



**Immunzytologische Analyse der Mod(mdg4) Protein-Isoformen
und
funktionelle Analyse des Locus in *Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Frau **Manuela Gabler**

geboren am 14.06.1977

in Neubrandenburg (Mecklenburg-Vorpommern)

Gutachter:

1. Prof. Dr. H. Saumweber
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. Prof. Dr. G Reuter

Halle (Saale), den 14.04.2011

"Das Forschen ist an sich schon beinah die Entdeckung. Man findet immer, wenn man innig genug sucht - auf jede dringlich gestellte Frage kommt schließlich die Antwort. Oft zu unserem Schmerz."

Klaus Mann 1952

Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C ₂ H ₂	2-Cysteine-2-Histidine Protein-Motiv
cDNA	doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DS	<i>domain swap</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-(-aminoethylether)N,N',N'-tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
E(var)	Enhancer of Variegation
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
kb, Mb, Gb	Kilobasen, Megabasen, Gigabasen
kD	Kilodalton
lacZ	β-Galactosidase
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
NP40	Nonident P40
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	<i>phosphate buffered saline</i> + 0.2% Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEV	Positionseffekt-Variegation
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	<i>rotations/revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat (<u>S</u> odium- <u>d</u> odecyl- <u>s</u> ulfate)
Su(var)	<i>suppressor of variegation</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TR	Texas Red
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UTR	untranslatierter Bereich 5' des Start-ATG und 3' des Stop Codons
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-galactosid

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Gegenstand der Arbeit	7
2. Material und Methoden	9
2.1 Genetische Methoden	9
2.1.1 Anzucht und Haltung der Fliegen	9
2.1.2 Keimbahntransformation	9
2.1.3 Verwendete <i>Drosophila</i> -Stämme und Mutationen	9
2.2 Molekularbiologische Methoden	11
2.2.1 Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme	11
2.2.3 Inverse PCR	11
2.2.3 Gelelektrophorese von Proteinen und Nachweis im Westernblot	12
2.2.4 Isolation von Gesamt-RNA und halb-quantitative RT-PCR	13
2.2.5 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)	14
2.2 Immunzytologische Methoden	15
2.2.1 Immunmarkierung von Polytänchromosomen	15
2.2.2 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)-Analysen von Polytänchromosomen	16
3. Ergebnisse	17
3.1 Untersuchung der Verteilung der Mod(mdg4)-Proteine und der Bindungseigenschaften am Polytänchromosom	17
3.2 Einfluss der FLYWCH-Domäne auf die Lokalisierung der Mod(mdg4)-Proteine am Polytänchromosom	26
3.2.1 Mutagenese-gestützte Charakterisierung des FLYWCH-Motivs der Isoform Mod(mdg4)-64.2	26
3.2.2 Funktionelle Analyse chimärer Mod(mdg4)-64.2 Proteine	31
3.2.3 Funktionelle Analyse genomischer <i>mod(mdg4)-64.2-EGFP</i> Konstrukte	35
3.3 Einfluss von <i>mod(mdg4)</i> auf die chromosomale Telomer-Maintenance	39
3.3.1 Immunzytologische Untersuchungen der Mutante <i>Rev31</i>	40
3.3.2 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) -Analysen der Mutante <i>Rev31</i>	46
3.3.3 Untersuchung des Einflusses von <i>mod(mdg4)-64.2</i> auf die Regulation von telomerischen und euchromatischen Retrotransposons	49
3.3.4 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) am <i>HeT-A</i> Retrotransposon	54
3.3.5 Einengung einer euchromatischen Bindestelle der Isoform Mod(mdg4)-64.2 in der Region 26B	56
3.4 Untersuchungen zum <i>trans-Splicing</i> am komplexen Locus <i>mod(mdg4)</i>	59
3.4.1 Funktionelle Konservierung des <i>mod(mdg4)</i> -Lokus zwischen den Arten <i>Drosophila melanogaster</i> und <i>Drosophila virilis</i>	59
3.4.2 Nachweis von effektivem <i>trans-Splicing</i> am zweigeteilten <i>mod(mdg4)</i> -Lokus durch chromosomale <i>Rearrangements</i>	65
3.4.3 Nachweis der Bildung von Mod(mdg4)-67.2 in physiologischen Konzentrationen mit Hilfe von zwei Assay-Systemen	71

4.	Diskussion	77
4.1	Untersuchung der Verteilungsmuster der Mod(mdg4)-Proteine und deren Assoziation am Polytäanchromosom.....	77
4.2	Einfluss der FLYWCH-Domäne auf die Lokalisierung der Isoform Mod(mdg4)-64.2 am Polytäanchromosom.....	79
4.3	Einfluss von <i>mod(mdg4)</i> auf die chromosomale Telomer-Maintenance.....	83
4.4	Untersuchungen zum <i>trans-Splicing</i> am komplexen Locus <i>mod(mdg4)</i>	86
5.	Zusammenfassung	91
6.	Literaturverzeichnis	92
7.	Anhang.....	i

1. Einleitung

Seit dem Jahre 1953 ist die Struktur eines der wichtigsten Biomoleküle, der DNA, durch die Arbeiten von James Watson und Francis Crick bekannt (Watson und Crick 1953). Bereits 1944 wurde durch Oswald Avery, Colin MacLeod und Maclyn McCarty der Beweis erbracht, dass genau dieses Biomolekül und nicht, wie bis dahin angenommen die Proteine, die Träger der Erbinformation in den Organismen sind (Avery *et al.* 1944). Annähernd 50 Jahre später, im Jahr 2000, konnten durch die Entschlüsselung des 120 Mb umfassenden Genoms von *Drosophila melanogaster* mit Hilfe der *shotgun sequencing* Methode etwa 13.400 Gene identifiziert werden (Adams *et al.* 2000). Unmittelbar darauf erfolgte die Aufklärung des menschlichen Genoms (Venter *et al.* 2001), in welchem inzwischen mit Hilfe von Datenbanken in dem 3,2 Gb umfassenden Erbgut ca. 20.000-25.000 Gene postuliert wurden (International Human Genome Consortium *et al.* 2004). Für das Genom von *Saccharomyces cerevisiae* wurden für 12 Mb etwa 5.800 Gene (Goffeau *et al.* 1996), in *Caenorhabditis elegans* für 97 Mb DNA rund 19.400 Gene (The *C. elegans* Sequencing Consortium *et al.* 1998) und für den Reis im 390 Mb umfassenden Genom ca. 28.400 Gene postuliert (Kikuchi *et al.* 2003). Mit der Komplexität und Höherentwicklung der Organismen erweitert sich zwar die Größe des Genoms, jedoch steigt die Anzahl der darin verschlüsselten Gene nicht in der gleichen Relation. Offensichtlich ist doch aber in einem hoch entwickelten komplexen Organismus eine deutlich höhere Anzahl an Proteinen für die Homöostase und Funktionalität des Systems notwendig. An dieser Stelle wird deutlich, dass Mechanismen existieren müssen, welche aus den vorhandenen Genen zum entsprechenden Zeitpunkt die benötigte Menge der erforderlichen Proteine generieren können. Dabei werden durch verschiedene, aufeinander abgestimmte Prozesse aus einem Gen oft mehrere verschiedene Proteine synthetisiert. Schon auf der Ebene der DNA können beispielsweise durch Rekombinationsereignisse verschiedene Kombinationen der vorhandenen Informationen erzeugt werden und damit eine Variabilität der entstehenden Produkte. Weiterhin durchläuft die genetische Information bis zur Bildung eines fertigen Proteins mehrere molekulare Reifestufen. Hierbei können die Produkte auf den unterschiedlichen molekularen Ebenen entsprechende Modifizierungen erfahren. So kann die Transkription beispielsweise an unterschiedlichen alternativen Promotoren innerhalb eines Gens starten und die Poly-Adenylierung der mRNA an variablen Positionen ansetzen. Andererseits kann durch post-transkriptionelle Modifikationen wie zum Beispiel Glykosylierung, Methylierung und terminale Uridinylierung das

entstehende Protein verändert werden (Licatalosi und Darnell 2010). Die Erkennung und Nutzung von alternativen 5' oder 3' *splice-sites* scheint dabei jedoch die größte Vielfalt an möglichen Produkten, in Abhängigkeit von der Anzahl der kodierenden Exons zu generieren. Ein sehr anschauliches Beispiel hierfür ist das Gen *Dscam* (*Down syndrome cell-adhesion molecule*) bei *Drosophila*, dessen Produkte für die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes eine essentielle Rolle spielen. In jeder reifen mRNA werden 24 Exons des Locus kodiert, von denen 20 immer identisch sind und die verbleibenden aus 4 sogenannten Exonblöcken mit verschiedenen alternativen Exons gewählt werden. Durch entsprechende Kombination der variablen Exons können aus diesem Gen somit mehr als 38.000 Protein-Isoformen gebildet werden (Schmucker *et al.* 2000, Chen *et al.* 2006). Auch in Pflanzen, wie beispielsweise *Arabidopsis thaliana*, unterliegen nachweislich rund 20% der bekannten Gene dem alternativen *Splicing*. Dabei werden unter anderem der Blütenpromotor FCA (Macknight *et al.* 2002) oder essentielle Proteine für Resistenzen gegen Krankheiten wie RPS4 generiert (Zhang und Gassmann 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Muster der alternativen *Splicing*-Ereignisse durch den Gewebetyp aber auch durch Stressbedingungen, insbesondere Kälte-Stress, beeinflusst wird (Iida *et al.* 2009). Für das menschliche Genom wurde die Bildung von alternativen Produkten zunächst für 75% der Gene postuliert. Nach RNA-Sequenzierung und Datenbankvergleichen wurden später für beinahe alle sogenannten multi-Exon Gene, diese umfassen immerhin mehr als 90% des Genoms, alternative mRNA-Produkte vermutet (Licatalosi und Darnell 2010).

Wird aus separat transkribierten RNAs ein reifes mRNA Molekül gebildet, geschieht dies durch den Mechanismus des *trans-Splicing*. Die kodierenden Bereiche der einzelnen prä-mRNA Moleküle können dabei auf separaten nicht homologen Chromosomen lokalisiert sein oder von unterschiedlich orientierten DNA-Strängen auf einem Chromosom kodiert werden (Gingeras 2009). Als erstes konnte dieser Mechanismus 1986 in *Trypanosoma* gezeigt werden (Sutton und Boothroyd 1986), wo alle mRNA Transkripte der mitochondriellen DNA (auch als Kinetoplast bezeichnet) durch *trans-Splicing* generiert werden, was eine wichtige Grundlage für die parasitäre Lebensweise und die damit notwendige Anpassung an die Umwelt bei diesen Organismen darstellt (Simpson *et al.* 2006). Aber auch in anderen Einzellern wie der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wurden Beispiele für *trans-Splicing* gefunden. Beim *psaA*-Gen, einem Bestandteil der photosynthetischen Maschinerie, sind die drei kodierenden Exons über das gesamte Chloroplasten-Genom verteilt und werden via *trans-Splicing* zusammengeführt (Perron *et al.* 2004). Wenig später wurden Belege für diesen Mechanismus auch

in Nematoden gefunden. Inzwischen ist bekannt, dass bei *Caenorhabditis elegans* rund 70% der mRNAs am 5'Ende mit sogenannten *spliced leader* Sequenzen (kurz SL-Sequenzen) durch einen *trans-Splicing* Mechanismus verknüpft werden. Da diese *spliced leaders* oftmals unmittelbar vor das initiierende Methionin-Codon eingefügt werden, wird eine der möglichen Funktionen in der Initiation der Translation vermutet. Außerdem werden die durch Operons kodierten meist polycistronischen prä-mRNAs mit Hilfe des SL-spezifischen *trans-Splicing* in polyadenylierte monocistronische mRNAs gepalten. Damit spielt dieser Mechanismus eine wichtige Rolle bei der post-transkriptionellen Regulation der Gene. Dabei können die kodierenden SL-Gene einige Tausend Nukleotide entfernt von der Zielsequenz oder gar auf anderen Chromosomen lokalisiert sein (Blumenthal 2005).

Der Mechanismus des *trans-Splicing* ist dabei nicht nur auf einzellige Organismen und Fadenwürmer limitiert. Für einen Vertreter der Pflanzen, *Arabidopsis thaliana*, wurden derartige Ereignisse für das Transkribieren der *nad*-Gene (*nad1*, *nad2*, *nad5*), welche wichtige Komponenten der Atmungskette in den Mitochondrien repräsentieren, gezeigt (deLongevialle *et al.* 2007).

Nachweislich konnten fehlerhafte *trans-Splicing* Mechanismen auch als wichtige Faktoren bei der Entstehung von menschlichen Krankheiten nachgewiesen werden. In normalen endometrialen-Zellen werden spezielle chimäre RNAs gebildet, die 5'Exons vom *JAZF1*-Gen enthalten (kodiert auf Chromosom 7p15) und 3'Exons des Gens *JJAZ1*, welches auf dem Chromosom 17q11 lokalisiert ist. Beim endometrialen Stromasarkom (Gebärmutterkrebs) wird die gleiche RNA gebildet, allerdings liegt hier eine chromosomale Translokation der beiden kodierenden Bereiche vor, was als T(7;17)(p15;q21) bezeichnet wird. Vorrangig wird die fehlende natürliche Kontrolle des *Splicing* und damit eine Überproduktion des Proteins im Tumor von den Autoren als Ursache für die Erkrankung diskutiert (Gingeras 2009, Li *et al.* 2008).

In *Drosophila melanogaster* ist das Gen *modifier of midget* - *mod(mdg4)* als Beispiel für alternatives *trans-Splicing* bekannt, wofür Dorn *et al.* 2001 den Beleg liefern konnten. Der Nachweis multipler Promotorelemente, verteilt über den gesamten Locus, untermauerte einige Zeit später diese Hypothese (Promotion M. Volkmar 2010).

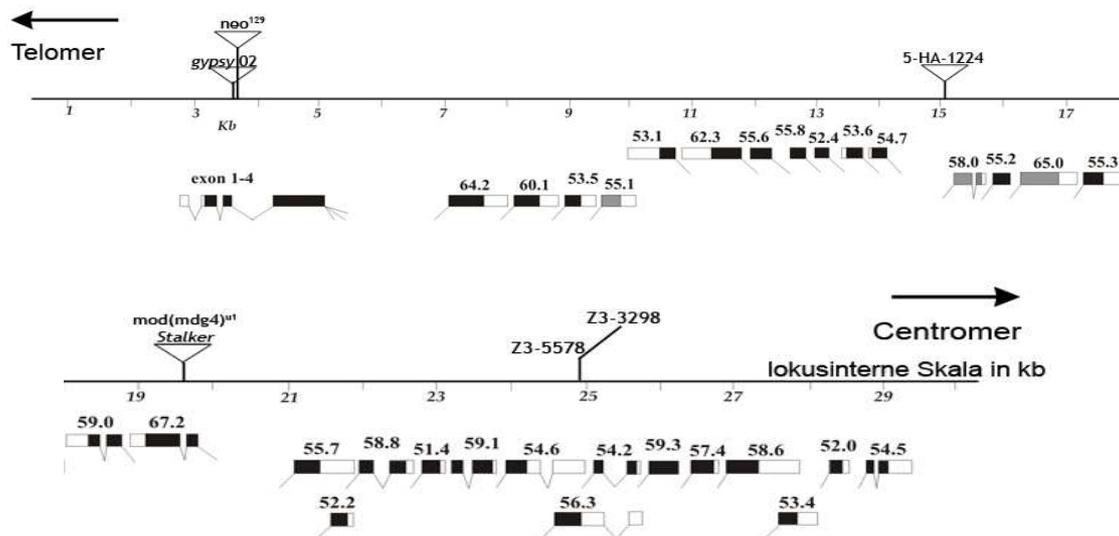


Abbildung 1: Schematische Darstellung der genomischen Region des komplexen *mod(mdg4)*-Lokus und einiger bekannter insertioneller Mutationen. Die *mod(mdg4)* Exons sind unterhalb der Skala dargestellt. Gefüllte Boxen stehen für kodierende Sequenz, leere für 5'- bzw. 3' UTR (untranslatierter Bereich). Die einzelnen *trans-Splicing* Positionen sind durch Aufstriche gekennzeichnet. Die gemeinsamen Exons 1-4 befinden sich *upstream* im Locus (oben links in der Abbildung). *Downstream* davon, im spezifischen Teil des Gens, sind 31 Isoform-spezifische Exons 5 (bzw. 5 und 6) aufgeführt. Die Isoformen sind nach dem theoretischen Molekulargewicht der kodierten Proteine in kDa bezeichnet. Neun isoformspezifische Exons werden vom Gegenstrang kodiert, sie sind in Bezug auf die gemeinsam kodierten Exons nach oben versetzt dargestellt. Die insertionellen Mutationen sind durch Dreiecke vermerkt, die beiden mit Z3 bezeichneten Mutationen sind EMS-induzierte Mutationen im Isoform-spezifischen Exon der Isoform *mod(mdg4)*-56.3 (Thomas *et al.* 2005). Die Karte ist nach Dorn *et al.* (2001) modifiziert.

Das komplexe Gen kodiert für 31 verschiedene Chromatinproteine, welche einen gemeinsamen N-terminalen Bereich, bestehend aus 402 Aminosäuren, aufweisen. Der variable C-terminale Bereich der Proteine wird von den verschiedenen 3' Exons des Gens gebildet (Abb.1).

Die Proteine enthalten im gemeinsamen Bereich eine BTB/POZ-Domäne (*Bric à brac*, *Tramtrack*, *Broad complex / pox virus* and *zinc finger* - kurz BTB). Dieses stark konservierte ca.120 Aminosäuren enthaltende Proteinmotiv wurde bei verschiedensten Spezies (Nematoden, Huhn, Ratte, Mensch) meist im N-terminalen Teil der Moleküle nachgewiesen. Proteine mit einer BTB-Domäne spielen erwiesenermaßen eine wichtige Rolle bei der zellulären Transkriptionsregulation. Es wird allgemein angenommen, dass diese Domäne die Bildung von Protein-Homodimeren oder -Heterodimeren, aber auch deren Oligomerisierung unterstützt. Neben dem *mod(mdg4)*-Lokus konnten in

Drosophila auch für die Genprodukte von *kelch* und *lola* BTB-tragende Proteine konstatiert werden (Read *et al.* 2000, Horiuchi *et al.* 2003).

Der C-Terminus der Proteine, die vom *mod(mdg4)*-Lokus kodiert werden, kann aus 31 verschiedenen Exons 5 (bzw. Exons 5 und 6) gebildet werden und variiert, in Abhängigkeit vom genutzten spezifischen Exon, zwischen 71 und 208 Aminosäuren. Die einzelnen Isoformen werden dabei nach dem Molekulargewicht der entstehenden Proteine benannt, welches aus der cDNA-Sequenz der entsprechenden Klone abgeleitet wurde. In 28 der 31 generierten Isoformen konnte die FLYWCH-Domäne als ein stark konserviertes Proteinmotiv im spezifischen Teil der Moleküle nachgewiesen werden. Basierend auf 5 hydrophoben, konservierten Aminosäuren ergab sich die Bezeichnung dieser Domäne (Dorn und Krauss 2003). Babu *et al.* (2006) ordneten später die FLYWCH Domäne als eine Untergruppe der WRKY-GCM1-Domäne ein, die mit einem typischen C₂H₂-Zinkfinger-Motiv zur Gruppe der DNA-bindenden Domänen vieler eukaryotischer Transkriptionsfaktoren gehört (Babu *et al.* 2006). Für keine der *Mod(mdg4)*-Isoformen konnte bisher eine DNA-Bindung eindeutig belegt werden. Durch Nègre *et al.* (2010) wurde zwar kürzlich für das Protein *Mod(mdg4)*-67.2 ein DNA-Targetmotiv beschrieben, allerdings konnte auch hier keine direkte DNA-Bindung des Proteins nachgewiesen werden.

Für 3 *Mod(mdg4)* Proteine konnte die FLYWCH-Domäne in der bisher definierten Form nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurden in den C-Termini dieser Isoformen zur FLYWCH-Domäne ähnliche Motive postuliert (BED-, BEN-Domäne; Labrador *et al.* 2003, Abhiman *et al.* 2008).

Der Lokus *mod(mdg4)* ist sehr komplex und die gebildeten Proteine weisen ein breites Spektrum an möglichen Funktionen in *Drosophila* auf. Tragen die Mutanten, welche in verschiedenen genetischen und biochemischen Assays identifiziert wurden, Veränderungen im gemeinsam kodierten Teil des Lokus, so sind die Tiere homozygot nicht lebensfähig. Im Hintergrund solcher Mutanten konnten Einflüsse im PEV (*position effect variegation*, Dorn *et al.* 1993a), Veränderungen bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung synaptischer Verbindungen bei der Innervierung von Muskelzellen (Gorczyca *et al.* 1999) und Einflüsse auf apoptotische Prozesse im Hefe-Di-Hybrid-System (Harvey *et al.* 1997) gefunden werden. Mutanten, welche einzelne spezifische Exons 5 (oder 5 und 6) betreffen, sind bisher lediglich für 2 Isoformen bekannt. Die beschriebenen Isoform-spezifischen Mutanten sind dabei im Gegensatz zu den Mutanten des gemeinsamen Bereiches homozygot lebensfähig.

Mit Hilfe der Mutante für die Isoform Mod(mdg4)-67.2 konnte erstmals einem einzelnen Mod(mdg4)-Protein eine Funktion zugeordnet werden. Durch eine *stalker*-Insertion im Isoform-spezifischen Exon ist das *mod(mdg4)^{u1}* Allel hypomorph und bildet nur noch ein verkürztes Mod(mdg4)-67.2-Protein (Gerasimova *et al.* 1995, Abb.1). In dieser Mutante wird die Expression des *yellow*-Lokus im Mutantenhintergrund y^2 unterdrückt (Georgiev und Gerasimova 1989), was auf eine veränderte Wirkung von Chromatin-Insulatoren zurückgeführt werden konnte. Chromatin-Insulatoren sind DNA-Protein Komplexe, welche in der Lage sind Enhancer-Promotor-Aktivitäten zu blockieren und/oder sie fungieren als Barriere gegen die Ausbreitung des Gen-*silencing* Effekts durch die Nähe von Heterochromatin. Die Isoform Mod(mdg4)-67.2 ist zusammen mit weiteren Proteinen an der Ausbildung dieser speziellen Chromatin-Elemente beteiligt. Dabei werden im Genom inserierte *gypsy*-Retrotransposons durch *Suppressor of Hairy-wing* - [Su(Hw)] Sequenz-spezifisch gebunden. Dieses Zink-Finger DNA-bindende Protein rekrutiert anschließend weitere Faktoren wie CP190, dTopor und auch Mod(mdg4)-67.2 zur Etablierung des funktionellen Insulators (Gerasimova *et al.* 1995, Gause *et al.* 2001, Pai *et al.* 2004, Capelson und Corces 2005). Die Funktion dieser Elemente besteht in der Gewährleistung der adäquaten Regulator-Gen-Interaktion durch Abschirmen der Promotoren von der inkorrekten *Enhancer*-Wirkung benachbarter Gene (Mohan *et al.* 2007). Voraussetzung hierfür ist die Insertion der Insulatoren zwischen Enhancer- und Promoter-Element. In diploidem Gewebe sind mehrere solcher individuellen *gypsy*-Insulator Sites zu „Insulator-Bodies“ vereinigt (Gerasimova und Corces 1998, Gerasimova *et al.* 2000). Diese Ausbildung der höheren Chromatin-Ordnung, was mit der Bildung von DNA-Loop-Strukturen einhergeht, wird dabei maßgeblich durch die Isoform Mod(mdg4)-67.2 vermittelt (Capelson und Corces 2005). Somit ist diese Isoform sowohl in die Ausbildung funktioneller Chromatin-Insulatoren als auch in die Paarungsvermittlung bestimmter Chromatin-Strukturen direkt bzw. indirekt involviert.

Inzwischen konnten für eine weitere Isoform, Mod(mdg4)-56.3, mittels Punktmutanten im Isoform-spezifischen Exon wichtige Anhaltspunkte für die Funktion erhalten werden (Thomas *et al.* 2005). Hierbei wurde ein Einfluss des Proteins auf die Paarung der homologen Chromosomen während der Zellteilung gezeigt. Im Verlauf der Meiose ist die akkurate Segregation der dicht gepaarten Homologen ein obligatorischer Schritt der geschlechtlichen Fortpflanzung. Die Punktmutationen in *mod(mdg4)-56.3* (*mod(mdg4)^{Z3-5578}* und *mod(mdg4)^{Z3-3298}*, Thomas *et al.* 2005, Abb.1) führen bei *Drosophila melanogaster* zu einer drastisch erhöhten Frequenz an *non-disjunction* (NDJ), also fehlerhaften Verteilung sowohl von Autosomen wie auch von

Geschlechtschromosomen auf die Tochterzellen. Es konnte durch die Arbeiten (Thomas *et al.* 2005) belegt werden, dass die Isoform Mod(mdg4)-56.3 mit Hilfe des Proteins *Stromalin in meiosis* (SNM) die Paarung der homologen Chromosomen in der G2-Phase der Zellteilung vermittelt. Bei Untersuchungen der chromosomalen Regionen, in welchen die interhomologen Interaktionen während der Chromosomen-Paarungen stattfinden (auch „*pairing sites*“ genannt), wurde eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von rDNA-*Repeats* und der X-Y-Paarung in der männlichen Meiose gefunden (McKee 1996). Möglicherweise wird durch die Isoform Mod(mdg4)-56.3 und dem Protein SNM eine rDNA-240bp-*repeat* abhängige Paarung der Chromosomen im Verlaufe der Zellteilung vermittelt (McKee 1996, Thomas *et al.* 2005). Hinweise darauf könnten zudem in der speziellen Proteinstruktur der Mod(mdg4)-Isoform liegen, da für das stark konservierte BTB-Motiv die Ausbildung von Protein-Homo- und Heterodimeren postuliert wird.

Für eine weitere Isoform, *mod(mdg4)-64.2*, konnten in vorangegangenen Arbeiten (Diplomarbeit M. Gabler 2003) ebenfalls Hinweise auf eine mögliche Funktion des Proteins erhalten werden. In immunzytologischen Analysen wurde neben der euchromatischen auch eine Assoziation des Proteins mit den telomerischen Regionen der Chromosomen gefunden. Im Gegensatz zu den meisten Eukaryoten deren Telomere durch die Aktivität der Telomerase aufrecht erhalten werden, bestehen bei *Drosophila* diese speziellen Strukturen aus *Repeats* der non-LTR-Retrotransposons *HeT-A*, *TART* und *Tahre*. Mittels reverser Transkription der elementeigenen RNA (Retrotransposition) addieren sich die Elemente autark an die chromosomalen DNA-Enden (Pardue und deBaryshe 2003, Abad *et al.* 2004b). Möglicherweise hat die Isoform Mod(mdg4)-64.2 einen funktionellen Anteil an der Aufrechterhaltung dieser besonderen telomerischen Strukturen.

1.1 Gegenstand der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten durch verschiedene Untersuchungsmethoden weitere Anhaltspunkte zum prinzipiellen Grundverständnis des *mod(mdg4)*-Lokus erhalten werden. Analysen am Polytäanchromosom mit einem Antikörper, welcher den gemeinsamen N-Terminus der Proteine und somit alle Isoformen detektiert (anti-ModC), zeigte in einer Vielzahl von Signalen die Bindung der Mod(mdg4)-Proteine an den Telomeren der Chromosomen, an zahlreichen euchromatischen Sites und am Chromozentrum. Die Arbeiten von Büchner *et al.* (2000) belegten mit Hilfe von Isoform-spezifischen Antikörper-

pern, dass für die beiden untersuchten Isoformen die Zahl der detektierten Signale gegenüber der Gesamtheit aller Proteine deutlich reduziert ist und keine überlappenden Bindemuster am Polytänchromosom detektiert werden konnten. Somit stellte sich die Frage, ob das erhaltene Bindungsmuster aller Isoformen die Summe aus den Verteilungsmustern der einzelnen Mod(mdg4)-Proteine darstellt und ob alle Isoformen ein individuelles Bindemuster zeigen. Mit Hilfe EGFP-getagter Fusionsproteine sollte daher eine systematische Analyse der Mod(mdg4)-Isoformen erfolgen. Durch die Lokalisierung der Proteine und die Ermittlung des spezifischen Bindungsverhaltens sollten weitere Anhaltspunkte für die Charakterisierung der einzelnen Isoformen und letztendlich für ein mögliches generelles Funktionsprinzip des Lokus erhalten werden.

Das spezifische Verteilungsmuster der einzelnen Isoformen wird vermutlich durch die C-terminal lokalisierte konservierte FLYWCH-Domäne vermittelt (Büchner *et al.* 2000, Gause *et al.* 2001, Gabler *et al.* 2005). Um diese Annahme näher zu untersuchen, bestand ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit in der genaueren Analyse dieses Proteinmotivs. Mittels verschiedener Mutanten-Konstrukte sollte der Einfluss dieser Proteindomäne auf die Spezifität der Chromatin-Assoziation der Isoformen näher charakterisiert werden. Neben der systematischen Analyse der einzelnen Isoformen sollte der komplexe *mod(mdg4)*-Lokus hinsichtlich der Regulation bei der Transkription der einzelnen Exons bzw. in Transkription-Einheiten zusammengefassten Exon-Gruppen untersucht werden. Aus der Struktur des Lokus wird die Kodierung der Exons auf beiden, sowohl dem parallelen wie auch dem antiparallelen DNA-Strang ersichtlich (Abb.1). Die Arbeiten von Dorn *et al.* (2001) gaben erste Hinweise darauf, dass nicht nur jene Isoformen, deren spezifisches Exon 5 (oder 5 und 6) auf dem antiparallelen DNA Strang kodiert werden, sondern wahrscheinlich alle Isoformen durch alternatives *trans-Splicing* gebildet werden (Büchner *et al.* 2000, Dorn und Krauss 2003). Daraufhin stellte sich die Frage inwieweit die physische Nähe der einzelnen Transkriptionseinheiten im intakten Lokus für effektives *trans-Splicing* notwendig ist. Für die Isoform Mod(mdg4)-67.2 wurde gezeigt, dass in transheterozygoten Tieren, welche jeweils ein Mutanten-Allel für den gemeinsam kodierten Bereich und ein Allel für das Isoform-spezifische Exon tragen, wieder funktionelles Protein gebildet wird (Mongelard *et al.* 2002). Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte mit Hilfe chromosomaler *Rearrangements* mit einem Bruchpunkt im *mod(mdg4)*-Lokus die Bildung von funktionellem Protein trotz räumlicher Trennung der beiden Transkriptions-Einheiten genauer evaluiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Genetische Methoden

2.1.1 Anzucht und Haltung der Fliegen

Die Anzucht und Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgte auf einem Standardmedium (1% Agar, 5% Zuckerrübensirup, 4% Rosinenbrei, 4% Hartweizengrieß, 1.3% Bierhefe, 1.3% Maismehl, 0.2% Propionsäure). Zur Vermeidung von Schimmelbildung bzw. Bakterienwachstum wurde dem Medium 0.5% Nipagin sowie 140 µM Ampicillin zugesetzt. Die Haltung der Stämme erfolgte bei 18°C. Kreuzungen wurden im Allgemeinen bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Für Ablagen zum Sammeln von Embryonen wurde ein Medium aus 2.2% Agar, 10% Zucker und Aktivkohle (nach Bedarf) verwendet. Zur Stimulation der Eiablage wurde Bäckerhefe auf die Oberfläche des Mediums gegeben.

2.1.2 Keimbahntransformation

Um transgene Linien von *Drosophila melanogaster* zu erzeugen, wurde die Methode von Rubin und Spradling (1982) angewendet und wie folgt abgewandelt: Alle Transgene waren w^+ markiert. Abhängig von der Transgengröße wurden 300 bis 700 ng Transformationsvektor zusammen mit 150 ng Transposasequelle mittels einer Glaskapillare in den posterioren Pol 0-40 min alter, dechorionisierter Embryonen w^{118}_{iso} injiziert.

2.1.3 Verwendete *Drosophila*-Stämme und Mutationen

Die ausführliche Beschreibung der verwendeten Mutationen und Balancer-Chromosomen inklusive zytologisch bestimmter Inversionsbruchpunkte sowie dominanter und rezessiver Mutationen kann Lindsley und Zimm (1992) bzw. FLYBASE (www.flybase.bio.indiana.edu) entnommen werden.

Zur besseren Handhabung von Sequenzen wurde eine lokusinterne Skalierung festgelegt. Zur Umrechnung zwischen dieser und der annotierten *Drosophila melanogaster*-Genomsequenz sei angemerkt, dass Position 1 auf der *mod(mdg4)*-Skala der *D. melanogaster*-Genomposition (Release 5) 3R:17.205.907 entspricht; Position 10.001 korrespondiert zu 3R:17.195.907 und Position 30.001 entspricht 3R:17.175.907.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete *Drosophila melanogaster* Stämme und Mutationen

AJ545076 - DrosDel ¹ <i>P{RS5}5-HA-1224</i>	RS5- <i>P</i> -Elementinsertion bei 3R:17.191.074 http://www.drosdel.org.uk/
AJ622611 - DrosDel ¹ <i>P{RS5}5-HA-5045</i>	RS5- <i>P</i> -Elementinsertion bei 2L: 6.054.407 http://www.drosdel.org.uk/
AJ545701 - DrosDel ¹ <i>P{RS3}CB-5786-3</i>	RS3- <i>P</i> -Elementinsertion bei 2L: 6.082.374 http://www.drosdel.org.uk/
<i>Dr</i> , $\Delta 2-3$ / TM6C, <i>Sb</i>	Transposasequelle, regulatorisches zweites Intron deletiert ($\Delta 2-3$), in der Keimbahn aktiv; <i>Dr</i> -Marker
a-31	$y^1 ac sc pn$ (keine Mutation in <i>mod(mdg4)</i>)
$y^2 sc^{D1} wct^6$	P.Georgiev, Institute of Gene Biology, Moskau
<i>mod(mdg4)</i> ^{u1}	Stalker-Insertion in Exon5 von <i>mod(mdg4)</i> -67.2 P.Georgiev, Institute of Gene Biology, Moskau
Bloomington #188	$y^2 sc^1 w^a ec^1$ <i>gypsy</i> -Insertion im <i>yellow</i> -Lokus
Bloomington #5905 [w^{1118}_{iso}]	w^{1118} ; isogener Hintergrund für das 1., 2. u. 3. Chromosom
Bloomington #2057 [Canton-S]	$y^1 ocR3.2$; <i>Gr22b1 Gr22d1 cn1 CG33964R4.2 bw^1 sp^1</i> ; <i>LysC1 labR4.2 MstProx1 GstD51 Rh61</i> <E>; Referenzstamm des <i>Drosophila melanogaster</i> -Genomprojekts (Canton-S)
Bloomington #4414	$y^1 w^*$; <i>P{Act5C-GAL4}25FO1/CyO</i> , y^+ ubiquitäre Expression von GAL4 in allen Geweben
Df(2L)ED383	Stamm der DrosDel Kollektion, Deletion Position 5.801.918 - 6.465.768
# 150388 - DGRC ² w^{1118} ; Df(2L)ED343/SM6a	Deletion 2L: Position 6.000.124-6.082.374 http://kyotofly.kit.jp/cgi-bin/stocks/index.cgi
#150287 - DGRC ² w^{1118} ; Df(2L)ED373/SM6a	Deletion 2L: Position 5.981.079-6.411.333 http://kyotofly.kit.jp/cgi-bin/stocks/index.cgi
Df(2L)ED344	Stamm der DrosDel Kollektion, Deletion Position 5.980.272-6.082.374
# 150494 - DGRC ² w^{1118} ; Df(2L)ED330/SM6a	Deletion 2L: Position 5.943917-5.999.667 http://kyotofly.kit.jp/cgi-bin/stocks/index.cgi
Df(2L)ED7890	Stamm der DrosDel Kollektion, Deletion Position 6.054.407-6.082.374
GAL4 Treiber 14-2	Treiber-Stamm Prof. Harald Saumweber, Berlin Spezifisch für Speicheldrüsen
<i>T(2;3)26A,mod(mdg4)</i>	reziproke Translokation zwischen Chromosom 2L (Position 5.949.427) und Chromosom 3R (Position 17.191.073) M. Volkmar pers. Mitteilung
<i>In(3R)89C,mod(mdg4)</i>	Inversion auf 3R, Position 17.191.073 und Position 12.260.706 M. Volkmar pers. Mitteilung
<i>In(3R)mod(mdg4),94C</i>	Inversion auf 3R, Position 17.191.073 und Position 18.552.029 M. Volkmar pers. Mitteilung
<i>Df(3R)ED6050</i>	Deletion auf 3R, Position 17.191.073 bis Position 17.122.251 M. Volkmar pers. Mitteilung
<i>mod(mdg4)</i> ⁰² [71-4]	Insertion eines <i>gypsy</i> -Retrotransposon in das dritte Intron von <i>mod(mdg4)</i> Position 3R:17.202.239
<i>Mod(mdg4)</i> $\Delta 64.2$ [$\Delta 64.2$]	Exakte Deletion des spez.Exon <i>mod(mdg4)</i> -64.2 M. Volkmar pers. Mitteilung
<i>Mod(mdg4)</i> ^{HA1224-Rev31} [Rev31]	Deletion innerhalb des <i>mod(mdg4)</i> Lokus von Position 6.502 bis 21.447 (lokusinterne Skala) M. Volkmar pers. Mitteilung

¹ **DrosDel:** Die verwendeten *P*-Element-Linien entstammen der „DrosDel-Kollektion“, einer Sammlung von RS (*re-arrangement screen*) *P*-Element Insertionen zum gezielten Aufbau von Deletionen und/oder Duplikationen bei *Drosophila melanogaster* (Golic und Golic 1996).

² **DGRC:** Drosophila Genetic Resource Center, Kyoto Stock Center - Institute of Technology

2.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie z.B. PCR oder Trennung von Restriktionsfragmenten in Agarosegelen wurden nach Sambrook und Russell (Hrsg. 2001) bzw. nach Protokollen und Empfehlungen der Hersteller verwendeter Reagenzien und Kits durchgeführt. Genutzte Kits werden bei ihrer ersten Erwähnung in dieser Arbeit namentlich mit Hersteller angegeben.

Für die Isolation geringer Mengen genomischer DNA aus einzelnen Larven oder adulten Tieren fand die *single fly prep*-Methode (Gloor und Engels, 1992) Anwendung.

Nach Planung der PCR-Reaktionen wie in Kleppe *et al.* (1971) empfohlen, wurde die Zielsequenz mittels thermophiler Taq-Polymerase (GibcoBRL) bzw. Pfu-Polymerase (Stratagene) nach Standardprotokoll (Seiki *et al.* 1990) amplifiziert.

Die Klonierungen von PCR-Fragmenten erfolgten mit dem pGEM-T Cloning Kit (Promega).

Sequenzreaktionen wurden mit dem BigDye® Terminator v1.0 bzw. v1.1 Cycle Sequencing Kit nach Herstellervorgaben durchgeführt.

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit dem Staden-Package, Version 2001.0 bzw. GCG-Package, Version 10.2.

Die für die einzelnen Reaktionen verwendeten Primer sind in Tabelle 7.2 im Anhang aufgeführt.

2.2.1 Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Arbeiten wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α (Invitrogen) verwendet. Zur Kultivierung für Plasmidpräparationen im Mini- und Midi Maßstab wurden XL1-Blue MRF' Zellen (Stratagene) genutzt.

DH5 α : F- ϕ 80dlacZM15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r k-, m k+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -

XL-1Blue MRF': Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn5 (Kan^r)]

2.2.3 Inverse PCR

Die Methode der inversen PCR wurde zur Bestimmung des Insertionsorts von P-Element-Insertionen angewendet und erfolgte in Anlehnung an das Protokoll E.Jay Rehm

(Berkley Drosophila Genome Project) mit folgenden Modifikationen. Die PCR-Reaktionen am Ligationsansatz wurden zunächst mit den Primern 5'P forw-1 und 5'P rev-1 für das 5'-Ende des *P*-Elements bzw. 3'P forw-1 und 3'P rev-1 für das 3'-Ende des *P*-Elements vorgenommen. Für eine größere Produktausbeute wurden verschachtelte PCR's mit entsprechenden Primerpaaren für den 5'-Bereich [5'P forw-2 und 5'P rev-2] bzw. den 3'-Bereich [3'P forw-2 und 3'P rev-2] durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden vorwiegend mit dem Primer 5'P rev2 sequenziert, der vom 5' *P-repeat* (Tab.7.2-Anhang) in Richtung der angrenzenden genomischen DNA orientiert ist. Durch Datenbankvergleich der an das *P*-Element angrenzenden Sequenz mit der Gesamtsequenz von *Drosophila melanogaster* konnten die entsprechenden Insertionsstellen identifiziert werden.

2.2.3 Gelelektrophorese von Proteinen und Nachweis im Westernblot

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970). Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5%, im Trenngel 7.5-15% (abhängig vom aufzutrennenden Molekulargewichtsbereich). Die Elektrophorese wurde in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1% SDS) bei 20 mA für ein Minigel (10x15 cm) durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandards wurden Proteinleitern (MBI Fermentas) eingesetzt. Die Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese auf eine PVDF-Membran (Macherey-Nagel) durch Elektro-Blot-Transfer bei 0.8 mA/cm² für 2 h transferiert (Blotpuffer: 192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20% Methanol). Die Membran wurde für 2 h bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver (Biorad) in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.4) geblockt. Im Anschluss daran wurden die primären Antikörper (Tab.2.2) in 5% Milchpulver oder 3% BSA in PBS verdünnt zugegeben und entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 3x 15 min Waschen in PBST (1x PBS; 0.2% Tween20) wurden die entsprechenden Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Tab.2.2) in 5% Trockenmilchpulver (Biorad) zugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde wiederum 3x 15 min in PBST gewaschen. Danach erfolgte die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Antikörper mit dem ECL- bzw. ECL Plus System (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers.

Tabelle 2.2: Übersicht über verwendete Antikörper und eingesetzte Verdünnungen

Firma Molecular Probes/Invitrogen		
A-11039	alexa Fluor® 488 goat anti-chicken IgG (H+L)	1:100
A-11072	alexa Fluor® 594 F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)	1:100
A-11008	Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	1:50 - 1:200
A-21422	alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG (H+L)	1:50
A-11001	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	1:50 - 1:200
G-21040	goat anti-mouse IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugate	1:5000
G-21234	goat anti-rabbit IgG (H+L), horseradish peroxidase conjugate	1:5000
Firma Santa Cruz		
sc-30210	Vasa (d-260) Antibody rabbit IgG	1:100 - 1:200
sc-5546 ehem. Sigma	α-Tubulin (H-300) Antibody	1:20.000 - 1:50.000
Firma Millipore/Upstate		
MAB 3580	Anti-Green Fluorescent Protein	1:1000
07-449	Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys27) H3K27me3	1:200
07-549	Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys36) H3K36me3	1:200
04-079	Anti-trimethyl-Histone H4 (Lys20), rabbit monoclonal	1:200
Firma abcam		
ab11316	gamma Tubulin antibody [GTU-88] - Centrosome Marker	1:500
ab1218	GFP antibody Mouse monoclonal	1:50
ab6556	GFP antibody Rabbit polyclonal	1:500
ab8898	Histone H3 (tri methyl K9) antibody - ChIP Grade (H3K9me3)	1:200, 5µl
ab8580	Histone H3 (tri methyl K4) antibody - ChIP Grade H3K4me3	5µl
Eigene Antikörper und anderer Labore		
Anti ModC rabbit polyclonal	Labor Dr. Rainer Dorn Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg	1:1000 - 1:4000
anti-Mod(mdg4)-67.2 ⁴⁰³⁻⁶¹⁰ chicken	Labor P. Geyer (Iowa State University)	1:1000

2.2.4 Isolation von Gesamt-RNA und halb-quantitative RT-PCR

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte aus 20-25 adulten, 5-7 Tage alten *Drosophila*-Weibchen mit Hilfe der Trizol®-Methode nach dem Protokoll des Herstellers (Invitrogen™). Die so präparierte RNA wurde in 87.5 µl RNase-freien Wasser über Nacht bei 4°C gelöst. Im Anschluss daran erfolgt ein DNase-Verdau mit Hilfe des RNase-Free DNase Set (Qiagen), die Reinigung der Präparation mit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) und die abschließende Konzentrationsbestimmung der RNA.

Die Transkription der RNA zur cDNA erfolgte nach folgendem Ansatz unter der Nutzung von *random* Hexamer Primern und MLV-Reverse Transcriptase (Promega).

- 1 µg RNA
- 1 µl *random* Hexamer Primer
- ad 14 µl RNase freies Wasser
- 10 min bei 70°C inkubieren
- 4 µl 5x MLV RT Puffer
- 1 µl dNTP 10 mM (Fermentas)
- 1 µl MLV Reverse Transcriptase
- 1 Stunde bei 37°C inkubieren.

Für die halb-quantitative PCR wurden jeweils gleiche Volumina an cDNA mit den entsprechenden Primern (Tab.7.2-Anhang) eingesetzt.

2.2.5 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunpräzipitation wurde in Anlehnung an das Protokoll wie in Dellino *et al.* (2004) beschrieben mit folgenden Modifikationen durchgeführt. Es wurden 200 adulte Weibchen-Köpfe durch Zugabe von 1.8% Formaldehyd in X-linking Puffer (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 100 mM NaCl) für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Drehrad quervernetzt. Durch Zugabe von 125 mM Glycin bei 4°C für 5 min wurde dieser Prozess gestoppt. Das so fixierte Gewebe wurde mit ChIP-wash A Puffer (10 mM HEPES, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.25% Triton X-100) und ChIP-wash B Puffer (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.01% Triton X-100) bei 4°C für jeweils 10 min auf dem Drehrad gewaschen. Durch die anschließende Ultraschallbehandlung (10-15 min jeweils 30 sec im diagenode Bioruptor) in TEN140 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 140 mM NaCl) und 30µl 1 mM PMSF (SERVA) erfolgte der Aufschluss des Gewebes bei 4°C. Anschließend erfolgte eine weitere Zugabe von TEN140+2mM PMSF, 0.1% SDS, 0.1% DOC und 1% Triton X-100. Nach 10 min Inkubation auf dem Drehrad (4°C) wurden Zelltrümmer und Gewebereste durch Zentrifugation bei 15.000 rpm, 4°C sedimentiert. Vom verbleibenden Überstand wurden 13% als „Input“ entnommen, die restliche Lösung wurde in 3 gleiche Volumina aufgeteilt. Ein Teil wurde als „no-antibody“ Kontrolle unbehandelt in den weiteren Präparationsschritten mitgeführt, während die anderen beiden Proben mit 5 µg des entsprechenden Antikörpers inkubiert wurden. Nach der Antikörper-Behandlung bei 4°C über Nacht auf dem Drehrad wurden 40 µl einer 50%igen Protein G Sepharose™Beads-Lösung in RIPA Puffer (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% DOC) zu den Proben gegeben und abermals 3 h bei 4°C auf dem Drehrad geschwenkt. Die Antikörper-Sepharose™Beads-Komplexe wurden 6x mit je 1 ml RIPA, 1x mit LiCl-Puffer (250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP40, 0.5% DOC) und letztendlich 2x mit TE Puffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift werden die Beads in 100 µl TE Puffer resuspendiert und für 30 min bei 37°C mit RNase A (End-Konzentration 50 µg/ml, Marligen Biosciences) behandelt, anschließend wurde mit Proteinase K (End-Konzentration 0.5 mg/ml, Fermentas) bei 37°C über Nacht inkubiert. Das Aufbrechen der Quervernetzung erfolgte am nächsten Tag bei 65°C für 6 h,

die Reinigung der DNA mit Hilfe des Kits NucleoSpin® Extract II nach dem Protokoll des Herstellers.

Die anschließenden *real-time* PCR Analysen wurden nach Dellino *et al.* (2004) mit folgenden Modifikationen durchgeführt. Zu 5 µl DNA Probe wurde in 20 µl Reaktionsvolumen 10 µl iQ™ SYBR®-Green Supermix 2x für Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories) und 4 pmol der im Anhang aufgeführten Primer (Tab.7.2) hinzugegeben. Die Reaktionen wurden in 96-Proben Platten im iCycler Real-Time PCR Optical Detection System mit Hilfe der iCycler™ iQ Optical System Software Version 3.0a (Bio-Rad) durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie in Dellino *et al.* (2004) empfohlen.

2.2 Immunzytologische Methoden

2.2.1 Immunmarkierung von Polytänchromosomen

Für Präparation von polytänen Speicheldrüsenchromosomen wurde die Methode von Silver und Elgin (1978) wie folgt modifiziert. Speicheldrüsen aus Larven im dritten Stadium wurden in einer 0.7% NaCl-Lösung + 0.5% NP-40 präpariert und in Fixierlösung (45% Essigsäure, 2% Formaldehyd) 4 min inkubiert. Nach dem Spreiten und Fixieren der Chromosomen wurde der Objektträger bis zur Antikörperfärbung in PBS bei 4°C aufbewahrt.

Für Immunmarkierungen mit anti-Histon-Antikörpern erfolgte die Präparation von polytänen Speicheldrüsenchromosomen nach Alfageme *et al.* (1980) mit folgenden Modifikationen. Larven im dritten Stadium wurden in 0.7% NaCl + 0.5% NP-40 präpariert, für 2 min in 2% Formaldehyd, 1% Triton X-100 fixiert und nach einer Inkubation von 3 min in 45% Essigsäure, 2% Formaldehyd gespreitet. Die verwendeten Lösungen wurden ca. alle 3 h neu hergestellt und während des Gebrauchs auf Eis gelagert.

Die Antikörpermarkierung erfolgte mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern (Tab.2.2). Die primären Antikörper (Tab.2.2) wurden mit dem entsprechenden Präparat in PBST und 5% Trockenmilchpulver (Biorad) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten in PBST für jeweils 5 min wurden die Präparate mit den sekundären Antikörpern in PBST, 5% Trockenmilchpulver für 2 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten in PBST für jeweils 5 min erfolgte die Einbettung der Präparate in McIlvaine Citratpuffer pH 7.0 : Glycerol (1:1) mit DAPI (200ng/ml) zur Lagerung (bei 4°C) und gleichzeitigen DNA-Färbung. Dazu wurden

die Präparate im Anschluss mit Nagellack verschlossen (modifiziert nach Gustashaw 1991).

Die Auswertung der Immunmarkierung wurde mit einem Konfokalmikroskop (LSM 510; Zeiss) unter Nutzung der Standardfiltersätze für DAPI, alexa488, alexa555, FITC durchgeführt.

2.2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)-Analysen von Polytäanchromosomen

Polytäre Speicheldrüsenchromosomen wurden wie unter 2.2.1 beschrieben präpariert und in 45% Essigsäure 4 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 10 min mit 70% Ethanol behandelt und an der Luft getrocknet. Nach Erhitzen der gespreiteten Chromosomen in 2x SSC bei 70°C für 30 min folgte die Denaturierung in 0.07 M NaOH für 90 sec. Durch schrittweises Waschen in 70%, 80% und 90% Ethanol wurden die Präparate dehydriert und abermals an der Luft getrocknet. Zur Vorbereitung der Sonde wurde die Reaktion mit den Primern HeT-A 2798-for und HeT-A 3292-rev in Anwesenheit von Digoxigenin (DIG)-markierten dNTPs, zur Markierung der DNA-Fragmente, durchgeführt. Von der so markierten Sonde wurden dann 20% in 71% Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 10% Dextranulphat, 2x SSC) und 9% Lachs-Spermien DNA (Invitrogen) bei 80°C für 5 min denaturiert. Die denaturierten Chromosomen wurden mit 20 µl markierter und denaturierter Sonde bei 37°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen der Präparate für 3x 5 min in 2x SSC. Das Blocken der Chromosomen-Präparate wurde für 30 min bei 37°C in Blocking-Lösung (4x SSC, 0.1% Triton X-100, 5% BSA) durchgeführt, gefolgt von einer Färbung mit FITC-gekoppelten anti-DIG Antikörper für 1 h bei 37°C in der feuchten Kammer. Ungebundene Antikörper wurde anschließend durch 3 x 5 min Waschen mit 4x SSC + 0.1% Triton X-100 entfernt. DNA-Färbung, Fixierung und Auswertung der Präparate erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Verteilung der Mod(mdg4)-Proteine und der Bindungseigenschaften am Polytänchromosom

Die vom *mod(mdg4)*-Lokus kodierten 31 verschiedenen Proteine enthalten einen gemeinsamen N-Terminus und einen Isoform-spezifischen variablen C-terminalen Bereich. Immunzytologische Untersuchungen lieferten erste Hinweise für differierende und individuelle Verteilungsmuster der einzelnen Isoformen. So zeigten Büchner *et al.* (2000) in Analysen mit Isoform-spezifischen Antikörpern, dass die Bindemuster der beiden Proteine Mod(mdg4)-67.2 und Mod(mdg4)-58.0 am Polytänchromosom sehr unterschiedlich und nicht überlappend sind. Analysen mit einem Antikörper, der den gemeinsamen N-Terminus der Proteine als Epitop erkennt (anti-ModC - C steht für Common), zeigte für die Gesamtheit aller Mod(mdg4)-Proteine mehrere hundert Bindestellen am Chromatin polytärer Riesenchromosomen. Bemerkenswert ist dabei, dass die Proteine nicht nur im Euchromatin, sondern auch an den besonderen Strukturen der Telomere und des Chromozentrums detektiert werden konnten (Abb.3.1, Büchner *et al.* 2000).

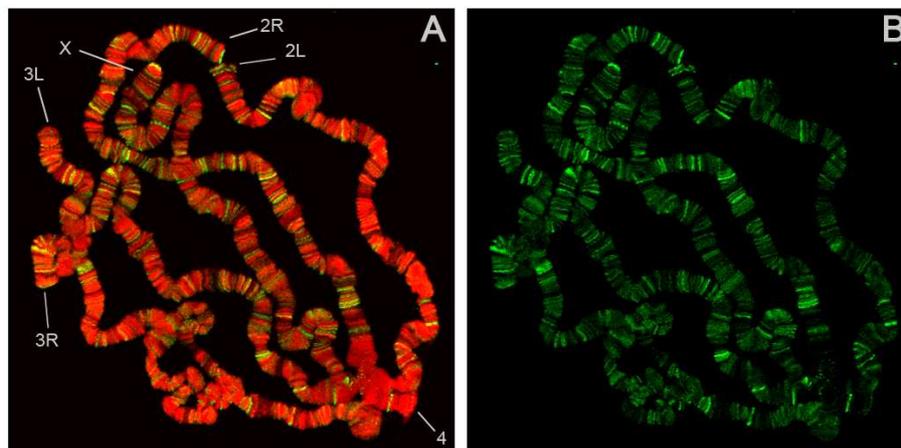
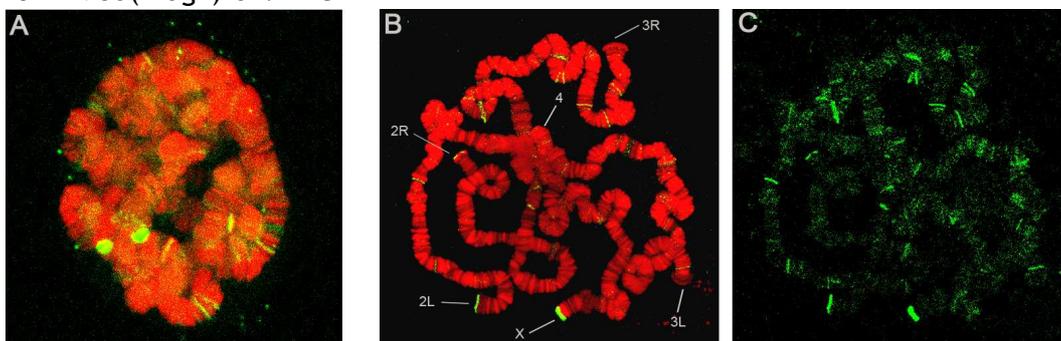


Abbildung 3.1: Verteilungsmuster der Mod(mdg4)-Isoformen am Polytänchromosom
(A) Überlagerung der DNA-Färbung mit DAPI (rot) und Antikörperfärbung (B) Antikörperfärbung (grün) mit anti-ModC.

Die durch die Isoform-spezifischen Antikörper erhaltenen Verteilungsmuster stellen jeweils einen kleineren Ausschnitt an Bindungsstellen der Gesamtheit aller Mod(mdg4)-Proteine dar. Auch die Anzahl detektierter Signale war für beide untersuchte Isoformen unterschiedlich. So konnten für die Isoform Mod(mdg4)-58.0 lediglich 25 reproduzierbare Bindestellen, für Mod(mdg4)-67.2 dagegen mehrere hundert *Sites* detektiert werden (Büchner *et al.* 2000). Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollten die Verteilungs-

muster aller *Mod(mdg4)*-Proteine am Chromatin analysiert werden. Dabei ging es um die Fragestellung, ob für andere *Mod(mdg4)*-Isoformen ebenfalls charakteristische individuelle Muster des Chromatin-Targetings erhalten werden können oder ob sich Bindestellen bestimmter Isoformen am Chromatin überlagern. Dazu wurden die entsprechenden *mod(mdg4)*-cDNA Transgene als EGFP-Fusionskonstrukte kloniert und in den Labor-Referenzstamm w^{1118}_{iso} transformiert. Für die immunzytologische Untersuchung der einzelnen Proteine erfolgte eine Induktion der Speicheldrüsen-spezifischen Expression der Fusionsproteine mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems aus Hefe und eine anschließende Analyse mit EGFP-spezifischen Antikörpern (Abb.3.2).

Isoform *Mod(mdg4)*-64.2-EGFP



Isoform *Mod(mdg4)*-60.1-EGFP

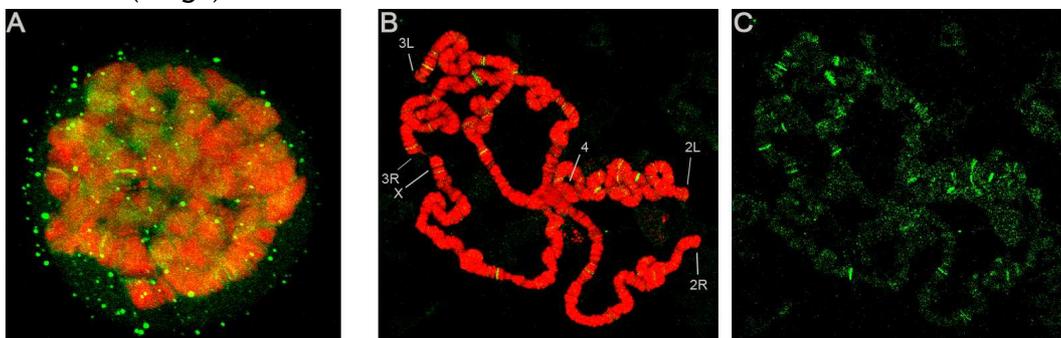
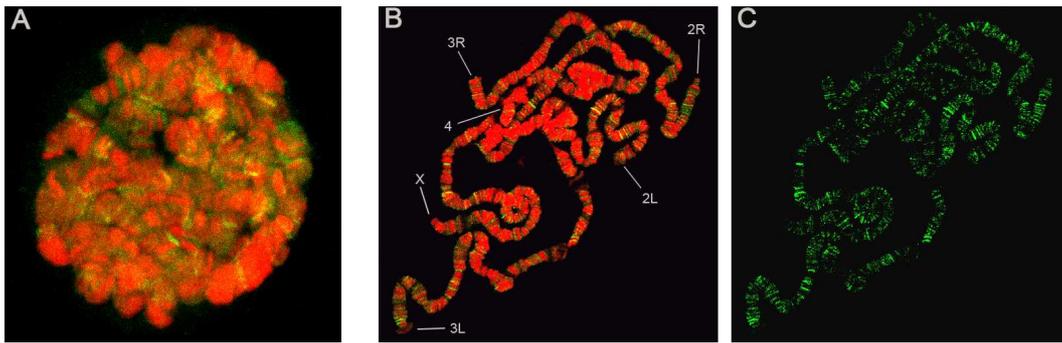


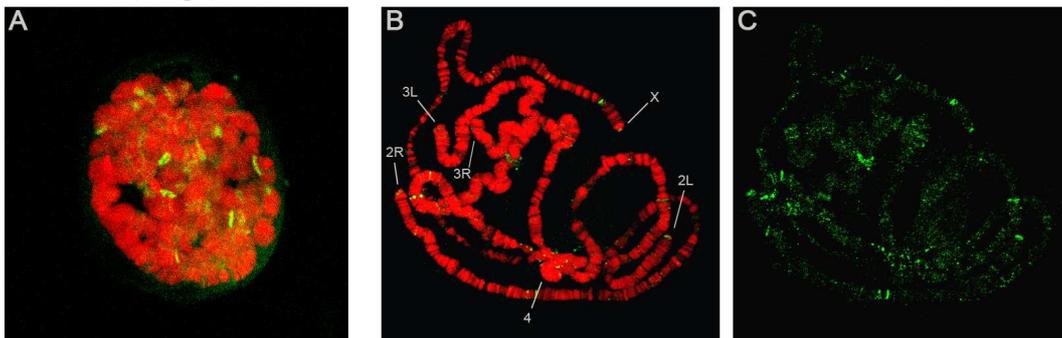
Abbildung 3.2: Übersicht der Verteilungsmuster von *Mod(mdg4)* *in vivo* und an präparierten polytären Speicheldrüsenchromosomen. (A) *in vivo* *Mod(mdg4)*-EGFP-Fluoreszenz (grün) in Speicheldrüsenkernen, ungebundenes Protein wird in punktförmigen Aggregaten im Kern angereichert. DNA-Färbung (rot) mit DAPI. (B) Überlagerung von DNA(DAPI)- und Antikörperfärbung, die einzelnen Chromosomenarme sind entsprechend beschriftet (C) Antikörperfärbung mit anti-EGFP (grün).

→Abbildung wird auf der nächsten Seite wird fortgesetzt.

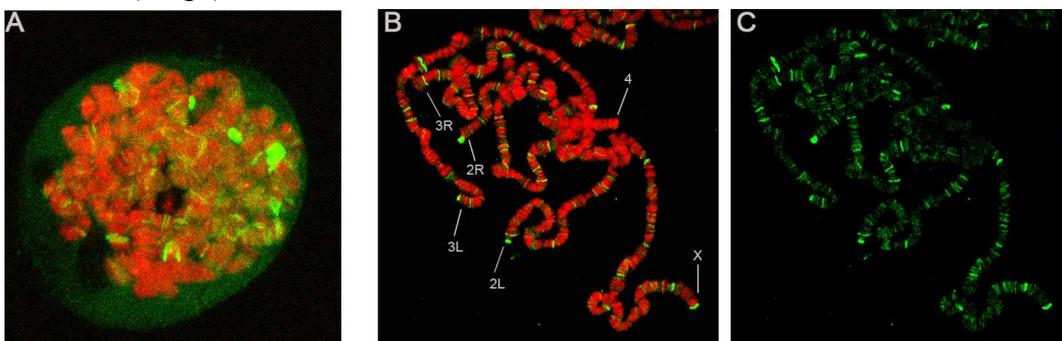
Isoform Mod(mdg4)-55.1-EGFP



Isoform Mod(mdg4)-53.1-EGFP



Isoform-Mod(mdg4)-62.3-EGFP



Isoform-Mod(mdg4)-55.6-EGFP

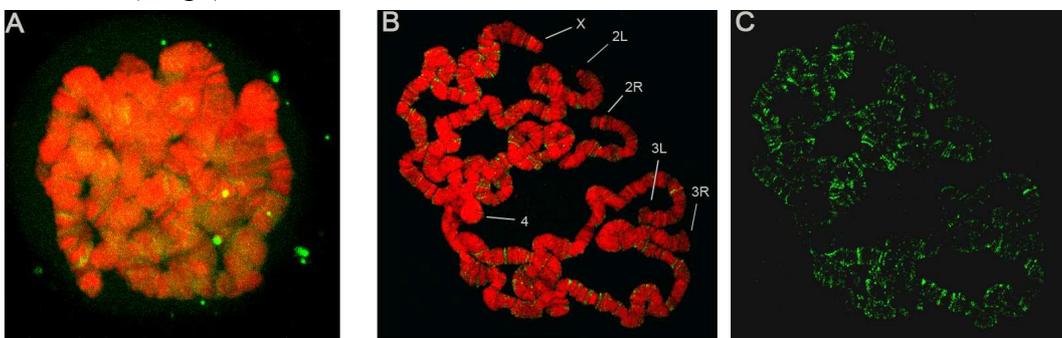
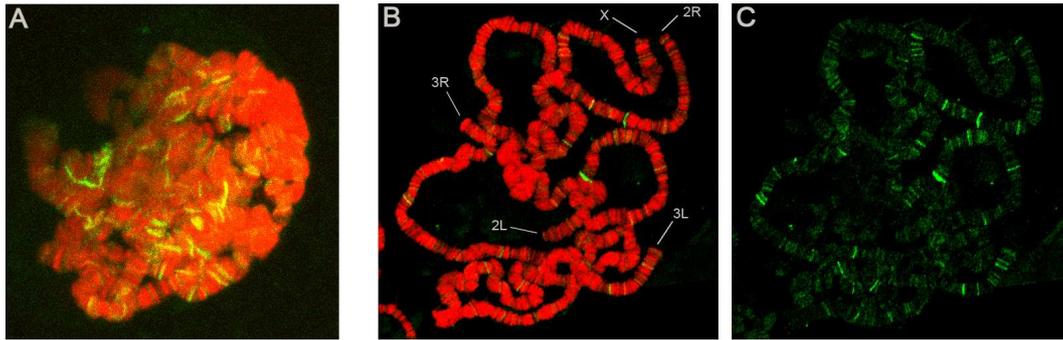


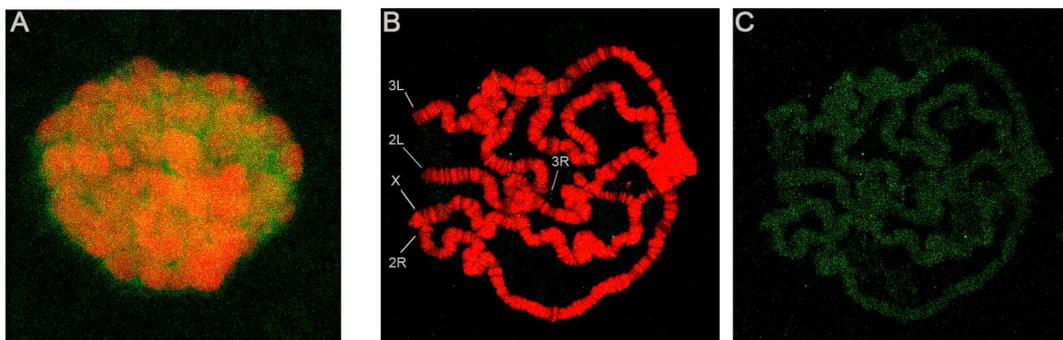
Abbildung 3.2: Übersicht der Verteilungsmuster von Mod(mdg4) *in vivo* und an präparierten polytären Speicheldrüsenchromosomen. (A) *in vivo* Mod(mdg4)-EGFP-Fluoreszenz (grün) in Speicheldrüsenkernen, ungebundenes Protein wird in punktförmigen Aggregaten im Kern angereichert. DNA-Färbung (rot) mit DAPI. (B) Überlagerung von DNA(DAPI)- und Antikörperfärbung, die einzelnen Chromosomenarme sind entsprechend beschriftet (C) Antikörperfärbung mit anti-EGFP (grün).

→Abbildung wird auf der nächsten Seite wird fortgesetzt.

Isoform-Mod(mdg4)-58.8-EGFP



Isoform-Mod(mdg4)-56.3-EGFP



Isoform-Mod(mdg4)-52.4-EGFP

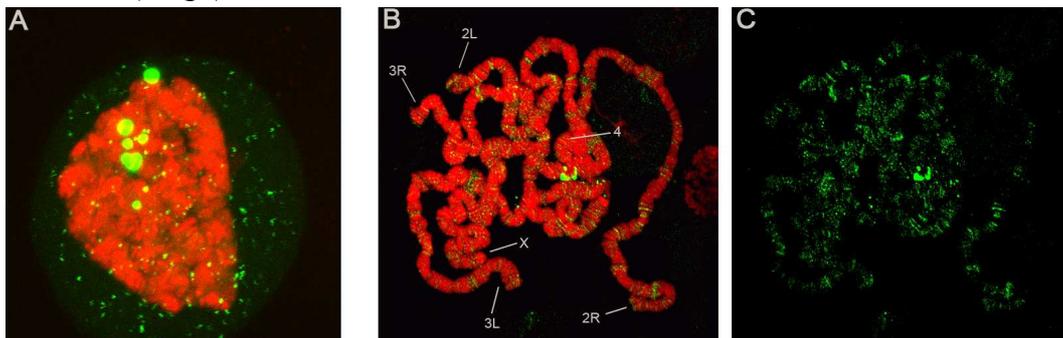


Abbildung 3.2: Übersicht der Verteilungsmuster von Mod(mdg4) *in vivo* und an präparierten polytären Speicheldrüsenchromosomen. (A) *in vivo* Mod(mdg4)-EGFP-Fluoreszenz (grün) in Speicheldrüsenkernen, ungebundenes Protein wird in punktförmigen Aggregaten im Kern angereichert. DNA-Färbung (rot) mit DAPI. (B) Überlagerung von DNA(DAPI)- und Antikörperfärbung, die einzelnen Chromosomenarme sind entsprechend beschriftet (C) Antikörperfärbung mit anti-EGFP (grün).

Beim Vergleich der *in vivo* Aufnahmen von nativem Mod(mdg4)-EGFP in intakten Speicheldrüsenzellkernen sind einige Unterschiede erkennbar (Abb.3.2 - A). So zeigten die Isoformen Mod(mdg4)-60.1 und Mod(mdg4)-52.4 eine starke Anreicherung von nicht chromatin-assoziiertem Protein, wohingegen bei den anderen Isoformen kaum ungebundenes Protein zu detektieren war. Im Gegensatz zu dem endogen exprimierten Protein erfolgt hier die Bildung der Produkte in einem künstlichen Expressionssystem unter Verwendung des Speicheldrüsen-spezifischen GAL4-Treibers. Dies könnte zu einer Überexpression der Proteine und damit möglicherweise zur Bildung von

Proteinaggregaten führen. Für die Untersuchung der einzelnen Isoformen wurde in diesen Analysen der GAL-Treiber-Stamm Gal4-14-2 verwendet, wodurch Gewebe- und Entwicklungs-spezifische Unterschiede in der Proteinexpression der einzelnen Isoformen ausgeschlossen werden konnten. Die Untersuchung von verschiedenen transgenen Linien eines cDNA-Konstruktes sollte klären, ob aufgrund unterschiedlicher genomischer Insertionsorte des Transgens Unterschiede in der Proteinexpression verursacht werden. Die Nähe von endogenen regulatorischen Faktoren wie beispielsweise *Enhancer*- oder *Silencer*-Elementen könnten die Expression der Proteine unabhängig vom benutzten Treiber-Stamm beeinflussen. Die Analyse von 3 verschiedenen Linien der Isoform Mod(mdg4)-60.1 und jeweils 2 verschiedenen Insertions-Linien der Isoformen Mod(mdg4)-56.3 und Mod(mdg4)-64.2 zeigten keine Unterschiede im Vergleich der *in vivo* Proteinexpression. Nun stellte sich die Frage, ob durch die künstliche Überexpression der Proteine möglicherweise zusätzliche ektopische Bindungsstellen im Chromatin erkannt werden. Zur Klärung erfolgte ein Vergleich des Verteilungsmusters, welches durch den Isoform-spezifischen Mod(mdg4)-58.0-Antikörper erhalten wurde, mit Ergebnissen der zytologischen Analyse des *mod(mdg4)-58.0*-Fusionskonstruktes mittels EGFP-Antikörper. Durch Lokalisierung und anschließenden Vergleich mehrerer Bindungsstellen (3L 63B und EF, 3R 99F und 84) dieser Isoform, welche einmal mit dem spezifischen Antikörper und einmal durch das cDNA-Konstrukt erhalten wurden, konnte die Übereinstimmung und Reproduzierbarkeit der Signale für beide Nachweis-Methoden bestätigt werden. Außerdem wurden bei dem Vergleich für das cDNA-Konstrukt keine zusätzlichen Bindestellen am Chromatin detektiert. Dies zeigt, dass durch die Überexpression der Proteine im nicht-endogenen GAL4-Expressionssystem keine zusätzlichen und somit ektopischen Chromatin-Signale nachweisbar sind. Auch die Anreicherung von ungebundenem Protein in Form von punktförmigen Aggregaten im Kern sollte damit keinen Einfluss auf die spezifische Chromatin-Assoziation der Proteine haben. Die Analyse intakter Speicheldrüsenkerne hinsichtlich der Verteilung der nativen EGFP-Fusionsproteine zeigte gleichermaßen eine Assoziation der EGFP-Signale mit dem Chromatin (Abb.3.2). Die nachfolgende Präparation der Chromosomen und die immunzytologische Untersuchung mit dem EGFP-spezifischen Antikörper belegten die beobachtete Chromatin-Assoziation der Proteine. Mit Ausnahme der Isoform Mod(mdg4)-56.3 zeigten alle untersuchten Isoformen eine deutlich detektierbare und auch reproduzierbare Verteilung der Proteine am Polytäanchromosom (Abb.3.2, Tab.7.1-Anhang). Die einzelnen Proteine konnten an einer unterschiedlichen Zahl von euchromatischen Bindestellen detektiert werden. Der

Nachweis der Proteine erfolgte dabei in den Interbanden der Chromosomen, allerdings war die Lokalisation einiger Signale in der Banden-/ Interbanden-Struktur nicht eindeutig zu klären. In den Analysen wurde zudem für 4 der untersuchten Isoformen eine Bindung an einer unterschiedlichen Zahl an Telomeren (1-4 gebundene Telomere) der Chromosomen gefunden (Tab.3.1).

Tabelle 3.1: Verteilung der untersuchten Mod(mdg4)-Proteine an den Telomeren der Polytänchromosomen. In der Kopfzeile sind die Telomere der einzelnen Chromosomen aufgelistet, in der ersten Spalte die untersuchten Mod(mdg4)-Isoformen aufgeführt.

Isoform	Telomer				
	X	2L	2R	3L	3R
Mod(mdg4)-64.2	+	+	+	/	+
Mod(mdg4)-60.1	/	/	/	/	/
Mod(mdg4)-55.1	/	/	/	/	/
Mod(mdg4)-53.1	+	+	+	/	/
Mod(mdg4)-62.3	+	+	+	+	/
Mod(mdg4)-52.4	/	+	/	/	/
Mod(mdg4)-58.0*	/	/	/	/	/
Mod(mdg4)-58.8	/	/	/	/	/

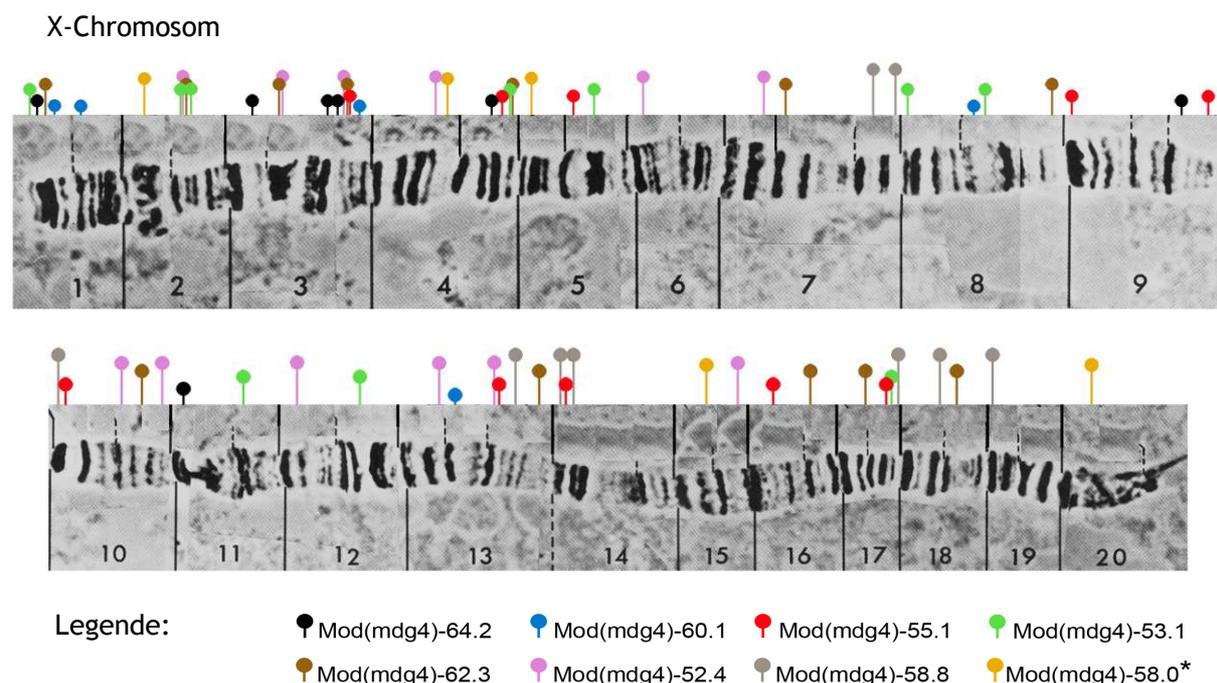
* Die bereits kartierten Bindestellen der Isoform Mod(mdg4)-58.0 wurden zu vergleichenden Analysen aus Büchner *et al.* (2000) mit herangezogen.

Auffällig ist, dass Signale der Isoform Mod(mdg4)-64.2 an allen Telomeren mit Ausnahme des Chromosoms 3L detektiert werden konnten. Interessanterweise wurden bei den Analysen, welche Abad *et al.* (2004a) publizierten, in dem von ihnen untersuchten *Drosophila*-Stamm ebenfalls am 3L-Chromosom keine telomerischen *HeT-A Repeats* nachgewiesen. Die Korrelation des Fehlens der telomerischen *HeT-A-Repeats* mit der Abwesenheit des Telomer-assoziierten Signals der Isoform am Telomer von 3L könnten ein Hinweis auf eine mögliche Assoziation der Isoform Mod(mdg4)-64.2 mit dem *HeT-A* Element sein (siehe auch Kapitel 3.3.3). Im Vergleich dazu zeigten die anderen Telomer-assoziierten Isoformen ein abweichendes Muster der Telomerbindung, wodurch eine Assoziation dieser Proteine an die *Het-A Repeats* eher unwahrscheinlich ist. Die Isoform Mod(mdg4)-62.3 bindet an 4 der 5 untersuchten Telomere und für Mod(mdg4)-53.1 konnte eine Assoziation an 3 Telomeren nachgewiesen werden. Die beschriebenen Telomer-assoziierten Mod(mdg4)-Isoformen konnten alle an den Enden der Chromosomen X, 2L und 2R nachgewiesen werden, Unterschiede zeigten sich lediglich bei der Lokalisierung an den Telomeren des 3. Chromosoms (Tab.3.1).

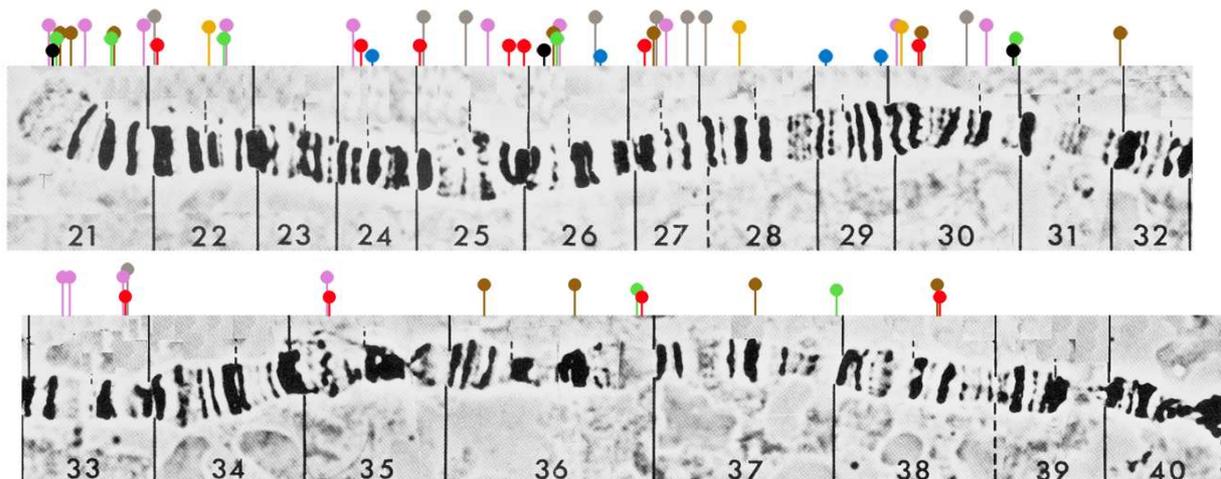
Aus den Analysen mit dem gemeinsamen Antikörper anti-ModC war bekannt, dass eine oder mehrere Isoformen eine Bindung an das Chromozentrum der Polytänchromosomen

zeigen (Büchner *et al.* 2000, Abb.3.1). Mit der Isoform Mod(mdg4)-52.4 konnte eines der möglichen Proteine identifiziert werden. Im Gegensatz zu den meist weniger kompakten euchromatischen Bereichen unterscheiden sich die telomerischen und centromerischen Bereiche der Chromosomen durch eine dichter gepackte Chromatin-Struktur (Zhimulev *et al.* 2003, Pardue und deBaryshe 2008). Die Isoform Mod(mdg4)-52.4 konnte dabei nicht nur an diesen dicht gepackten Chromatin-Strukturen, sondern auch an zahlreichen euchromatischen Bindestellen der weniger dicht gepackten Interbanden nachgewiesen werden (Abb.3.2).

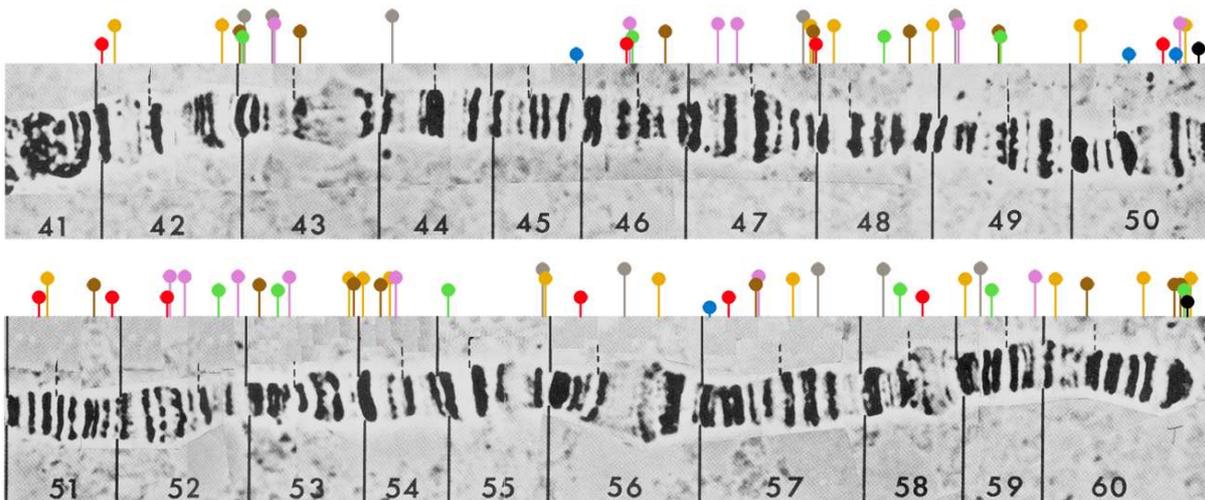
Beim Vergleich der Verteilungsmuster der verschiedenen Isoformen konnten deutliche Unterschiede in der Zahl der detektierten Signale festgestellt werden. So sind die Isoformen Mod(mdg4)-62.3, Mod(mdg4)-55.1 und Mod(mdg4)-52.4 an mehr als 50 euchromatischen Positionen detektierbar, Mod(mdg4)-64.2 und Mod(mdg4)-60.1 dagegen an weniger als 20 (Abb.3.2, Tab.7.1-Anhang). Um zu prüfen, ob die untersuchten Isoformen überlappende Bindestellen am Chromatin aufweisen, wurden alle gefundenen Isoform-spezifischen Chromatin-Signale lokalisiert und kartiert. Die Kartierung der Signale erfolgte auf Grundlage der fotografischen Chromosomenkarten von Bridges (1935) und Lefevre (1976) aus Lindsley und Zimm (1992). Zunächst wurden die erhaltenen Ergebnisse in tabellarischer Form dokumentiert (Tab.7.1 - Anhang). Für eine bessere und anschaulichere Darstellung der Daten wurden die kartierten Bindestellen schematisch in den fotografischen Chromosomenkarten dargestellt (Abb.3.3). Die unterschiedlichen Farben und Größen der einzelnen Markierungen symbolisieren dabei jeweils eine der untersuchten Mod(mdg4)-Isoformen (siehe auch Legende zu Abb.3.3).



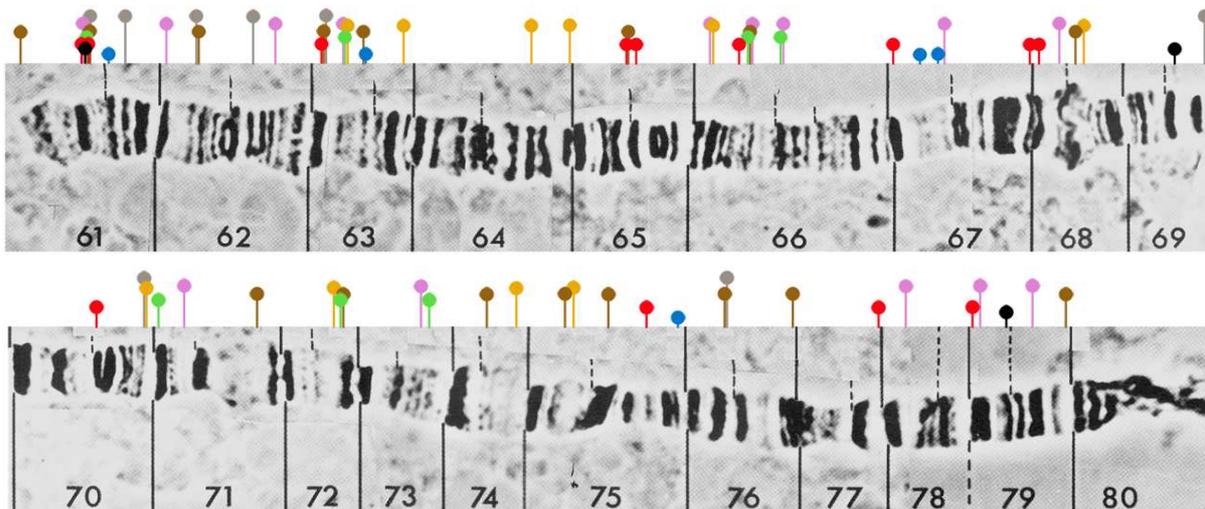
Chromosom 2L



Chromosom 2R



Chromosom 3L



Legende:

- Mod(mdg4)-64.2
- Mod(mdg4)-60.1
- Mod(mdg4)-55.1
- Mod(mdg4)-53.1
- Mod(mdg4)-62.3
- Mod(mdg4)-52.4
- Mod(mdg4)-58.8
- Mod(mdg4)-58.0*

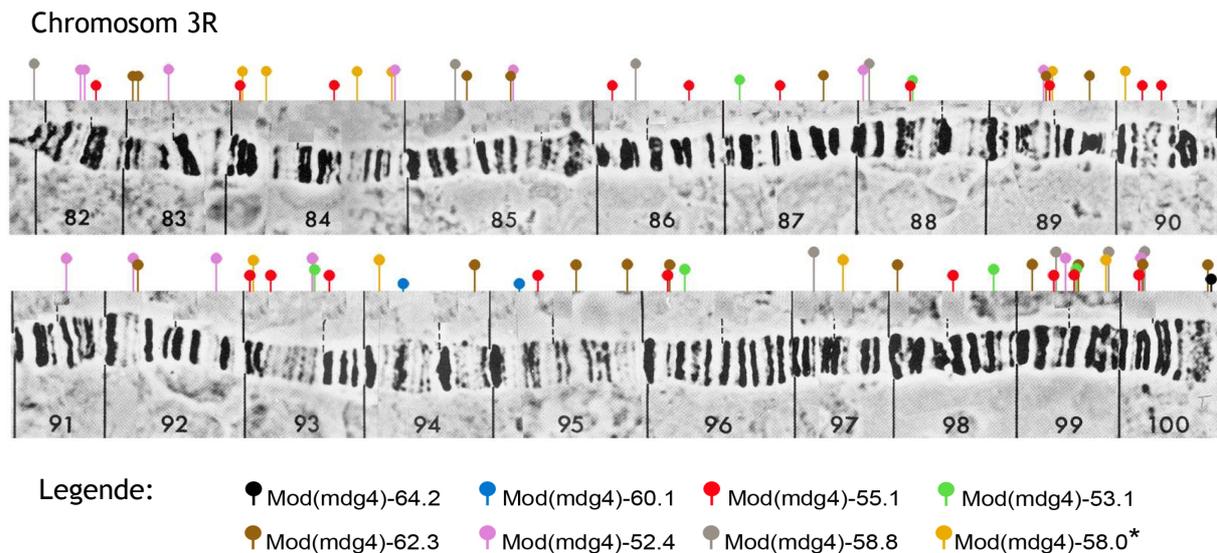


Abbildung 3.3: Schematische Übersicht über die Lokalisierung von 8 verschiedenen Mod(mdg4)-Isoformen am polytären Speicheldrüsenchromosom. Die Beschreibung der verwendeten Symbolik ist in der Legende ersichtlich.

* Die bereits kartierten Bindestellen der Isoform Mod(mdg4)-58.0 aus Büchner *et al.* (2000) wurden zu vergleichenden Analysen mit herangezogen.

Die schematische Übersicht verdeutlicht, dass für die einzelnen Mod(mdg4)-Isoformen auf allen Chromosomen euchromatische Bindestellen detektiert werden konnten. Bei der Kartierung der Signale wurden keinerlei Überlappungen von Bindestellen zwischen den einzelnen Mod(mdg4)-Isoformen gefunden. Weiterhin ist auffällig, dass die Signale im euchromatischen Bereich in den Interbanden-Regionen der Chromosomen lokalisiert sind. Aufgrund der besonderen Chromatin-Struktur der Telomere ist bei den Signalen an den Chromosomenenden keine genauere Aussage über die exakte Lokalisierung der Bindestellen möglich, da in diesem Chromosomenabschnitt beispielsweise die für die euchromatischen Bereiche typischen Banden-/Interbanden-Strukturen fehlen. Basierend auf den detektierten, sich nicht überschneidenden euchromatischen Bindestellen der einzelnen Isoformen sollte man auch bei den Telomer-assoziierten Signalen ein Isoform-spezifisches Bindungsmuster erwarten können.

Die detektierten EGFP-Signale der Mod(mdg4)-Proteine zeigten keine gleichmäßig homogene Verteilung am Polytänchromosom. In einigen Regionen wurde ein Clustering von unterschiedlichen Isoformen gefunden. Dies betrifft beispielsweise die Region 3 auf dem X-Chromosom, die Region 26 auf dem Chromosom 2L und die Region 63 auf dem Chromosom 3L (Abb.3.3, Tab.7.1-Anhang). In diesen Clustern konnten einerseits die Bindestellen von verschiedenen Mod(mdg4)-Isoformen gefunden werden. Auf der anderen Seite wurden in einigen Regionen aber auch mehrere eng benachbarte Bindestellen der gleichen Isoform detektiert. Trotz der Anreicherung an Signalen in diesen

Bereichen konnte auch hier keinerlei Überlappung der unterschiedlichen Bindestellen gefunden werden. Auf dem 4. Chromosom, welches das kleinste Chromosom bei *Drosophila melanogaster* darstellt, konnte von den 8 kartierten Mod(mdg4)-Isoformen lediglich für die Isoform Mod(mdg4)-55.1 eine Bindestelle gefunden werden (Tab.7.1-Anhang).

3.2 Einfluss der FLYWCH-Domäne auf die Lokalisierung der Mod(mdg4)-Proteine am Polytänchromosom

3.2.1 Mutagenese-gestützte Charakterisierung des FLYWCH-Motivs der Isoform Mod(mdg4)-64.2

Alle Mod(mdg4)-Proteine enthalten im gemeinsam kodierten N-Terminus die konservierte BTB/POZ Domäne. 28 der 31 vom Locus kodierten Isoformen weisen zudem im C-Terminus die konservierte C₂H₂-Motiv enthaltende FLYWCH Domäne auf (Dorn und Krauss 2003, Babu *et al.* 2006). Evolutionär ist dieser Locus insbesondere innerhalb der orthologen *Drosophila*-Arten, aber auch in anderen Insekten nachweisbar. Dies ermöglicht letztendlich einen Vergleich einzelner Isoformen zwischen den verschiedenen Arten. Der für die Isoform Mod(mdg4)-64.2 beispielhaft gezeigte Homologievergleich des FLYWCH-Motivs verdeutlicht, dass die Domäne besonders innerhalb der *Drosophila*-Arten aber auch bei der Stechmücke *Anopheles gambiae* stark konserviert ist (Krauss und Dorn 2004). In der phylogenetischen Entwicklung der Insekten trennte sich die Stechmücke *A. gambiae* vor 250 Mio. Jahren vom Entwicklungszweig der *Drosophila*-Arten (Krauss und Dorn 2004).

Der Isoform-spezifische Vergleich zeigte, dass die stark konservierten Aminosäuren, welche dem Motiv auch den Namen geben, bei allen untersuchten Arten erhalten geblieben sind. Auch die restlichen Aminosäuren, welche sich zwischen den namensgebenden Aminosäuren innerhalb des konservierten Bereiches befinden, zeigen eine sehr hohe Homologie (Abb.3.4).

Spezifischer Teil der Isoform Mod(mdg4)-64.2

```

Dme  DTEISFIRSQKKNAQLVFRNYIYNKKLTQANGOTTWRCADVLKLRCKAVVITRDGHFIDAR 464
Dps  DGIIFKIRSQKKNAQLVYRDYIYNKKLTQANGOTTWRCADVLKLRCKAVVITKNGEFVDAR
Dvi  AGKIQFIRSQKKNAQLVYRDYIYNKKLTQANGOTTWRCADVLKLRCKAVVITKNGEFLDAR
Aga  --TVKFIRSQKKCAQLVYDGYIYNRKMIQQNGRTTWRCDDLKLYHCKATCVTKQNKLIIR
      :.***** *****: .*****:* * **:******.*:** :***. :*::.:.:. *

Dme  RQHNEHASHRIGQRQLYKVEQELEEYIEICTSNPKISQYLGSSNI-IVTAKDGDCKLFL 524
Dps  RLHNHESHAVRIGQRQLYKVEEELEEYIEICTSNPKISQYLNSSNISIMTAKDGKECKLFL
Dvi  RQHNEHASHRIGQRQLYNVEEELDEYIEICTSNPKISQYLSSSNISIMTAKDGKECKLYV
Aga  SEHNHNDHSSKIEDKALYDFPEDLEEYVNIRTRDP-----
      ***:.*: :* :. **.. :*:***:* * :*

Dme  PAAEATEIEMQALVDAAEELDEEERHAEERIRDRQRVGRWRTEEAKHRSLKSEHP 580
Dps  PASEATQIEMQALAEAVAEAVDEEEEEEQQHITQVVEVVKPLQHRQLLKTGL---
Dvi  PASEATEIEMQALVDAADDEEDLMERVVELKPIQRLSHKLLKH-----
Aga  -----IDVKNHKVDVIDTGAEFKIVVRDRSSTMHQAVKD-----
      :. . * : : :

```

Abbildung 3.4: Vergleich der Proteinsequenz des spezifischen Teils der Isoform Mod(mdg4)-64.2 zwischen den Arten *Drosophila melanogaster* (Dme), *Drosophila pseudoobscura* (Dps), *Drosophila virilis* (Dvi) und *Anopheles gambiae* (Aga) (modifiziert nach Krauss und Dorn, 2004). Unterhalb der angegebenen Sequenzen ist folgende Homologie-Symbolik zu finden: Stern (*)- identische Aminosäuren; Doppelpunkt (:)- funktionell ähnliche Aminosäuren; Punkt (.)- strukturell ähnliche Aminosäuren. Die FLYWCH-Domäne ist grau unterlegt, blau hervorgehoben sind die stark konservierten Aminosäuren der FLYWCH-Domäne.

Rot umrahmt ist der Proteinbereich außerhalb der FLYWCH-Domäne, welcher bei den gezeigten Arten signifikante Sequenzhomologie aufweist.

Außerhalb dieser definierten Konsensussequenz ist bei der Stechmücke *A. gambiae* keine weitere Homologie der Aminosäuren zu den *Drosophila*-Arten zu finden. Die starke Konservierung der FLYWCH-Domäne bei nahezu allen Mod(mdg4)-Isoformen und die große Homologie des Motivs bei der gleichen Isoform innerhalb verschiedener *Drosophila*-Arten führt zu der Fragestellung, ob in der evolutionären Konservierung des Motivs ein wichtiger Anhaltspunkt für die Isoform-spezifischen Verteilungsmuster der einzelnen Mod(mdg4)-Proteine zu finden ist (Abb.3.2, Abb.3.3, Abb.3.4) und ob für die spezifische Bindung der Proteine an das Chromatin die FLYWCH-Domäne verantwortlich ist. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden mittels *in vitro* Mutagenese verschiedene Mutanten-Konstrukte für die FLYWCH-Domäne der Isoform *mod(mdg4)-64.2* hergestellt. Zunächst wurde die komplette Sequenz der Isoform-spezifischen FLYWCH-Domäne (Aminosäuren 408-468) deletiert, um zu prüfen, inwieweit das konservierte Motiv selbst Einfluss auf die Chromatin-Bindung des Proteins hat (Mutante Δ FLYWCH). Weiterhin wurde die im Motiv enthaltene WRC-Sequenz deletiert und an zwei hoch konservierten Aminosäure-Positionen der Domäne jeweils Austausch gegen Alanine vorgenommen. Dabei handelte es sich um die Aminosäuren Y425 und H468 (Abb.3.5).

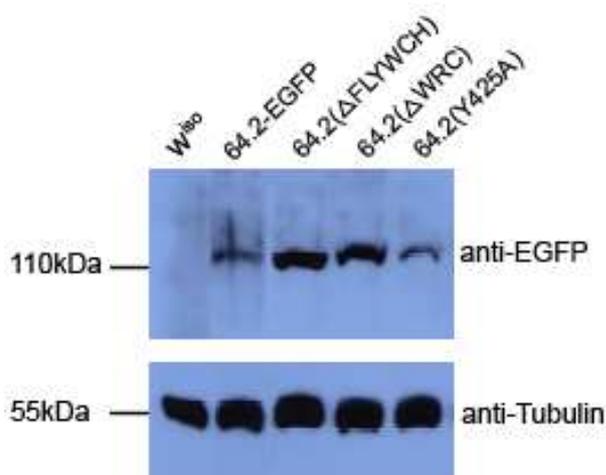
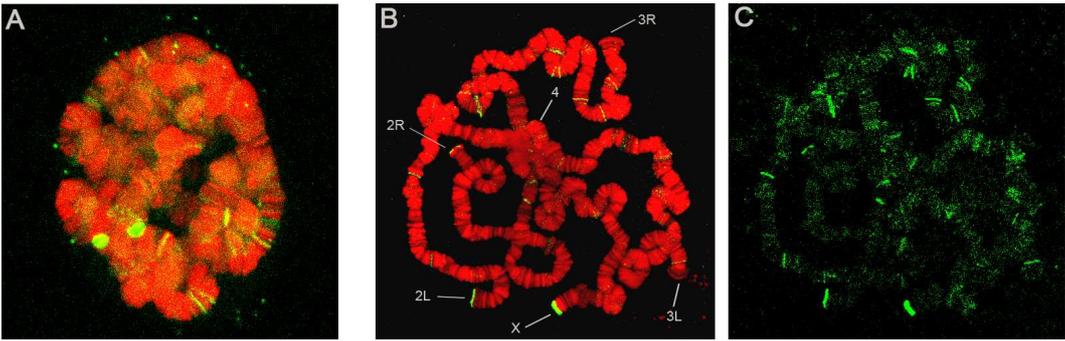


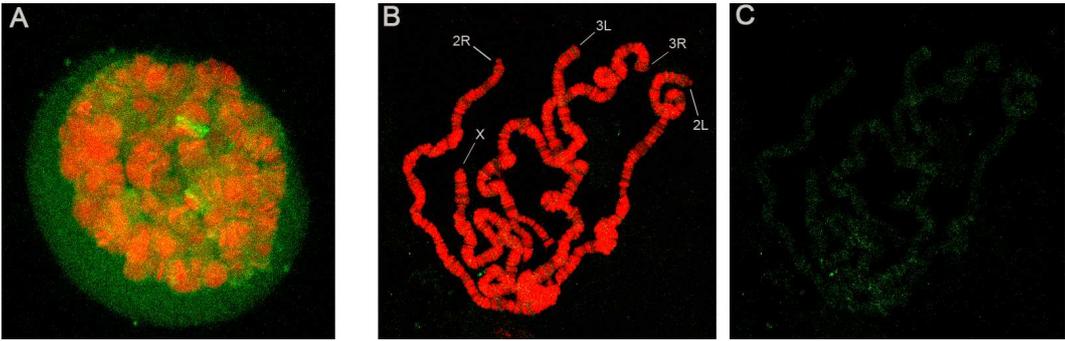
Abbildung 3.6: Westernblot-Analyse zum Nachweis der *mod(mdg4)*-64.2-EGFP Mutanten-Konstrukte im Speicheldrüsen-Proteinextrakt von Larven des 3. Entwicklungsstadiums. Die Beschriftung der aufgetragenen Proben erfolgte in verkürzter Schreibweise: Kontrolle $w^{118 iso}$ Stamm (1. Probe, w^{iso}); Mod(*mdg4*)-64.2-EGFP (2. Probe, 64.2-EGFP); Mod(*mdg4*)-64.2-(ΔFLYWCH)-EGFP (3. Probe, 64.2(ΔFLYWCH)); Mod(*mdg4*)-64.2(ΔWRC)-EGFP (4. Probe, 64.2(ΔWRC)); Mod(*mdg4*)-64.2(Y425A)-EGFP (5. Probe, 64.2(Y425A)). Die Detektion der EGFP-Fusionsproteine erfolgte mit dem polyklonalen EGFP-Antikörper (oberer Bildabschnitt), die Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen durch Detektion mit dem monoklonalen Tubulin-Antikörper (unterer Bildabschnitt).

Das nachgewiesene Molekulargewicht der untersuchten Proteine weicht mit einer Größe von ca. 100-115 kDa signifikant vom theoretisch ermittelten Molekulargewicht des Fusionsproteins Mod(*mdg4*)-64.2-EGFP (91.2 kDa) ab. Durch Harvey *et al.* (1997), Büchner *et al.* (2000) und Mongelard *et al.* (2002) wurden bereits gleichsame Beobachtungen gemacht und als Erklärung dafür post-translationale Modifikationen der Proteine postuliert. Weiterhin konnte in den Westernblot-Analysen gezeigt werden, dass die nachgewiesenen Fusionsproteine in den Zellen keiner Degradation unterliegen. Bei der anschließenden Untersuchung der nativen EGFP-Fluoreszenz in intakten Speicheldrüsenkernen wurde bei keinem der untersuchten Mutanten-Konstrukte ein Chromatin-assoziiertes Signal detektiert. Es konnte lediglich eine diffuse Verteilung der Fluoreszenz im Kern beobachtet werden. Im Vergleich dazu wurden bei der Analyse der Speicheldrüsenkerne mit dem nicht mutierten *mod(mdg4)*-64.2-EGFP Konstrukt deutliche und reproduzierbare Signale erhalten (Abb.3.7). Auch bei der immunzytologischen Untersuchung präparierter Polytänchromosomen mit dem EGFP-spezifischen Antikörper konnte bei keinem der untersuchten Mutanten-Konstrukte ein detektierbares Signal am Chromatin gefunden werden (Abb.3.7, B, C).

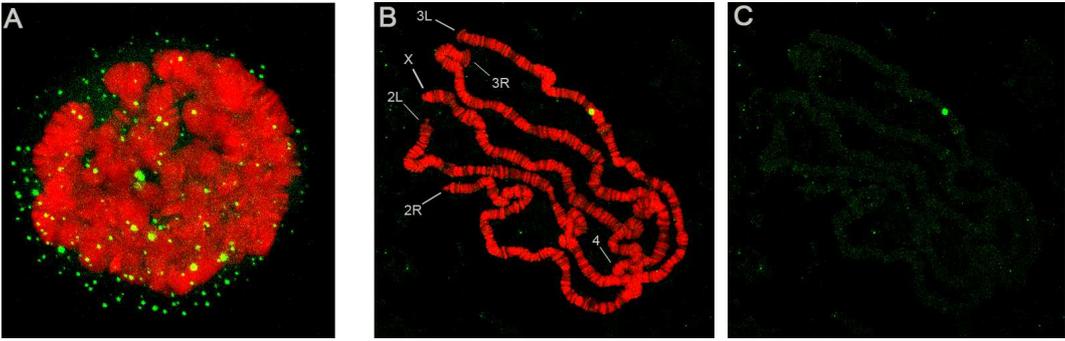
Isoform Mod(mdg4)-64.2-EGFP



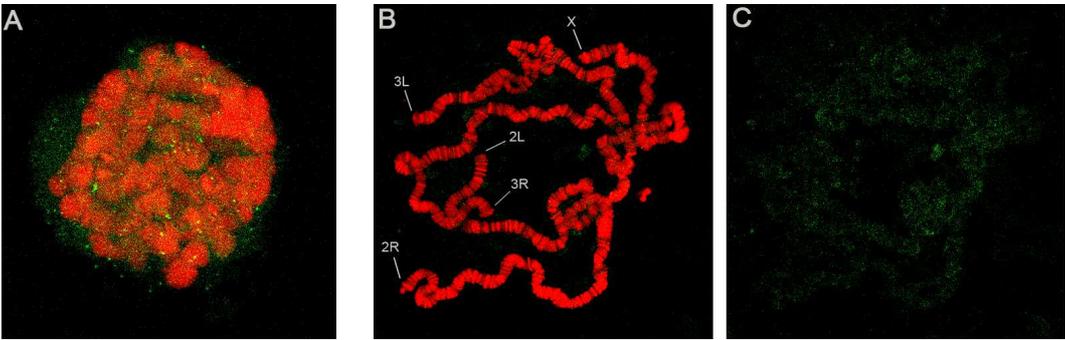
Mod(mdg4)-64.2(Δ FLYWCH)-EGFP



Mod(mdg4)-64.2(Δ WRC)-EGFP



Mod(mdg4)-64.2(Y425A)-EGFP



Mod(mdg4)-64.2(H468A)-EGFP

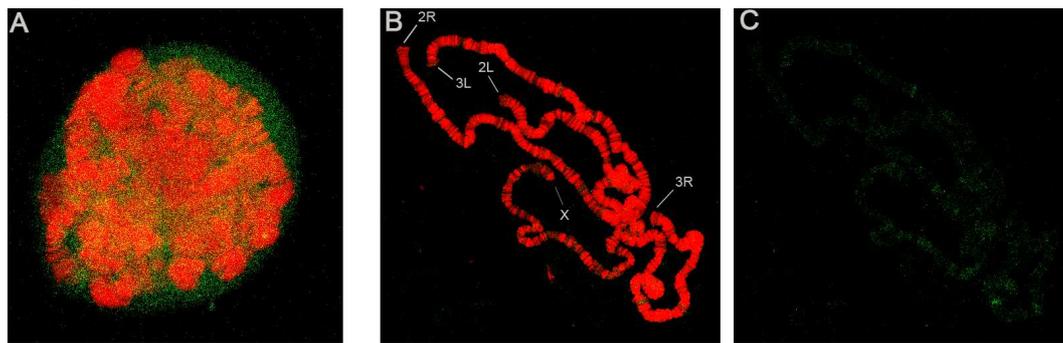


Abbildung 3.7: Übersicht der Proteinverteilung der *mod(mdg4)-64.2*-Mutantenkonstrukte *mod(mdg4)-64.2(ΔFLYWCH)*, *mod(mdg4)-64.2(ΔWRC)*, *mod(mdg4)-64.2(Y425A)* und *mod(mdg4)-64.2(H468A)* *in vivo* und an präparierten polytären Speicheldrüsenchromosomen. Zum besseren Vergleich wurde die Abbildung zur Verteilung des Wildtyp *Mod(mdg4)-64.2-EGFP* Proteins hinzugefügt (A) *in vivo* *Mod(mdg4)-EGFP*-Fluoreszenz (grün) in Speicheldrüsenkernen, DNA-Färbung (rot) mit DAPI. (B) Überlagerung von DNA(DAPI)- und Antikörperfärbung, die einzelnen Chromosomenarme sind entsprechend beschriftet. (C) Antikörperfärbung mit anti-EGFP (grün).

Die Auswertung der *in vivo* Aufnahmen intakter Speicheldrüsenkerne sowohl des *mod(mdg4)-64.2(ΔFLYWCH)*- als auch des *mod(mdg4)-64.2(ΔWRC)*-Konstruktes zeigten eine deutliche Anreicherung von EGFP-Protein im Kern. Dies würde damit die durch Westernblot-Analysen erhaltenen Ergebnisse bestätigen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sich das nicht-gebundene Protein teilweise in Form von Dots anreicherte, was möglicherweise auf die Bildung von Protein-Aggregaten aufgrund der Überexpression (vgl. Isoform *Mod(mdg4)-60.1* in Abb.3.2 mit Abb.3.8) zurückzuführen ist. Abschließend kann man damit sagen, dass eine intakte FLYWCH-Domäne des Proteins essentiell für die Chromatin-Bindung der Isoform *Mod(mdg4)-64.2* ist. Bereits der Austausch einzelner stark konservierter Aminosäuren führt dabei zum Verlust der Chromatin-Assoziation des Proteins.

3.2.2 Funktionelle Analyse chimärer *Mod(mdg4)-64.2* Proteine

Die vorangegangenen Analysen haben gezeigt, dass das Vorhandensein einer intakten FLYWCH-Domäne offensichtlich einen entscheidenden Einfluss auf die Chromatin-Bindung der Isoform *Mod(mdg4)-64.2* hat. Der Homologie-Vergleich der Domäne zeigte, dass die einzelnen Aminosäuren, welche dem Motiv auch den Namen FLYWCH geben, zwischen verschiedenen *Mod(mdg4)*-Isoformen stark konserviert sind, die anderen Aminosäuren innerhalb des definierten Motivs dagegen nicht (Dorn und Krauss 2003). Diese sind allerdings, betrachtet man nur eine spezifische Isoform, innerhalb

verschiedener Arten wiederum sehr stark konserviert (Abb.3.4, Krauss und Dorn 2004). Dies legt den Schluss nahe, dass möglicherweise diese Aminosäuren innerhalb der Domäne einen maßgeblichen Einfluss auf die Isoform-spezifische Bindung der einzelnen Mod(mdg4)-Proteine haben. Basierend auf dieser Annahme könnte ein Austausch der FLYWCH-Domäne der Isoform Mod(mdg4)-64.2 mit der Domäne einer anderen Isoform zu einem veränderten Bindungsmuster der mutierten Isoform führen. Zur experimentellen Überprüfung dieser Hypothese wurde die FLYWCH-Domäne der Isoform Mod(mdg4)-64.2 mit der Isoform Mod(mdg4)-60.1 und Mod(mdg4)-56.3 getauscht. Die zuvor ermittelten Verteilungsmuster der Isoformen Mod(mdg4)-64.2, Mod(mdg4)-60.1 und Mod(mdg4)-56.3 (Abb.3.2, 3.3, Tab.7.1-Anhang) bildeten die Grundlage für diese Analysen. Sollte die Mutante aufgrund des Domänen-Austausches ein verändertes Bindungsmuster aufweisen, könnte dies durch vergleichende Analysen mit den Verteilungsmustern der unveränderten Isoformen nachgewiesen werden. Die Konstrukte für die Untersuchung der chimären Proteine wurden als *mod(mdg4)-64.2-60.1DS* und *mod(mdg4)-64.2-56.3DS* (DS steht für *domain swap*) bezeichnet. Nach der Klonierung der Konstrukte in den Vektor *pP{GS[UAS-EGFP-3'-mini white]}* und Transformation in *Drosophila melanogaster* konnte die Proteinverteilung nach Expression mit dem GAL4-Treiber Gal4 14-2 Speicheldrüsen-spezifisch untersucht werden. Wie die bisher beschriebenen *mod(mdg4)-cDNA* Konstrukte tragen auch diese den C-terminalen EGFP-Tag für immunzytologische Nachweise. Mit Hilfe des polyklonalen EGFP-Antikörpers erfolgte zunächst der Nachweis der Proteinexpression im Westernblot (Abb.3.8).

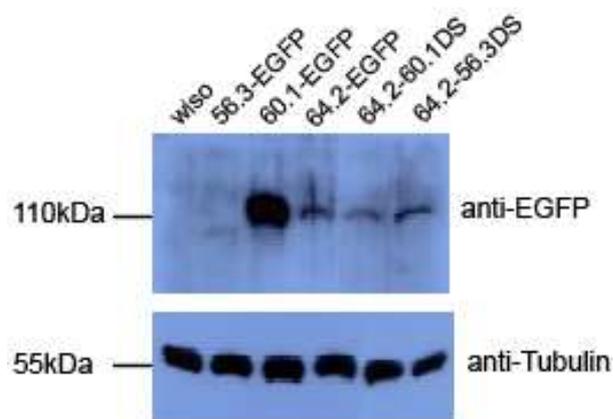


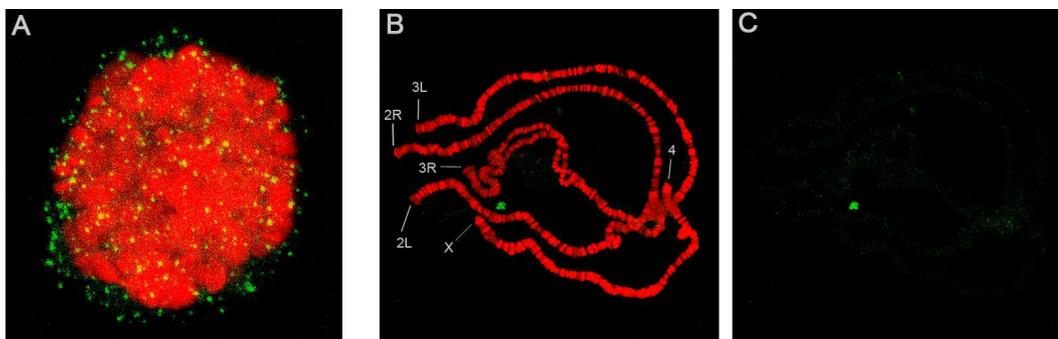
Abbildung 3.8: Westernblot-Analyse zum Nachweis der *mod(mdg4)*-64.2-EGFP Mutanten-Konstrukte an Speicheldrüsen-Proteinextrakt von Larven des 3. Entwicklungsstadiums. Die Beschriftung der einzelnen Proben erfolgte in verkürzter Schreibweise: Kontrolle w^{118}_{iso} Stamm (1. Probe, w^{iso}); Mod(*mdg4*)-56.3-EGFP (2. Probe, 56.3-EGFP); Mod(*mdg4*)-60.1-EGFP (3. Probe, 60.1-EGFP); Mod(*mdg4*)-64.2-EGFP (4. Probe, 64.2-EGFP); Mod(*mdg4*)-64.2-60.1DS-EGFP (5. Probe, 64.2-60.1DS); Mod(*mdg4*)-64.2-56.3DS-EGFP (6. Probe, 64.2-56.3DS). Die Detektion der EGFP-Fusionsproteine erfolgte mit dem polyklonalen EGFP-Antikörper (oberer Bildabschnitt), die Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen durch Detektion mit dem monoklonalen Tubulin-Antikörper (unterer Bildabschnitt).

Bei der Analyse der Proteinexpression im Westernblot wurden neben den chimären Proteinen auch die *cDNA-EGFP* Konstrukte der Isoformen *mod(mdg4)*-56.3, *mod(mdg4)*-60.1 und *mod(mdg4)*-64.2 untersucht (Abb.3.8). Die Ergebnisse zeigten, dass alle Fusionsproteine nachgewiesen werden konnten und daraus schlussfolgernd in den Tieren auch exprimiert werden. Obwohl gleiche Mengen an Proteinextrakt aufgetragen wurden (Kontrolle mit anti-Tubulin-Antikörper), zeigen sich unterschiedliche Konzentrationen an detektiertem Mod(*mdg4*)-cDNA-EGFP-fusioniertem Protein. Besonders deutlich wird dies beim Protein Mod(*mdg4*)-56.3 durch den Nachweis eines sehr schwachen Signals. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die nicht-endogene Expression des Proteins in einem Entwicklungsstadium sein, in dem die endogene Expression dieser Isoform noch nicht stattfinden würde. Der Abbau des Proteins in den Zellen könnte eine mögliche Folge und damit Ursache für die geringe nachweisbare Konzentration des Proteins sein (siehe auch Abschnitt 3.1, Abb.3.2).

Da alle untersuchten Linien mit dem gleichen GAL4-Treiberstamm ausgekreuzt wurden, konnten Unterschiede bei der GAL4-Induktion der Transgenexpression als Ursache für die ungleichen Proteinmengen im Westernblot ausgeschlossen werden. Vermutlich liegen die beobachteten Unterschiede in den verschiedenen Transgen-Insertionsorten begründet. Durch immunzytologische Analysen am Polytänchromosom sollten

anschließend die Bindungseigenschaften der exprimierten chimären Proteine untersucht werden (Abb.3.13).

Mod(mdg4)-64.2-60.1DS



Mod(mdg4)-64.2-56.3DS

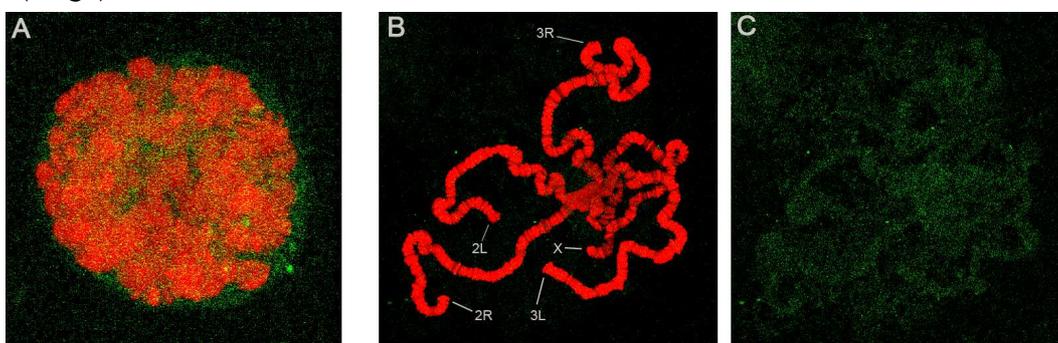


Abbildung 3.9: Übersicht der Proteinverteilung der *mod(mdg4)*-Mutanten-Konstrukte *mod(mdg4)-64.2-60.1DS* und *mod(mdg4)-64.2-56.3DS* *in vivo* und an präparierten polytären Speicheldrüsenchromosomen. (A) *in vivo* Mod(mdg4)-EGFP-Fluoreszenz (grün) in Speicheldrüsenkernen, DNA-Färbung (rot) mit DAPI. (B) Überlagerung von DNA(DAPI)- und Antikörperfärbung, die einzelnen Chromosomenarme sind entsprechend beschriftet. (C) Antikörperfärbung mit anti-EGFP (grün).

Sowohl bei den *in vivo* Analysen der nativen Speicheldrüsenkerne wie auch beim immunzytologischen Nachweis der Proteine am präparierten Polytänchromosom konnte keine Chromatin-Assoziation der untersuchten chimären Mod(mdg4)-Proteine detektiert werden. Die beiden Proteine Mod(mdg4)-64.2-56.3DS und Mod(mdg4)-64.2-60.1DS zeigten im nativen Kern eine diffuse Verteilung der EGFP-Fluoreszenz bzw. eine dotartige Anreicherung der Proteine. Damit wurde bei den Analysen der chimären Proteine nicht das erwartete, veränderte Bindungsmuster am Polytänchromosom gefunden. Es konnte zwar nach wie vor eine eindeutige Kernlokalisierung nachgewiesen werden, jedoch fehlte die bisher detektierte Chromatin-Bindung der untersuchten Proteine. Dies zeigt, dass der für die konservierte FLYWCH-Domäne bisher definierte Bereich nicht die notwendigen Informationen für die Chromatin-Assoziation der Isoformen enthält. Die gebildeten Mutanten-Proteine mit dem Austausch der FLYWCH-Domäne stellen demzufolge wahrscheinlich Hybridmoleküle ohne spezifische Funktion dar. Sie

enthielten jeweils nur einen Teil des konservierten Motivs der beiden spezifischen Isoformen. Demzufolge müsste der für die FLYWCH-Domäne bisher definierte Bereich weiter gefasst werden, um das vollständige funktionelle Motiv einzuschließen.

3.2.3 Funktionelle Analyse genomischer *mod(mdg4)*-64.2-EGFP Konstrukte

Für die vorangegangenen Analysen der Bindungseigenschaften der Proteine des *mod(mdg4)*-Lokus wurden cDNA-Konstrukte unter der Kontrolle des GAL4-induzierbaren UAS-Promotors verwendet. Dadurch war jedoch die Analyse des *in vivo* Expressionsmusters der einzelnen Isoformen nicht möglich, da diese durch GAL4 unabhängig vom endogenen Promotor induziert wurden. Durch die Verwendung von genomischen Konstrukten sollte im Folgenden die endogene Expression der Isoformen untersucht werden.

Mit Hilfe der Mutagenese-PCR wurde zunächst das Wildtyp-Konstrukt für die Isoform *mod(mdg4)*-64.2 bestehend aus dem genomischen 5' Bereich des Lokus einschließlich des spezifischen Exons der Isoform mit C-terminaler EGFP Fusion generiert. Die vorangegangenen Analysen haben außerdem gezeigt, dass die FLYWCH-Domäne in der bisher definierten Form für die Bindung der Proteine an das Chromatin nicht ausreichend ist. Daher sollten mit Hilfe von Mutanten-Konstrukten, in denen der C-Terminus verkürzt wurde, geprüft werden, welcher Bereich des Proteins für die Isoform-spezifische Chromatin-Bindung essentiell ist.

Dazu wurde ein Konstrukt etabliert, bei welchem neben der stark konservierten FLYWCH-Domäne noch weitere 30 C-terminal anschließende Aminosäuren enthalten sind. Bei dem Homologievergleich der Proteinsequenzen des spezifischen Exon 5 der Isoform *Mod(mdg4)*-64.2 zwischen verschiedenen Arten fiel eine starke Konservierung dieser 30 Aminosäuren zwischen den untersuchten Arten auf (Abb.3.4, rot umrandeter Bereich). Im C-terminalen Bereich fehlen bei diesem Konstrukt die restlichen Aminosäuren 498-580 (Konstrukt *mod(mdg4)*-64.2(Δ 498-580)). Beim dritten Konstrukt sind die Aminosäuren 468-580 des spezifischen Exon 5 deletiert, das gebildete Protein endet somit unmittelbar nach der FLYWCH-Domäne (Konstrukt *mod(mg4)*-64.2(Δ 468-580), Abb.3.4). Nach Etablieren der transgenen *Drosophila*-Linien sollte zunächst die Kontrolle der Proteinexpression erfolgen. Dazu wurden Westernblot Analysen mit Proteinextrakt aus den larvalen Speicheldrüsen durchgeführt (Abb.3.10). Die Proteinextrakte der Stämme *UAS-Mod(mdg4)*-64.2-EGFP (GAL4-induziert) und w^{1118}_{iso} dienten der Kontrolle des verwendeten polyklonalen EGFP-Antikörpers.

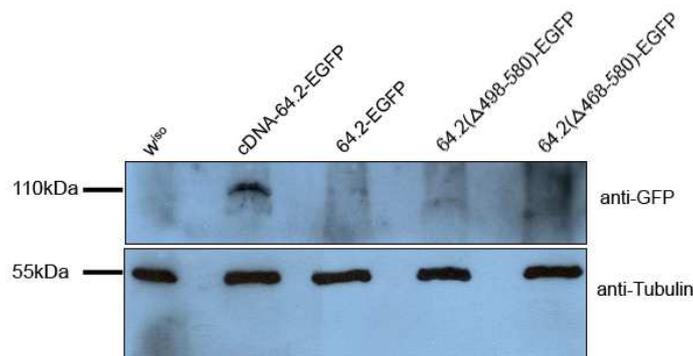
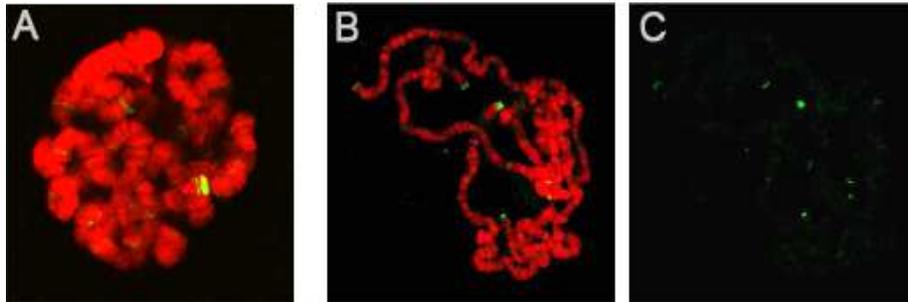


Abbildung 3.10: Westernblot-Analyse zum Nachweis der genomischen *mod(mdg4)*-64.2-EGFP Konstrukte an Speicheldrüsen-Proteinextrakt von Larven des 3.Entwicklungsstadiums. Die Beschriftung der einzelnen Proben erfolgte in verkürzter Schreibweise: Kontrolle w^{1118}_{iso} Stamm (1.Probe, w^{iso}); cDNA-Konstrukt *mod(mdg4)*-64.2-EGFP (2.Probe, cDNA-64.2-EGFP); genomisches Konstrukt *mod(mdg4)*-64.2-EGFP (3.Probe, 64.2-EGFP); genomisches Konstrukt *mod(mdg4)*-64.2(Δ498-580)-EGFP (4.Probe, 64.2(Δ498-580)-EGFP); genomisches Konstrukt *mod(mdg4)*-64.2(Δ468-580)-EGFP (5.Probe, 64.2(Δ468-580)-EGFP). Die Detektion der EGFP-Fusionsproteine erfolgte mit dem polyklonalen EGFP-Antikörper (oberer Bildabschnitt), die Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen durch Detektion mit dem monoklonalen Tubulin-Antikörper (unterer Bildabschnitt).

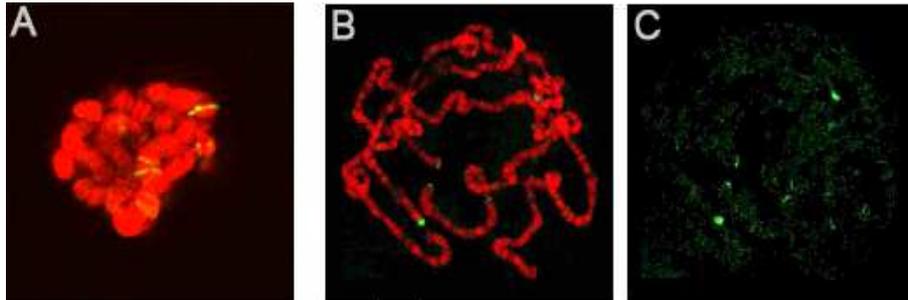
Für die Analysen wurden jeweils gleiche Mengen an Protein aufgetragen, gezeigt durch den Nachweis mit dem Tubulin-Antikörper. Dennoch war ein deutlicher Unterschied in den nachgewiesenen Mod(mdg4)-Proteinmengen erkennbar. Dabei zeigte sich, dass das Protein unter der Kontrolle des UAS-Promotors in höherer Konzentration im Proteinextrakt vorlag, als die Proben unter der Kontrolle des genomischen Promotors, welche alle eine signifikant niedrigere Konzentration aufwiesen. Dies bestätigte zum einen, dass die UAS-kontrollierten cDNA-Konstrukte im binären UAS/GAL4-Systems über ein höheres Expressionslevel als die endogenen Proteine verfügen. Die Analysen zeigten zudem, dass die Isoform Mod(mdg4)-64.2 auch endogen im Speicheldrüsenewebe exprimiert wird. Die genomischen Konstrukte zeigten im Westernblot die, abhängig von der Größe der deletierten Sequenz der FLYWCH-Domäne, erwarteten Unterschiede im Molekulargewicht der einzelnen Proben (Abb.3.10).

Anschließend sollte geprüft werden, ob die verkürzten Proteinvarianten der Isoform Mod(mdg4)-64.2 noch in der Lage sind, an das Chromatin zu binden (Abb.3.11).

genomisches Konstrukt *mod(mdg4)*-64.2-EGFP



genomisches Konstrukt *mod(mdg4)*-64.2(Δ 498-580)-EGFP



genomisches Konstrukt *mod(mdg4)*-64.2(Δ 468-580)-EGFP

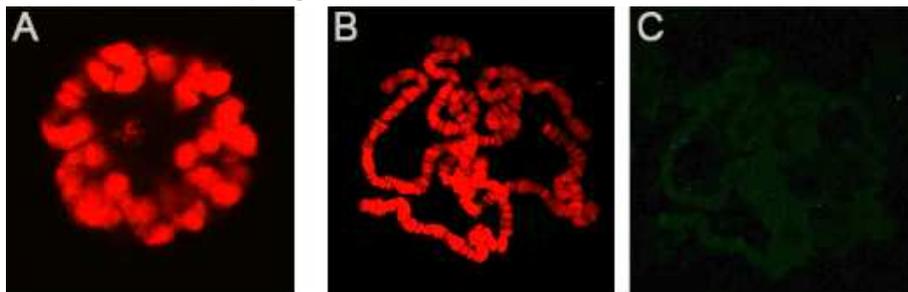


Abbildung 3.11: Übersicht der Proteinverteilung der genomischen *mod(mdg4)*-Mutanten-Konstrukte *mod(mdg4)*-64.2-EGFP, *mod(mdg4)*-64.2(Δ 498-580)-EGFP und *mod(mdg4)*-64.2(Δ 468-580)-EGFP *in vivo* und an präparierten polytären Speicheldrüsenchromosomen. (A) *in vivo* Mod(*mdg4*)-EGFP-Fluoreszenz (grün) in Speicheldrüsenkernen, DNA-Färbung (rot) mit DAPI. (B) Überlagerung von DNA(DAPI)- und Antikörperfärbung. (C) Antikörperfärbung mit anti-EGFP.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten für zwei der untersuchten Konstrukte eine klare Chromatin-Assoziation der Proteine. Sowohl in den *in vivo* Analysen wie auch bei den präparierten Polytäanchrosomen konnte bei dem *mod(mdg4)*-64.2-EGFP-Konstrukt (Kontrolle) und dem verkürzten *mod(mdg4)*-64.2(Δ 498-580)-EGFP-Konstrukt Chromatin-gebundenes Protein detektiert werden. Für das stark verkürzte *mod(mdg4)*-64.2(Δ 468-580)-Konstrukt, welches ein Protein bildet, was unmittelbar hinter der FLYWCH-Domäne endet (Abb.3.4), konnten bei den Analysen keine signifikanten Fluoreszenzsignale detektiert werden (Abb.3.11). Der Vergleich der Bindungseigenschaften der beiden verkürzten Proteinvarianten machte deutlich, dass auch die unmittelbar hinter dem bisher definierten FLYWCH-Motiv liegenden, stark konservierten Aminosäuren für die

Chromatin-Assoziation unbedingt notwendig sind (Abb.3.11). Zudem konnte gezeigt werden, dass das Volllängen-Protein und Mod(mdg4)-64.2(Δ 498-580)-EGFP neben wenigen euchromatischen Signalen auch an die Telomere binden (Vergleich Abb.3.2, Abb.3.11), wie es für die Isoform Mod(mdg4)-64.2 bereits durch die Analyse des cDNA-EGFP Konstruktes ermittelt werden konnte. Damit wurde ein weiterer Hinweis darauf erhalten, dass durch die Überexpression des Proteins im binären UAS/GAL4-System keine ektopischen Bindestellen durch die Isoform gebunden werden (Abb.3.2, 3.11). Durch die Verwendung der genomischen Konstrukte konnte das endogene Expressionsmuster analysiert werden. Deshalb sollte anschließend die Isoform Mod(mdg4)-64.2 hinsichtlich ihrer Expression in verschiedenen Geweben untersucht werden. Die Analysen im Westernblot belegten, dass die Menge an gebildetem Protein im untersuchten Speicheldrüsengewebe sehr gering war, was den Nachweis mittels Detektion der nativen EGFP-Fluoreszenz erschweren würde. Aufgrund dessen wurden rekombinante Linien von zwei verschiedenen Transgeninsertionen (Transgene T₆ und T₈) auf dem 2. Chromosom aufgebaut und Tiere erhalten, welche 4 Kopien des Transgens tragen. Mit Hilfe dieser Linie wurde die Verteilung des Mod(mdg4)-64.2 Proteins in larvalen Imaginalscheiben und Gehirnen, sowie den adulten Gonaden untersucht (Abb.3.12).

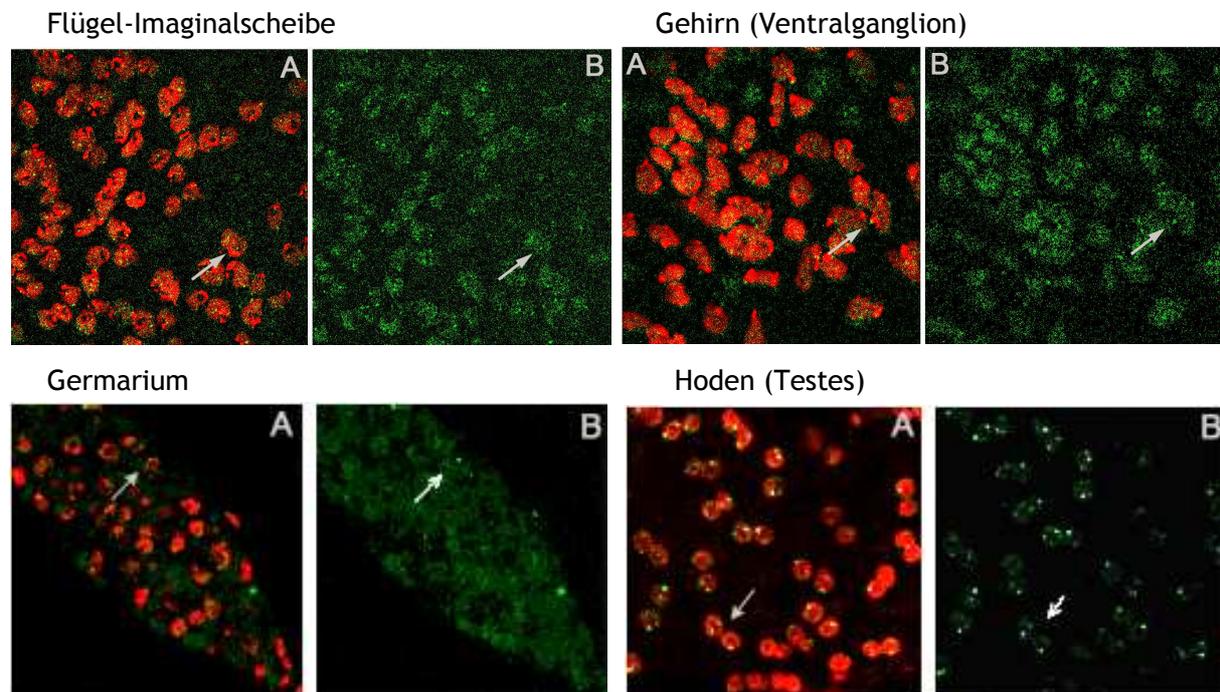


Abbildung 3.12: Untersuchung der *in vivo* Verteilung des Fusionsproteins Mod(mdg4)-64.2-EGFP (4-fache Kopienzahl) in diploiden Interphasekernen der larvalen Flügel-Imaginalscheibe, larvalen Gehirn, dem Germarium und den Hoden adulter Fliegen. (A) Überlagerung von DNA Färbung mit DAPI (rot)- und nativer EGFP-Fluoreszenz (grün). (B) native EGFP-Fluoreszenz, der Pfeil weist auf deutlich erkennbare, punktförmige Proteinanreicherungen in den Kernen.

Die *in vivo* Untersuchungen der verschiedenen Gewebe zeigten eine punktförmige Anreicherung des Proteins im Zellkern. Diese wird besonders in den Abbildungen des adulten Hodens deutlich (Abb.3.12, Pfeil), wobei in den meisten Kernen zwei signifikante Fluoreszenzsignale detektiert werden konnten. In den Geweben der Flügel-Imaginalscheibe und des larvalen Gehirns konnte dagegen eine diffuse Verteilung des Proteins im Kern beobachtet werden. Hierbei sind ebenfalls Anreicherungen der Fluoreszenzsignale zu erkennen, jedoch nicht so kräftig wie im Germarium und den Testes.

Somit kann man aus den erhaltenen Ergebnissen schließen, dass das Protein Mod(mdg4)-64.2 in polytären wie auch diploiden Geweben sowohl in den Larven als auch den adulten Tieren exprimiert wird. Mit Hilfe des genomischen Konstruktes konnte die Analyse einer Expression der Isoform Mod(mdg4)-64.2 in weiteren Geweben erfolgen. Hierfür empfiehlt sich jedoch die Anwendung von EGFP-spezifischen Antikörpern, da eine höhere Sensitivität der Signale erhalten werden kann. Außerdem sind die durch Antikörperfärbungen erhaltenen Signale stabiler als die schnell ausbleichende native EGFP-Fluoreszenz.

3.3 Einfluss von *mod(mdg4)* auf die chromosomale Telomer-Maintenance

Die immunzytologischen Untersuchungen in Abschnitt 3.1.1 zeigten, dass einige der Mod(mdg4)-Isoformen an die Telomere der Chromosomen assoziieren (Tab.3.1). Bei *Drosophila* werden die Chromosomenenden nicht durch Telomerase-basierte Mechanismen wie in den meisten Eukaryoten erhalten. In diesem Organismus bestehen die Telomere aus mehrfachen *Repeats* der non-LTR (non-Long Terminal Repeat) Retrotransposons *HeT-A*, *TART* und *Tahre* (*Telomere-associated and HeT-A-related element*) (Pardue und deBaryshe, 2003, Abad *et al.* 2004b). Zur Aufrechterhaltung der Telomere addieren sich diese Elemente mittels reverser Transkription der elementeigenen RNA autark an die Enden der Chromosomen.

Die immunzytologischen Analysen der Mod(mdg4)-Verteilungsmuster zeigten eine Bindung des Mod(mdg4)-64.2-Proteins an alle Enden der Polytänchromosomen mit Ausnahme des 3L Telomers. Wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt, konnten durch Abad *et al.* (2004a) in dem untersuchten Stamm nur am 3L Chromosom keine *HeT-A Repeats* nachgewiesen werden. Das Fehlen des Fluoreszenz-Signals an genau diesem Telomer legt die Vermutung nahe, dass die Isoform Mod(mdg4)-64.2 an die telomerischen *HeT-A* Retrotransposons assoziiert. Dadurch stellte sich die Frage, inwiefern dieses Protein eine Funktion beim Erhalt der Telomere aufweist. Die vom Protein Mod(mdg4)-64.2

abweichenden Verteilungsmuster der Telomer-Assoziation weiterer *Mod(mdg4)*-Isoformen weist darauf hin, dass andere Isoformen wahrscheinlich nicht an *HeT-A* binden. Darüber hinaus ist allerdings eine Assoziation an andere Telomer-Elemente wie *TART*, *Tahre* oder auch *TAS* (*telomere associated sequences*) möglich. Somit könnten auch die Isoformen *Mod(mdg4)*-53.1, *Mod(mdg4)*-62.3 und *Mod(mdg4)*-52.4 einen Einfluss auf die Telomer-Maintenance der Chromosomen bei *Drosophila* haben (Tab.3.1). Um mögliche Telomer-Effekte weiterführend analysieren zu können, sind weitere *mod(mdg4)*-Mutanten im spezifischen Bereich des Gens hilfreich.

3.3.1 Immunzytologische Untersuchungen der Mutante *Rev31*

Um den postulierten Einfluss von *mod(mdg4)* auf die Telomer-Maintenance näher zu untersuchen, wurde die Mutante *mod(mdg4)^{HA1224-Rev31}* (verkürzte Schreibweise *Rev31*) gewählt (Abb.3.13, blau hervorgehoben). Diese konnte nach der Mobilisierung des *P{RS5}-5-HA-1224*-Elementes, welches im spezifischen Teil des *mod(mdg4)*-Lokus inseriert war, aus einer Serie überlappender Deletionen isoliert und molekular charakterisiert werden (Abb.3.13). Die Mutante *Rev31* stellte in der Serie der erhaltenen Mutanten die bis dahin einzige Mutante der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 dar. Zudem fehlten die Isoform-spezifischen Exons weiterer Telomer-gebundener Isoformen wie *Mod(mdg4)*-53.1, -62.3 und -52.4. Insgesamt sind bei dieser Mutante 18 spezifische Exons 5 (bzw. 5 und 6) proximal der gemeinsam kodierten Exons deletiert (Abb.3.13). Durch genetische und molekularbiologische Analysen der erhaltenen Mutanten sollten weitere Anhaltspunkte für das Zuordnen möglicher Funktionen zu Gruppen an Isoformen oder zu einzelnen Isoformen erhalten werden.

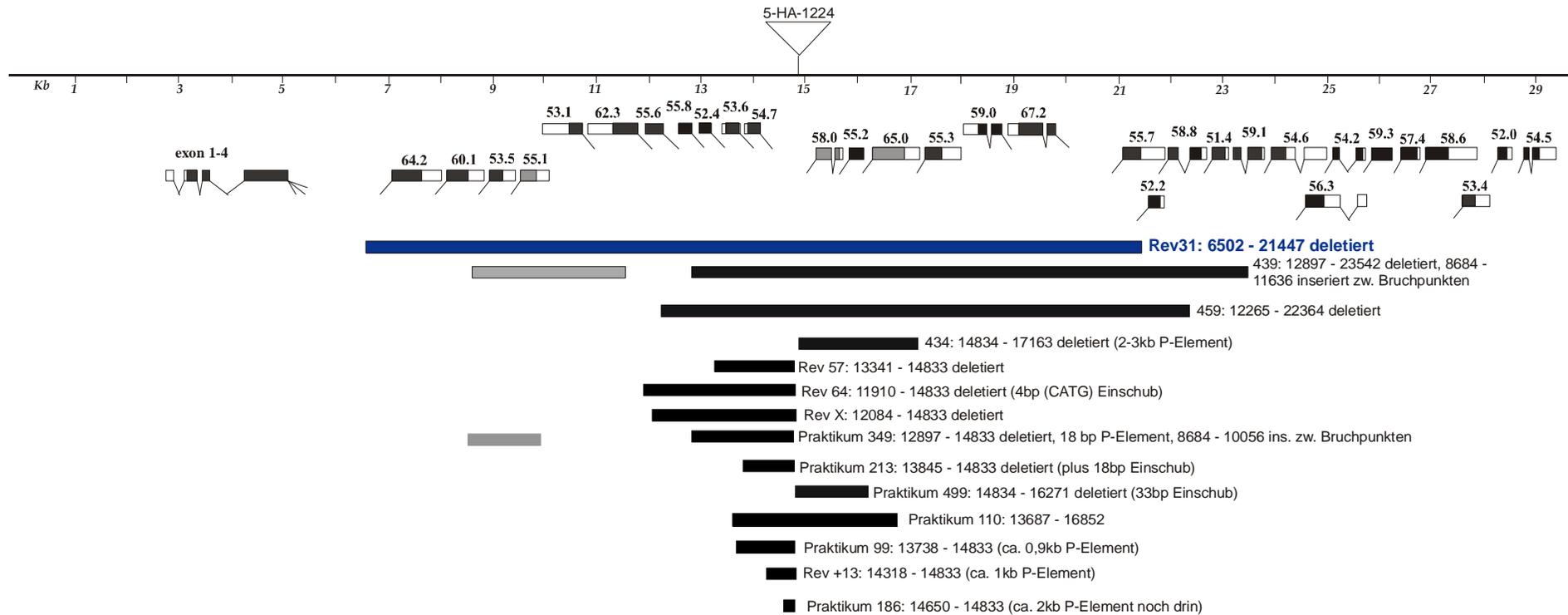


Abbildung 3.13: Aus der Mobilisierung des *P*-Elementes *P{RS5}-5-HA-1224* erhaltene Revertanten mit genomisch-überlappenden Deletionen. Die schwarzen Balken markieren die Größe der Deletion, die Bruchpunkte (lokusinterne Skala) und mögliche verbliebene *P*-Element-Sequenz sind in Klammern hinter der Stammbezeichnung vermerkt. Graue Balken verweisen auf duplizierte Sequenz in der entsprechenden Revertante. Die in weiteren Analysen verwendete Mutante *Rev31* ist blau hervorgehoben.

Die immunzytologischen Untersuchungen der Defizienz *Rev31* mit dem gemeinsamen Antikörper anti-ModC zeigten, dass Chromatin-assoziierte Mod(mdg4)-Proteine am Polytänchromosom detektiert werden konnten. Allerdings ist die Anzahl der detektierten Banden sowie die Anzahl und Intensität der Signale an den Telomeren im Vergleich zur $w^{1118}_{iso^-}$ -Kontrolle deutlich reduziert (Abb.3.14).

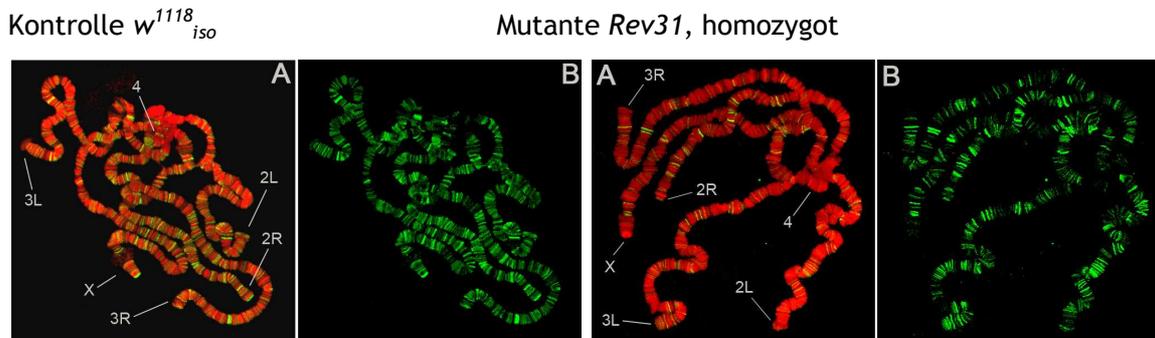


Abbildung 3.14: Vergleich der Proteinverteilung der Mod(mdg4)-Isoformen am Polytänchromosom von der Kontrolle $w^{1118}_{iso^-}$ und der homozygoten Defizienz *Rev31*.
 (A) Überlagerung der DNA-Färbung mit DAPI (rot)- und Antikörperfärbung (grün)
 (B) Antikörperfärbung mit anti-ModC.

Da in den homozygoten Mutanten-Larven des Stammes *Rev31* aufgrund der Deletion nicht mehr alle Mod(mdg4)-Proteine gebildet werden, sollten die detektierten Fluoreszenzsignale den verbliebenen Isoformen zugeordnet werden können.

Genauere Analysen des Mod(mdg4)-Bindungsmusters der homozygoten Mutante *Rev31* zeigten eine Korrelation zwischen dem Fehlen spezifischer Fluoreszenzsignale und der physischen Deletion spezifischer Exons. So zeigt Abbildung 3.14 beispielsweise in der homozygoten Deletion *Rev31* kein Signal am Telomer des X-Chromosoms, wohingegen für die Isoform Mod(mdg4)-64.2 ein sehr intensives Signal an diesem Chromosom erkennbar war (vergleiche Abb.3.2 vs., 3.14). Weitere Belege waren die fehlenden Signale der Isoform Mod(mdg4)-52.4 am Chromozentrum, der Isoform Mod(mdg4)-60.1 am X-Chromosom und der Isoform Mod(mdg4)-55.1 am 4.Chromosom (Abb.3.15).

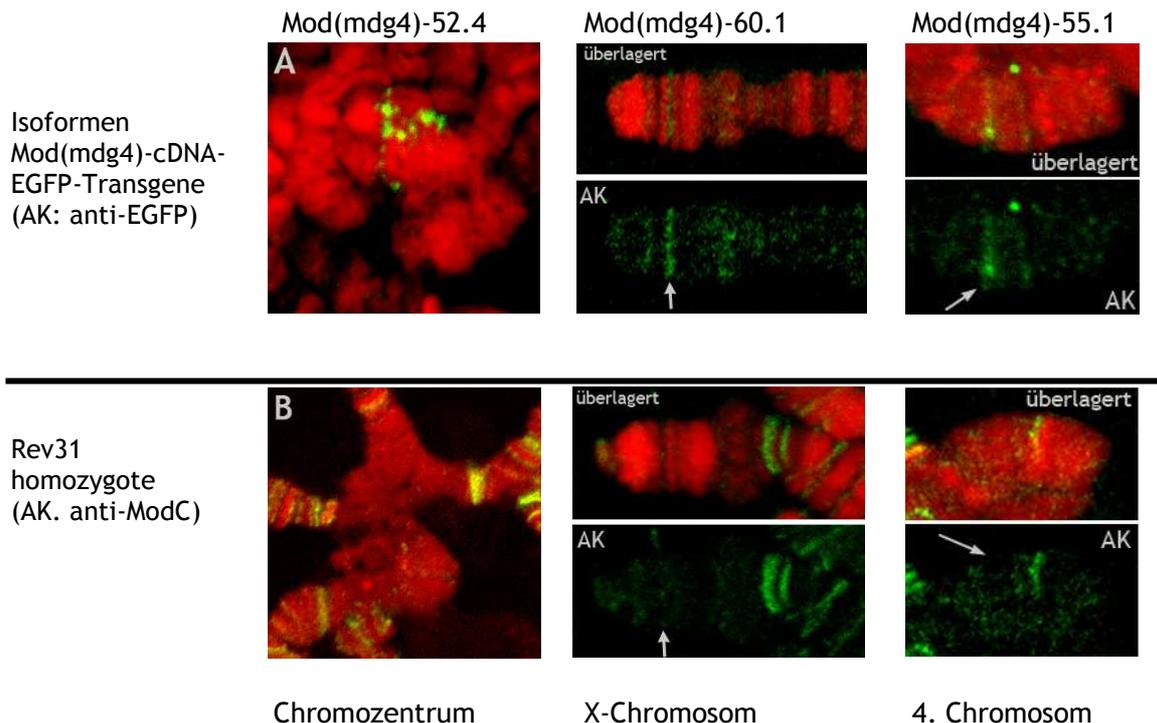


Abbildung 3.15: Analyse und Vergleich der Isoform-spezifischen Bindungssignale in der homozygoten Mutante *Rev31* (unterer Abschnitt) und der entsprechenden Mod(mdg4)-EGFP Fusionskonstrukte (oberer Bildabschnitt). Die jeweiligen zum Vergleich herangezogenen Isoformen sind oberhalb der Grafik vermerkt, die untersuchten Chromosomen darunter. Die Analyse der mod(mdg4)-EGFP-Fusionskonstrukte (Abbildungen oberhalb der Linie) erfolgte mit dem monoklonalen anti-EGFP Antikörper, die Analyse der homozygoten Revertante *Rev31* (Abbildungen unterhalb der Linie) mit dem Antikörper ModC. Die in der Revertante *Rev31* fehlenden Signale auf dem X- (für Mod(mdg4)-60.1) und dem 4. Chromosom (für Mod(mdg4)-55.1) sind durch Pfeile markiert.

Die zytologischen Analysen von Polytänchromosomen aus der Revertante *Rev31* im heterozygoten Genotyp mit w^{118}_{iso} zeigten bei einigen Chromosomen interessante Auffälligkeiten. In den Chromosomen X, 2L und 2R wies jeweils eines der beiden homologen Chromosomen ein signifikant verkürztes Telomerende auf. Eine Färbung dieser Chromosomen mit dem Antikörper, der alle Mod(mdg4)-Isoformen detektiert (anti-ModC) zeigte, dass bei den physisch verkürzten Telomeren auch eine reduzierte Signalstärke zu finden war (Abb.3.16). Für die Chromosomen 3L und 3R war dagegen keine Varianz in der Länge detektierbar. Bei den Untersuchungen der homozygoten Larven des Stammes *Rev31* konnten keine Unterschiede in der Länge der beiden homologen Telomere gefunden werden (Abb.3.14, 3.15).

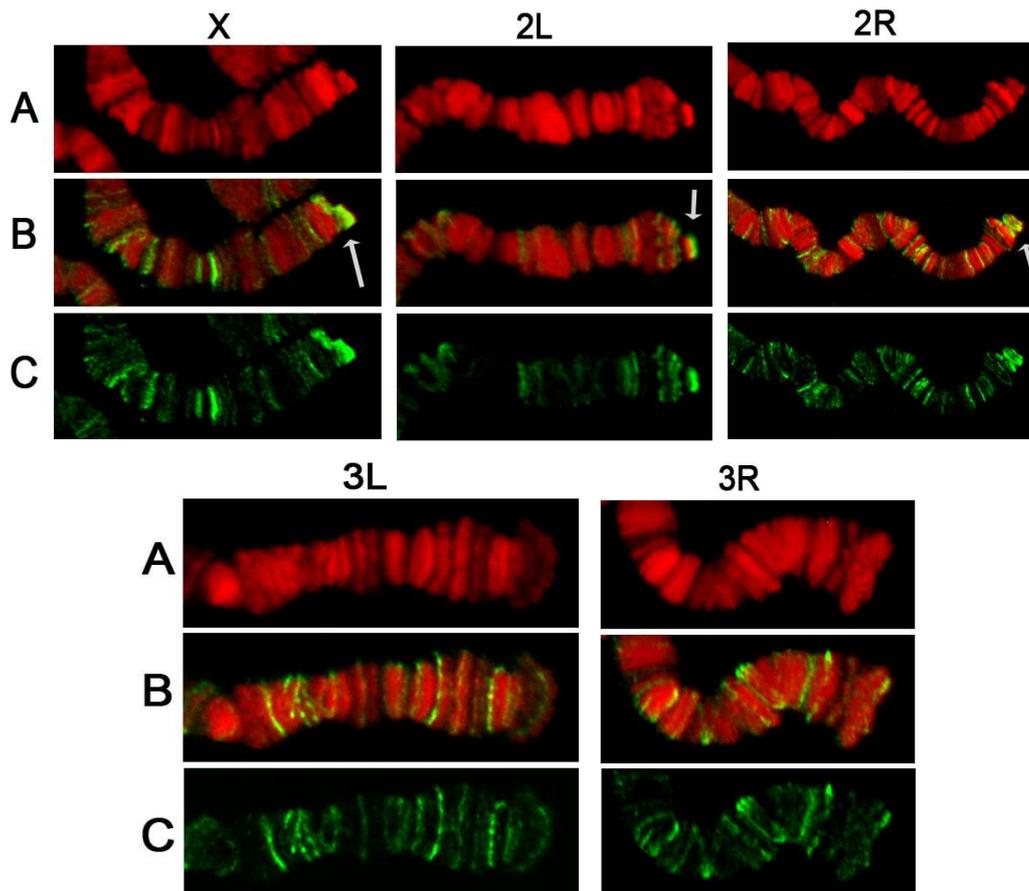


Abbildung 3.16: Die unterschiedlichen Telomerlängen im heterozygoten Genotyp *Rev31/w¹¹⁸_{iso}* sind durch Pfeile hervorgehoben. Die einzelnen Chromosomen sind über der Zusammenstellung entsprechend beschriftet.
 (A) DNA-Färbung mit DAPI (rot), (B) Überlagerung der DNA- und der Antikörperfärbung, (C) Antikörperfärbung mit anti-ModC (grün).

Anschließend sollte geklärt werden, aus welchem genetischen Hintergrund die jeweiligen divergierenden Chromosomen stammen und ob die Deletion *Rev31* Ursache für eine signifikante Verkürzung der Telomere ist.

Hierfür wurde der Stamm y^2 genutzt, welcher eine Insertion des *gypsy*-Transposons in der unmittelbaren Nähe des X-chromosomalen Telomers in der Region 1B trägt. Die dadurch bedingte zusätzliche Insertion einer nicht endogenen Bindestelle der Isoform Mod(mdg4)-67.2 wird im heterozygoten Genotyp dieses Stammes durch eine Bande deutlich, welche sich in dieser Region nur über eine Hälfte des Polytänchromosoms erstreckt (Gerasimova und Corces 1998). Durch immunzytologische Analysen mit dem Isoform-spezifischen polyklonalen anti-Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰ Antikörper sollten sich damit die beiden homologen Chromosomen eindeutig zuordnen lassen.

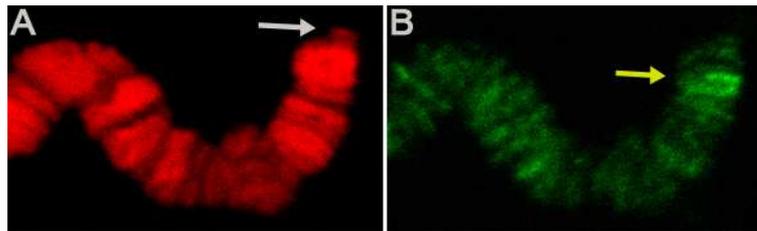


Abbildung 3.17: Immunzytologische Untersuchung am transheterozygoten Genotyp $y^2/+$; $Rev31/+$, das Homologe mit der zusätzlichen Bindestelle aufgrund der *gypsy*-Insertion (gelber Pfeil) weist das längere Telomer auf (weißer Pfeil). (A) DNA-Färbung mit DAPI (rot) (B) Antikörperfärbung mit anti-Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰ (grün).

Die immunzytologischen Analysen zeigten die bereits beschriebene unterschiedliche Länge der beiden dicht gepaarten homologen Chromosomen (Abb.3.17, weißer Pfeil). Die Färbungen mit dem Antikörper anti-Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰ belegten, dass das X-Chromosom, welches das verkürzte Telomer aufweist, der Deletion *Rev31* zugeordnet werden kann. Auf dem Homologen, welche das längere Telomer trägt, konnte die beschriebene zusätzliche Bande detektiert werden. Daraus kann man schlussfolgern, dass auch bei den Chromosomen 2L und 2R, welche im heterozygoten Genotyp unterschiedlich lange Telomere zeigten, die Mutante *Rev31* die wahrscheinliche Ursache für die beobachtete Verkürzung der Chromosomenenden ist. Da sich bei diesem Stamm bereits im heterozygoten Genotyp ein phänotypisch sichtbarer Mutanten-Effekt zeigt, muss von einem dominanten Effekt der Mutante *Rev31* ausgegangen werden.

In der Literatur wurde an mehreren Beispielen gezeigt (Abad *et al.* 2004b, George *et al.* 2006), dass innerhalb verschiedener *Drosophila melanogaster* Stämme Unterschiede in der Struktur der Telomere vorliegen. Um auszuschließen, dass es sich bei dem Phänotyp der unterschiedlichen Länge der Telomere möglicherweise um eine Variabilität innerhalb verschiedener Laborstämme handelt, wurden transheterozygote Tiere der Mutante *Rev31* nach Kreuzen mit dem Stamm *Canton-S* untersucht (Abb.3.18).

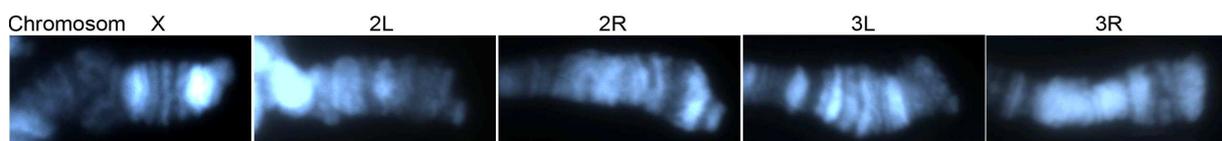


Abbildung 3.18: Unterschiedliche Telomerlänge im heterozygoten Genotyp *Rev31/Canton-S*. Die einzelnen Chromosomen sind mit DAPI gefärbt und oberhalb der Abbildung beschriftet. Bei den Chromosomen X, 2L und 2R sind verkürzte Telomere eines Homologen erkennbar.

Abbildung 3.18 zeigt deutlich, dass auch bei heterozygoten Tieren der Defizienz *Rev31* mit dem Wildtyp-Stamm *Canton-S* Unterschiede in der Telomerlänge der Chromosomen X, 2L und 2R beobachtet werden konnten. Somit konnte mit Hilfe dieser Ergebnisse eine spezifische Variabilität der einzelnen Referenzstämme ausgeschlossen werden.

3.3.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) -Analysen der Mutante *Rev31*

Die immunzytologischen Analysen der Isoform Mod(mdg4)-64.2 gaben einen Anhaltspunkt dafür, dass das Protein an die telomerischen *HeT-A* Retrotransposons assoziiert sein könnte. Die Untersuchungen der Mutante *Rev31*, in welcher das spezifische Exon dieser Isoform deletiert ist, zeigten zudem einen dominanten Effekt auf die Länge der Telomere. Mit Hilfe von FISH-Analysen sollte daher untersucht werden, ob die beobachtete Verkürzung der Telomere in der Mutante mit einer Veränderung der *Repeats* des *HeT-A* Retrotransposons korreliert. George *et al.* (2006) zeigten, dass die Größe der *HeT-A* Elemente an den Telomeren sehr stark variiert, bis zu 70% der Elemente zeigen eine signifikante Verkürzung im 5' Bereich. Aus diesem Grunde wurde für die Sonde ein 594bp umfassender Sequenzbereich aus dem ORF des *HeT-A* Gag-Proteins gewählt. Bei den Analysen der heterozygoten Mutante *Rev31* dienten die homozygote Defizienz *Rev31* und der Referenzstamm w^{1118}_{iso} als Kontrolle.

In den FISH-Analysen konnten bei allen untersuchten Stämmen an den Telomeren beider gepaarter homologer Chromosomen (Chromosom X, 2L, 2R, 3R) Fluoreszenz-Signale detektiert werden (Abb.3.19). Dies zeigt, dass trotz der Verkürzung der Telomere in der Mutante *Rev31*, weiterhin *HeT-A* Retrotransposons an den Chromosomen-Enden erhalten bleiben.

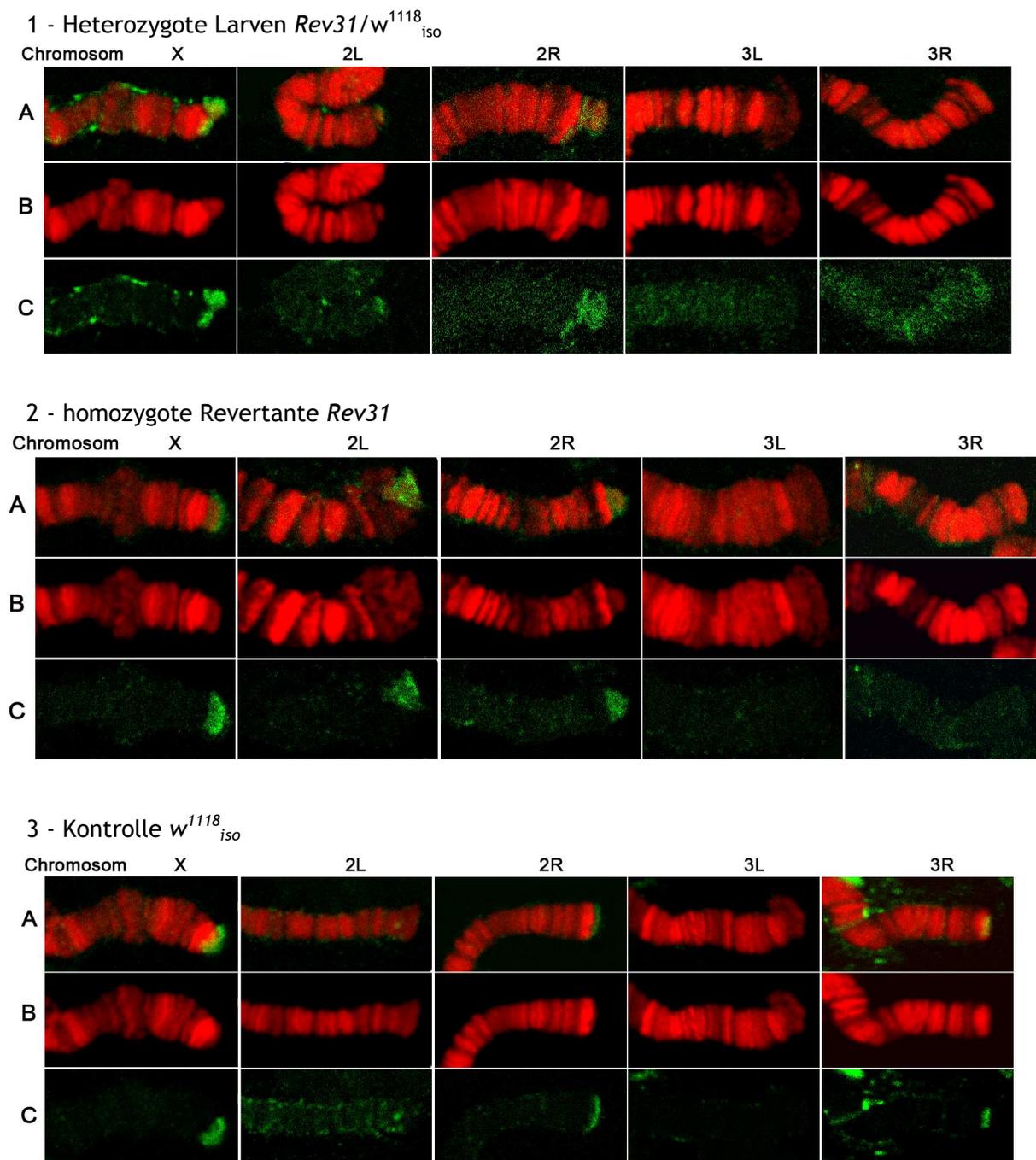


Abbildung 3.19: *HeT-A* FISH-Analysen an präparierten larvalen polytären Speicheldrüsenchromosomen. Dargestellt sind die Telomerbereiche der einzelnen Chromosomen des transheterozygoten Genotyps $Rev31/w^{1118}_{iso}$, der homozygoten Mutante $Rev31$ und der Kontrolle w^{1118}_{iso} . Die Chromosomen sind über den Zusammenstellungen entsprechend beschriftet. (A) Überlagerte Abbildung von (B) DNA-Färbung mit DAPI (rot) und (C) Signal der FISH-Sonde (grün).

Bei den Färbungen der heterozygoten Mutante $Rev31$ wurde an dem kürzeren der beiden Chromosomen-Enden (Chromosom X, 2L, 2R) ein signifikant schwächeres Fluoreszenzsignal detektiert (Abb.3.19). Dies weist darauf hin, dass der Sequenzanteil des *HeT-A* Retrotransposons an diesem Telomerende gegenüber dem anderen Homo-

logen signifikant reduziert ist. Im verwendeten Kontroll-Stamm w^{1118}_{iso} und der homozygoten Revertante *Rev31* (Abb.3.19) konnten dagegen keine Unterschiede in der Signalstärke an den homologen Chromosomen beobachtet werden.

In keinem der untersuchten Genotypen konnte mit der verwendeten Sonde ein Signal am Telomer des 3L Chromosoms detektiert werden. Durch Abad *et al.* (2004a) wurde bereits beschrieben, dass in einigen Wildtyp Stämmen am 3L Chromosom keine *HeT-A* Retrotransposons nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse wurden durch die FISH-Analysen auch für den verwendeten Referenz-Stamm w^{1118}_{iso} und den Stamm der Revertante *Rev31* erhalten.

Das Sonden-Signal am Telomer des Chromosoms 3R war zudem deutlich schwächer als an den anderen Chromosomen (Abb.3.19, C 3R). Nach Abad *et al.* (2004a) findet man bei den einzelnen Telomeren Längenunterschiede von 147 kb für das X-Chromosom, 28 kb für das Chromosom 3R bzw. 26 kb für das 3L-Chromosom (dies bezieht sich auf die Gesamtheit der telomerischen Retrotransposons einschließlich der *telomere-associated sequences - TAS*). Die Größe der *HeT-A/TART* Arrays ist dabei sehr unterschiedlich. Es wurden beispielsweise Größen von 19 kb am X-Chromosom und 13 kb am Chromosom 3R belegt (Abad *et al.* 2004a, George *et al.* 2006). Aufgrund der Größe vollständiger *HeT-A*- Elemente von ca. 6 kb (Pardue *et al.* 2005) sollten die Chromosomen mit kurzen *HeT-A/TART* Arrays nur eine geringe Zahl an *HeT-A Repeats* enthalten. Hier ist somit eine signifikant nachweisbare Reduktion des *HeT-A* Sequenzanteils durch den Einfluss von Mutanten kaum möglich. Im Gegensatz dazu wird die Reduktion von *HeT-A* Sequenz an Chromosomen mit größeren *HeT-A/TART*-Arrays durch eine Verkürzung der Telomere nachweisbar (Abb.3.19). Die Analysen der Revertante *Rev31* zeigten den Phänotyp der Telomerverkürzung auch noch, nachdem der Stamm nach den ersten Untersuchungen mehr als 20 Generationen später noch einmal analysiert wurde. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die unterschiedliche Telomerlänge durch den Einfluss der Mutante über einen unterschiedlich langen Zeitraum hervorgerufen wurde. George *et al.* (2006) hatten in ihren Arbeiten den Einfluss von *Tel-1* Mutanten auf die Telomerlängen bei *Drosophila melanogaster* untersucht. Dabei stellten sie fest, dass in den aktuellen Telomeranalysen die Anreicherung der *HeT-A*- und *TART* Sequenz stärker war (etwa 9-fach erhöht) als sie in der ursprünglichen Publikation beschrieben wurde (Siriaco *et al.* 2002, etwa 4-fach erhöht). Als eine Möglichkeit für die Abweichung in den Resultaten wurde der Einfluss der *Tel-1* Mutante über mehrere Generationen innerhalb der Fliegenpopulation diskutiert.

3.3.3 Untersuchung des Einflusses von *mod(mdg4)*-64.2 auf die Regulation von telomerischen und euchromatischen Retrotransposons

Die FISH-Analysen haben gezeigt, dass in der Mutante *Rev31* das detektierte Signal am Telomer schwächer ist und damit zunächst auf weniger *HeT-A* Sequenz geschlossen werden konnte. In dieser Mutante sind 18 Isoform-spezifische Exons proximal der gemeinsam kodierten Exons deletiert (Abb.3.13). Aufgrund der Telomer-Bindung der Isoform *Mod(mdg4)*-64.2 wurde vermutet, dass dieses Protein eventuell maßgeblich zum Erhalt der telomerischen *HeT-A Repeats* beiträgt. Da die Deletion der Revertante *Rev31* weitere Isoformen umfasst, welche eine Bindung an Telomere zeigten, könnten neben der Isoform *Mod(mdg4)*-64.2 noch weitere Proteine des Locus für die Regulation der Telomere verantwortlich sein. Die Prüfung dieser Fragestellung sollte mittels einer Mutante erfolgen, in welcher lediglich das spezifische Exon der Isoform *mod(mdg4)*-64.2 deletiert ist. Würde nur diese Isoform für den Erhalt der Telomere verantwortlich sein, so müsste man in der Isoform-spezifischen Mutante einen vergleichbaren Telomer-Phänotyp finden.

Mittels der „*Ends-in gene targeting*“ - Methode (Xie und Golic 2004) konnte die beschriebene Mutante im Labor erfolgreich etabliert werden (Abb.3.20, Promotion M. Volkmar 2010). In der Promotionsarbeit M. Volkmar (2010) wird diese Mutante unter der Bezeichnung „Linie D13 85c V I“ geführt, in der hier vorliegenden Arbeit wird dieser Stamm im weiteren Verlauf als Defizienz *mod(mdg4)*- Δ 64.2 (bzw. Δ 64.2 in der verkürzten Schreibweise) bezeichnet (Abb.3.20).

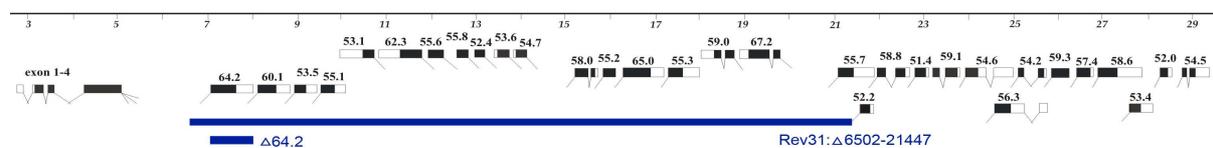


Abbildung 3.20: Schematische Abbildung der deletierten genomischen Sequenzen in den Defizienzen *Rev31* und Δ 64.2 im *mod(mdg4)*-Lokus. Die deletierten Bereiche sind als **blaue** Balken gekennzeichnet, bei der Mutante *Rev31* ist zusätzlich die Größe der fehlenden Sequenz als Beginn- und End-Position in Bezug auf die lokuserne Skala vermerkt.

Bei der Untersuchung des Stammes Δ 64.2 konnten im transheterozygoten Genotyp mit dem Kontrollstamm w^{1118}_{iso} keine Unterschiede in der Telomerlänge festgestellt werden. Wie bereits erwähnt, fanden George *et al.* (2006) Unterschiede beim Vergleich der Ergebnisse von Telomeranalysen, die nach mehreren Generationen wiederholt wurden. Deshalb erfolgte eine erneute Analyse der Linie Δ 64.2 mehr als 23

Generationen später. Jedoch konnten auch in diesem Falle keine signifikanten Unterschiede in der Länge der Chromosomen-Enden detektiert werden (Abb.3.21).

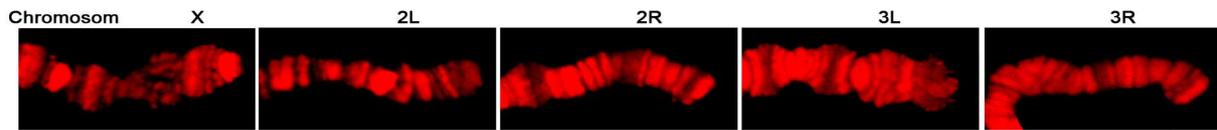


Abbildung 3.21: Kein Unterschied bei der Untersuchung der Telomerlänge im heterozygoten Genotyp *mod(mdg4)-Δ64.2 / w¹¹¹⁸_{iso}*. Die untersuchten Chromosomen stammen aus Larven, die aus einer Kreuzung von $\Delta64.2/\Delta64.2 \times w^{1118}_{iso}$ hervorgingen ($\Delta64.2$ wurde bis zu diesem Zeitpunkt bereits für >23 Generationen als homozygoter Stamm vermehrt). Die einzelnen Chromosomen sind mit DAPI gefärbt und entsprechend beschriftet.

In Abbildung 3.21 ist deutlich zu erkennen, dass bei den Chromosomen X, 2L und 2R, an welchen bei der Mutante *Rev31* ein offensichtlicher Telomer-Phänotyp beobachtet werden konnte, keine Unterschiede an den Enden der beiden Homologen zu detektieren war. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man nun schlussfolgern, dass die Isoform *Mod(mdg4)-64.2* möglicherweise doch keine regulatorische Funktion bei der Erhaltung der Telomere ausübt. Andererseits sind die Telomere bei *Drosophila* stark kondensiert und komplex aufgebaut. Somit wäre es denkbar, dass geringfügige Änderungen der Struktur nicht immer mit einem signifikanten Phänotyp einhergehen. In der Revertante *Rev31*, in welcher mehrere Telomer-assoziierte Isoformen deletiert sind, konnte ein deutlicher Effekt auf die Telomerlänge nachgewiesen werden.

Weitere Anhaltspunkte zur funktionellen Bedeutung von *mod(mdg4)* für die Regulation der Telomere sollten mit Hilfe von Microarray-Analysen erhalten werden. Nach der Isolation von Gesamt-RNA adulter Weibchen vom Kontrollstamm *w¹¹¹⁸_{iso}* sowie den homozygoten Mutanten *Rev31* und $\Delta64.2$ erfolgte eine genomweite Expressionsanalyse um Gene zu identifizieren, welche in ihrer Transkription durch *mod(mdg4)* reguliert werden (Promotion M. Volkmar 2010). Bei der vergleichenden Auswertung der Daten wurde vorrangig auf die Veränderung der Expression verschiedener Transposons im *Drosophila* Genom fokussiert (Tab.3.2). Sollten die Transposons der Kontrolle von *Mod(mdg4)-64.2* unterliegen und dementsprechend eine veränderte Expression zeigen, dann müsste für die Revertante *Rev31* ein ähnlicher Effekt in der Regulation erwartet werden.

Tabelle 3.2: Einfluss der *mod(mdg4)*-Mutanten $\Delta 64.2$ und *Rev31* auf die Expression ausgewählter *Drosophila* Transposons. Eine Erhöhung der Transkriptionsrate ist rot und durch einen aufwärts gerichteten Pfeil (\uparrow), eine Verringerung blau und durch einen abwärts gerichteten Pfeil (\downarrow) gekennzeichnet, unveränderte Transkriptionsraten sind schwarz hervorgehoben. Die Zahlenwerte verdeutlichen jeweils das x-fache der Transkriptionsrate gegenüber der im Kontrollstamm w^{1118}_{iso} gefundenen Referenzwerte, die Target-ID repräsentiert das entsprechende Element der Affymetrix-Microarray-Analyse.

Element	Effekt in $\Delta 64.2$	Effekt in <i>Rev31</i>	Target - ID
HeT-A	\uparrow 2,8	\uparrow 12,1	1624224_at
Frogger	\uparrow 9,5	\uparrow 7,4	1625649_s_at
Gypsy	\uparrow 5,5	\uparrow 3,7	1624819_s_at
Invader4	\uparrow 3,0	\downarrow 0,3	1625791_s_at
Copia	kein Effekt	kein Effekt 1,3	1632683_s_at
Rover	kein Effekt	kein Effekt 0,88	1624377_s_at
R2-Element	\downarrow 0,056	\downarrow 0,055	1630934_at

In der Mutante $\Delta 64.2$ ist ein Anstieg der *HeT-A* Transkriptmenge um das 2,8-fache gegenüber dem Wildtyp zu verzeichnen, in der Revertante *Rev31* dagegen um den Faktor 12 (Tab.3.2).

Für die Transposons *Frogger* und *Gypsy* wurde ebenfalls eine Erhöhung der Expression in beiden untersuchten Defizienzen beobachtet. Für die *Invader4*-Elemente wurden unterschiedliche Effekte bei der Regulation deutlich. In der Mutante $\Delta 64.2$ ist eine leichte Erhöhung der Expression detektierbar, in der größeren Defizienz *Rev31* dagegen eine Reduktion. Möglicherweise wird in der Mutante *Rev31* eine oder mehrere weitere Isoformen deletiert, welche die Aktivierung der *Invader4*-Expression initiieren. Das Fehlen dieser Proteine führte nun zu einer Reduktion der Transkriptionsrate beim Stamm *Rev31* gegenüber der Mutante $\Delta 64.2$. Im Vergleich der *Invader4*-Transposon Referenzwerte vom Kontrollstamm w^{1118}_{iso} mit den Daten der Revertante *Rev31* konnte lediglich eine schwache Verringerung der Transkriptmenge gefunden werden. Für die Transposons *Copia* und *Rover* wurden für beide untersuchte Mutanten keine Veränderung in der Expression gefunden, das *R2*-Element zeigte in beiden Fällen eine Verringerung der Expressionsrate.

Die durch die Microarray-Analysen erhaltenen Daten geben erste Hinweise auf eine höhere Expression von *HeT-A* im Hintergrund der Mutante $\Delta 64.2$. Aber auch für andere Retrotransposons konnten Veränderungen in der Transkriptmenge festgestellt werden. Durch semiquantitative RT-PCR-Analysen sollten die erhaltenen Daten überprüft werden. Hierfür wurden vom homozygoten Stamm der Linie $\Delta 64.2$ und vom Kontrollstamm w^{1118}_{iso} Gesamt-RNA Präparationen von adulten Weibchen durchgeführt. Mittels halb-

quantitativer RT-PCR erfolgte im Anschluss die Untersuchung der Transkriptmengen der entsprechenden Transposons. Die Expression des Retrotransposon *HeT-A* wurde durch den Einsatz von 3 verschiedenen Primerpaaren, jeweils eines im 5'UTR, im *HeT-A* Gag (CDS) und im 3'UTR Sequenzbereich, analysiert. Dabei musste für die Amplifikation von signifikant nachweisbaren Produktenmengen eine unterschiedliche Zahl an PCR-Zyklen gewählt werden. Diese betragen für das Produkt im 5'UTR und der CDS 36 Zyklen, demgegenüber für das Fragment im 3'UTR nur 25 Zyklen.

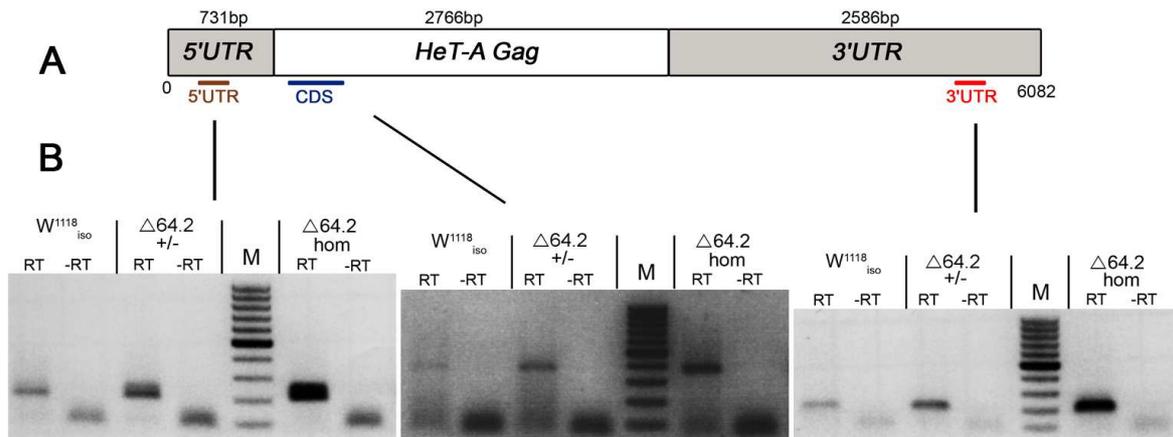


Abbildung 3.22: Einfluss der Mutante $\Delta 64.2$ auf die Transkriptmengen des telomerischen *HeT-A* Retrotransposons. Die Lage der zur Untersuchung eingesetzten Primer ist in der schematischen Darstellung des Elements (A) unterhalb der Exons (graue und weiße Rechtecke) vermerkt und farblich hervorgehoben. (B) Die Ergebnisse der RT-PCR Analysen zeigen die amplifizierten Produkte der 5'UTR, CDS und 3'UTR. Die Beschriftung der eingesetzten Proben erfolgte oberhalb der Gelbilder: Kontrolle (w^{1118}_{iso}), heterozygote Mutante ($\Delta 64.2 +/-$) und homozygote Mutante ($\Delta 64.2 hom$). Zu den cDNA-Proben (RT) wurden als Negativkontrollen jeweils äquivalente Mengen nicht umgeschriebener RNA (-RT) Proben eingesetzt, (M) 100 bp DNA-Marker.

Die durch die RT-PCR-Analysen erhaltenen Daten konnten die Ergebnisse der Microarray-Analysen bestätigen. Die Untersuchungen verschiedener genomischer Regionen des *HeT-A* Retrotransposons zeigten dabei übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der detektierten erhöhten Transkriptmengen in der Mutante $\Delta 64.2$ gegenüber der Kontrolle (Abb.3.22). Bei Analysen der *Drosophila* Telomere konnte gezeigt werden, dass der Anteil an intakten und vollständig erhaltenen *HeT-A* Elementen gegenüber den vorwiegend im 5' Bereich stark verkürzten Retrotransposons an den Chromosomen-Enden nur etwa 70% beträgt (George *et al.* 2006). Die unterschiedliche Zahl an Zyklen zur Amplifikation der Produkte für das 5' und 3'UTR weisen darauf hin, dass auch bei den RT-PCR-Analysen der Anteil an vollständig erhaltenen Retrotransposon gegenüber den verkürzten Elementen in allen untersuchten Stämmen deutlich geringer ist. Signifikante

Produktmengen sind für das 5'UTR erst nach 36 Zyklen nachweisbar, für das 3'UTR dagegen bereits nach 25 Zyklen (Abb.3.22).

George *et al.* (2006) beschreiben in ihren Arbeiten interessanterweise die Beobachtung, dass in polytären Geweben wie beispielsweise den larvalen Speicheldrüsen die *HeT-A* Elemente im Gegensatz zum diploiden Gewebe, wie beispielsweise in adulten Köpfen, stark unterrepräsentiert sind. In den dabei untersuchten Wildtyp-Stämmen *Oregon-R* und *Canton-S* konnte jeweils eine Rate von ca. 0,6 der Unter-Replikation im Verhältnis der Speicheldrüsen zu den Köpfen gefunden werden. Möglicherweise könnte hierin eine Erklärung dafür bestehen, warum bei den RT-PCR-Analysen Veränderungen in den *HeT-A* Transkriptmengen gefunden wurden, aber bei den immunzytologischen Untersuchungen der Mutante keinerlei Unterschiede festgestellt werden konnten.

Auch bei der Analyse nicht-telomerischer Transposons von *Drosophila melanogaster* konnten die Ergebnisse bezüglich der veränderten Transkriptmengen gegenüber dem eingesetzten Kontrollstamm w^{1118}_{iso} bestätigt werden. Dabei wurden für die Amplifikation von signifikant nachweisbaren Produktmengen für die Elemente *R2* und *Copia* 26 PCR-Zyklen, für *Invader4* und *Frogger* 29 und für die *Gypsy polymerase* und das *Rover* Element 31 Zyklen angewendet (Abb.3.23).

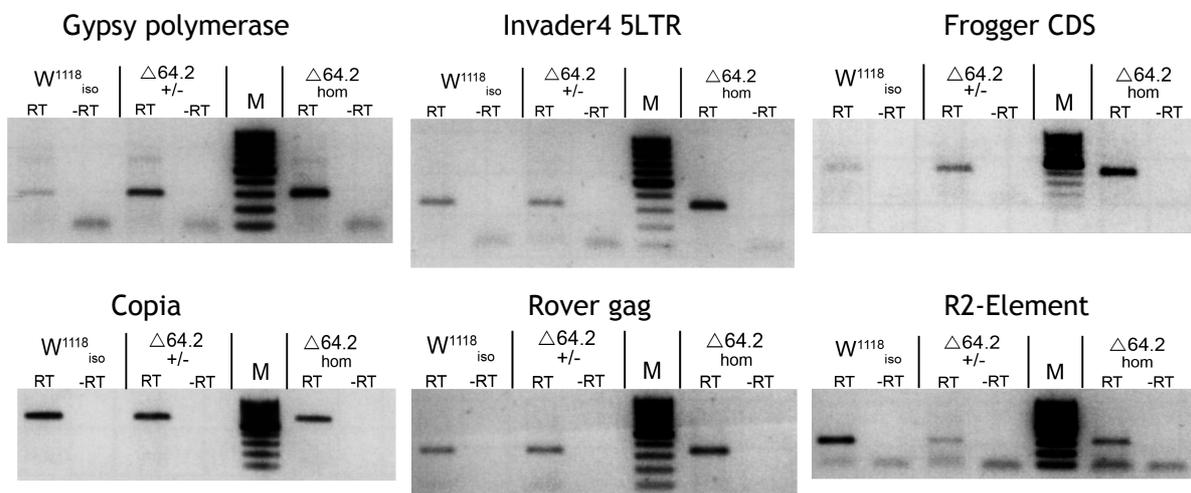


Abbildung 3.23: Einfluss der Mutante $\Delta 64.2$ auf die Transkriptmengen nicht-telomerischer Retrotransposons. Die Beschriftung der eingesetzten Proben erfolgte oberhalb der Gelbilder: Kontrolle (w^{1118}_{iso}), heterozygote Mutante ($\Delta 64.2 +/-$) und homozygote Mutante ($\Delta 64.2 hom$). Parallel zu den cDNA Proben (als RT gekennzeichnet) wurden als Negativkontrolle äquivalente Mengen -RT Proben eingesetzt, (M) 100 bp DNA-Marker.

Es konnten für die Transposons *Gypsy*, *Invader4* und *Frogger* eine signifikante Erhöhung der Expression im Hintergrund der untersuchten homozygoten Mutante $\Delta 64.2$ detektiert werden. Beim Element *Copia* konnte keine Veränderung der amplifizierten Produktmenge gefunden werden und das *R2*-Element zeigt wie bereits beschrieben, eine Reduktion an nachgewiesenem Transkript. Bei dem Element *Rover* wurde entgegen der Daten der Microarray-Analysen eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge detektiert (Abb.3.23). Somit hat die Isoform Mod(mdg4)-64.2 möglicherweise nicht nur einen regulatorischen Einfluss auf das telomerische Retrotransposon *HeT-A*, sondern auch auf weitere euchromatisch und auch heterochromatisch inserierte transponible Elemente. Dies würde mit der Beobachtung koinzidieren, dass das Protein Mod(mdg4)-64.2 nicht nur an den Telomeren sondern auch an 12 euchromatischen Bindestellen der Chromosomen nachgewiesen werden konnte (Abb.3.2, 3.3, Tab.7.1-Anhang). Die veränderten Transkriptmengen ausgewählter nicht-telomerischer Transposons untermauern diese Überlegung zusätzlich (Abb.3.23).

3.3.4 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) am *HeT-A* Retrotransposon

Die anfangs gezeigten immunzytologischen Analysen gaben erste Indizien für eine Bindung der Isoform Mod(mdg4)-64.2 an die telomerischen *HeT-A* Retrotransposons. Durch Microarray- und halbquantitative RT-PCR-Analysen konnte der Isoform-spezifische regulatorische Einfluss des Proteins auf die *HeT-A* Elemente belegt werden. In nachfolgenden ChIP-Analysen der *mod(mdg4)-64.2*-spezifischen Null-Mutante $\Delta 64.2$ (Abb.3.20) sollten die erhaltenen Ergebnisse überprüft und die Anhaltspunkte zur möglichen Funktion der Isoform erhärtet werden.

Die Effizienz der Transkription wird direkt durch die Änderung der DNA-Verpackung oder Modifikationen an der Oberfläche der Nukleosomen beeinflusst (Park 2009). So konnte an aktivierten Promotoren die Anreicherung von tri-methyliertem Lysin 4 des Histon H3 (verkürzte Schreibweise H3K4me3) gezeigt werden. Die Modifikation des dreifach-methylierten Lysin 9 am Histon H3 (verkürzte Schreibweise H3K9me3) ist dagegen eine Markierung für transkriptionell inaktives Chromatin (Lachner *et al.* 2003). Da für die telomerischen *Repeats* das Vorhandensein der beiden beschriebenen Markierungen belegt ist (Andreyeva *et al.* 2005), sollte mittels spezifischer Antikörper eine Korrelation zwischen einer An- bzw. Abreicherung dieser Markierungen an definierten *HeT-A* Sequenzen und der veränderten *HeT-A* Transkriptmenge geprüft werden. Für die

Chromatin-Immünpräzipitation wurde dafür isoliertes Chromatin aus adulten Köpfen mit den spezifischen anti-H3K4me3 und anti-H3K9me3 Antikörpern analysiert.

Bei den Tandem-*Repeats* der *HeT-A* Retrotransposons ist der Promotor für das *downstream* lokalisierte Element innerhalb der äußersten 590 bp der 3'UTR in der vorangehenden *HeT-A* Einheit kodiert (Danilevskaya *et al.* 1997, Mason *et al.* 2007). Daher wurden für die anschließende Quantifizierung des erhaltenen DNA-Materials per *real-time* PCR 3 definierte Sequenzbereiche des *HeT-A* Retrotransposons untersucht (Abb.3.24-A).

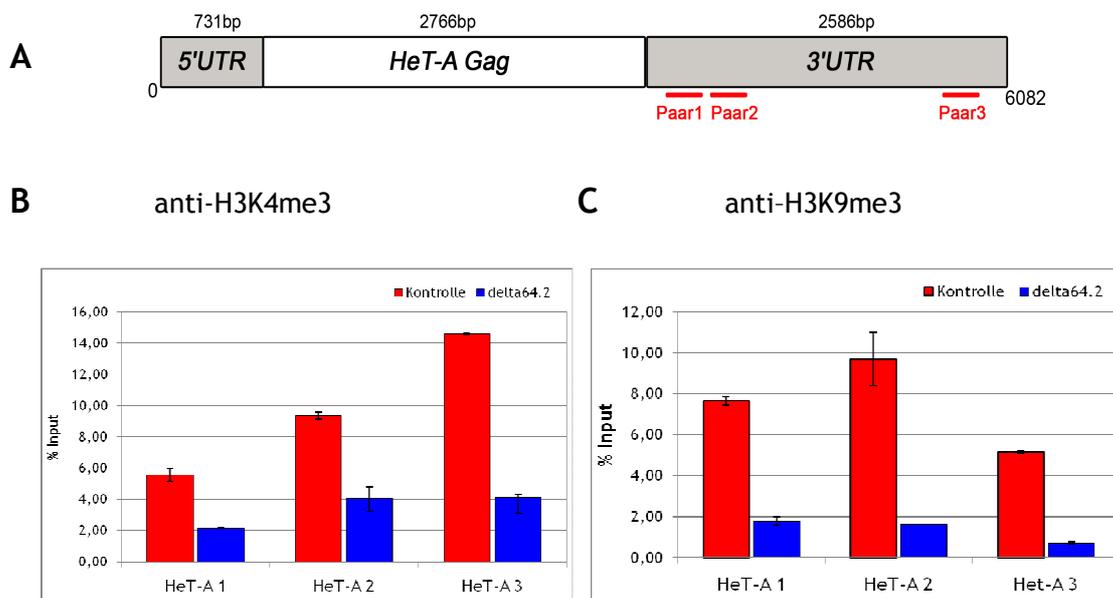


Abbildung 3.24: (A) Schematische Darstellung des *HeT-A* - Elements mit Größenangaben der einzelnen UTR und des Exons (graue und weiße Rechtecke); Gesamtgröße (am Ende) in bp; unterhalb des 3'UTR sind die für die *real-time* PCR-Analysen (B-C) verwendeten Primer als Paar 1-3 vermerkt und farblich (rot) hervorgehoben. B-C: Ergebnisse der *real-time* PCR nach ChIP-Analysen am Chromatin der Kontrolle *w¹¹¹⁸_{iso}* (rote Säulen) und der Mutante $\Delta 64.2$ homozygot (blaue Säulen) mit (B) anti-H3K4me3- bzw. (C) anti-H3K9me3-spezifischen Antikörpern.

Die Histonmarkierungen für transkriptionell aktives (H3K4me3) wie auch inaktives (H3K9me3) Chromatin sind in den telomerischen *HeT-A* *Repeats* abundant (Andreyeva *et al.* 2005, Mason *et al.* 2007), was auch anhand der ChIP-Analysen sowohl für die Kontrolle *w¹¹¹⁸_{iso}* wie auch für die Mutante $\Delta 64.2$ gezeigt werden konnte. Dabei wurde eine Reduktion der beiden Marks an den untersuchten *HeT-A* Sequenzbereichen gefunden (Abb.3.24). Die für beide Markierungen nachgewiesene Abreicherung am Chromatin könnte auf einen Verlust an *HeT-A* Sequenz hinweisen.

Für die Mutante $\Delta 64.2$ konnte auf zytologischer Ebene keine Veränderung der Telomerlänge festgestellt werden (Abb.3.21), was auf einen möglichen kompensatorischen Effekt durch weitere Telomer-assoziierte Isoformen hindeuten könnte. Die durch die

ChIP-Analyse erhaltenen Daten würden dahingegen die Hypothese einer Telomerverkürzung auch in der Mutante $\Delta 64.2$ erneut untermauern.

Eine mögliche Erklärung, worauf die unterschiedlichen Resultate in den verschiedenen Experimenten zurückzuführen sind, könnte in der Art des verwendeten Materials liegen. Für die zytologischen Analysen wurde polytänes Gewebe in Form von larvalen Speicheldrüsen eingesetzt, wohingegen die ChIP-Analysen an diploidem Gewebe aus adulten Köpfen durchgeführt wurden. Die Retrotransposons *HeT-A* und *TART* sind allerdings im Gegensatz zum diploiden in polytänen Gewebe stark unterrepräsentiert (George *et al.* 2006). Somit scheint der Nachweis eines vermutlich schwachen Effektes auf die Länge der einzelnen Telomere in der Mutante $\Delta 64.2$ mit Hilfe der ChIP-Analysen am diploiden Gewebe sensitiver, im Vergleich zu den zytologischen Methoden zu sein.

3.3.5 Einengung einer euchromatischen Bindestelle der Isoform Mod(mdg4)-64.2 in der Region 26B

Die bisherigen Untersuchungen gaben einige Anhaltspunkte dafür, dass die Isoform Mod(mdg4)-64.2 an die telomerischen *HeT-A* Retrotransposons assoziiert und vermutlich auch eine Funktion bei deren Regulation ausübt. Da für *Drosophila melanogaster* keine euchromatischen Insertionen von *HeT-A* Elementen bekannt sind, können die detektierten euchromatischen Bindestellen der Isoform Mod(mdg4)-64.2 nicht mit einer Assoziation an *HeT-A* Retrotransposons korreliert werden. Die Microarray- und halbquantitativen RT-PCR-Analysen zeigten gleichzeitig einen Einfluss der Mutante $\Delta 64.2$ auf die Regulation von euchromatisch inserierten transponiblen Elementen.

Zur Überprüfung der Hypothese, ob die detektierten euchromatischen Bindestellen der Isoform möglicherweise mit der Assoziation des Proteins an euchromatische Retrotransposons korreliert, sollte die Bindestelle in der Region 26B auf dem Chromosom 2L näher charakterisiert und auf einen gut zu analysierenden Sequenzbereich eingegrenzt werden (Abb.3.25).

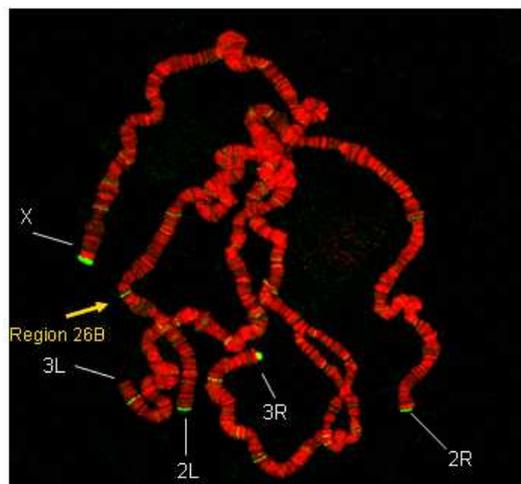


Abbildung 3.25: Übersicht über die Verteilung der Isoform Mod(mdg4)-64.2. Die einzelnen Chromosomenarme sind entsprechend beschriftet (weiß). Die untersuchte Bindestelle in der Region 26B ist durch einen Pfeil markiert (gelb). DNA-Färbung mit DAPI (rot), anti-EGFP Antikörper (grün).

Mit Hilfe von verschiedenen Defizienzen, welche den Bereich der möglichen Binderegion überlappend deletieren, sollte die Region genauer analysiert werden. Es wurden zunächst Deletionen gewählt, die einen großen Bereich der möglichen Binderegion umfassen, um anschließend die Region durch kleinere Defizienzen weiter einzuengen. Eine Transgen-Insertion des *mod(mdg4)-64.2-EGFP* Konstruktes auf dem 2. Chromosom wurde dafür mit dem GAL4-Treiber-Stamm Gal4-4414 rekombiniert und anschließend mit dem CyGFP-balancierten Stamm der jeweiligen Defizienz gekreuzt. Die erhaltenen transheterozygoten Larven wurden anschließend mittels UV-Licht auf Vorhandensein bzw. das Fehlen des CyGFP-Balancers selektiert, präpariert und durch Färbung mit dem EGFP-spezifischen Antikörper analysiert (Abb.3.26).

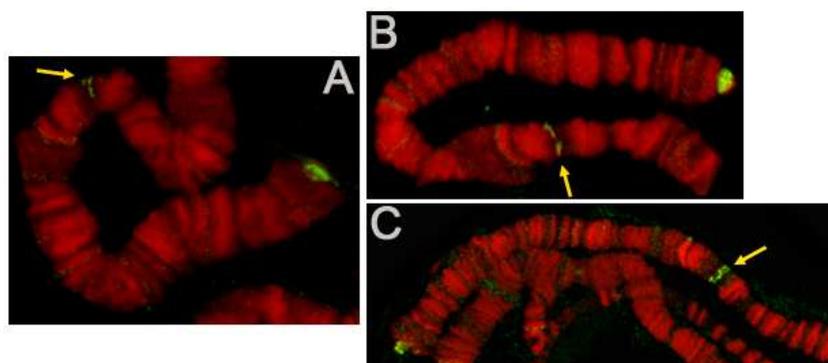


Abbildung 3.26: Zytologische Untersuchung der Bindestelle der Isoform Mod(mdg4)-64.2 in der Region 2L, 26B (markiert durch einen gelben Pfeil) in verschiedenen heterozygoten *Drosophila* Defizienz-Mutanten. DNA-Färbung DAPI (rot), anti-EGFP Antikörper (grün). (A) Df(2L)-ED 343 Auf dem Wildtyp-Chromosom ist die Bindestelle erhalten (Fluoreszenzsignal erkennbar, auf dem Homologen aus der Defizienz fehlt die Bindestelle (Fluoreszenzsignal fehlt) (B) Df(2L)-ED 330 (C) Df(2L)-ED 7890.

In Abbildung 3.26 sind die immunzytologischen Analysen von 3 verschiedenen Defizienzen dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass bei der Untersuchung der Defizienz Df(2L)-ED 343 nur eines der beiden homologen Chromosomen ein signifikantes Fluoreszenzsignal in der Region 26B zeigt (Abb.3.26 (A), Pfeil). Dies gibt einen gewichtigen Hinweis darauf, dass in der untersuchten Defizienz die Bindestelle der Isoform in der deletierten genomischen Region lokalisiert war. Die beiden anderen Defizienzen Df(2L)-ED 330 und Df(2L)-ED 7890 zeigten im Vergleich dazu ein Fluoreszenzsignal über beide homologen Chromosomen (Abb.3.26 B, C). Folglich war in diesen Mutanten die DNA-Sequenz für die untersuchte Bindestelle der Isoform Mod(mdg4)-64.2 nicht deletiert. Mit Hilfe der zytologischen Analyse verschiedener Defizienzen für die Region 26B konnte die euchromatische Bindestelle der Isoform Mod(mdg4)-64.2 auf den Sequenzbereich von Position 6.000.124 - 6.054.407 (DrosDel, <http://kyotofly.kit.jp/cgi-bin/stocks/index.cgi>) und damit auf eine verbleibende Größe von 54.3 kb eingegrenzt werden (Abb.3.27).

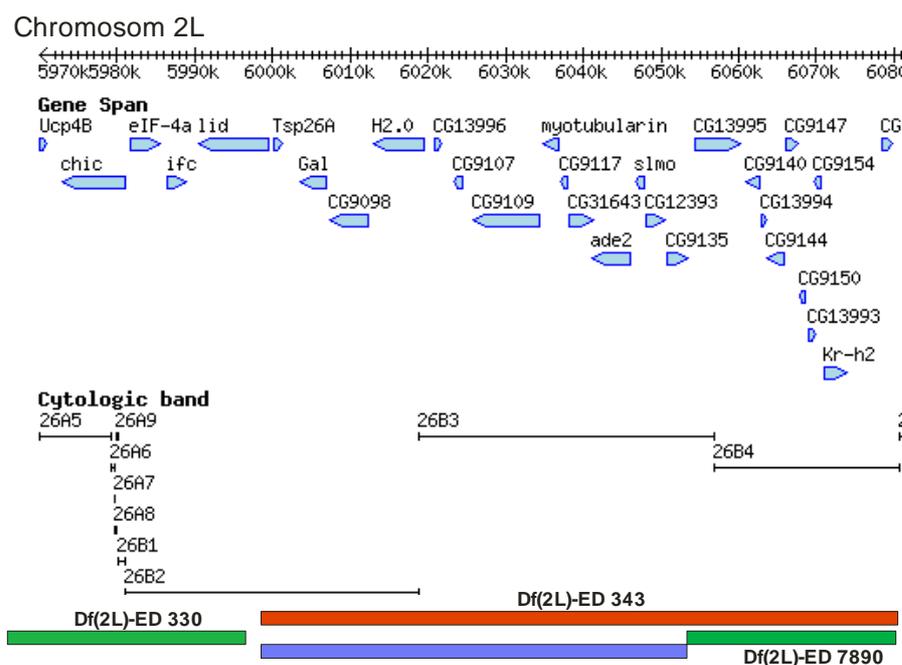


Abbildung 3.27: Übersicht über die genomische Region 26 A5-B4 des Chromosoms 2L. Die Größe der untersuchten Defizienz-Mutanten ist durch farbige Balken im unteren Teil der Grafik dargestellt. In den Defizienzen Df(2L)-ED 330 und Df(2L)-ED 7890 (grün) konnte in der immunzytologischen Analyse das Fluoreszenzsignal für die Isoform Mod(mdg4)-64.2 nachgewiesen werden. Bei der Defizienz Df(2L)-ED 343 (rot) fehlt dieses Signal. Der blaue Balken markiert den Bereich der Sequenz, welcher die Bindestelle der Isoform Mod(mdg4)-64.2 enthält (Grafik modifiziert nach FLYBASE - www.flybase.bio.indiana.edu).

In der ermittelten 54.3 kb umfassenden Region der Bindestelle für die Isoform Mod(mdg4)-64.2 konnte keine Insertion eines transponiblen Elementes nachgewiesen werden (Abb.3.27).

Um letztendlich Aussagen über eine mögliche Konsensus-Sequenz der Isoform treffen zu können sind weiterführende Analysen zum Einengen der Binderegion notwendig. Hierfür könnten beispielsweise weitere überlappende Defizienzen der Region untersucht werden. Durch ChIP-Analysen mit einem Isoform-spezifischen Antikörper oder einem anti-EGFP Antikörper unter Verwendung des EGFP-fusionierten *mod(mdg4)-64.2*-Transgens und anschließende Sequenzierung der isolierten DNA könnte die Binderegion der Isoform Mod(mdg4)-64.2 zudem genauer charakterisiert werden.

3.4 Untersuchungen zum *trans-Splicing* am komplexen Locus *mod(mdg4)*

In *Drosophila* werden die reifen mRNAs des *mod(mdg4)* Locus durch den Mechanismus des *trans-Splicing* gebildet. Dabei werden die Protein-kodierenden Informationen von beiden der komplementären DNA-Stränge bereitgestellt (Büchner *et al.* 2000, Labrador *et al.* 2001). Durch Sequenzierung der *mod(mdg4)*-cDNAs (Büchner *et al.* 2000) und den Nachweis einer vollständigen mRNA, welche von 2 verschiedenen Sequenzen des Gens kodiert wird (Labrador *et al.* 2001, Dorn *et al.* 2001), konnte in früheren Publikationen das *trans-Splicing* am *mod(mdg4)*-Locus belegt werden.

Die im nachfolgenden Teil der Arbeit beschriebenen Analysen sollen zum einen die funktionelle Konservierung des Locus zwischen den Arten *Drosophila melanogaster* und *Drosophila virilis* näher untersuchen. Weiterhin soll geprüft werden, inwieweit die Unversehrtheit des *mod(mdg4)*-Locus eine Voraussetzung für effektives *trans-Splicing* ist.

3.4.1 Funktionelle Konservierung des *mod(mdg4)*-Locus zwischen den Arten *Drosophila melanogaster* und *Drosophila virilis*

In diesem Abschnitt der Arbeit erfolgt eine Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse aus der Publikation Gabler *et al.* (2005).

Vergleichende Analysen der Struktur des *mod(mdg4)*-Locus zeigten, dass dieser innerhalb der Gattung *Drosophila* evolutionär stark konserviert ist (Krauss und Dorn 2004). Durch Sequenzierung des *mod(mdg4)*-Locus eines repräsentativen *Drosophila virilis* λ -Klons und dem Vergleich der korrespondierenden *Drosophila melanogaster* (kurz *D. melanogaster*) Sequenz wurde sowohl eine strukturelle Konservierung des Locus wie auch der Mod(mdg4)-Isoformen gezeigt (Abb.3.28).

Beim Vergleich des gemeinsamen 5' Bereiches des Gens zwischen *D. melanogaster* und *D. virilis* wurde eine DNA-Sequenz-Identität von 82% gefunden, der Bereich der konservierten BTB/POZ Domäne ist dabei sogar zu 100% identisch. Auch bei den spezifischen C-Termini der einzelnen Mod(mdg4)-Isoformen konnte eine starke Homologie nachgewiesen werden. Innerhalb des FLYWCH-Motivs zeigten die homologen Isoformen Mod(mdg4)-67.2 eine Identität von 85%, für Mod(mdg4)-64.2 und Mod(mdg4)-60.1 konnten 90% Übereinstimmung zwischen den beiden Arten gefunden werden (Gabler *et al.* 2005). Aufgrund der starken strukturellen und sequenziellen Konservierung von *mod(mdg4)* in *D. virilis* stellte sich nun die Frage, ob auch von einer funktionellen Konservierung des Lokus innerhalb der beiden Arten ausgegangen werden kann. Zur Prüfung wurden transgene Linien mit einem 11.5 kb genomischen *NotI*-Fragment etabliert, welches die *D. virilis* gemeinsamen Exons 1-4 und 5 proximal gelegene Isoform-spezifische *mod(mdg4)*-Exons enthielt (Abb.3.28).

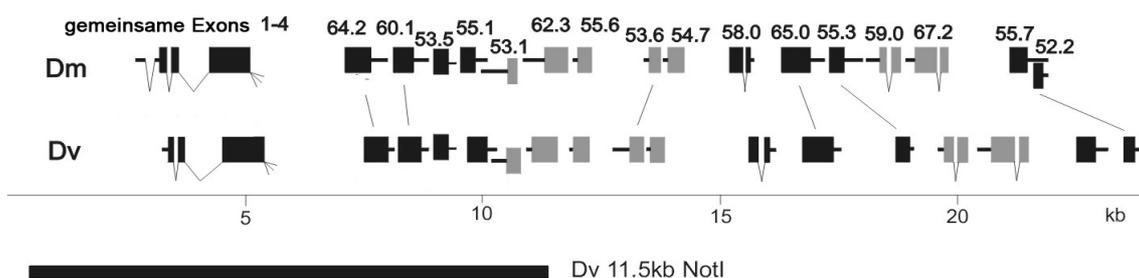


Abbildung 3.28: Schematischer Vergleich der genomischen Struktur des *mod(mdg4)*-Lokus von *D. melanogaster* (Dm) und *D. virilis* (Dv). Oberhalb der (lokusinternen) Skala ist die Exon/Intron Struktur für beide Arten gezeigt. Translatierte Regionen sind durch Rechtecke markiert - **schwarze** Exons werden dabei vom gleichen DNA-Strang wie die gemeinsamen Exons 1-4, **graue** Exons vom komplementären DNA-Strang kodiert. Unter der Skalierung ist das 11.5 kb genomische *NotI*-Fragment aus *D. virilis* (**Dv 11.5kb NotI**) eingezeichnet, welches für Analysen in *D. melanogaster* eingesetzt wurde. [Grafik aus Gabler *et al.* 2005, modifiziert]

Mutanten des gemeinsamen 5'Bereiches von *mod(mdg4)* in *D. melanogaster* sind rezessiv letal und auch nicht in der Lage, einander zu komplementieren (Abb.1, Büchner *et al.* 2000). Durch die Anwesenheit des beschriebenen 11.5 kb *D. virilis* Transgens konnten sowohl die homozygoten Mutanten-Phänotypen als auch die transheterozygoten Kombinationen dieser Mutanten-Allele, unabhängig von einer Insertion des Konstruktes auf dem 2. oder 3. Chromosom, gerettet werden. Dieser erste Beleg für eine funktionelle Konservierung des Locus gibt gleichzeitig einen Hinweis darauf, dass für die Rettung der Mutanten durch das Transgen chimäre *mod(mdg4)*-Transkripte gebildet wurden. Zum experimentellen Nachweis dieser Transkripte wurden RT-PCR Analysen durchgeführt, welche eine Differenzierung zwischen den chimären und den korrespondierenden *D. virilis* Transkripten ermöglichte. Dazu wurde die, den gemeinsamen Exons 1-4 unmittelbar *downstream* lokalisierte Isoform *mod(mdg4)*-64.2 gewählt und die RT-PCR-Analysen wie folgt vorgenommen. Zunächst wurde ein *forward*-Primer generiert, welcher ausschließlich an das gemeinsame Exon 4 von *D. virilis mod(mdg4)* bindet. Der genutzte *reverse*-Primer für das Isoform-spezifische Exon *mod(mdg4)*-64.2 konnte unter den gewählten Bedingungen an die spezifischen Exons beider Arten hybridieren. Die beiden orthologen *mod(mdg4)*-64.2-spezifischen Exons enthalten jeweils an einer anderen Position eine Konsensus-Sequenz für das Restriktionsenzym *PvuII*. Durch den Restriktions-Verdau der per RT-PCR erhaltenen Fragmente konnten somit die chimären *D. virilis/D. melanogaster (D.vir/D.mel)* von den Transgen-kodierten *D. virilis* Transkripten unterschieden werden (Abb.3.29-A). Dabei wurde nach der Restriktion für die chimäre *D.vir/D.mel mod(mdg4)*-64.2 cDNA ein internes 474 bp Fragment erhalten (Abb.3.29-A, Probe1 B), im Falle der *D. virilis mod(mdg4)*-64.2 cDNA dagegen ein 660 bp internes *PvuII*-Fragment (Abb.3.29-A, Probe2 B). Diese beiden definierten Produkte dienten gleichzeitig als Indikator für das Vorhandensein der jeweiligen cDNAs.

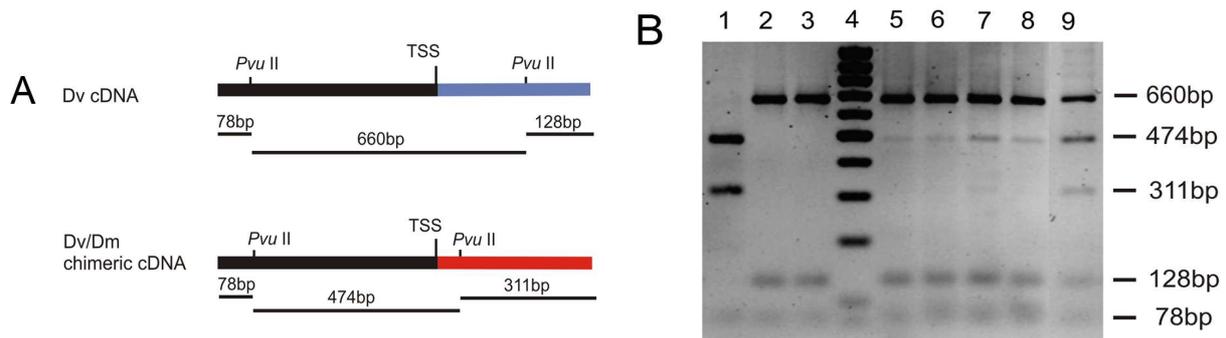


Abbildung 3.29: RT-PCR Analysen zum Nachweis der *D. virilis mod(mdg4)-64.2* cDNA und der chimären Transkripte in transgenen *D. melanogaster* Weibchen. (A) Schematische Darstellung der Transkripte nach RT-PCR und die erwarteten Restriktionsfragmente nach Verdau mit PvuII für *D. virilis* cDNA (**Dv cDNA**) und die chimäre *D.vir/D.mel* cDNA (**Dv/Dm chimeric cDNA**). TSS: *Trans-splice-site*; schwarze Balken: durch *D. virilis* Transgen kodierte gemeinsame Exons 1-4; blauer Balken: *D. virilis* Isoform-spezifisches Exon *mod(mdg4)-64.2*; roter Balken: endogenes Isoform-spezifisches Exon *mod(mdg4)-64.2* *D. melanogaster*. (B) PvuII-Verdau der RT-PCR Amplifikate zum Nachweis chimärer *D.vir/D.mel* Transkripte. Probe1: chimäre cDNA *D.vir/D.mel mod(mdg4)-64.2*; Probe2: cDNA Klon *D. virilis mod(mdg4)-64.2*; Probe3: äquimolarer Mix von *D.mel. mod(mdg4)-64.2* und *D.vir mod(mdg4)-64.2* cDNA Klonen; Probe4: 100 bp DNA Marker; Probe 5 und 6: RT-Probe transgener Tiere mit dem Genotyp *2-P(w+ Dv mod(mdg4) 11.5kb NotI)/+* und *3-P(w+ Dv mod(mdg4) 11.5kb NotI)/+*; Probe 7 und 8: *2-P(w+Dv mod(mdg4) 11.5kb NotI)-mod(mdg4)^{neo129} homozygot* und *3-P(w+ Dv mod(mdg4) 11.5kb)/+*; *mod(mdg4)⁰²/mod(mdg4)⁰²*; Probe9: 1:1 Mix von *D.vir mod(mdg4)-64.2* cDNA und chimärer *D.vir/D.mel mod(mdg4)-64.2* cDNA. [Grafik aus Gabler et al. 2005]

Die Analysen eines äquimolaren Mix der orthologen *mod(mdg4)-64.2* cDNAs von *D. melanogaster* und *D. virilis* zeigten nach dem PvuII Verdau nur das *D. virilis* Fragment (Abb.3.29 B, Probe 3). Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn ein Mix von isolierter RNA der beiden Arten als RT-PCR Template eingesetzt wurde, womit *template switching* während der Amplifikation als mögliche Fehlerquelle für falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden konnte.

In den RNA-Proben aus *D. melanogaster* Weibchen, bei denen eine Kopie des Transgens auf dem 2. bzw. 3. Chromosom inseriert war, konnten die entsprechenden chimären Transkripte nachgewiesen werden (Abb.3.29-B, Probe 5 und 6). Dies traf ebenfalls auf Stämme zu, welche das Transgen im Hintergrund von homozygoten Mutanten des gemeinsamen 5' Bereiches in *D. melanogaster* exprimierten (Abb.3.29-B, Probe 7 und 8). Die erhöhte Produktmenge des chimären 474 bp-Fragmentes in cDNAs von Linien, welche zwei Kopien des 11.5kb *NotI*-Transgens enthielten (Abb.3.29-B, Probe7), verweist auf eine Dosis-abhängige Anreicherung an chimärem Transkript. Auch weitere, nicht durch das *D. virilis* Transgen kodierte Isoform-spezifische Exons konnten durch RT-PCR Analysen als chimäre mRNAs nachgewiesen werden (*mod(mdg4)-51.4*, *mod(mdg4)-56.3*,

mod(mdg4)-67.2). Für diese Analysen wurde der Stamm mit dem Genotyp 2-*P(w⁺ Dv mod(mdg4) 11.5kb)/+; mod(mdg4)⁰²/mod(mdg4)⁰²* sowie *D. melanogaster* Isoform-spezifische *reverse*-Primer verwendet.

In Tieren der homozygoten Mutante *mod(mdg4)⁰²* konnten an präparierten Speicheldrüsenchromosomen keine Mod(mdg4)-Proteine nachgewiesen werden (Büchner *et al.* 2000). Daher sollte durch immunzytologische Analysen von Larven des Genotyps 2-*P(w⁺ Dv mod(mdg4) 11.5kb)/+; mod(mdg4)⁰²/mod(mdg4)⁰²* geklärt werden, inwiefern durch die Anwesenheit des *D. virilis* Transgens die Chromatin-Bindung der Mod(mdg4)-Proteine wiederhergestellt werden kann. Die Analysen mit dem gemeinsamen anti-ModC Antikörper zeigten eine signifikante Färbung am Chromosom in Anwesenheit des Transgens (Abb.3.30).

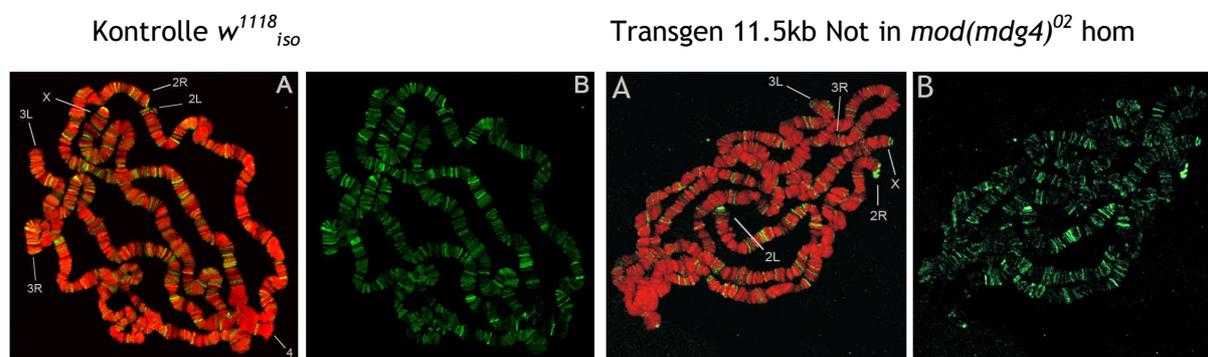


Abbildung 3.30: Verteilungsmuster der Mod(mdg4)-Proteine an präparierten polytären Speicheldrüsenchromosomen. Dargestellt sind die Kontrolle *w¹¹¹⁸_{iso}* und der Genotyp 2-*P(w⁺ Dv mod(mdg4) 11.5kb)/+; mod(mdg4)⁰²/mod(mdg4)⁰²* (Transgen 11.5kb Not in *mod(mdg4)⁰²* hom). (A) Überlagerung von DNA-Färbung mit Propidiumjodid bzw. DAPI (rot) und Antikörperfärbung (grün) (B) Antikörperfärbung mit anti-ModC.

Dies gab zunächst einen ersten Anhaltspunkt für eine Rettung des Mod(mdg4)-Verteilungsmusters durch das 11.5 kb *NotI* Transgen. Anschließend wurden immunzytologische Untersuchungen mit dem Isoform-spezifischen Antikörper Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰ durchgeführt, welcher ausschließlich diese Isoform detektiert. Da das genomische *D. virilis* Transgen die Isoform-spezifischen Exons *mod(mdg4)*-67.2 nicht enthält (Abb.3.28), können in den Tieren des Genotyps 2-*P(w⁺ Dv mod(mdg4) 11.5kb)/+; mod(mdg4)⁰²/mod(mdg4)⁰²* nur chimäre Transkripte und damit auch nur chimäre Proteine dieser Isoform gebildet werden. In den Larven der homozygoten Mutante *mod(mdg4)⁰²* konnten mit dem spezifischen Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰-Antikörper keine Chromatin-assoziierten Proteine detektiert werden. Dagegen ist das Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale im Genotyp 2-*P(w⁺ Dv mod(mdg4) 11.5kb)/+; mod(mdg4)⁰²/mod(mdg4)⁰²* mit dem des Wildtyps vergleichbar (Abb. 3.31). Dies liefert einen weite-

ren Hinweis auf die Bildung von signifikanten Mengen an chimären Mod(mdg4)-67.2 Protein.

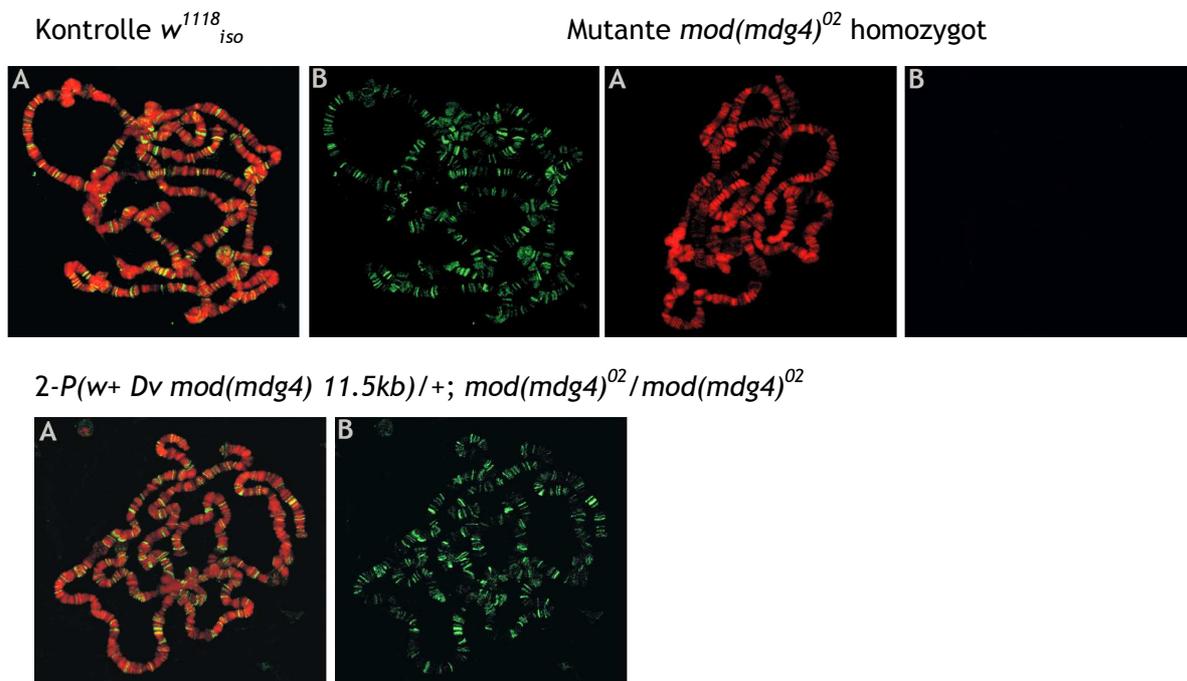


Abbildung 3.31: Das Verteilungsmuster des chimären Mod(mdg4)-67.2 Proteins an polytären Speicheldrüsenchromosomen des Genotyps 2-*P*(*w+* *Dv mod(mdg4) 11.5kb*)/+; *mod(mdg4)*⁰²/*mod(mdg4)*⁰² ist vergleichbar mit dem des *D. melanogaster* Wildtyp-Proteins. (A) Überlagerung der DNA-Färbung mit Propidiumjodid (rot) und der Antikörperfärbung (grün) (B) Färbung mit dem Isoform-spezifischen Antikörper anti Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰.

Anschließend sollte geprüft werden, ob spezifische Mod(mdg4)-67.2 Bindestellen, welche in den Kontroll-Larven detektiert wurden, auch in den transgenen 2-*P*(*w+* *Dv mod(mdg4) 11.5kb*)/+; *mod(mdg4)*⁰²/*mod(mdg4)*⁰² nachgewiesen werden können. Dazu wurde die zytologische Region 1-3 auf dem X-Chromosom hinsichtlich der gefundenen Bindungsmuster verglichen. Alle im Wildtyp gefundenen Signale konnten durch die Färbung der transgenen Larven reproduziert werden, was gleichzeitig einen Hinweis darauf gibt, dass die Bindungsspezifität des chimären Proteins mit der des *D. melanogaster* Proteins vergleichbar ist. Der Nachweis, dass der verwendete spezifische Antikörper tatsächlich das vollständige chimäre Protein erkennt, sollte mittels Westernblot Analysen erfolgen. Dazu wurden Proteinextrakte aus den Speicheldrüsen der entsprechenden Larven gewonnen und untersucht.

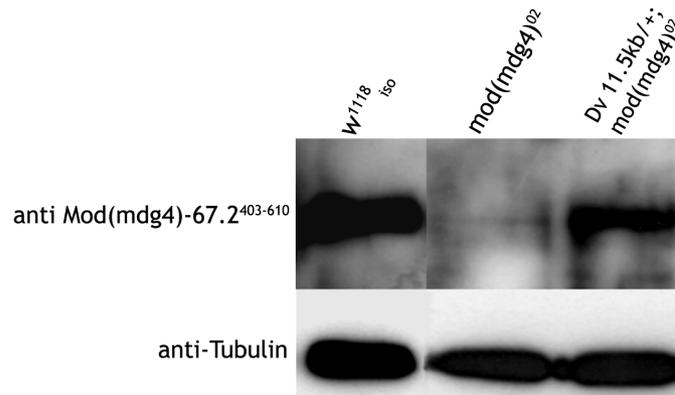


Abbildung 3.32: Westernblot-Analysen mit anti Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰ Antikörper. Der obere Teil zeigt den Nachweis des vollständigen Mod(mdg4)-67.2 Proteins (Wildtyp-Protein für w^{1118}_{iso} und chimäres Protein für $Dv\ 11.5kb/+ ; mod(mdg4)^{O2}$), die aufgetragenen Protein-extrakte sind über der Abbildung entsprechend beschriftet. Der Nachweis mit dem anti-Tubulin Antikörper dient als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proben-Mengen.

Durch den Antikörper Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰ wurde in den transgenen Tieren eine Bande auf gleicher Höhe wie im Referenz-Stamm detektiert. In der Probe der homozygoten Mutante $mod(mdg4)^{O2}$ war dagegen kein Protein nachweisbar (Abb.3.32, Probe 2). Dies zeigt, dass durch die chimären Transkripte, welche von verschiedenen prä-mRNAs nicht-homologer Chromosomen zusammengefügt wurden, signifikante Mengen an Protein gebildet werden können.

3.4.2 Nachweis von effektivem *trans-Splicing* am zweigeteilten *mod(mdg4)*-Lokus durch chromosomale *Rearrangements*

Im vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, dass durch ein *D. virilis* Transgen, welches den Teil des Lokus mit den gemeinsamen Exons kodiert, mittels *trans-Splicing* zum endogenen *D. melanogaster* Lokus signifikante Mengen chimärer Proteine gebildet werden. In früheren Arbeiten wurde belegt, dass durch Transgene Isoform-spezifischer Exon, welche an unterschiedlichen Orten des Genoms inseriert waren, via *trans-Splicing* zu den endogen kodierten gemeinsamen Exons reife mRNAs gebildet werden (Dorn *et al.* 2001). Bei diesen beiden Beispielen sind jeweils nur Teile des Lokus in Form von Transgen-Konstrukten physisch vom *mod(mdg4)*-Lokus separiert und im Genom inseriert. Der endogene Lokus selbst blieb dabei intakt und diente allein als Kontrolle bzw. als *Splice-Donor* der gemeinsam kodierten Exons 1-4 oder einzelner Isoform-spezifischer Exons. Daher sollte geprüft werden, ob nach wie vor ausreichende Mengen an Transkript gebildet werden können, wenn die einzelnen kodierenden Transkriptions-Einheiten des *mod(mdg4)*-Lokus, also die gemeinsamen Exons im N-termina-

len Bereich und die spezifischen Exons 5 (bzw. 5 und 6), räumlich voneinander getrennt im Genom vorliegen.

Die genomweit verteilten Insertionen von $P\{RS\}$ -Elementen in der DrosDel- P -Elementkollektion bietet eine breite experimentelle Basis für die zielgerichtete Manipulation des *Drosophila*-Genoms (Ryder *et al.* 2004). Dabei können nicht nur definierte Defizienzen und Duplikationen, sondern auch chromosomale *Rearrangements* wie Inversionen oder Translokationen induziert werden. Ausgehend von zwei P -Elementen (ein $P\{RS3\}$ - und ein $P\{RS5\}$ -Element) mit unterschiedlichen Insertionsorten wird durch einen FLP-Rekombinase vermittelten Ausbau die *remnant*-Form ($P\{RS3r\}$ und $P\{RS5r\}$) der Elemente erzeugt. Durch die Kombination der entsprechenden *remnant*-Elemente können anschließend die chromosomalen Umbauten gezielt initiiert werden (Golic und Golic 1996).

Für die gezielte Manipulation des *mod(mdg4)*-Lokus wurde das P -Element $P\{RS5\}$ -5-HA-1224 genutzt, welches im Locus an der Position 3R:17.191.074, 350bp *upstream* des spezifischen Exons *mod(mdg4)*-58.0 inseriert ist (Abb.3.32). Durch die Kombination des *remnant* P -Elementes mit verschiedenen $RS3$ -*remnant* P -Elementen an unterschiedlichen genomischen Positionen konnten die entsprechenden chromosomalen Umbauten zielgerichtet induziert werden. Auf diese Weise wurden eine reziproke Translokation $T(2;3)26A,mod(mdg4)$ (mit $P\{RS3\}CB-0716-3r$, Position 2L:5.949.427), die zwei Inversionen $In(3R)89C,mod(mdg4)$ (mit $P\{RS3\}CB-6279-3r$, Position 3R:12.260.706) und $In(3R)mod(mdg4),94C$ (mit $P\{RS3\}CB-5827-3r$, Position 3R:18.552.029) sowie die 68,8 kb umfassende Defizienz $Df(3R)ED6050$ (mit $P\{RS3\}CB-6403-3r$, Position 3R:17.122.251) erzeugt (Tab.3.3).

Tabelle 3.3: Übersicht über die erhaltenen chromosomalen *Rearrangements* und Defizienzen des *mod(mdg4)*-Lokus. * Größe des invertierten DNA-Bereiches.

Mutation	Lebensfähigkeit	Molekulare Daten
<i>In(3R)89C,mod(mdg4)</i>	hom. lebensfähig	89C4/93D8 (4.93 Mb)*
<i>In(3R)mod(mdg4),94C</i>	hom. lebensfähig	93D8/94C4 (1.36 Mb)*
<i>T(2;3)26A,mod(mdg4)</i>	hom. lebensfähig	26A3/93D8
<i>Df(3R)6050</i>	rezessiv letal	93D4/93D8 (68,8 kb)
<i>mod(mdg4)^{HA1224-Rev31}</i>	semi-letal	Deletion von 14.9 kb
<i>mod(mdg4)^{neo129R32}</i>	rezessiv letal	Deletion von 1.6 kb

Neben der Mutation *Df(3R)ED6050* wurden durch unexakten Ausbau des 5-HA-1224-P-Elements, induziert durch die $\Delta 2$ -3 Transposase, die Mutante *mod(mdg4)^{HA1224Rev31}* (verkürzte Schreibweise *Rev31*) erhalten. In diesem Stamm ist die genomische *mod(mdg4)*-Sequenz an der Position 3R: 17.184.461-17.199.406 (6.502 - 21.447 lokusinterne Skala) deletiert.

Nach der Sequenzierung der Defizienz *mod(mdg4)^{neo129-R32}* (verkürzte Schreibweise *R32*) wurde eine Deletion des *mod(mdg4)* 5' Bereiches, welche die gemeinsam kodierten Exons 1-3 einschließt, nachgewiesen. Die deletierte genomische Sequenz umfasst den Bereich 3R: 17.202.204-17.203.765 (2.142 - 3.640 der lokusinternen Skala), wobei in dieser Mutante zusätzlich noch 205 bp P-Element Rest enthalten sind (Abb.3.33).

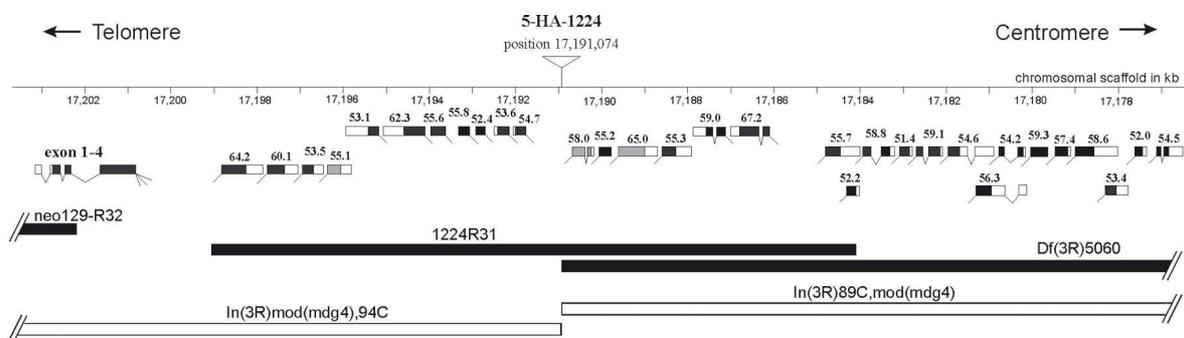


Abbildung 3.33: Schematische Übersicht über die untersuchten chromosomalen *Rearrangements* und Deletionen des *mod(mdg4)*-Lokus. Die *RS5-P-Element*insertion *5-HA-1224* ist als Dreieck auf der Skala eingezeichnet. Defizienzen sind schematisch als schwarze Balken, die paracentrischen Inversionen als weiße Balken dargestellt. Die Skalierung erfolgte nach BDGP, Release 4.2 (Flybase 2003). [Grafik modifiziert nach Krauss und Dorn 2004]

In der Defizienz *Rev31* fehlen 18 der 31 kodierten spezifischen Exons, wobei die gemeinsam kodierten Exons 1-4 im Gegensatz zur Mutante *R32* erhalten geblieben sind. In der Defizienz *Df(3R)ED6050* sind 20 Isoform-spezifische Exons des 3' Bereiches deletiert, welche im Falle der Inversion *In(3R)89C,mod(mdg4)* 4,93 Mb von den gemeinsamen Exons 1-4 und den unmittelbar folgenden kodierten 11 spezifischen Exons wegverlagert werden. Die erhaltene reziproke Translokation *T(2;3)26A,mod(mdg4)* verlagert den 5' Bereich des Gens, dieser umfasst die gemeinsamen Exons und den anschließenden proximalen Teil bis zur Insertion des *5-HA-1224-P-Elements*, auf den linken Arm des zweiten Chromosoms (Abb.3.33, Tab.3.3). Die beschriebenen chromosomalen *Rearrangements* der Inversionen und der Translokation konnten alle als homozygote Stämme etabliert werden. Alle Mutationen wurden durch PCR über einen *Rearrangement*-Bruchpunkt hinweg und anschließenden Sequenzierung des PCR-Produktes überprüft (M. Volkmar, pers. Mitteilung). Die zytologische Analyse der heterozygoten *Rearrangements* mit den entsprechenden Wildtyp-Chromosomen bestätigte die

erwarteten chromosomalen Bruchpunkte (Abb.3.34, gelber Pfeil). Im Fall der Translokation konnte ein Translokationskreuz (Abb. 3.34-A) beobachtet werden, bei den Inversionen traten verschieden große Schleifen entsprechend der invertierten Sequenzlänge auf (Abb.3.34-B und -C).

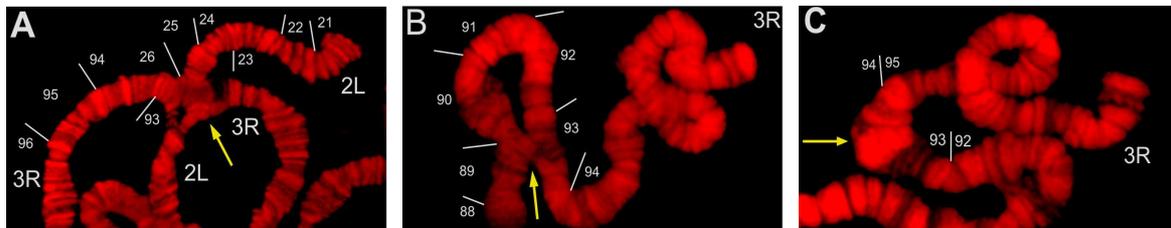


Abbildung 3.34: Zytologische Analyse der *mod(mdg4)* Rearrangements an präparierten heterozygoten Speicheldrüsenchromosomen. Analytierte Genotypen sind (A) $w^{1118}_{iso}; +/T(2;3)26A,mod(mdg4)/+$, (B) $w^{1118}_{iso}; +/In(3R)89C,mod(mdg4)/+$, (C) $w^{1118}_{iso}; +/In(3R)mod(mdg4),94C/+$. In den Abbildungen sind jeweils die Chromosomenarme und die zytologischen Regionen (nach Lindsley und Zimm 1992) bezeichnet. Die gelben Pfeile markieren die chromosomalen Bruchpunkte. DNA-Färbung mit DAPI (rot).

In den beschriebenen *Rearrangements* sind die beiden Transkriptionseinheiten für die Isoform *mod(mdg4)*-67.2 physisch voneinander getrennt. Bei der Translokation befinden sich diese auf 2 verschiedenen Chromosomen (2L und 3R). Bei den beiden Inversionen sind die gemeinsamen Exons 1,36 Mb im Fall von *In(3R)mod(mdg4),94C* und 4,93 Mb im Fall der Inversion *In(3R)89C,mod(mdg4)* vom „restlichen“ Locus separiert. Semiquantitative RT-PCR Analysen konnten zeigen, dass das Expressionslevel der Isoform *mod(mdg4)*-67.2 einerseits im Hintergrund der homozygoten Translokation wie auch bei den beiden Inversionen im Vergleich zum *mod(mdg4)*-Wildtyp reduziert war. In den beiden Defizienzen *Df(3R)ED6050* und *mod(mdg4)^{HA-1224Rev31}* ist das spezifische Exon dieser Isoform physisch deletiert, weshalb auch im transheterozygoten Genotyp dieser beiden Mutanten kein *mod(mdg4)*-67.2 Transkript nachgewiesen werden konnte (Abb.3.33; Promotion M. Volkmar 2010, pers. Mitteilung,). Mittels Westernblot-Analysen sollte anschließend geprüft werden ob trotz der nachweislich reduzierten Menge von *mod(mdg4)*-67.2-Transkript in den entsprechenden Genotypen signifikante Mengen Protein nachweisbar sind (Abb.3.35).

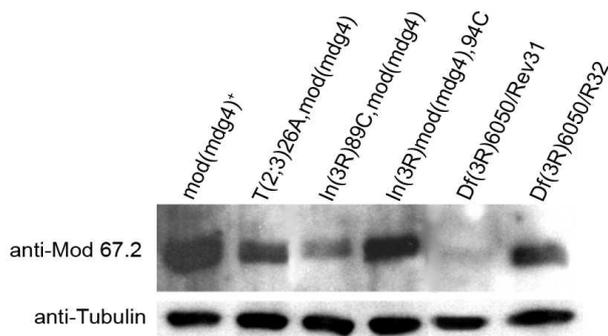


Abbildung 3.35: Westernblot Analysen zum Nachweis der Isoform Mod(mdg4)-67.2 in chromosomalen homozygoten *mod(mdg4)*-Rearrangements und transheterozygoten Defizienzen an Speicheldrüsen-Proteinextrakt von Larven des 3. Entwicklungsstadiums. Die Detektion des Proteins erfolgte mit dem spezifischen polyklonalen anti-Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰ Antikörper (α -Mod 67.2, oberer Bildabschnitt) bei einer Größe von ca. 105 kDa, die Kontrolle der aufgetragenen Protein-Mengen durch Detektion mit dem monoklonalen Tubulin-Antikörper (α -Tubulin, unterer Bildabschnitt).

Die Analysen zeigten zum einen, dass für die homozygote Translokation und die beiden homozygoten Inversionen das Protein in der Größe des vergleichbaren Wildtyp-Proteins gefunden wurde. In allen untersuchten *Rearrangements* ist die Menge an detektiertem Protein im Vergleich zum Wildtyp reduziert aber dennoch eindeutig nachweisbar. Im transheterozygoten Mutanten-Stamm *Df(3R)ED6050/mod(mdg4)^{HA-1224Rev31}* wurde kein Produkt für *mod(mdg4)-67.2* gefunden. Der Nachweis signifikanter Proteinmengen in den untersuchten transheterozygoten *mod(mdg4)^{neo129R32}/Df(3R)ED6050* Tieren ist ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass die beiden Mutanten-Allele in der Lage sind, einander zu komplementieren und durch mRNA *trans-Splicing* vollständige mRNAs und damit auch entsprechendes Protein gebildet werden kann. Dabei liefert die Mutante *Df(3R)ED6050* den *Splice-Donor* in Form der gemeinsam kodierten Exons und die Mutante *mod(mdg4)^{neo129R32}* den *Splice-Akzeptor* für das Transkript.

Anschließend sollte geprüft werden, inwieweit das im Westernblot detektierte Protein Mod(mdg4)-67.2 mit dem Wildtyp-Protein vergleichbare funktionelle Eigenschaften aufweist. Dazu wurde das Verteilungsmuster der Isoform an präparierten Polytäanchrosomen verschiedener Genotypen untersucht (Abb.3.36, Abb.7.1-Anhang).

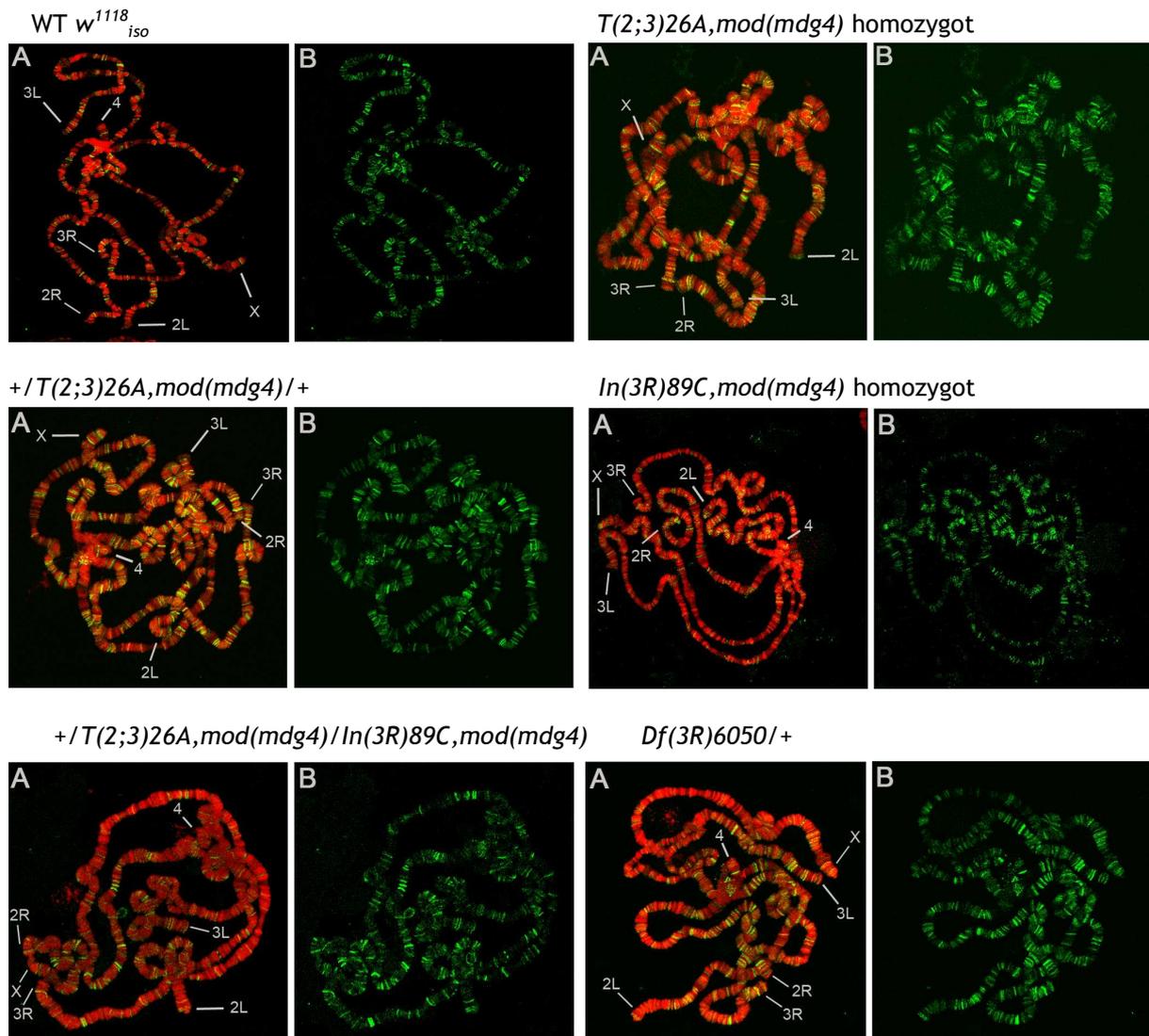


Abbildung 3.36: Übersicht über die Proteinverteilung von Mod(mdg4)-67.2 an präparierten polytären Speicheldrüsenchromosomen der Kontrolle w^{1118}_{iso} und verschiedener chromosomaler *mod(mdg4)* Rearrangements. (A) zeigt die Überlagerung von DNA(DAPI)-Färbung (rot) und Antikörperfärbung (grün) - die einzelnen Chromosomenarme sind entsprechend beschriftet. (B) zeigt die Färbung mit dem spezifischen polyklonalen anti-Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰ Antikörper (grün).

In allen untersuchten Genotypen konnte das Protein Mod(mdg4)-67.2 an mehreren hundert Bindestellen, vergleichbar mit dem Verteilungsmuster des Wildtyps, detektiert werden. Dies traf sowohl auf die homozygoten Rearrangements der Translokation und die größere der beiden Inversionen, wie auch auf die heterozygoten Genotypen zu. In transheterozygoten Tieren, welche unterschiedliche *mod(mdg4)*-Rearrangements trugen, konnte ebenfalls ein mit dem Wildtyp vergleichbares Bindungsmuster gefunden werden. Bei der Lokalisierung der detektierten Bindestellen in der zytologischen Region 1-3 auf dem X-Chromosom konnte in der homozygoten Translokation das Verteilungsmuster

lungsmuster des Proteins vom Referenz-Stamm w^{1118}_{iso} reproduziert werden. Dies weist darauf hin, dass es sich bei dem gebildeten Mod(mdg4)-67.2 Protein, dessen mRNAs von nicht homologen Chromosomen kodiert werden, sehr wahrscheinlich um das Mod(mdg4)-Wildtyp Protein handelt. Außerdem gibt es Anhaltspunkte dafür, dass das nachgewiesene Protein die gleiche Funktionalität aufweist wie das vom Kontroll-Stamm gebildete Protein. Die Analysen der heterozygoten Deletion *Df(3R)ED6050* zeigten weiterhin, dass 50% Genprodukt der Isoform ausreichend ist, um signifikante Mengen Mod(mdg4)-67.2 Protein zu bilden.

3.4.3 Nachweis der Bildung von Mod(mdg4)-67.2 in physiologischen Konzentrationen mit Hilfe von zwei Assay-Systemen

Mittels Westernblot Analysen und immunzytologischer Untersuchung konnte die Bildung von signifikanten Mengen Mod(mdg4)-67.2-Proteins in verschiedenen chromosomalen *Rearrangements* nachgewiesen werden. Nun sollten mit Hilfe verschiedener Assay-Systeme die funktionellen Eigenschaften des Proteins näher charakterisiert werden.

Durch die Arbeiten von Gerasimova *et al.* (1995) und Gause *et al.* (2001) ist bekannt, dass die Isoform Mod(mdg4)-67.2 eine wichtige Komponente zur Etablierung eines Chromatin-Insulators an *gypsy* non-LTR-Retrotransposons darstellt. Der Insulator unterbindet die Enhancer-Promotor Interaktion, wenn er zwischen diesen beiden Sequenzelementen inseriert ist. Auf diese Art organisieren Insulator-Elemente beispielsweise die Enhancer-Promotor Interaktion im *bithorax* HOX Genkomplex bei *Drosophila* (Mihaly *et al.* 1998), dem β -globin Genkomplex beim Huhn (Chung *et al.* 1993) und dem *H19-Igf2*-Lokus in der Maus (Bell *et al.* 2000, Wallace *et al.* 2007).

In der homozygoten Mutante *mod(mdg4)^{u1}*, welche eine *Stalker*-Transposon Insertion im spezifischen Exon von *mod(mdg4)-67.2* enthält, wird ein stark verkürztes, nicht mehr funktionelles Protein gebildet, dessen Expressionslevel im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert ist (Gause *et al.* 2001). Die veränderten Insulator-Eigenschaften, welche durch diese Mutation in den *gypsy* induzierten Mutanten *ct⁶* und *yellow²* beschrieben wurden, sollten als Assay-System zum Nachweis von funktionellem Mod(mdg4)-67.2 Protein in den chromosomalen *Rearrangements* dienen. Der *ct⁶*-Mutantenphänotyp [dieser äußert sich in einer veränderten Flügelform aufgrund von Gewebeverlust in der gesamten Peripherie (Jack 1985)] wird in der homozygoten Mutante *mod(mdg4)^{u1}* im Vergleich zum Wildtyp *mod(mdg4)⁺* stark supprimiert (Abb.3.37). Im Gegensatz dazu wird in heterozygoten *mod(mdg4)^{u1}/+* Fliegen der *ct⁶*-Phänotyp nur sehr schwach

supprimiert. Offensichtlich ist dabei eine Wildtyp-Kopie der Isoform ausreichend, um einen funktionellen *gypsy*-Insulator zu etablieren (Abb.3.37).

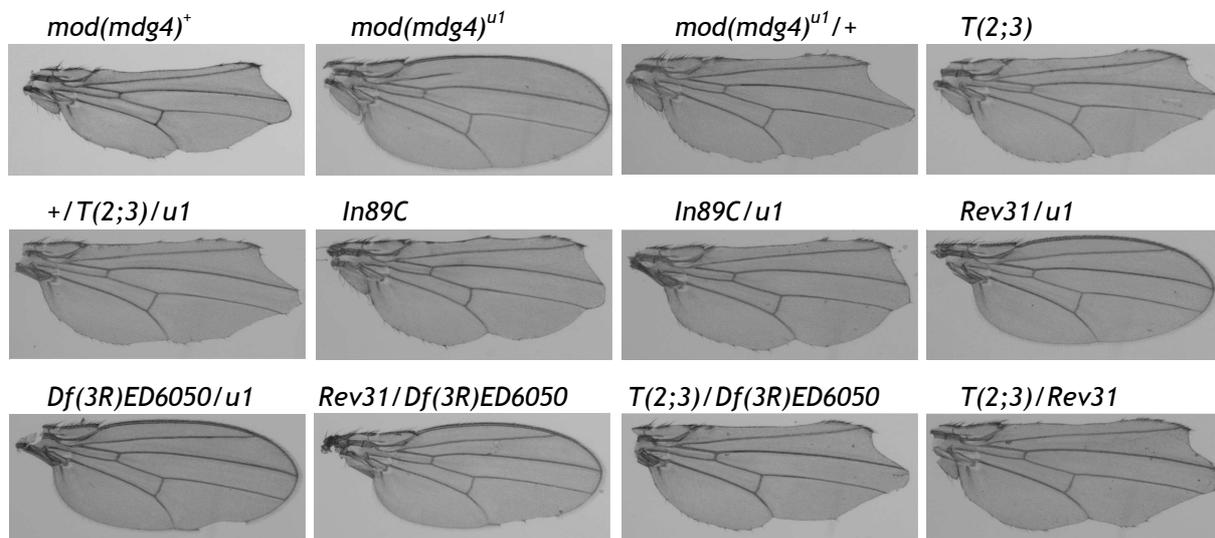


Abbildung 3.37: Darstellung des Einflusses verschiedener *mod(mdg4)* Mutationen auf den *gypsy* induzierten Mutanten-Phänotyp *cut*⁶. Am Beispiel der präparierten Flügel (Männchen) kann die Ausprägung des *cut*⁶-Phänotyps verfolgt werden. Die untersuchten Männchen (bzw. von ihnen präparierte Flügel) waren hemizygot für das *y*²*sc*^{D1}*wct*⁶ Chromosom.

Wird durch das Vorhandensein von intaktem Mod(*mdg4*)-67.2-Protein ein funktioneller Insulator gebildet, so bleibt die Expression von *cut* in den Flügelrändern aus. Dies äußerte sich im Hintergrund der beschriebenen Mutationen in Form von starken Einschnitten in den Flügelrändern, wie am Beispiel von *mod(mdg4)*⁺ deutlich zu erkennen ist (Abb.3.37). Auch in der homozygoten Translokation und der homozygoten Inversion *In(3R)89C,mod(mdg4)* konnte eine starke Ausprägung des *cut*⁶- Phänotyps, gekennzeichnet durch starke Einschnitte in den Flügelrändern, gefunden werden (Abb.3.37). Diese Beobachtungen gaben somit einen weiteren Hinweis auf die Bildung eines intakten Insulators und damit schlussfolgernd auch auf das Vorhandensein von funktionellen Mod(*mdg4*)-67.2 Protein in physiologischer Konzentration. Eine Paarung während der Interphase, welche die nun auf 2 verschiedene Chromosomen separierten Teile des Locus in der homozygoten Translokation möglicherweise in räumliche Nähe bringen könnte, wurde ausgeschlossen. Wichtige Anhaltspunkte dazu lieferten die nachgewiesenen reduzierten Produktmengen von *mod(mdg4)*-67.2 mRNA in RT-PCR-Analysen und von Protein im Westernblot (Abb.3.35). Dies wurde als ein weiteres Indiz gewertet, dass trotz des Verlustes der räumlichen Nähe der beiden korrespondierenden Transkriptions-Einheiten physiologisch ausreichende Mengen von Protein gebildet werden können.

Bei den Genotypen *mod(mdg4)^{u1}* (homozygot-Kontrolle) und *Rev31/mod(mdg4)^{u1}* (Abb.3.37) wies der ausgebildete Flügel keine Einschnitte am Rand (keine Ausprägung des *ct⁶*-Phänotyps) auf, was auf das Fehlen an funktionellen Mod(mdg4)-67.2 Protein hindeutet. Jedoch muss ergänzend bemerkt werden, dass in der Mutante von 61 analysierten Flügeln 9 keine vollständige Suppression des *ct⁶*-Phänotyps zeigten. In den transheterozygoten Mutanten *Df(3R)ED6050/mod(mdg4)^{u1}* und dem *loss-of-function* Genotyp *Df(3R)ED6050/Rev31* zeigte sich ein nur noch partiell ausgeprägter *ct⁶*-Phänotyp (Abb.3.37). Im Vergleich zu den anderen untersuchten Genotypen zeigte sich in diesen beiden eine sehr starke Varianz bei der Ausformung des *ct⁶*-Phänotyps. Daher wurden für die *Df(3R)ED6050/Rev31*-Tiere exakte Daten für jedes Tier erfasst, um anschließend einen genauen Wert für die beschriebene Varianz zu ermitteln. Hierfür wurden 96 isolierte Flügel vermessen und dabei ein *ct⁶*-Phänotyp Anteil gegenüber dem intakten Flügelrand von 12,5% ($\pm 9,7\%$) bestimmt (das gewählte Beispiel in der Abbildung 3.37 repräsentiert diesen Wert). In der transheterozygoten Mutante *Df(3R)ED6050/mod(mdg4)^{u1}* wurde eine Varianz an *ct⁶*-Phänotyp von 59% gegenüber dem Wildtyp-Flügelrand (41%) beobachtet.

Somit konnte anhand der *ct⁶*-Phänotypen bei den homo- und heterozygoten chromosomalen *Rearrangements* die Ausbildung eines funktionellen Insulators gezeigt werden, was auf das Vorhandensein von physiologischen Mengen funktionellen Mod(mdg4)-67.2 Proteins schließen lässt. Die untersuchten Deletionen *Rev31* und *Df(3R)ED6050* zeigten dagegen eine stark reduzierte Wirkung bei der Hemmung der Enhancer-Promotor-Interaktion, was auf die *loss-of-function* Mutation von *mod(mdg4)-67.2* in diesen Tieren verweist.

Neben der Untersuchung des *ct⁶*-Phänotyps der Flügelränder kann der Mutanten-bedingte Einfluss auf die Bildung eines funktionellen Insulators auch im *gypsy*-induzierten *y²*-Hintergrund anhand der Borsten-Pigmentierung deutlich gemacht werden. Das dargestellte Schema verdeutlicht die Auswirkung der *gypsy*-Insertion bei Vorhandensein von funktionellem Mod(mdg4)-67.2 Protein und beim Fehlen der Isoform (Abb.3.38). Bei Anwesenheit der Isoform wirkt der Insulator unidirektional und hemmt somit die Aktivierung des *yellow*-Lokus durch den *wing blade*- und *body cuticle*- Enhancer. Infolgedessen zeigen die Tiere *yellow*-gefärbte Abdomen ohne Pigmentierung. Die Interaktion des *bristles*-Enhancers mit dem Promotor ist davon nicht beeinflusst und die *yellow*-Expression in den Borsten kann vom Insulator unbehindert stattfinden. Diese erscheinen dadurch wildtypartig dunkel pigmentiert (Abb.3.38-A). Kommt es aufgrund von Mutationen zu einem Verlust des Mod(mdg4)-67.2 Proteins wirkt der Insulator nun

bidirektional und hemmt zusätzlich noch die Promotor-Enhancer-Interaktion der *downstream* liegenden Elemente. Dadurch wird nun auch die *yellow*-Expression in den Borsten der Fliegen unterbunden, was sich in Form von stark reduzierter bis hin zu fehlender Pigmentierung der Borsten äußert (Abb.3.38-B).

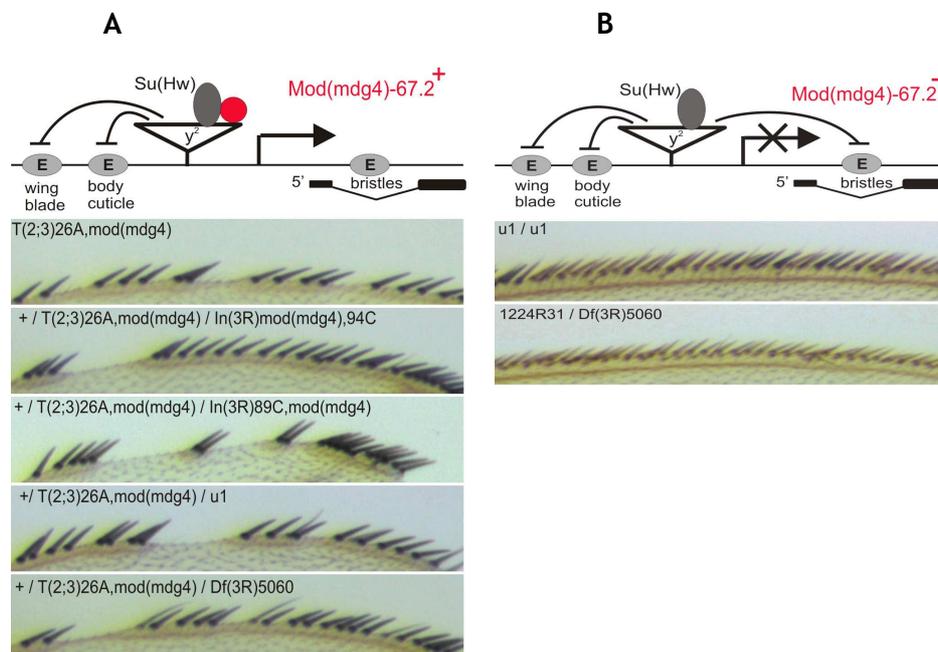


Abbildung 3.38: Genetische Interaktion von *mod(mdg4)*-Mutationen mit der *gypsy*-induzierten Mutation *yellow²* (y^2). Die Schemata im oberen Bildabschnitt verdeutlichen den Effekt der *gypsy*-Insertion auf verschiedene Enhancer-Elemente, welche die *yellow*-Expression in den entsprechenden Geweben kontrollieren, in An- (A) bzw. Abwesenheit (B) der Isoform *Mod(mdg4)-67.2* (rot). Zusätzlich ist *Su(Hw)* als weitere wichtige Komponente des *gypsy*-Insulators aufgeführt. Ausschnitte repräsentativer Flügelränder befinden sich darunter, die Genotypen sind entsprechend vermerkt.

Aufgrund der Verwendung eines y^2 -X-Chromosoms, das zusätzlich das ct^6 -Allel trägt, welches ebenfalls durch *Mod(mdg4)-67.2* beeinflusst ist, wird hier neben dem *yellow*- auch der *cut*-Mutantenphänotyp ausgeprägt, was zu einer ungleichmäßigen Anordnung der Borsten in Abbildung (A) führt.

Die unidirektionale Wirkung des Insulators und somit das Vorhandensein von funktionellen *Mod(mdg4)-67.2* Protein wurde bei der Untersuchung der chromosomalen *Rearrangements* anhand der dunkel pigmentierten Borsten deutlich. Dies konnte sowohl für die homozygoten wie auch die transheterozygoten *Rearrangements* gezeigt werden. Weiterhin konnten auch bei der transheterozygoten Translokation mit den Mutanten *mod(mdg4)^{u1}* und der Deletion *Df(3R)ED6050* ebenfalls Wildtyp-Borsten am Flügelrand nachgewiesen werden.

Aus den Arbeiten von Gerasimova *et al.* (1995) ist weiterhin bekannt, dass die Pigmentierung des Abdomens in den y^2 ; *mod(mdg4)^{u1}* adulten Tieren keine einheitliche *yellow*-

Färbung zeigt. Hier ist vielmehr ein variegierendes Muster zu erkennen, welches durch eine partielle Inaktivierung des *bristles*-Enhancers hervorgerufen wird. Dieser Effekt war auch bei der Untersuchung der Flügelborsten im erwähnten Genotyp zu beobachten. Neben *yellow*-gefärbten Borsten konnten zusätzlich dunkle wildtypartige Borsten gefunden werden. Eine einheitliche *yellow*-Färbung und damit komplett fehlende Pigmentierung der Borsten ist dagegen in der *mod(mdg4)-67.2 loss-of-function* Mutante mit dem transheterozygoten Genotyp *Rev31/Df(3R)ED6050* festzustellen (Abb.3.38-B). Somit konnte mit Hilfe der beiden Assay-Systeme gezeigt werden, dass trotz der fehlenden Integrität des *mod(mdg4)*-Lokus und damit räumlich getrennten Transkriptionseinheiten, physiologisch funktionelle Mengen an *Mod(mdg4)-67.2* gebildet werden. Ob die nachgewiesenen signifikanten Mengen an mRNA *trans-Splicing* in der homozygoten Translokation eventuell eine Konsequenz der Paarung der beiden separierten *mod(mdg4)*-Teile sind, sollte nachfolgend überprüft werden. Die Eigenschaften der in den chromosomalen *Rearrangements* nach wie vor vorhandenen FRT-Sites, deren Rekombinationsfrequenz von der Entfernung der beiden Sites zueinander abhängig ist (Golic und Golic 1996, Ryder *et al.* 2004), sollte zur Prüfung der Fragestellung genutzt werden. Dementsprechend wurde die Frequenz ermittelt, mit der im somatischen Gewebe die vorhandenen FRT-Sites miteinander rekombinieren können. Dabei diente der w^+ -Marker für den roten Augenphänotyp als Indikator, bei welchem eine Änderung der Pigmentierung nur dann detektierbar ist, wenn in einer Zelle gleichzeitig beide w^+ -Chromosomen miteinander rekombinieren. Es soll angemerkt werden, dass in der homozygoten Translokation, in der eine Paarung der homologen Chromosomen ausgeschlossen wurde, ein spontanes gleichzeitiges „rück-Rekombinieren“ beider w^+ -Chromosomen einer einzelnen Zelle eher unwahrscheinlich ist. Durch Auszählen der Tiere mit veränderter Augenpigmentierung (w^+/w^- Sektoren im w^+/w^+ Hintergrund bzw. w^- Sektoren im w^+/w^- Hintergrund) wurde die Rekombinationsfrequenz ermittelt (Tab.3.4).

Tabelle 3.4: Ermittlung der durch FLP induzierten Rekombinationsfrequenz in verschiedenen *mod(mdg4)* Genotypen. Der Verlust des w^+ -Markers diente als Indikator. Alle gezeigten Genotypen enthielten das *ywP(70FLP,ry⁺)3F* Chromosom als Quelle für die Flipase.

Genotyp	Rekombinationsfrequenz Prozentualer Anteil an Mosaik-Augenphänotyp	Anzahl an ausgewerteten Augen
<i>T(2;3)26A,mod(mdg4)</i>	0.2	412
<i>+/T(2;3)26A,mod(mdg4)/+</i>	70.1	1500
<i>CB-0716-3r/T(2;3)26A,mod(mdg4)/+</i>	75.6	402
<i>+/T(2;3)26A,mod(mdg4)/5r-HA-1224</i>	55.8	458

Zwischen der homozygoten und der heterozygoten Translokation wurde ein mehr als 100-facher Unterschied in der Rekombinationsfrequenz gefunden. Eine ebenfalls erhöhte Frequenz wurde in transheterozygoten *T(2;3)26A,mod(mdg4)* Fliegen mit jeweils einem der beiden *P*-Elemente (*CB-0716-3r* oder *5r-HA-1224*), welche zum Aufbau der reziproken Translokation genutzt wurden, beobachtet (Tab.3.4). Diese Daten weisen auf eine enge räumliche Nähe der genomischen FRT-Sites in den heterozygoten *+/T(2;3)26A,mod(mdg4)* Fliegen, wogegen die stark reduzierte Rekombinationsfrequenz in der homozygoten Translokation auf eine physikalische Distanz der beiden FRT-Sites im Zellkern hindeutet.

4. Diskussion

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Analyse und Charakterisierung einzelner Isoformen des *mod(mdg4)*-Lokus in *Drosophila melanogaster*. Dazu sollten mittels EGFP-Markierung die Verteilungsmuster der Proteine am präparierten polytänen Speicheldrüsenchromosom immunzytologisch bestimmt werden.

Für das Protein Mod(mg4)-64.2 wurde bereits eine Assoziation an die Telomere der Chromosomen von *Drosophila melanogaster* gezeigt (Diplomarbeit M. Gabler 2003). Mit Hilfe weiterer immunzytologischer und molekularbiologischer Analysen sollte die Funktion der konservierten FLYWCH-Domäne bei der Chromatin-Assoziation des Proteins evaluiert werden. Des Weiteren sollte unter Zuhilfenahme von Mutantenallelen eine mögliche Funktion bei der Regulation der telomerischen Retrotransposons genauer betrachtet werden.

In einem zweiten Schwerpunkt sollte durch *trans-Splicing* Analysen eines genomischen *D. virilis* Transgens im Hintergrund des *D. melanogaster* Referenzstammes die funktionelle Konservierung des Lokus zwischen den beiden orthologen Arten untersucht werden.

Weiterhin konnte mittels verschiedener chromosomaler *Rearrangements* mit einem Bruchpunkt im *mod(mdg4)*-Lokus die Notwendigkeit der physischen Integrität des Gens für ein effizientes *trans-Splicing* evaluiert werden.

4.1 Untersuchung der Verteilungsmuster der Mod(mdg4)-Proteine und deren Assoziation am Polytänchromosom

Die vorangegangenen Analysen von Büchner *et al.* (2000) gaben einen ersten Hinweis auf ein mögliches spezifisches Chromatin-*Targeting* einzelner Mod(mdg4)-Isoformen. Mit Hilfe von 2 spezifischen Antikörpern konnten für die Isoform Mod(mdg4)-67.2 mehrere hundert und für Mod(mdg4)-58.0 reproduzierbar 46 euchromatische, nicht überlappende Signale detektiert werden (Büchner *et al.* 2000).

Durch die Analysen von EGFP-markierten Fusionsproteinen wurde im Rahmen dieser Arbeit die genaue Lokalisierung von weiteren 7 Isoformen am Polytänchromosom ermittelt. Dabei konnten alle Proteine an einer unterschiedlichen Anzahl von nicht überlappenden euchromatischen Sites in den Banden-Interbanden-Regionen detektiert werden. Die Ausnahme bildete hierbei die Isoform Mod(mdg4)-56.3, bei welcher keine Bindungs-

stellen am Polytäanchromosom detektiert werden konnten. Diese Isoform übt nachweislich eine wichtige Funktion bei der korrekten Segregation der Chromosomen in der männlichen Meiose aus, wobei die Kernlokalisierung des Proteins während der G2-Phase der Zellteilung erfolgt (Thomas *et al.* 2005). Während der DNA-Replikation der Polytäanchromosomen zeigen chromosomale Strukturen wie Interbanden, Puffs und sehr feine Banden als erstes den Übergang in die beginnende Teilungsphase. Erleichtert wird dies durch die weniger stark kondensierte, eher aufgelockerte Verpackung der DNA im Gegensatz zu den stärker kondensierten heterochromatischen Bereichen. Daher werden die euchromatischen Bereiche auch als Regionen genetisch aktiven Chromatins eingeordnet (Zhimulev *et al.* 2003). Eine vorwiegende Lokalisierung der einzelnen Mod(mdg4)-Isoformen in den Interbanden und damit in den euchromatischen Regionen des Chromosoms könnte ein Hinweis auf eine mögliche Funktion bei der Regulation transkriptionell aktiver Gene sein (Abb.3.2). Zudem lassen die nicht überlappenden Verteilungsmuster der Proteine vermuten, dass die einzelnen Isoformen unterschiedliche Gene bzw. Gengruppen regulieren könnten. Eine weitere nachgewiesene Funktion (mindestens) einer Isoform ist der Aufbau von Insulator-Elementen. Neben der Unterbindung der inkorrekten Promotor-Enhancer-Interaktion (Gerasimova und Corces 1996, Geyer 1997) sind diese Elemente durch die Lokalisation in der Grenze zwischen aktivem und inaktivem Chromatin am Aufbau und der Isolierung von Chromatin-Domänen mit unterschiedlich starker Kondensierung beteiligt (*chromatin boundary* Funktion; Udvardly und Schedl 1985, Prioleau *et al.* 1999, Wallace und Felsenfeld 2007). Die detektierten euchromatischen Bindestellen der Mod(mdg4)-Isoformen könnten somit einen Anhaltspunkt für eine mögliche Funktion bei der Trennung von unterschiedlich kondensierten Chromatin-Bereichen darstellen.

Bei der Isoform Mod(mdg4)-52.4 konnte neben der Lokalisation in den euchromatischen Interbanden auch eine Bindung des Proteins im Chromozentrum beobachtet werden. Diese besondere chromosomale Struktur zeichnet sich durch eine stark kondensierte heterochromatische Verpackung der DNA aus. Im Zusammenwirken mit verschiedenen Chromatinproteinen ist sie für die Ausbildung der Kinetochore und damit für die Segregation der homologen Chromosomen während der mitotischen Teilung der Zellen verantwortlich (Cleveland *et al.* 2003). Möglicherweise hat die Isoform Mod(mdg4)-52.4 eine Funktion beim Aufbau oder bei Regulationsprozessen innerhalb des Chromozentrums. Andererseits besteht das sogenannte peri-zentrische Heterochromatin hauptsächlich aus transponiblen Elementen und nicht-kodierender Satelliten-DNA. (Clarke und Carbon 1985, Nakaseko *et al.* 1987). Für das *Drosophila*-Genom sind neben den

telomerisch lokalisierten Retrotransposons zahlreiche euchromatisch und auch heterochromatisch inserierte Transposons bekannt (Kaminker *et al.* 2002). Möglicherweise hat die Isoform Mod(mdg4)-52.4 auch eine Funktion bei der Regulation dieser Elemente.

Bei der Auswertung der immunzytologischen Analysen war weiterhin ein Clustering verschiedener Isoformen in bestimmten chromosomalen Bereichen wie beispielweise in der Region 3E3-8 auf dem X-Chromosom, 26B3-11 auf dem Chromosom 2L und Region 63A/B auf dem Chromosom 3L auffällig (Abb.3.3, Tab.7.1-Anhang). In diesen Bereichen fällt eine weniger stark kondensierte Region mit vorwiegend schwächeren Banden in den genannten Beispielen auf (Abb.3.4). Eine Anhäufung der Bindestellen unterschiedlicher Isoformen könnte möglicherweise eine Anreicherung verschiedener Gene in diesem Bereich zur Ursache haben. Für die Region auf dem Chromosom 2L konnte diese Annahme auch bestätigt werden. Hier werden mehr als 30 verschiedene Gene im besagten Bereich kodiert. Auch in der zytologischen Region 63A/B auf dem Chromosom 3L wurde eine große Anzahl an möglichen Kandidatengenen gefunden. Demgegenüber sind im Bereich 3E3-8 auf dem X-Chromosom lediglich 3 verschiedene Gene enthalten. Somit besteht offensichtlich keine Korrelation zwischen einer regionalen Clustering von verschiedenen Isoformen und der Anzahl der in diesem Bereich kodierten Gene.

Neben der euchromatischen Lokalisation und der Assoziation einer Isoform im Chromozentrum konnte die Bindung mehrerer Isoformen an den Telomeren der Chromosomen gezeigt werden (Tab.3.1). Diese bestehen bei *Drosophila* im Gegensatz zu anderen Eukaryoten aus *Repeats* der non-LTR Retrotransposons *HeT-A*, *TART* und *Tahre* (Pardue und deBaryshe 2008). Dies zeigt, dass die Mod(mdg4)-Proteine an unterschiedlichen Chromatin-Strukturen binden können, was einen weiteren wichtigen Anhaltspunkt für das spezifische Chromatin-Targeting und damit eine nicht-redundante Funktion der einzelnen Isoformen darstellt.

4.2 Einfluss der FLYWCH-Domäne auf die Lokalisierung der Isoform Mod(mdg4)-64.2 am Polytänchromosom

Die vorangegangenen Analysen haben gezeigt, dass die einzelnen Mod(mdg4)-Proteine ein Isoform-spezifisches Verteilungsmuster am Polytänchromosom aufweisen. Neben dem gemeinsam kodierten N-terminalen Teil enthalten die meisten der Proteine im variablen C-Terminus ein konserviertes FLYWCH-Motiv. Mit Hilfe verschiedener Mutanten-Konstrukte der Isoform Mod(mdg4)-64.2 sollte die Funktion des konservierten Protein-Motivs bei der spezifischen Chromatin-Assoziation genauer untersucht werden. Für

das Protein PEB-1 in *Caenorhabditis elegans* konnte für die DNA-bindenden Eigenschaften die Notwendigkeit einer intakten FLYWCH-Domäne bereits gezeigt werden (Beaster-Jones und Okkema 2004). In den Analysen zur Isoform Mod(mdg4)-56.3 konnte bei dem Mutantenallel Z3-5578 ein Funktionsverlust des Proteins in Form von erhöhter *non-disjunction*-Rate in der männlichen Meiose nachgewiesen werden. Die Punktmutation Z3-5578 führt durch ein transkriptionell verfrühtes Stop-Codon an Aminosäureposition 449 zu einem stark verkürzten Protein, welches keine FLYWCH-Domäne mehr enthält (Thomas *et al.* 2005).

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden zunächst zwei *domain-swap* Mutanten generiert. Bei diesen Konstrukten wurde der definierte konservierte Bereich der FLYWCH-Domäne der Isoform Mod(mdg4)-64.2 einmal mit der Domäne der Isoform Mod(mdg4)-60.1 (Mutante *Mod(mdg4)-64.2-60.1DS*) und zum anderen mit dem Motiv der Isoform Mod(mdg4)56.3 ausgetauscht (Mutante *Mod(mdg4)-64.2-56.3DS*). Würde nur die FLYWCH-Domäne allein die Isoform-spezifische Bindung der Proteine vermitteln, würden die gebildeten chimären Proteine das Bindungsmuster aufweisen, deren FLYWCH-Domäne sie enthalten. Das bedeutet, die Proteine der Linie *Mod(mdg4)-64.2-60.1DS* sollten dann das Verteilungsmuster der Isoform Mod(mdg4)-60.1 präsentieren. Die erwartete Veränderung des nachzuweisenden Bandenmusters konnte jedoch nicht gefunden werden, die chimären Proteine zeigten in den Analysen einen kompletten Verlust der Chromatin-Assoziation (Abb.3.9).

Gleichfalls sehr interessante Beobachtungen wurden bei der Untersuchung von unterschiedlich großen Deletionen und Punktmutationen der Mod(mdg4)-64.2 Domäne gemacht. Die Proteine, denen das FLYWCH-Motiv vollständig fehlte (*Mod(mdg4)-64.2ΔFLYWCH*) zeigten keine Bindung an das Chromatin, obwohl die Expression in den Speicheldrüsen via Westernblot-Analysen eindeutig nachgewiesen werden konnte (Abb.3.7). Für Mutanten, in denen die FLYWCH-Domäne in der bisher definierten Größe erhalten blieb, die stark konservierten C-terminal anschließenden 30 Aminosäuren dagegen fehlten (Klon *Mod(mdg4)-64.2Δ468-580*, Abb.3.4), konnte ebenfalls keine Chromatin-Assoziation der Proteine mehr detektiert werden (Abb.3.7). Blieben die C-terminalen Aminosäuren dagegen erhalten, konnten in immunzytologischen Analysen reproduzierbare Signale am Polytänchromosom detektiert werden (Linie *Mod(mdg4)-64.2(Δ498-580)*, Abb.3.11).

Offensichtlich umfasst die bisher definierte Form der FLYWCH-Domäne nicht den vollständigen, für die Funktion notwendigen Bereich. Sehr wahrscheinlich sind noch weitere flankierende/anschließende Aminosäuren für die spezifischen Eigenschaften der

Domäne unbedingt notwendig. Die Ergebnisse der *domain-swap*-Analysen (Abb.3.9) und die Untersuchungen der Mutante *Mod(mdg4)-64.2(Δ468-580)* zeigten, dass die Aminosäuren, welche sich C-terminal der definierten Domäne befinden, für die Funktion der Proteine essentiell sind (Abb.3.4, 3.11). Krauss und Dorn (2004) postulierten für das konservierte C₂H₂-Motiv der FLYWCH-Domäne die Ausbildung einer Zink-Finger-ähnlichen Sekundärstruktur. Proteine, welche dieses stark variierende Zink-Finger Motiv enthalten, üben allgemein Funktionen bei der DNA- und RNA-Bindung sowie Protein-Protein-Interaktion und Membran-Assoziation aus (Laity *et al.* 2001). Es wäre daher auch denkbar, dass aufgrund der C-terminalen Deletionen mögliche Interaktionen mit Isoform-spezifischen Interaktionspartnern nicht mehr stattfinden können.

In den Analysen zum PEB-1 FLYWCH Motiv in *Caenorhabditis elegans* konnte verifiziert werden, dass Punktmutationen der konservierten Aminosäuren *in vitro* zum Verlust der DNA-Bindung des Proteins führten. Jedoch wurde bei keiner der untersuchten Mutanten ein Verlust der Sekundärstruktur des Proteins vorgefunden. (Beaster-Jones und Okkema 2004). Die konservierten Aminosäuren des FLYWCH-Motivs haben damit offensichtlich keinen entscheidenden Einfluss auf die Konformation und Sekundärstruktur der Proteine, sondern vermitteln ausschließlich deren spezifische Bindung an das Chromosom. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Punktmutationen und eine Deletion von 3 Aminosäuren innerhalb der FLYWCH-Domäne untersucht [Mutanten *Mod(mdg4)-64.2(Y428A)* und *Mod(mdg4)-64.2(H468A)*, *Mod(mdg4)-64.2(ΔWRC)*, Abb.3.9]. In keiner der untersuchten Linien konnten signifikante Signale an Chromatin-assoziiertem Protein detektiert werden.

Wie bereits Beaster-Jones und Okkema (2004) durch Untersuchungen am PEP-1 Protein vermuten ließen, konnten auch bei der Untersuchung der *Mod(mdg4)*-FLYWCH-Domäne einzelne Aminosäuren bzw. kurze Protein-Sequenzen *in vivo* als essentielle Bestandteile der Domäne für eine Chromatin-Bindung bestätigt werden. Unterstützende Hinweise für diese Theorie sind die Ergebnisse der Untersuchung zur Z3-3298 Mutation der Isoform *Mod(mdg4)-56.3*. Diese Punktmutation verändert das erste konservierte Histidin 511 im C₂H₂-Motiv zu einem Tyrosin und führt dadurch zu einem offensichtlichen Funktionsverlust des Proteins in Form von fehlerhafter Paarung und dadurch folgender ungleichmäßiger Chromosomenverteilung während der Meiose.

Für die Untersuchungen der *Mod(mdg4)*-EGFP-Fusionskonstrukte wurde das binäre UAS/GAL4 Expressionssystem genutzt. Um auch das endogene Expressionsmuster der Isoform *Mod(mdg4)-64.2* analysieren zu können, wurden genomische Konstrukte mit EGFP fusioniert und transgene Linien generiert.

Zunächst konnte mit Hilfe dieses genomischen Konstruktes nachgewiesen werden, dass trotz der Überexpression der Proteine im künstlichen Expressionssystem keine ektopischen Bindestellen am Chromatin durch die Proteine erkannt werden. Weiterhin konnte das Protein sowohl in larvalem wie auch in adultem diploidem Gewebe nachgewiesen werden. Dabei zeigten die *in vivo* Aufnahmen der larvalen Imaginalscheiben und Gehirne neben einer punktuellen Anreicherung des Proteins in den Kernen auch eine diffuse Verteilung innerhalb der Zellen. Im adulten Germarium konnte nur eine sehr geringe Expression des Proteins und eine diffuse Verteilung im Gewebe detektiert werden. In den adulten Hoden dagegen sind intensive punktförmige Anreicherungen des Proteins detektierbar. Hierbei wurde meist eine recht kräftige neben einer schwächeren Aggregation gefunden. Somit konnte das Vorkommen der Isoform Mod(mdg4)-64.2 sowohl in den polytären Speicheldrüsen wie auch im diploiden Gewebe der Larven und der adulten Tiere nachgewiesen werden. Das zeigt, dass das Protein Mod(mdg4)-64.2 sowohl in der larvalen wie auch während der Entwicklung des adulten Tieres endogen exprimiert wird.

Auch für andere Isoformen wie Mod(mdg4)-67.2 konnte bisher die Expression sowohl in polytären wie auch diploiden Geweben verifiziert werden. Neben einigen hundert Signalen am Speicheldrüsenchromosom wurden auch wenige punktförmige Aggregationen des Proteins in den larvalen Imaginalscheiben detektiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich mehrere der polytären Bindestellen, an welchen das Protein mit Su(Hw) kolokalisiert ist, zu Insulator-Bodies zusammenschließen und damit die Zahl der detektierten Signale deutlich reduziert wird (Gerasimova und Corces 1998, Gerasimova *et al.* 2000). Die Beobachtung, dass die Anzahl der Signale in den diploiden Interphase-Kernen gegenüber den polytären Chromosomen stark reduziert war, konnte auch für die Isoform Mod(mdg4)-64.2 gemacht werden. Möglicherweise liegen hier ähnliche Mechanismen vor, bei denen mehrere Bindestellen zu einer höher geordneten Chromatin-Domäne zusammengefasst werden.

Mit Hilfe des EGFP-fusionierten endogenen *mod(mdg4)-64.2* Konstruktes könnten in weiterführenden Analysen die Expression des Proteins in anderen Geweben und auch in unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Drosophila* untersucht werden, um die postulierte Bildung der beschriebenen Chromatin-Domäne zu bestätigen oder zu widerlegen.

4.3 Einfluss von *mod(mdg4)* auf die chromosomale Telomer-Maintenance

Die immunzytologischen Untersuchungen der Isoform Mod(mdg4)-64.2 konnten eine Assoziation des Proteins mit den Telomeren der Chromosomen belegen (Abschnitt 3.1.1, Abb.3.2, 3.5). Mit Ausnahme des 3L Telomers, an welchem in diesem Falle kein entsprechendes Signal detektiert werden konnte, enthalten alle anderen Chromosomen-Enden des verwendeten Stammes eine unterschiedliche Zahl von Kopien des *HeT-A* Retrotransposons (Abad *et al.* 2004a). Daher lag die Vermutung nahe, dass das Protein Mod(mdg4)-64.2 möglicherweise einen spezifischen regulatorischen Einfluss auf *HeT-A* Retrotransposons ausübt. Bekräftigt wurde diese Annahme durch Untersuchungen der Mutante *Rev31*, in welcher das spezifische Exon *mod(mdg4)-64.2* und weitere, den gemeinsam kodierten Exons 1-4 proximal lokalisierten Isoform-spezifische Exons deletiert sind (Abb.3.13). Hier zeigten die immunzytologischen Analysen des heterozygoten Genotyps, dass die Telomere der Chromosomen X, 2L und 2R im Hintergrund der Mutante *Rev31* gegenüber dem Wildtyp signifikant verkürzt sind (Abb.3.16, 3.17). Die Ausprägung des phänotypisch sichtbaren Mutanten-Effektes erfolgt bei dieser Mutante bereits in heterozygoten Tieren, weshalb zudem auf einen dominanten Mutanten-Effekt geschlossen wurde.

Die FISH-Analysen mittels einer *HeT-A*-spezifischen Sonde zeigten für beide Homologe der Chromosomen X, 2L, 2R und 3R in den homo- und heterozygoten *Rev31*-Mutanten gut detektierbare Fluoreszenzsignale (Abb.3.19). Somit kann man davon ausgehen, dass auch an den verkürzten Telomer-Enden der Chromosomen 2L und 2R aus dem genetischen Hintergrund der Mutante *Rev31* nach wie vor *HeT-A*-Elemente vorhanden sind. Wie bereits in Kapitel 3.3.2 erwähnt, ist der Nachweis einer signifikanten Telomer-Verkürzung vermutlich aufgrund der besonderen Chromatin-Struktur der Telomere und der variierenden Größe der *HeT-A/TART*-Arrays nicht bei allen Chromosomen möglich. Am Telomer des Chromosoms 3L konnte durch die FISH-Analysen das Fehlen der *HeT-A*-Elemente in allen untersuchten Genotypen bestätigt werden (Abb.3.16, Abad *et al.* 2004a).

In der Mutante *Rev31* sind insgesamt 18 Isoform-spezifische Exons physisch deletiert, weshalb der Phänotyp der Telomerverkürzung nicht eindeutig einer einzelnen Isoform zugeordnet werden konnte. Durch M. Volkmar wurde mittels der Methode des „*Ends-in gene targeting*“ (Xie und Golic 2004, Promotion M. Volkmar 2010) eine Isoform-spezifische Deletion für das Exon *mod(mdg4)-64.2* etabliert (Mutante $\Delta 64.2$, Abb.3.20). Die immunzytologischen Untersuchungen dieser Defizienz zeigten im heterozygoten

Genotyp mit dem Wildtypstamm w^{1118}_{iso} jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Telomerlänge der einzelnen Chromosomen (Abb.3.21).

Ein Grund dafür könnte sein, dass eine geringfügige Änderung der Chromosomen-Enden durch das Fehlen einer Isoform aufgrund des komplexen und stark kondensierten Aufbaus der Telomere keinen phänotypischen Effekt auf die Telomerlänge hat. In der Mutante *Rev31* sind mehrere Isoformen betroffen, wodurch ein additiver Einfluss der fehlenden Proteine auf die Telomer-Maintenance wahrscheinlicher ist. So wurden beispielsweise bei den Untersuchungen der Verteilungsmuster verschiedener Mod(mdg4)-EGFP Fusionsproteine neben der Isoform Mod(mdg4)-64.2 auch für die Proteine Mod(mdg4)-62.3, Mod(mdg4)-53.1 und Mod(mdg4)-52.4 Signale an den Telomeren der Speicheldrüsenchromosomen detektiert (Tab.3.1).

In weiterführenden molekularbiologischen Analysen wurde ein Einfluss der Mutante $\Delta 64.2$ auf die Regulation der *HeT-A* Retrotransposons belegt (Tab.3.2). Mittels halbquantitativer RT-PCR konnte eine Erhöhung der Transkriptmengen für das telomerische *HeT-A* Retrotransposon in der homozygoten Mutante gezeigt werden (Abb.3.22). Diese Ergebnisse würden konträr zum erwarteten Phänotyp stehen, denn ausgehend von der Reduktion der Telomerlänge in der *mod(mdg4)-64.2*-umfassenden Deletion *Rev31* und der Assoziation der Isoform an *HeT-A* wurde in $\Delta 64.2$ eine Verkürzung der Telomere erwartet. Siriaco *et al.* (2002) zeigten in ihren Arbeiten ebenfalls Veränderungen in der Telomerlänge bei *Tel*-Mutanten. Mit Hilfe von Southernblot- und FISH-Analysen postulierten sie eine Vermehrung der Kopienzahl für die *TART*-Elemente um das 2-fache, für die *HeT-A*-Elemente hingegen um mindestens das 4-fache in den untersuchten Mutanten. Offensichtlich verändert sich die Anzahl der *Repeats* dieser beiden telomerischen Elemente unabhängig voneinander. In den Mutanten, welche im erwähnten Beispiel zu einer Telomerverlängerung führen, steigt daher die Anzahl der *HeT-A* Kopien stärker an als die Kopien der *TART*-Elemente (Siriaco *et al.* 2002). Würde man diese Überlegung nun auf Mutanten übertragen, welche zu einer Reduktion der Telomerlänge führen, dann sollten die Kopienzahl der *HeT-A*-Elemente stärker reduziert werden als die Anzahl der *TART*-Elemente. Die beiden Elemente *HeT-A* und *TART* werden aufgrund ihrer Struktur in die Klasse der non-LTR Retrotransposons eingestuft. Da das *HeT-A*-Element keine eigene Reverse Transkriptase kodiert, im *TART*-Element hingegen eine entsprechende Sequenz nachgewiesen wurden, geht man von einem engen Zusammenwirken der beiden Elemente während der Transposition an die Telomerenden aus (Pardue and DeBaryshe 2008). Im Hintergrund der Mutante $\Delta 64.2$ könnte dieses Gleichgewicht nun verändert sein. Aufgrund des bereits diskutierten Überschusses an *TART*-

gegenüber den *HeT-A*-Elementen in der Mutante wird in den Zellen im Vergleich zum Wildtyp mehr Reverse Transkriptase gebildet. Dies könnte wiederum eine Erhöhung der *HeT-A*-Transkriptmenge trotz reduzierter Anzahl an entsprechenden Elementen zur Folge haben. Diese Theorie lässt sich auch mit den Ergebnissen aus den ChIP-Analysen vereinen. Hier wurde eine dem Wildtyp gegenüber reduzierte Menge an *HeT-A* spezifischer Sequenz vermutet, was einen weiteren Hinweis auf den Verlust telomerischer *HeT-A Repeats* darstellen könnte. Es wäre allerdings auch denkbar, dass die benötigte Menge an *HeT-A*-Transkript trotz reduzierter Zahl der *Repeats* durch eine stärkere Transkriptionsaktivierung und daraus resultierende erhöhte Expressionsrate der noch vorhandenen *HeT-A*-Elemente gewährleistet werden soll. In diesem Falle könnte die erhöhte Menge an *HeT-A* Transkripten die verfügbare Menge des Enzyms Reverse Transkriptase austitrieren, was wiederum zu einer verringerten Transpositionsrate führen würde. Durch Microarray-Analysen der Mutanten *Rev31* und $\Delta 64.2$ konnten mit den RT-PCR-Analysen vergleichbare Ergebnisse erhalten werden (Promotion M. Volkmar 2010, Tab.3.2). Auch hier zeigte sich eine deutliche Erhöhung in der Transkriptmenge der *HeT-A* Elemente. Zudem scheint auch eine Korrelation zwischen der Telomerverkürzung und der erhöhten Transkriptmenge der *HeT-A* Retrotransposons zu bestehen. In der Mutante *Rev31* konnten teilweise starke Unterschiede in der Telomerlänge detektiert werden (Abb.3.19), die Microarray-Analysen weisen dementsprechend ein um das 12-fache erhöhtes Transkriptlevel auf (Tab.3.2). Für die Mutante $\Delta 64.2$ konnte dagegen zytologisch keine signifikante Veränderung der Telomere nachgewiesen werden, die Transkription der *HeT-A* Elemente ist vergleichsweise „nur“ um den Faktor 2,8 erhöht. Mittels Southernblot-Analysen oder auch Dot-Blot-Analysen der beiden Mutanten könnte die Annahme, dass sich die nachgewiesene Verkürzung der Telomere in der Mutante *Rev31* durch eine Reduktion der *HeT-A Repeats* erklärt, genauer untersucht werden. Für die Mutante $\Delta 64.2$ könnte gleichzeitig die momentan lediglich theoretisch angestellte Vermutung einer Telomerverkürzung experimentell bestätigt oder gegebenenfalls auch widerlegt werden.

Neben dem telomerischen Retrotransposon *HeT-A* ist in der Mutante $\Delta 64.2$ auch die Transkription von weiteren euchromatischen transponiblen Elementen verändert (Abb.3.23, Tab.3.2). In diesen Beispielen korrelieren die Daten der Microarray-Analysen ebenfalls mit den Ergebnissen der halb-quantitativen RT-PCR. Der Großteil der untersuchten Transposons gehört zur Familie der LTR-Transposons (Kaminker *et al.* 2002). Während der Transposition wird die RNA Kopie der Elemente durch die kodierte Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben, welche anschließend wieder an einer

anderen Stelle im Genom inseriert (Finnegan 1997, Beauregard *et al.* 2008). Die Ausnahme bildet das *R2*-Element, welches wie die *HeT-A* Retrotransposons zur Klasse der LINE-like Elemente (*long interspersed nucleotide elements*) zugeordnet wird (Kaminker *et al.* 2002). Für die Familie der *R2*- wie auch der *R1*-Elemente konnten bisher Insertionen lediglich im *28S rDNA*-Lokus und im Heterochromatin gezeigt werden, euchromatisch lokalisierte Kopien wurden nicht belegt (Jakubczak *et al.* 1991, Kaminker *et al.* 2002). Dadurch würde der insertionelle genomische Hintergrund der *R2*-Transposons dem der *HeT-A*-Elemente bezüglich der Kondensation des Chromatins ähnlich sein, jedoch konnten keine korrelierenden Ergebnisse hinsichtlich des untersuchten Transkriptlevels in den beiden Mutanten festgestellt werden. Im Gegensatz zu den *HeT-A*-Retrotransposons welche eine erhöhte Transkriptionsrate zeigten, wurde für das *R2*-Element eine verringerte Expression im Vergleich zum Wildtyp gefunden (Abb.3.23, Tab.3.2). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die getesteten Elemente aus der Klasse der LTR-Transposons gefunden. Während die Expressionsrate bei den Elementen *Frogger* und *Gypsy* deutlich erhöht war, konnte für *Copia* keine signifikante Veränderung im Transkriptlevel detektiert werden (Abb.3.23, Tab.3.2). Damit konnte aus den vorliegenden Ergebnissen bisher keine Gesetzmäßigkeit abgeleitet werden, ob eine bestimmte Klasse oder Familie von Retrotransposons von Mod(mdg4)-64.2 in ihrer Transkription generell positiv oder negativ reguliert werden. Die vergleichenden Analysen mit der Mutante *Rev31* legen zudem die Schlussfolgerung nahe, dass wahrscheinlich mehrere der Mod(mdg4)-Isoformen die Expression verschiedener Transposons beeinflussen.

4.4 Untersuchungen zum *trans-Splicing* am komplexen Lokus *mod(mdg4)*

Der Begriff alternatives *Splicing* beinhaltet, dass aus einem Gen verschiedene reife mRNAs generiert werden. Dabei können unterschiedliche Exon-Kassetten, sich gegenseitig ausschließende Exons oder unterschiedliche 3'- und 5'-*splice Sites* genutzt werden. Letztendlich entscheidet die Bindung des Spliceosoms nach Erkennen der entsprechenden *splice Sites*, welche Exons in die reife mRNA involviert werden (Lynch 2004). Vom alternativen *trans-Splicing* spricht man dagegen, wenn mindestens 2 unterschiedliche Primärtranskripte (prä-mRNAs) zu einer reifen mRNA integriert werden. In *Drosophila melanogaster* stellt das Gen *mod(mdg4)* das bekannteste Beispiel dar, bei dem durch alternatives *trans-Splicing* mehr als 30 verschiedene essentielle Proteine gebildet werden (Büchner *et al.* 2000, Dorn und Krauss 2003). Die geringen Kenntnisse

über die funktionelle Signifikanz der großen Zahl an *mod(mdg4)*-Isoformen und die ungewöhnliche Struktur des Lokus in *D. melanogaster* waren der Anlass für die genauere Untersuchung des Gens in der orthologen Art *D. virilis*. Diese evolutionär verwandte Art trennte sich vor ca. 40-60 Mio. Jahren von den *Sophophora*, zu welchen *D. melanogaster* gehört (Beverley und Wilson 1984). Die vergleichenden Analysen zeigten eine starke evolutionäre Konservierung der Lokus-Struktur innerhalb der beiden Arten, was bereits auf die funktionelle Signifikanz der multiplen Isoformen hinweist.

Erste Anhaltspunkte für eine funktionelle Differenzierung der einzelnen Isoformen in *D. melanogaster* wurden in vorangegangenen Arbeiten von Büchner *et al.* (2000) durch die Analyse der beiden Isoformen Mod(mdg4)-58.0 und Mod(mdg4)-67.2 gegeben. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen nicht überlappenden Verteilungsmuster von weiteren 7 Mod(mdg4)-Isoformen sind ein zusätzlicher Beleg dafür. Der hohe Konservierungsgrad der Sequenzen der Isoformen *mod(mdg4)*-58.0 und -67.2 in *D. virilis* korreliert mit einer Bindung des Proteins an die korrespondierenden Sites der Polytänochrosomen wie es am Beispiel der Isoform Mod(mdg4)-58.0 gezeigt wurde (Gabler *et al.* 2005). Vergleicht man die spezifischen C-Termini der orthologen Mod(mdg4)-Isoformen findet man innerhalb der konservierten FLYWCH-Domäne eine hohe Sequenz-Identität (Abb.3.4). Die starke Konservierung der meisten Aminosäure-Positionen innerhalb des Motivs zwischen den beiden verwandten Arten verweist ebenfalls auf deren funktionelle Wichtigkeit für die Isoform-spezifische Interaktion mit anderen Proteinen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass verbunden mit der Konservierung der ungewöhnlichen Struktur des *mod(mdg4)*-Lokus in *D. virilis* auch das mRNA *trans-Splicing* in beiden Arten evolutionär erhalten geblieben ist. Bestätigt wurde dies durch den Nachweis chimärer *mod(mdg4)*-Transkripte in transgenen Tieren (Abb.3.29). Mit Hilfe des spezifischen Antikörpers erfolgte ferner der Nachweis des Mod(mdg4)-67.2 Proteins an den Polytänochrosomen der Larven des Genotyps *2-P(w+ Dv mod(mdg4) 11.5kb)/+; mod(mdg4)⁰²/mod(mdg4)⁰²* (Abb.3.31). Da das Isoform-spezifische Exon der mRNAs nicht vom *D. virilis* 11.5 kb *NotI* Transgen kodiert wird, sollte es sich bei dem nachgewiesenen Produkt um das chimäre *D. virilis/D. melanogaster* Mod(mdg4)-67.2 Protein handeln (Abb.1, 3.28., 3.31). Durch Westernblot Analysen wurde anschließend gezeigt, dass das chimäre Voll-Längen Protein in mit der endogenen Isoform vergleichbarer Menge gebildet wurde (Abb.3.32). Somit konnte belegt werden, dass durch chimäre Transkripte, welche von nicht-homologen Chromosomen kodierten mRNAs gebildet werden, signifikant nachweisbare Mengen von Protein gebildet werden können. Die Rettung von rezessiven *D. melanogaster* Mutanten des *mod(mdg4)* gemeinsam

kodierten Bereiches durch *D. virilis* Transgene weist gleichzeitig auf die funktionelle Konservierung der Mod(mdg4)-Protein-Isoformen zwischen den beiden orthologen Arten hin (Gabler *et al.* 2005).

Mongelard *et al.* (2002) zeigten, dass die inter-allelische Komplementation durch mRNA *trans-Splicing* gewährleistet wird, wenn 2 unabhängige Mutationen in denen verschiedene *mod(mdg4)*-mRNA Transkripte defekt sind, in *trans* kombiniert werden. Dabei wurde vermutet, dass die Integrität von Donor- und Akzeptor-prä-mRNA innerhalb des Locus eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von physiologisch ausreichenden /funktionellen Mengen von Wildtyp Mod(mdg4)-67.2 Protein ist.

Die Rettung der Mutanten-Phänotypen durch das *D. virilis* 11.5 kb Transgen und der Nachweis von chimärem Mod(mdg4)-67.2 in Tieren mit unterschiedlichen Transgen-Insertionen gibt andererseits Hinweise darauf, dass zur Bildung von signifikanten Protein-Mengen die einzelnen Transkriptions-Einheiten an unterschiedlichen Stellen im Genom lokalisiert sein können.

Mit Hilfe verschiedener, definierter chromosomaler *Rearrangements* konnte im Rahmen dieser Arbeit ein weiterer Beleg für die Bildung von physiologischen Protein-Mengen trotz fehlender räumlicher Nähe von *trans-Splice*-Donor und -Akzeptor erbracht werden. Hierfür wurden eine reziproke *T(2;3)*-Translokation und zwei Inversionen unterschiedlicher Größe analysiert (Tab.3.3, Abb.3.33). Durch die zytologischen Analysen konnten die Veränderungen in der Paarungsstruktur der durch die unterschiedlichen *Rearrangements* betroffenen Chromosomen bestätigt werden (Abb.3.34). Für anschließende Untersuchungen der Expression verschiedener Isoformen wurden solche ausgewählt, deren Transkriptions-Einheiten aufgrund der vorhandenen Mutationen des Locus räumlich voneinander getrennt waren. Die halbquantitativen RT-PCR-Untersuchungen dieser Isoformen zeigten in den einzelnen homozygoten *Rearrangements* eine signifikante Reduktion der Produktmengen im Vergleich zum Kontrollstamm w^{118}_{iso} (Promotion M. Volkmar 2010, persönliche Mitteilung). Dabei korrelierte die detektierte Expressionshöhe umgekehrt mit der Größe der untersuchten Inversion bzw. der Distanz der beiden Transkriptions-Einheiten. Das bedeutet, in der homozygoten Translokation wurden die geringsten, in der kleineren der beiden Inversionen die höchsten, mit dem Wildtyp vergleichbare Produktmengen detektiert. Untersuchungen der Expression der Isoform Mod(mdg4)-67.2 mittels Westernblot-Analysen erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Auch hier konnten im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduzierte Mengen von Protein in Korrelation zur Distanz der kodierten *mod(mdg4)*-mRNAs nachgewiesen werden (Abb.3.35). Anhand von immunzytologischen Analysen konnte eine mit dem Wild-

typ Protein vergleichbare Verteilung des Mod(mdg4)-67.2 Proteins an den präparierten Speicheldrüsenchromosomen der einzelnen Mutanten gezeigt werden (Abb.3.36, Abb.7.1-Anhang). Dies gab einen weiteren Hinweis auf die vorhandene Funktionalität des gebildeten Proteins trotz räumlicher Trennung der beiden Transkriptions-Einheiten. Eine genauere Prüfung erfolgte unter Zuhilfenahme von zwei beschriebenen funktionellen Assay-Systemen.

Durch Gerasimova *et al.* (1995) wurde gezeigt, dass die Isoform Mod(mdg4)-67.2 Effekte auf den Phänotyp von *gypsy*-induzierten Mutationen im *yellow*- und *cut*-Lokus ausübt. Im Gegensatz zu den dabei beschriebenen Mod(mdg4)-67.2 *loss-of-function* Mutationen konnte im Hintergrund der untersuchten chromosomalen *Rearrangements*, welche nun einen geteilten *mod(mdg4)*-Lokus präsentieren, ein funktioneller Chromatin-Insulator etabliert werden (Abb.3.37, 3.38). Ein möglicher Grund für die grundsätzlich weiterhin vorhandene Genaktivität des nun räumlich getrennten Lokus besteht in der Struktur des Lokus selbst. Durch die Arbeiten von A. Dörfel (2007) und M. Volkmar (2010) konnten bereits zahlreiche Promotoren innerhalb des Gens nachgewiesen werden. Da die beiden Teile des Lokus lediglich physisch voneinander getrennt sind und sonst keine weiteren Veränderungen in der genomischen Sequenz erfolgten, sollte von den einzelnen Promotoren grundsätzlich die entsprechende Wildtyp-Aktivität erwartet werden können. Es besteht zwar die Möglichkeit, dass die Transkripte des wegverlagerten Teils aufgrund der neuen benachbarten Sequenz nun dem Einfluss anderer regulatorischer Elemente unterliegen, letztendlich transkriptionell weniger aktiv oder gar heterochromatisiert sein könnten, dieser Effekt konnte jedoch experimentell nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde für die dem Bruchpunkt benachbart liegenden Isoformen eine erhöhte Expression festgestellt (Volkmar 2010). Diese rührt wahrscheinlich von Promotorelementen her, die in den Elementen enthalten sind, welche die *Rearrangement*-Bruchpunkte markieren. Die Transkription der entfernt lokalisierten Isoformen konnte mittels halb-quantitativer PCR gezeigt werden (Promotion M. Volkmar 2010), wodurch eine gänzliche transkriptionelle Inaktivierung des räumlich getrennten Teils des Lokus ausgeschlossen werden konnte. Diese Tatsache wurde auch durch die nachgewiesene physiologisch wirksame Konzentration des Mod(mdg4)-67.2 Proteins untermauert. Weiterhin konnte nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, dass die beiden getrennten Teile des Gens *mod(mdg4)*, lokalisiert auf unterschiedlichen Chromosomenarmen in der homozygoten Translokation, inter-chromosomal miteinander paaren.

In diesem Falle sollte man allerdings nicht die gefundene Reduktion in der Expressionshöhe der distal lokalisierten Isoformen (in Bezug auf den Bruchpunkt im *mod(mdg4)*-Lokus) detektieren können, wie in den Analysen gezeigt wurde. Außerdem würde man eine höhere „Rück-Rekombinationsrate“ (Tab.3.4) als die beobachtete erwarten. Durch *in-vivo* FISH-Analysen an intakten Speicheldrüsenkernen mit einer Sonde, welche beide Teile des getrennten Lokus in der Nähe des Bruchpunktes erkennt, könnten weitere wichtige Daten zur endgültigen Klärung der Fragestellung erhalten werden.

Da die prä-mRNA der gemeinsam kodierten Exons den *trans-Splice*-Donor (Exons 1-4) für eine Vielzahl von möglichen *trans-Splice*-Akzeptoren darstellt (Exons 5 bzw. 5 und 6), kann man davon ausgehen, dass diese als unabhängiges Transkript in hohem Maße gebildet wird und in Form eines konzentrationsabhängigen Gradienten im Kern vorliegt. Unter diesen Voraussetzungen würden, entsprechende räumliche Nähe vorausgesetzt, recht effizient auch geringe Mengen produzierter *Splice*-Akzeptoren zu einer reifen mRNA umgesetzt werden können. Geht man davon aus, dass die gebildeten Transkripte des in den *Rearrangements* wegverlagerten Teils des Lokus durch Diffusion den notwendigen *Splice*-Partner erreichen, wäre der vorhandene Pool von *Splice*-Donor eine optimale Voraussetzung für eine maximale *Splice*-Effizienz. Dieses Modell würde ferner durch die Analysen des alternativen *trans-Splicing* zwischen dem endogenen *mod(mdg4)*-Lokus und einem Transgen, welches einen Teil des *mod(mdg4)*-Lokus der phylogenetisch verwandten Art *D. virilis* trägt, bekräftigt werden. Die Arbeiten bestätigten zum einen das effektive *trans-Splicing* der verschiedenen Transkriptionseinheiten innerhalb der stark konservierten Loci beider Arten. Weiterhin konnte aber auch die Funktionalität der chimären Proteine durch immunzytologische Analysen verifiziert werden (Gabler *et al.* 2005).

Abschließend konnte damit nicht nur eine strukturelle Konservierung des *mod(mdg4)*-Lokus innerhalb orthologer Arten gezeigt werden, sondern auch eine funktionelle Konservierung am Beispiel einzelner Isoformen zwischen *D. melanogaster* und *D. virilis*. Für die Bildung physiologischer Proteinmengen basierend auf *trans-Splicing* unterschiedlicher Transkriptionseinheiten ist die Integrität des Lokus nicht zwingend erforderlich. Dies konnte am Beispiel des 11.5 kb *D. virilis* Transgens und mit Hilfe der homozygoten chromosomalen *Rearrangements* gezeigt werden.

Für weiterführende Analysen zum Einfluss der räumlichen Trennung von Donor und Akzeptor auf die Effizienz des *trans-Splicing* stellen die bereits etablierten transgenen Linien mit einem *D. melanogaster* Transgen, welches ausschließlich die gemeinsamen Exons 1-4 kodiert, eine gute Ausgangsbasis dar.

5. Zusammenfassung

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse beschreiben den komplexen Locus *mod(mdg4)* in *Drosophila melanogaster*. Durch alternatives *trans-Splicing* können aus diesem Gen mehr als 30 verschiedene Isoformen gebildet werden. Die dabei entstehenden Proteine enthalten alle einen identischen N-Terminus und einen Isoform-spezifischen C-terminalen Bereich.

Ein Ziel der Arbeit lag in der immunzytologischen und funktionellen Charakterisierung ausgewählter *Mod(mdg4)*-Isoformen. Mit Hilfe von EGFP-Fusionskonstrukten konnte für 7 verschiedene *Mod(mdg4)*-Proteine ein nicht-überlappendes Verteilungsmuster am larvalen Polytänchromosom gefunden werden. Für die Isoform *Mod(mdg4)*-64.2 konnte dabei eine Assoziation mit nahezu allen Telomeren der Chromosomen gezeigt werden. Durch die Analysen der Defizienz *Rev31* und der Isoform-spezifischen Mutante $\Delta 64.2$ wurde der Einfluss dieser Isoform auf die Regulation des telomerischen *HeT-A* Retrotransposons belegt. Dabei konnte außerdem ein Effekt des Proteins *Mod(mdg4)*-64.2 auf die Regulation von euchromatisch inserierten transponiblen Elementen nachgewiesen werden.

In weiteren Analysen wurde die konservierte FLYWCH-Domäne im Isoform-spezifischen C-terminalen Bereich der Proteine funktionell analysiert. Durch Austausch und Deletion der gesamten definierten Domäne bzw. einzelner konservierter Aminosäuren der Isoform *Mod(mdg4)*-64.2 konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv essentiell für die Isoform-spezifische Chromatin-Assoziation des Proteins ist. Im Zuge der Untersuchungen wurde ferner die Erkenntnis gewonnen, dass die bisher definierte FLYWCH-Domäne nicht die gesamte, für die Chromatin-Bindung des Proteins notwendige Sequenz umfasst.

Einen zweiten Schwerpunkt der Arbeit bildete die Analyse des *trans-Splicing* des komplexen *mod(mdg4)*-Lokus. Mittels Homologie-Vergleiche wurde eine starke strukturelle Konservierung des Gens zwischen den orthologen *Drosophila* Arten gezeigt. Mit dem Nachweis chimärer *D. virilis/D. melanogaster* Transkripte durch RT-PCR und eines mit dem Wildtyp vergleichbaren Verteilungsmusters des chimären *Mod(mdg4)*-67.2 Proteins am Polytänchromosom konnte auch die funktionelle Konservierung des Lokus am Beispiel einzelner Isoformen bestätigt werden. In zwei funktionellen Assay-Systemen wurde der Nachweis erbracht, dass die genomische Integrität des *mod(mdg4)*-Lokus keine zwingende Voraussetzung für die Expression der, durch *trans-Splicing* gebildeten Isoformen ist.

6. Literaturverzeichnis

- Abad J.P., de Pablos B., Osoegawa K., de Jong P.J., Martin-Gallardo A. and Villasante A. (2004a). Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: fulllength copies of *HeT-A* and *TART* elements at telomeres. *Molecular Biology and Evolution* 21 (9): 1613-1619.
- Abad J.P., de Pablos B., Osoegawa K., de Jong P.J., Martin-Gallardo A. and Villasante A. (2004b). *TAHRE*, a novel telomeric retrotransposon from *Drosophila melanogaster*, reveals the origin of *Drosophila* telomeres. *Molecular Biology and Evolution* 21(9): 1620-4.
- Abhimad S., Iyer L.M. and Aravind L. (2008). BEN: A novel domain in chromatin factors and DNA viral proteins. *Bioinformatics* 24(4): 458-461.
- Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Hoskins R.A., Gelle R.F., George R.A. *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Alfageme C.R., Rudkin G.T. and Cohen L.H. (1980). Isolation, properties and cellular distribution of DL, a chromosomal protein of *Drosophila*. *Chromosoma* 78(1): 1-31.
- Andreyeva E.N., Belyaeva E.S., Semeshin V.F., Pokholkova G.V and Zhimulev I.F. (2005). Three distinct chromatin domains in telomere ends of polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* *Tel* mutants. *Journal of Cell Science* 118: 5465-5477.
- Avery O.T., MacLeod C.M. and McCarty M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine* 1944 79: 137-158.
- Babu M.M., Iyer L.M., Balaji S. and Aravind L. (2006). The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic Acids Research* 00: 1-16.
- Beaster-Jones L. and Okkema P.G. (2004). DNA binding and *in vivo* function of *C.elegans* PEB-1 require a conserved FLYWCH motif. *Journal of Molecular Biology* 339: 695-706.
- Beauregard A., Curcio M.J. and Belfort M. (2008). The take and give between retrotransposable elements and their hosts. *Review Annual Review of Genetics* 42: 587-617.
- Bell A.C. and Felsenfeld G. (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* 405 (6785): 408-409.
- Beverley S.M. and Wilson A.C. (1984). Molecular evolution in *Drosophila* and the higher Diptera II. A time scale for fly evolution. *Journal of Molecular Evolution* 21(1): 1-13.
- Blumenthal T. (2005). Trans-splicing and operons. *WormBook*, ed. The *C.elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.5.1, <http://www.wormbook.org>.
- Bridges P.N. (1942). *Journal of Heredity* 33: 403-408.
- Büchner K., Roth P., Schotta G., Krauss V., Saumweber H., Reuter G. and Dorn, R. (2000). Genetic and molecular complexity of the position effect variegation modifier *mod(mdg4)* in *Drosophila*. *Genetics* 155: 141-157.

Brückner, S. (2007). Zytologische Analyse am komplexen Locus *mod(mdg4)* bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik

Capelson M. and Corces V.G. (2005). The ubiquitin ligase dTopor directs the nuclear organization of a chromatin insulator. *Molecular Cell* 20: 105-116.

The *C. elegans* Sequencing Consortium *et al.* (1998). Genome sequence of the nematode *C.elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2017.

Chen B.E., Kondo M., Garnier A., Watson F.L., Püettmann-Holgado R., Lamar D.R. and Schmucker D. (2006). The molecular diversity of Dscam is functionally required for neuronal wiring specificity in *Drosophila*. *Cell* 125: 607-620.

Chung J. H., Whiteley M. and Felsenfeld G. (1993). A 5' element of the chicken β -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74: 505-514.

Cleveland D.W., Mao Y. and Sullivan K.F. (2007). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112(4): 407-421.

Clarke L. and Carbon J. (1985). The structure and function of yeast centromeres. *Annual Review of Genetics* 19: 29-55.

Danilevskaya O.N., Arkhipova I.R., Traverse K.L. and Pardue M.L. (1997). Promoting in tandem: The promoter for telomere transposon *HeT-A* and implications for the evolution of retroviral LTRs. *Cell* 88: 647-655.

Dörfel A. (2007). Isolation und funktionelle Charakterisierung von Mutanten für den komplexen Locus „*modifier of mdg4*“ in *Drosophila*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik.

Dorn R., Krauss V., Reuter G. and Saumweber H. (1993a). The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, *E(var)3-93D*, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 90: 11376-11380.

Dorn R., Reuter G. and Loewendorf A. (2001). Transgene analysis proves mRNA trans-splicing at the complex *mod(mdg4)* locus in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 98: 9724-9729.

Dorn R. and Krauss V. (2003). The *modifier of mdg4* locus in *Drosophila*: functional complexity is resolved by *trans* splicing. *Genetica* 117: 165-177.

Dellino G.I., Schwarz Y.B., Farkas G., McCabe D., Elgin S.C.R. and Pirrotta V. (2004). Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Molecular Cell* 13: 887-893.

Duffy, J.B. (2002). GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34: 1-15.

Epigenetics (2007). Allis C.D., Jenuwein T. and Reinberg D. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York

Finnegan D.J. (1997). Transposable elements: How non-LTR retrotransposons do it. *Current Biology* 7: R245-R248.

Fischer J.A., Giniger E., Maniatis T. and Ptashne M. (1988). GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* 332: 853-856.

Gabler M. (2003). Immunzytologische Analyse von Mod(mdg4) Protein-Isoformen bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik

Gabler M., Volkmar M., Weinlich S., Herbst A., Dobberthien P., Sklarss S., Fanti L., Pimpinelli S., Kress H., Reuter G. and Dorn R. (2005). Trans-splicing of the *mod(mdg4)* complex locus is conserved between the distantly related species *Drosophila melanogaster* and *D. virilis*. *Genetics* 169: 723-736.

Gause M., Morcillo P. and Dorsett D. (2001). Insulation of enhancer-promotor communication by a *gypsy* transposon insert in the *Drosophila cut* gene: cooperation between Suppressor of Hairy-wing and Modifier of *mdg4* proteins. *Molecular and Cellular Biology* 21: 4807-4817.

George J.A., DeBaryshe P.G., Traverse K.L., Celniker S.E. and Pardue M.L. (2006). Genomic organization of the *Drosophila* telomere retrotransposable elements. *Genome Research* 16: 1231-1240.

Georgiev P. G. and Gerasimova T.I. (1989). Novel genes influencing the expression of the *yellow* locus and *mdg4* (*gypsy*) in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Gene Genetics* 220: 121-126.

Georgiev P. and Kozycina M. (1996). Interaction between mutations in the *suppressor of Hairy wing* and *modifier of mdg4* genes of *Drosophila melanogaster* affecting the phenotype of *gypsy*-induced mutations. *Genetics* 142: 425-436.

Gerasimova T.I., Gdula D.A., Gerasimov D.V., Simonova O. and Corces V.G. (1995). A *Drosophila* protein that imparts directionality on a chromatin insulator is an enhancer of position-effect variegation. *Cell* 82: 587-597.

Gerasimova T.I. and Corces V.G. (1996). Boundary and insulator elements in chromosomes. *Current Opinion in Genetics & Development* 6: 185-192.

Gerasimova T.I. and Corces V.G. (1998). Polycomb and Trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell* 92: 511-521.

Geyer P.K. (1997). The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development* 7: 242-248.

Gingeras T.R. (2009). Implication of chimaeric non-co-linear transcripts. *Review Nature* 461: 206-211.

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M. et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-567.

Golic K.G. and Golic M.M. (1996). Engineering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics* 144(4): 1693-711.

- Gorczyca M., Popova E., Jia X.-X. and Budnik V. (1999). The gene *mod(mdg4)* affects synapse specificity and structure in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology* 39: 447-460.
- Gloor G. and Engels W. (1992). Single-Fly DNA Preps for PCR. *D I S* 71: 148-149.
- Gustashaw K.M. (1991). Chromosome Stains. In *The ACT Cytogenetics Laboratory Manual, Second Edition*, edited by M.J. Barch. The Association of Cytogenetic Technologists, Raven Press Ltd., New York.
- Harvey A.J., Bidwal A.P. and Miller L.K. (1997). Doom, a product of the *Drosophila mod(mdg4)* gene, induces apoptosis and binds to baculovirus inhibitor-of-apoptosis proteins. *Molecular and Cellular Biology* 17: 2835-2843.
- Horiuchi T., Giniger E. and Aigaki T. (2003). Alternative trans-splicing of constant and variable exons of a *Drosophila* axon guidance gene, *lola*. *Genes & Development* 17: 2496-2501.
- Iida K., Fukami-Kobayashi K., Toyoda A., Sakaki Y., Kobayashi M., Seki M. and Shinozaki K. (2009). Analysis of multiple occurrences of alternative splicing events in *Arabidopsis thaliana* using novel sequenced full-length cDNAs. *DNA Research* 16(3): 155-164.
- International Human Genome Consortium *et al.* (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945.
- Jakubczak J.L., Burke, W.D. and Eickbusch T.H. (1991). Retrotransposable elements *R1* and *R2* interrupt the rRNA genes of most insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 88: 3295-3299.
- Kaminker J.S., Bergman C.M., Kronmiller B., Carlson J., Svirskas R., Patel S., Frise E., Wheeler D.A., Lewis S.E., Rubin G.M., Ashburner M., Celniker S.E. (2002). The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology* 3(12): 0084.1-0084.20.
- Kikuchi S., Satoh K., Nagata T., Kawgashira N., Doi K., Kishimoto N., Yazaki J., Ishikawa M., Yamada H., Ooka H. *et al.* (2003) Collection, mapping and annotation of over 28.000 cDNA clones from *japonica Rice*. *Science* 301:376-380.
- Kim C.A. and Bowie J.U. (2003). SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends Biochemical Science*. 28(12): 625-628.
- Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I. and Khorana H.G. (1971). Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*. 56(2): 341-361.
- Koundakjian E.J., Cowan D.M., Hardy R.W. and Becker A.H. (2004). The Zuker collection: a resource for the analysis of autosomal gene function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167(1): 203-206.
- Krauss V. and Dorn R. (2004). Evolution of the trans-splicing *Drosophila* locus *mod(mdg4)* in several species of Diptera and Lepidoptera. *Gene* 331: 165-176.
- Labrador M., Mongelard F., Plata-Rengifo P., Baxter E.M., Corcs V.G. and Gerasimova T.I. (2001). Protein encoding by both DNA strands. *Nature, brief communication* 409: 1000
- Labrador M. and Corces V.G. (2003). Extensive exon reshuffling over evolutionary time coupled to *trans*-splicing in *Drosophila*. *Genome Research* 13: 2220-2228.

- Lachner M., O'Sullivan R.J. and Jenuwein T. (2003). An epigenetic road map for histone lysine methylation. *Journal of Cell Science* 116: 2117-2124.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laity J.H., Lee B.M and Wright P.E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 11: 39-46.
- Lefevre (1976). The Genetics and Biology of *Drosophila* (Ashburner and Novitski, eds.). *Academic Press London, New York, San Fransisco* Vol.1a pp.: 31-66.
- Letunic I., Doerks T. and Bork P. (2008). SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research* 37(2009): D229-D232.
- Li H., Wang J. and Sklar J. (2008). A neoplastic gene fusion mimics *trans*-splicing of RNAs in normal human cells. *Report Science* 321: 1357-1361.
- Licatalosi, D.D. and Darnell R.B. (2010). RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Review Nature - Genetics* 11: 75-87.
- Lindsley D.L. and Zimm G.G. (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Academic Press, New York*.
- de Longevialle A.F., Meyer E.H., Andrés C., Taylor N.L., Lurin C., Millar A.H. and Small I.D. (2007). The pentatricopeptid repeat gene *OTP43* is required for *trans*-splicing of the mitochondrial *nad1* Intron 1 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 19: 3256-3265.
- Lynch K.W. (2004). Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nature Reviews-Immunology*: 4:931-940.
- Macknight R., Duroux M., Laurie R, Dijkwel P., Simpson G. and Dean C. (2002). Functional significance of the alternative transcript processing of the *Arabidopsis* floral promoter FCA. *Plant Cell* 14(4): 877-88.
- Mason J.M., Frydrychova R.C. and Biessmann H. (2007). *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. *BioEssays Review* 30: 25-37.
- McKee B.D. (1996). The license to pair: identification of meiotic pairing sites in *Drosophila*. *Chromosoma* 105: 135-141.
- Mihaly J., Hogga I., Barges S., Galloni M., Mishra R. K., Hagstrom K., Müller M., Schedl P., Sipos L., Gausz J., Gyurkovics H. and Karch F. (1998). Chromatin domain boundaries in the *Bithorax* complex. *Cell* 54: 60-70.
- Mohan M., Bartkuhn M., Herold M., Philippen A., Heintz N., Bardenhagen I., Leers J., White A.H., Renkawitz-Pohl R., Saumweber H. and Renkawitz R. (2007). The *Drosophila* insulator proteins CTCF and CP190 link enhancer blocking to body patterning. *The EMBO Journal* 26(19): 4203-4214.
- Mongelard F., Labrador M., Baxter E.M., Gerasimova, T.I. and Corces V.G. (2002). *Trans*-splicing as a novel mechanism to explain interallelic complementation in *Drosophila*. *Genetics* 160: 1481-1487.

Nakaseko Y., Kinoshita N. and Yanagida M. (1987). A novel sequence common to the centromere regions of *Schizosaccharomyces pombe* chromosomes. *Nucleic Acids Research* 15(12): 4705-4715.

Nègre N., Brown C.D., Shah P.K., Kheradpour P., Morrison C.A., Henikoff J.G., Feng X., Ahmad K., Russell S., White A.H., Stein L., Henikoff S., Kellis M. and White K.P. (2010). A comprehensive map of insulator elements for the *Drosophila* genome. *PLOS Genetics* 6: 1-13

Pai C-Y., Lei E.P. Gosh D. and Corces V.G. (2004). The centrosomal protein CP190 is a component of the *gypsy* chromatin insulator. *Molecular Cell* 16: 737-748.

Pardue M.L. and DeBaryshe P.G. (2003). Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres .
Review *Annual Review of Genetics* 37: 485-511.

Pardue M.L., Rashkova S., Casacuberta E., DeBaryshe P.G., George J.A. and Traverse K.L. (2005). Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*.
Chromosome Research 13(5): 443-453.

Pardue M.L. and DeBaryshe P.G. (2008). Origin and Evolution of Telomeres - Chapter2
Drosophila Telomeres: A variation on the telomerase theme. edited by Jozef Nosek and L'ubomír Tomáška. *Landes Bioscience*.

Park P.J. (2009). ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology.
Nature Reviews 10: 669-680.

Perron K., Goldschmidt-Clermont M. and Rochaix J.D. (2004). A multiprotein complex involved in chloroplast group II intron splicing. *RNA* 10: 704-711.

Prioleau M.N., Nony P., Simpson M. and Felsenfeld G. (1999). An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken β -globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. *EMBO* 18(14): 4035-4048.

Read D., Butte M.J., Dernburg A.F., Frasch M. and Kornberg T. (2000). Functional studies of the BTB domain in the *Drosophila* GAGA and Mod(mdg4) proteins.
Nucleic Acids Research 28: 3864-3870.

Rehm Jay E. „Inverse PCR & Sequencing of P Element Insertions for STS Generation“ (BDGP - Berkeley *Drosophila* Genome Project) <http://www.fruitfly.org/>.

Rubin G.M. and Spradling A.C. (1982). Genetic transformation of *Drosophila melanogaster* with transposable element vectors. *Science* 218: 348-353.

Sambrook and Russell (Hrsg), (2001). Molecular cloning: A laboratory manual (third edition), *Cold Spring Harbor Press*.

Schmucker D., Clemens J.C., Shu H., Worby C.A., Xiao J., Muda M., Dixon J.E. and Zipursky S.L. (2000). *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 101: 671-684.

Schotta G. and Reuter G. (2000). Controlled expression of tagged proteins in *Drosophila* using a new modular P-element vector system. *Molecular Genes Genetics* 262(6): 916-920.

Seiki (1990). Amplification of genomic DNA. In JJ White und TJ White, Hg., *PCR Protocols. A guide to methods and applications*, Academic Press.

Silver L.M. and Elgin S.C.R. (1978). Production and characterization of antisera against three individual NHC proteins; a case of a generally distributed NHC protein. *Chromosoma* 68(2): 101-104.

Siriaco G.M., Cenci G., Haoudi A., Champion L.E., Zhou C., Gatti M. and Mason M. (2002). *Telomere elongation (Tel)*, a new Mutation in *Drosophila melanogaster* that produces long telomeres. *Genetics* 160: 235-245.

Simpson A.G.B., Stevens J.R. and Lukeš (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Review *TRENDS in Parasitology* 22: 167-174.

Sullivan W., Ashburner M. and Hawley R.S. (2000). "Drosophila Protocols", *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.

Sutton R.E. and Boothroyd J.C. (1986). Evidence for *trans* Splicing in *Trypanosomes*. *Cell* 47(4): 527 - 535

Thomas S.E., Soltani-Bejnood M., Roth P., Dorn R., Logsdon J.M. Jr. and McKee B.D. (2005). Identification of two proteins required for conjunction and regular segregation of achiasmate homologs in *Drosophila* male meiosis. *Cell* 123: 1-14.

Udvardy A., Maine E. and Schedl P. (1985). The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains. *Journal of Molecular Biology* 185: 341-358.

Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., Li P.W., Mural R.J., Sutton G.G., Smith H.O., Yandell M., Evans C.A., Holt R.A. *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.

Volkmar M. (2010). Analysen zur Transkriptionsregulation und zum *trans*-Spleißen am *mod(mdg4)*-Locus von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik

Wagner E. (2007). Funktionelle Analyse der konservierten FLYWCH-Protein-Domäne des *mod(mdg4)* Locus bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Institutsbereich Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik

Wallace J.A. and Felsenfeld G. (2007). We gather together: Insulators and genome organization. *Current Opinion in Genetics & Development* 17: 400-407.

Watson J.D. and Crick F.H.C. (1953). A structure of Deoxyribose nucleic acids. *Nature* 171: 737.

Xie, H. B. and Golic, K. G. (2004). Gene deletions by ends-in targeting in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 168: 1477-1489.

Zhang X.C. and Gassmann W. (2007). Alternative splicing and mRNA levels of the disease resistance gene *RPS4* are induced during defense responses. *Plant Physiology* 145(4): 1577-87.

Zhimulev I.F., Belayaeva E.S., Makunin I.V., Pirotta V., Semeshin V.F., Alekseyenko A.A., Belyakin S.N., Volkova E.I., Koryakov D.E., Andreyeva E.N., Demakova O.V., Kotlikova I.V., Kolesnikova T.D., Boldyreva L.V. and Nanayev R.A. (2003). Intercalary heterochromatin in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes and problems of genetic silencing. *Genetica* 117: 259-270.

7. Anhang

Tabelle 7.1: Übersicht über Bindungsstellen der untersuchten Mod(mdg4)-EGFP-Isoformen. Dargestellt sind die chromosomalen Regionen (nach Lindsley und Zimm 1992) im Tabellenkopf und die einzelnen Mod(mdg4)-Isoformen in der ersten Spalte. Aus Platzgründen wurde hier auf die vereinfachte Schreibweise der einzelnen Isoformen zurückgegriffen. Die lokalisierten Signale wurden in 3 verschiedene Typen eingeteilt, **fett** - sehr prominente und intensive Signale; ohne besondere Formatierung - reguläre, aber weniger starke Signale; *kursiv und blau* - sehr schwache Signale, nicht in allen Präparaten zu finden, aber trotzdem reproduzierbar.

* Die bereits kartierten Bindestellen der Isoform Mod(mdg4)-58.0 wurden zu vergleichenden Analysen aus Büchner *et al.* (2000) mit herangezogen.

Chromosom X:

	Region	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Isoform	Telomer										
64.2	+			A2, E3,E5	E2/3					E 3/4	
60.1	/	B2, C2		F1					D 1/2		
55.1	/			E 6-8	F5-8	C 3-10				A1-4, F 5-9	<i>A 8-11</i>
53.1	+	<i>A 1-3</i>	C3-5, D3-6		F11-14	<i>D 1-6</i>			<i>A3-5, D6/7</i>		
62.3	+	A 5-8	C 9/10	C9/10, <i>E6/7</i>	<i>F13/14</i>			<i>D 2-6</i>	F 3-8		D 3-8
52.4	/		C 9/10	C11/12, <i>E6/7</i>	C9/10		B 1-4	<i>B6-8</i>			C4-10, <i>F6-11</i>
58.0*	/		<i>B</i>		C	A					
58.8	/							E10/11, F10			<i>A 1/2</i>

Region	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Isoform										
64.2	A4/5									
60.1			<i>C4/5</i>							
55.1			E 4-8	A 7-9		B 7-10	E			
53.1	<i>D 3-11</i>	<i>E 10/11</i>					<i>E 3-9</i>			
62.3		E 3-7	<i>F 1-7</i>	<i>F 1-3</i>		<i>D 3-7</i>	B 3-6	D 9-13		
52.4		A 3-10	B5-9, E3-7		E 3-7					
58.0*					<i>C</i>					20
58.8			<i>E 9-14</i>	A2-4, A8/9			F 1-3	C 1-4	A 4/5	

Chromosom 2L:

	Region	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Isoform	Telomer										
64.2	+						B3-9				F2/3
60.1	/				D1/2		D7/8			B1, F5	
55.1	/		A3		C 3-6	A2/3,E2-4,F3/4		B2/4			B 1/2
53.1	+	D3/4	D5/6				B4-11				F4-6
62.3	+	A1,B3,D3/4					B3/4	C 2/3			B7-12
52.4	+	A2/3,C4-6,F2/3	D5/6		B3	D5-7	B8-11	D3/4			A3-6,D3/4
58.0*	/		C						C		A
58.8	/		A1/2			A5-8,C7-10	D3	C2/3, E	A3-6		C3-9

Region	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Isoform										
64.2										
60.1										
55.1			E4-7		B1-5	F8-11		D4-7		
53.1						F4-6	E1-5			
62.3	F3-5	D3-5, E3-5				A8-14, D3	D4-7	D3-5		
52.4			B3-7,B10,E3-6		B3-5					
58.0*										
58.8			E10/11							

Chromosom 2R:

Region	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Isoform												
64.2										E1-3		
60.1					F3/4					C8/9, D1		
55.1		A1-3				C2-6	F16-18			C14-19	B6-11, F9-12	C2-4
53.1			A3/4			C3-12		D3/4	C4			E7-11
62.3			A1-4,D1-4			E 3-9	F8-10	E6-12	C3		E3/4	
52.4			C3-7			C3/4	A14/15,C5-7		A12/13	D5-7		C8/9,D6-8.F3-11
58.0*		A,E					F	AB,F		A,D	C	
58.8			A3/4,C2-6	A6-8			E1/2		A10-13			

Region	53	54	55	56	57	58	59	60	Region Telomer
Isoform									
64.2									+
60.1					A3/4				/
55.1				C9-11	B3/4	E4-6			/
53.1	C5		B1-3			D4-7	C1-4		+
62.3	A3-5,F11/12	B1-10			C3-7			B3-9,F4,F5	+
52.4	C11-15	C9-12			C7-9		F5-8		/
58.0*	F	A,C	F	E	D		A	A,E,F	/
58.8			F7-12	D	E3-8	B10	B3-7		/

Chromosom 3L:

	Region	61	62	63	64	65	66	67	68
Isoform	Telomer								
64.2	/	C7							
60.1	/	D2/3		C3/4				B2/3,B4/5	
55.1	/	C3/4,C7/8		A1-3		C3-5,D4-6	A14/15	A1/2, F3/4	A1/2
53.1	/	C5/6		B7-11			B3/4,C1/2		
62.3	+	A1,C7/8	B5-7	A4-7,C5/6		C3-5	B3/4		C5-7
52.4	/	A5-6	A3-6,E3-5	B3-6			A7,B10/11,C5	B12/13	B3/4
58.0*	/			B,EF	D,F		A7		C
58.8	/	C4,E3	B4/5,D5/6	A5-7					

Region	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Isoform												
64.2	D1/2										C1/2	
60.1							F3					
55.1		D2-4					D3-6		F1/2		A2/3	
53.1			A1/2	D5-9	E3-6							
62.3			E3-5	D3-10		D3-5	B3-5,C3/4	B9-11,F2/3			F3-6	
52.4			B3-8		D3-7					B3/4	B3,E5-8	
58.0*		F		D		EF	B					
58.8	F	F						B7-11				

Chromosom 3R:

Region	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
Isoform											
64.2											
60.1											
55.1		<i>E8</i>		<i>A4/5 ,D13/14</i>		<i>B4-6,E14/15</i>	<i>C8/9</i>	<i>C2/3</i>	<i>B13-16</i>	<i>B5-8,C2-5</i>	
53.1							<i>A8-10</i>	<i>C5-11</i>			
62.3			<i>A3/4,A7-9</i>		<i>C11-13,D9/10</i>		<i>F3-11</i>		<i>B14/15,E5-9</i>		
52.4		<i>D2/3,D6-8</i>	<i>C3</i>	<i>F3/4</i>	<i>D17-19</i>			<i>A3</i>	<i>B14/15</i>		<i>D3-5</i>
58.0*				<i>A,B,E,F</i>					<i>B</i>	<i>A</i>	
58.8	<i>F4-6</i>				<i>C1/2</i>	<i>C5-7</i>		<i>A6-8</i>			

Region	92	93	94	95	96	97	98	99	100	Region Telomer
Isoform										
64.2										+
60.1			<i>B1/2</i>	<i>A/B</i>						/
55.1		<i>A6/7,B4/5,E3</i>		<i>C5-7</i>	<i>A5-7</i>		<i>D3-7</i>	<i>B6-8,D2-5</i>	<i>B2-4</i>	/
53.1		<i>D3-10</i>			<i>A17-20</i>		<i>F1/2</i>	<i>D6-9</i>		/
62.3	<i>A12-14</i>		<i>E8-13</i>	<i>D10/11,F7</i>	<i>A4-8</i>		<i>A4-8</i>	<i>A9-11,D3-9</i>	<i>B6-9,F5</i>	/
52.4	<i>E10/11,A8/9</i>	<i>D3-5</i>						<i>C2-8</i>	<i>B6/7</i>	/
58.0*		<i>A</i>	<i>A</i>			<i>D</i>		<i>F</i>		/
58.8						<i>B8-10</i>		<i>B11,F4-6</i>	<i>B8/9</i>	/

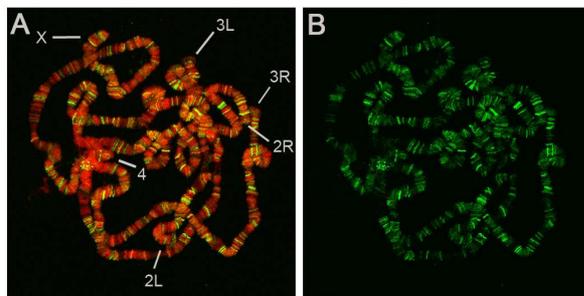
Chromosom 4:

Region	101	102
Isoform		
64.2		
60.1		
55.1		B
53.1		
62.3		
52.4		
58.0*		
58.8		

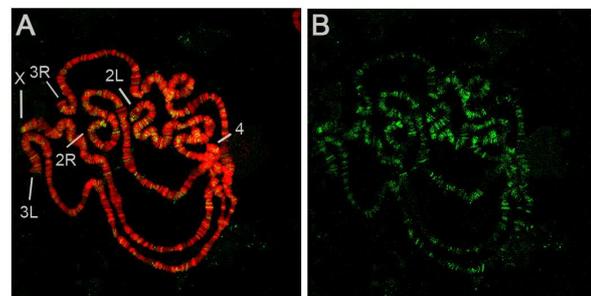
Anzahl der Signale je Chromosom und Summe aller Signale:

X	2L	2R	3L	3R	4	Σ aller Signale
6	2	1	3	0	0	12
5	4	4	5	2	0	20
10	11	10	13	19	1	64
10	6	9	7	6	0	38
14	13	14	16	17	0	74
11	14	13	14	13	0	65
5	3	18	10	10	0	46
9	9	10	8	8	0	44

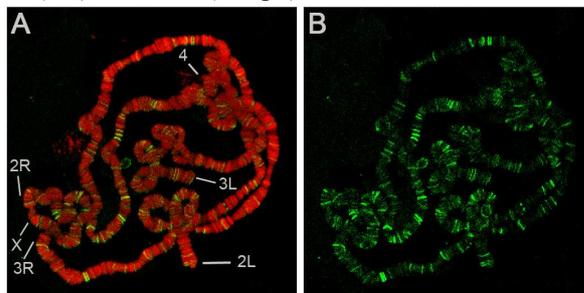
$w^{1118}_{iso};+/T(2;3)26A,mod(mdg4)/+$



$In(3R)89C,mod(mdg4)$ homozygote



$+/T(2;3)26A,mod(mdg4)/$
 $In(3R)89C,mod(mdg4)$



$w^{1118}_{iso};Df(3R)6050/+$

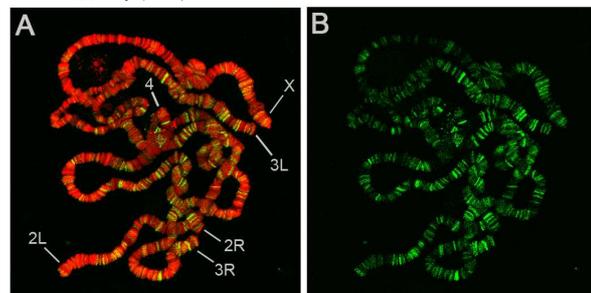


Abbildung 7.1: Übersicht über die Proteinverteilung von Mod(mdg4)-67.2 an präparierten polytären Speicheldrüsenchromosomen der Genotypen: $w^{1118}_{iso};+/T(2;3)26A,mod(mdg4)/+$, $In(3R)89C,mod(mdg4)$ homozygot, $+/T(2;3)26A,mod(mdg4)/In(3R)89C,mod(mdg4)$ und $w^{1118}_{iso};Df(3R)6050/+$. (A) zeigt die Überlagerung von DNA(DAPI)-Färbung (rot) und Antikörperfärbung (grün) - die einzelnen Chromosomenarme sind entsprechend beschriftet. (B) zeigt die Färbung mit dem spezifischen polyklonalen anti-Mod(mdg4)-67.2⁴⁰³⁻⁶¹⁰ Antikörper (grün).

Tabelle 7.2: Übersicht über verwendete Primer für Klonierung und Sequenzierung der verschiedenen Konstrukte, sowie Nachweis und Kontrolle der verwendeten *Drosophila*-Stämme. Die Unterteilung erfolgte in allgemeine Primer mit Bindestellen in *mod(mdg4)*, Primer zur Generierung der EGFP-Fusionskonstrukte, Primer zum Nachweis der verwendeten Deletionen zur Untersuchung der Bindestelle in Region 26B und Primer zur Auswertung der CHIP-Analysen und für semi-quantitative RT-PCR.

genomische <i>mod(mdg4)</i> -Primer		
Name	Sequenz	Bemerkung
93DgemF4	ACCGATTGGTGTATCCGTCTG	
Primer501	CTTCCAAGGCTGTGGTCAAGC	
Pr.330	GCTGCAAATCAAGGGGCTAAC	
mel-402-F	AAGCACCTCCGCAAATGTTATG	
mel-ex2-fwd	TTCTTCCGCAAGATGTTCACTCAGATG	
mel-ex3-rev	TGAATTGGATGAGGTCCTTCAGCG	Analyse 8/6
mel-ex4-fwd	CAAATACGAGCGGTGGCGGAGTGAC	RT-Analysen mod
mel-744	CGCAAATGTTATGGACCCTCTC	
In3rev	GACCGTGTCTGTGCAATTTGTCAGCTC	
PK1-B	GCGGCCGCCGGTCTCGATCTTGTAGCG	Analyse 8/6
PK2-F	GCGGCCGCCGCACTCTTAAACCACACCTATCC	
93D-B34	GCCAGCATCCTCGTTTTTCAGTG	
1297R	GCTTCGGCTTGGGCGTCTGATC	RT-Analyse 67.2
mel-1561-fwd	CGCACACATTGTACCTGACTATCAGATTC	
mel-2002-fwd	CATTTGCAATCTTGGCATTGCACC	R32
mel-2793-rev	GAAGTGTACCAGGCGACGAGATTGC	Analyse 8/6
mel-3652-fwd	TTTCGCGCCCAATACATACAG	
mel-3749-fwd	CACGCGTGCCAGAGAGAGACAACTG	
mel-4580-F	CTGGTGTGCAAAACAAACG	
mel-4637-B	CGCCGCGCTCGAGGAG	
mel-4916-fwd	TATGTGGAGGACGATACTTACG	Klonierung 53.5-EGFP
mel-5126-bck	TTGAGCCTCTGTGTTGCC	Klonierung 53.5-EGFP
mel-7372-rev	CGATGTACTCCTCCAGTTCCTGC	
mel-5562-B	GGTTCGGCTTCACGTTGACATCAG	
mel-6140-fwd	CGAATTAAGGGTGTCTGAAGAATTTACG	
mel-6454-B	CTAAATATCCGGACCAGGCGCG	
mel-6704-fwd	ATTATTTCCAGCTTGTGACGGTGTGTTTG	
mel-7372-fwd	GAGATCTGCACGTGCAACCCA	
mel-8333-rev	CGGCTGGTGGTTATGTAGTCCG	
mel-8365-rev	CGCTGAATGATCTTGTCTATCTTCTC	
mel-11335-fwd	GTGCCGCCACAATGCC	
mel-12514-fwd	CGAGTGTTAACGCAGAGTGGATTCC	
mel-16121-rev	CTGCAGCTCCGAAATTCGTC	
mel-16735-rev	CGCGGTGCGAGGCATCTGC	
mel-16628-rev	GCACAGTGCCGTTGGCCTT	
mel-16840-rev	GGTGTGTAACGTGTGGCAGGG	
mel-17473-rev	TGCAACGCCAGGATCCGATAA	
mel-17694-rev	AGCTGTGTCTATTACCTATGCAGTGCAG	
mel-21518-rev	CTTATGGTAGGTAATGCATGCAACTGG	
mel-22537-rev	GAGCCGTAATTTTCGGCCTTAG	
mel-24386-fwd	AAACAGGCTTAGGATTATTTGCAGAAG	
mel-25187-rev	CGAGAGGCGGACATCGG	
mel-27153-rev	GTCTCCTTTAACATGGTGATGCGTG	
mel-30894-rev	TCAATCTGCAGTACACCAACAACACACAC	

5-HA-1224-F	CAAGCGCTTGCACCCAGGGCTG	HA1224
5-HA-1224-B	GGATGCTCCGCGGGCTTCGGGATGGCAG	
Primer zur Generierung der mod(mdg4)-cDNA-EGFP Fusionskonstrukte		
Name	Sequenz	Bemerkung
EGFP-NotMG	ATAGCGGCCGCTAGCAAGGGCGAGGAGCTG	Klonierung EGFP
EGFP-BaMG	TATGGATCCCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG	Klonierung EGFP
93Dstart-GFP-2	TATGCGGCCGCTCAAAGATGGCGGACGAC	
93Dstart-GFP-2lang	TATGCGGCCGCTCAAAGATGGCGGACGACGAG	
55.7-Stop-GFP	GCGGCCATATTGCGGATAAAAAGCATC	
53.5-Stop-GFP	GCGGCCGCATAATCCTCTTTATGAGGACGAG	
54.6-Stop-GFP	GCGGCCGCTGGATGATTATGCACGCCA	
56.3-Stop-GFP	GCGGCCGCCAAATGGTTGTGAAGCCT	
58.6-Stop-GFP	GCGGCCGCAACGTCGTGAGTAAGTTCATTG	
55.6-Stop-GFP	GCGGCCGCTAGGCGACGCTTCTTTGG	
53.6-Stop-GFP	GCGGCCGCCCTTTCGATCGCCGGAC	
54.7-Stop-GFP	GCGGCCGCGGGATGGTTGTGGAGCCC	
58.0-Stop-GFP	GCGGCCGCTTTCCTCTCTTTATAGGCA	
57.5-Stop-GFP	GCGGCCGCGCATTAGCTTAGCCCTAACAGAA	
67.2-Stop-GFP	GCGGCCGCCCTTCTTCTTGTCTGCAGTGCT	
58.8-Stop-GFP	GCGGCCGCTGTGCTTGTGGCCGGC	
54.2-Stop-GFP	GCGGCCGCTGACGCATCCAGAGATAGGGCC	
Primer zum Nachweis der Deletionen Region 2L 26B		
Name	Sequenz	Bemerkung
CB-6314-F	AAGTAGCGGTACATGTGTG	Df(2L)ED-373
HA-1566-B	ATACTAATACTGGAATTCTGCG	Df(2L)ED-373
SZ-4117-F	AGAGACGCCAATCCTTCG	Df(2L)ED-383
CB-0384-B	CGGATCGAGTATAATGCTGTT	Df(2L)ED-383
CB-0544-F	TTAAGCGGGCTGTGAAA	Df(2L)ED-291
HA-1239-B	AACAACAACCTTATGTGAATCAT	Df(2L)ED-291
HA-1711-F	TTGATTGTGATGCATTGCAC	Df(2L)ED-344
CB-5786-B	GGCATTAACTTTCTAAACTACTC	Df(2L)ED-344 u 7890
HA-5045-F	ATTTCTGACCTGTGCCGACTGAGTTC	Df(2L)ED-7890
weitere Primer		
Name	Sequenz	Bemerkung
pHT4-vorn	ACAAGCGCAGCTGAACAAGC	
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Sequenzierung pGEM-T
pGEMT-AR	AATACTCAAGCTATGCATCC	Sequenzierung pGEM-T
tin38rev	GACCGTGTCTGCAATTTGTCAGCTC	
tin386rev	CGAAAATGGAGTGGTGTTCAG	
MGal4-F	GAATAAAGATGCCGTACAGATAGATTGG	
MGal4-B	GTATTCTGAGAAAGCTGGATGGATCGACC	
FRT-F	CTATTCCGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAG	
FRT-B	CTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAG	
1896	CGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATCATG	
anti1896	CATGATGAAATAACATAAGGTGGTCCCCTCG	
CB-0716-F	CCAAGAAACAACGCAAGTACC	Nachweis T(2;3)
CB-0716-B	CAGGTTAGCCAGCTCGGTG	Nachweis T(2;3)
EGFP72-fwd	GACGTAAACGGCCACAGT	
EGFP660-rev	GATCGCGCTTCTCGTTG	

EGFP-hs-back	CTTGTGGCCGTTTACGTC	
rp49-RT-F	GATGACCATCCGCCAGCATAC	
rp49-RT-B	AGTAAACGCGGTTCTGCATGAGC	
CB-5827-F	ACAGTTGCTGGTGGGGCAGG	Nachweis ln(3R)mod(mdg4), 94C
CB-5827-B	TGTTATATCGGGCATGTAACAACG	Nachweis ln(3R)mod(mdg4), 94C
5'P fwd1	ACCCACTTTAATGATTGCGAG	inverse PCR
5'P fwd2	ACCAGTGGGAGTACACAAACA	inverse PCR
5'P rev1	TTTACTCCAGTCACAGCTTTG	inverse PCR
5'P rev2	CACACAACCTTTCCTCTCAAC	inverse PCR
3'P fwd1	ATACTATTCCTTCACTCGCAC	inverse PCR
3'P fwd2	GCATACGTTAAGTGGATGTCTC	inverse PCR
3'P rev1	TGTCGTATTGAGTCTGAGTGAG	inverse PCR
3'P rev2	TGATTAACCCCTTAGCATGTCCG	inverse PCR
Primer für (halb-)quantitative RT-PCR bzw. ChIP-Analysen		
Name	Sequenz	Bemerkung
CopRNA_Fwd	GCTCTTTTAGCCGAGCAAGATGTG	Copia
CopRNA_Rev	CCCTTGAATATTTTCTTTGGTTTAGTTACC	
Gy-env-fwd	TAAAGGTTGTGGCGGGTACTCCC	Gypsy-env
Gy-env-rev	CTTCAAGTCGGCATGATCAAGAATTGT	Gypsy-env
Gyp-pol-fwd	AAGAACACGAATGCCAAGATAAAGA	
Gyp-pol-rev	GAGATTTGCTTCGAAAGAGCACCA	
Gyp-5'UTR-fwd	GACTTGTGGCGGCGCGATG	Gypsy 5'UTR
Gyp-5'UTR-rev	GGTTCAGATTGTTGGTTGGGCG	Gypsy 5'UTR
Gyp-gag-fwd	GCGGGTACAGAGTTGCAGGTGG	Gypsy-gag
Gyp-gag-rev	CAGCGTTAAGCAGGTCAGCACCC	
Gyp-1524-rev	ATGTTTTGTCCGAGTACGTGC	Gypsy-gag
Gyp-3'UTR-fwd	GCTCCACGCGAAGAATGCCTG	Gypsy 3'UTR
Gyp-3'UTR-rev	TTTCGCTGAGGTTTCGCTTAGACACTGT	Gypsy 3'UTR
Gyp-2648-fwd	GATATTGTTGTACCTGACTCCG	Gypsy-pol
Gyp-2958-rev	TCCTAAAGTCAATGACCAACC	Gypsy-pol
Rov_gag_fwd	ATGGCAACAGCAAGCCCTATAACTATC	Rover
Rov_gag_rev	GTTCCGAAAATCCTCCAAAAGTTGAT	
ROV_POL_Bisulf-F	GATTGGACGCAAATTGTTGT	
ROV_POL_Bisulf-B	GAAGTAGGTTATTCATGCAG	
Inv4pp2Fwd	GATTGGCCAAGACATATTAGAGCTTGG	Invader
Inv4pp2Rev	GCATGTTTTCTTGTGTTGACGCTC	
Inv4-5LTR-fwd	GACTCTTCGCATTCCAGAAATTCCTTC	
Inv4-5LTR-rev	AGTCTCATCCATATTATTTATTCACCTTCGCG	
Inv4-442-fwd	AACCATGCACGCACCGAGAGC	
Inv4-773-rev	CGACTTCCATACTGGGCAAAGCTCTC	
Inv4-3LTR-fwd	CGACTCTTCGCATTCCAGAAATTC	
Inv4-3LTR-rev	GAGTCTCATCCATATTATTTATTCACCTTCGCG	
HeT 128 fwd	GCCAAAGACTCTCACGCGCATAAC	HeT-A
HeT 309 rev	TGTTTATGGCGGCAGCTTGTCG	
HeT 286 fwd	AACCGACAAGCTGCCGCCATAAC	HeT-A 5'UTR
HeT 483 rev	CGCGTGGAGTATTATGTAGATTTAGCG	HeT-A 5'UTR
HeT 1900 fwd	CCATGACGACTCCTCTGTCACGATG	HeT-A 3'UTR
HeT 2103 rev	CGCCGAGTCGTTTGGTGAGTATC	HeT-A 3'UTR
hetA_864_fwd	TCTACCTCAATATATCGCCCATGTCCC	HeT-A CDS
HetA_492-rev	CGGCCGGAGACAATTTTTAAACTTTTA	
hetA_1007-rev	GCAGTAGTATTGGTGAGTGAGAGGGGG	
hetA_1241_rev	GGAAACTTCCCATTCATCGCTC	HeT-A CDS

hetA_2798_fwd	GGGCAGCATATTAGCGCGTACAAAGG	FISH-Sonde
hetA_2937-rev	CCTGGCGAGCTTCGGCAATTG	
hetA_3292_rev	GGTGCCCTTCTCAGATTCTGGTTCG	FISH-Sonde
Het-A_3574-fwd	ACCGTCATCACCTTCCTCG	HeT-A 3'UTR Mix1
Het-A_3993-rev	CCGCACGAGGTGTCCTG	HeT-A 3'UTR Mix1
HeT-A_4202-fwd	GCCTCCTGATGCCACTGC	HeT-A 3'UTR Mix2
HeT-A_4479-rev	TTGCAAGGCCCGTCTCC	HeT-A 3'UTR Mix2
HeT-A_5662-fwd	GCCTGCAACATGCCCC	HeT-A 3'UTR Mix3
HeT-A_5938-rev	TGCATGGGGTGAGTTTGG	HeT-A 3'UTR Mix3
HetA_6058-fwd	TCCGTACCTCCACCAGCAAAGTTAAA	
R2-1162-fwd	GCCTAGCCCAAGCTCTTGCAAGT	R2
R2-1438-rev	CTGATATTGGACGAAAGTCTTGCGGTC	
R2-1143-fwd	TAGCCCAAGCTCTTGCAAGT	R2-Mix
R2-1433-rev	TTGACGAAAGACTTGCGG	R2-Mix
Frog-61-fwd	GCTTCTCTTGCTCTCATTTGCCACTC	Frogger
Frog-293-rev	TTTTGGTTACTTCACTTTGATCACTTCACG	
Frog-1339-fwd	GACATAGAAGACATCAAAGGGAGCATAGC	
Frog-1712-rev	GCTGCTTCGTCTTCGTGGTGAGG	
Sat-rt-Fwd	ATAGGGATCGTTAGCACTGG	Kontrolle
Sat-rt-Rev	ATTTTATTACGAGCTCAGTGAG	Kontrolle
CG40006-1Fwd	TAACCAATGCCAACGC	Kontrolle Satellit
CG40006-1Rev	TCACGACAATTCCCAGAC	Kontrolle Satellit
tub56Dfor	GATGCCGGGACTCAAAAAGACCAC	Kontrolle Tubulin
tub56Drev	ATGAGGGAATCGTTCACATCC	Kontrolle Tubulin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Die Arbeit wurde selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den

Danksagung

Dr. Rainer Dorn danke ich für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas, die ständige Diskussionsbereitschaft sowie die Hilfe bei umfassenden Kreuzungen und den kritischen Hinweisen bei der Abfassung des Manuskriptes.

Bei Prof. Dr. Gunter Reuter bedanke ich mich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Arbeitsgruppe *Drosophila*-Genetik am Institut für Genetik der Martin-Luther-Universität anzufertigen ebenso wie den zahlreichen kritischen Fragen und Ideen zu verschiedenen Experimenten.

Michael Volkmar danke ich für die vielen, sehr ertragreichen und motivierenden spät-abendlichen Diskussionen und die zahlreichen Ideen und Hinweise zur Durchführung der molekularen Arbeiten, darüber hinaus aber auch für die sehr gute Zusammenarbeit, Hilfen bei vielerlei Fragen und den kraft-schöpfenden Kaffeepausen.

Bei Eugenia Wagner, Sandra Brückner und den Praktikanten des Labors R. Dorn bedanke ich mich für die Hilfe bei den Experimenten und immunzytologischen Analysen.

Sandy Mietzsch danke ich für die vielen fruchtbaren Gespräche, zahlreiche Ideen zur Durchführung der genetischen und zytologischen Analysen und den gemeinsamen sportlichen Aktivitäten zu Belebung des Geistes.

Maria Kube, Melanie Klimm und allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik danke ich für den freundlichen Umgang und das sehr angenehme Arbeitsklima der Abteilung.

Uneingeschränkter Rückhalt und Beistand habe ich während der ganzen Zeit von meinen Eltern, meiner Schwester nebst Familie sowie zu guter Letzt vom Jan und seiner Familie erfahren - dafür gilt ein ganz besonderer Dank!

Publikationsliste

Gabler M, Volkmar M, Weinlich S, Herbst A, Dobberthien P, Sklarss S, Fanti L, Pimpinelli S, Kress H, Reuter G, Dorn R.

Trans-splicing of the *mod(mdg4)* complex locus is conserved between the distantly related species *Drosophila melanogaster* and *D. virilis*.

Genetics. 2005 Feb 169(2): 723-36.

Poster (Co-Autorenschaft)

Volkmar M, Doerfel A, Gabler M, Penzel A, Dorn R

Genetic Dissection of the Complex Locus *modifier of mdg4* in *Drosophila melanogaster*.

(präsentiert durch Dr. Rainer Dorn während der „8th International Conference on Drosophila Heterochromatin“ 3.-9. Juni 2007 in Gubbio, Italien)

Volkmar M, Gabler M, Doerfel A and Dorn R

The *Drosophila melanogaster* locus *mod(mdg4)* is not dependent on close proximity of its coding units.

(präsentiert durch Michael Volkmar während der „20th European Drosophila Research Conference“ 12.-14. September 2007 in Wien)

Lebenslauf

persönliche Angaben

Geburtsdatum	14. Juni 1977
Geburtsort	Neubrandenburg / Mecklenburg Vorpommern
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	in Lebenspartnerschaft

Hochschulbildung

2003 - 2009 Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Fachbereich Biologie / Genetik
„Funktionelle Analyse des komplexen Locus *mod(mdg4)* bei *Drosophila melanogaster*“

1998 - 2003: Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Fachbereich Biochemie / Biotechnologie
Abschluss: Diplom-Biochemikerin

Schulbildung / Ausbildung

1996 - 1998: Berufsfachschule der Berufsbildenden Schulen
Weißenfels / Burgenlandkreis
Abschluss: Staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin

1990 - 1996 Gymnasium Weißenfels West
Abschluss: Abitur

1984 - 1990: POS Otto-Müller Leißling

Halle (Saale), den