983). The cloned dopa decarboxylase gene is developmentally regulated when integrated into the Drosophila genome. Cell 34, 37-45.
- Sorsa, V. (1988). Polytene chromosomes in genetic research. (ed. V. Sorsa), pp. 1- 289. Ellis Horwood Limited, Chichester, England.
- Southern, P. J., and Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. J. Mol. Appl. Gen. 1: 327-341.

Spradling, A. C., and Rubin, G. M. (1983). The effect of chromosomal position on the expression of the Drosophila xanthine dehydrogenase gene. Cell 34: 47-57.

Urness, L. D., and Thummel, C. S. (1990). Molecular interactions within the ecdysone regulatory hierarchy: DNA binding properties of the Drosophila ecdysone-inducible E74A protein. Cell 63: 47-61.

Varmus, H. E. (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. Ann. Rev. Genet. 18: 553-612.

Winnacker, E.-L. (1984). Gene und Klone: eine Einführung in die Gentechnologie. Verlag Chemie; Weinheim. S. 1-454.

Zachar, Z., Davison, D., Garza, D., and Bingham, P. M. (1985). A detailed developmental and structural study of the transcriptional effects of insertion of the copia transposon into the white locus of Drosophila melanogaster. Genetics 111: 495-515.

Zhimulev, I. F., Belyaeva, E. S., and Semeshin. (1981). Informational content of polytene chromosome bands and puffs. CRC Crit. Rev. Biochem. 11: 303-340.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorgelegte Arbeit in allen Teilen selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Professor Matthew Meselson ist Mitautor bei Veröffentlichung Nr. 6, da die Experimente während meiner vierjährigen Tätigkeit als research associate in seinem Labor an der Harvard-Universität durchgeführt und aus seinen NIH-Mitteln (und meinen DFG-Geldern) gefördert wurden. Aus ähnlichen Gründen ist Professor Thoru Pederson Mitautor bei Veröffentlichung Nr. 3. Die in diesen Veröffentlichungen beschriebenen Forschungsarbeiten wurden von mir geplant, allein ausgeführt und die Ergebnisse in Form eines Manuskriptes dargestellt. Die Professoren Meselson und Pederson waren bei der Überarbeitung/Gestaltung der jeweiligen Manuskripte für die Veröffentlichung beteiligt.

Mainz, den 15. Januar 1991

.....  


(Dr. Heinz Sass)

### Veröffentlichungen

1. Sass, H. (1978). Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Balbianiringe von Chironomus tentans. Dissertation - Universität Tübingen.
2. Sass, H. (1978). Experimental control of Balbiani ring transcriptional activity in Chironomus tentans. Cytobiologie 18: 202-203.
3. Sass, H. (1980a). Features of in vitro puffing and RNA synthesis in polytene chromosomes of Chironomus. Chromosoma 78: 33-78.
4. Sass, H. (1980b). Puffing und RNA-Synthese in larvalen und imaginalen Polytänchromosomen aus verschiedenen Geweben von Chironomus tentans. Biol. Zentralbl. 99: 399-428.
5. Sass, H. (1980c). Hierarchy of fibrillar organization levels in polytene interphase chromosomes of Chironomus. J. Cell Sci. 45: 269-293.
6. Sass, H. (1981). Effects of DMSO on the structure and function of polytene chromosomes of Chironomus. Chromosoma 83: 619-643.
7. Sass, H. (1982a). RNA polymerase B in polytene chromosomes: immunofluorescent and autoradiographic analysis during stimulated and repressed RNA synthesis. Cell 28: 269-278.
8. Sass, H. (1982b). Distribution of RNA polymerase B in polytene chromosomes. In Organization and expression of tissue-specific-genes. (Kiknadze and Belyaev, eds. p. 55, Novosibirsk, USSR).

9. Sass, H. (1983). Localization of Balbiani ring 2 gene sequences in an interband and band of the DRB-repressed locus of Chironomus tentans. **J. Cell Biol.** 97: 130a.
10. Sass, H. (1984). Gene identification in polytene chromosomes: some Balbiani ring 2 gene sequences are located in an interband-like region of Chironomus tentans. **Chromosoma** 90: 20-25.
11. Sass, H. (1989). Hsp82-neo transposition vectors to study insertional mutagenesis in Drosophila melanogaster and tissue culture cells. **Nucleic Acids Res.** 17: 10508.
12. Sass, H. (1990). P-transposable vectors expressing a constitutive and thermoinducible hsp82-neo fusion gene for Drosophila germline transformation and tissue-culture transfection. **Gene** 89: 179-186.
13. Sass, H. (1991). Gene regulation in polytene chromosomes: transcription, pre-mRNA-splicing, dosage compensation and puffing of a constitutively expressed and thermoinducible hsp82-neo transgene in D. melanogaster. Genetik-Kongreß, Berlin 1991. **Im Druck**.
14. Sass, H. und Bautz, E.K.F. (1980). Distribution of gene activities and RNA polymerase B (II) in polytene chromosomes of Chironomus. **Eur. J. Cell. Biol.** 22: 35.
15. Sass, H. und Bautz, E.K.F. (1982a). Immunoelectron microscopic localization of RNA polymerase B on isolated polytene chromosomes of Chironomus tentans. **Chromosoma** 85: 633-642.
16. Sass, H. und Bautz, E.K.F. (1982b). Interbands of polytene chromosomes: binding sites and start points for RNA polymerase B (II). **Chromosoma** 86: 77-93.

17. Sass, H. und Pederson, T. (1984a). Transcription-dependent localization of U1 and U2 small nuclear RNPs at major sites of gene activity in polytene chromosomes.  
**J. Mol. Biol.** 180: 911-926.
18. Sass, H. und Pederson, T. (1984b). Transcription-dependent localization of U1 and U2 small nuclear RNPs in polytene chromosomes.  
**J. Cell Biol.** 99: 145a.
19. Sass, H. und Meselson, M. (1989). Dosage compensation of Drosophila hsp82 and Adh genes at ectopic sites. 11th European Drosophila Research Conference, Marseille 1989, S.73.
20. Sass, H. und Meselson, M. (1991). Dosage compensation of the pseudoobscura hsp82 gene and the melanogaster Adh gene at ectopic sites in D. melanogaster.  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**: Im Druck
21. Löffler, T., Wismar, J., Sass, H., Miyamoto, T., Becker, G., Konrad, L., Blondeau, M., Protin, U., Kaiser, S., Gräf, P., Haas, M., Schuler, G., Schmidt, J., Phannavong, B., Gundacker, D. und Gateff, E. (1990). Genetic and molecular analysis of 6 tumor suppressor genes in Drosophila melanogaster.  
**Environmental Health Perspectives** 88: 157-161.

---

Es gibt eine Publikationslücke (1985-1988) wegen meines Wechsels von der Cytogenetik zur Molekularbiologie und im Untersuchungsobjekt von Chironomus zu Drosophila.

FACHBEREICH BIOLOGIE  
DER JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

# HABILITATIONSURKUNDE

Herr Dr. rer. nat.

## HEINZ SASS

geboren am 5. April 1944 in Frankfurt/Oder

hat durch seine Habilitationsschrift

REGELMECHANISMEN UND DETERMINANTEN  
DER TRANSKRIPTION IN POLYTÄNCHROMOSOMEN VON  
CHIRONOMUS UND DROSOPHILA

und seinen Vortrag mit anschließendem Kolloquium über das Thema

REGULATION DER GENAKTIVITÄT IN PFLANZLICHEN UND  
TIERISCHEN ZELLEN DURCH ANTISENSE-RNA

den für die Berufung zum Professor  
erforderlichen Nachweis hervorragender wissenschaftlicher Leistungen  
und pädagogischer Befähigung (Lehrbefähigung)  
im **Fach Genetik** erbracht.

Seine öffentliche Antrittsvorlesung behandelt das Thema

DAS REGULATORISCHE PHÄNOMEN DER  
GENDOSIS-KOMPENSATION

Diese Urkunde berechtigt Herrn Sass, seinem Doktorgrad  
den Zusatz „habilitatus“ („habil.“) hinzuzufügen sowie unter den  
im Hochschulgesetz von Rheinland-Pfalz und in der  
Habitationsordnung der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fachbereiche  
genannten Voraussetzungen die Lehrbefugnis (venia legendi) im  
oben genannten Fach wahrzunehmen und sich „Privatdozent“ zu nennen.

Festgestellt durch Beschluß der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fachbereiche  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

am 13. Mai 1992

Präsident



Dekan  
des Fachbereichs Biologie

