# Epigenetische Kontrolle meiotischer Rekombination und Kartierung neuer *Su(var)*-Gene in *Drosophila melanogaster*

### Dissertation

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

vorgelegt dem

# Institut für Biologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Kathleen Gebhardt, geb. Heidrich geb. am 17.08.1981 in Halle

Gutachter: 1. Prof. Dr. Gunter Reuter

2. Prof. Dr. Klaus Humbeck

3. Prof. Dr. Gunnar Schotta

Halle (Saale), den 11.12. 2012

## Abkürzungsverzeichnis

ac	Acetylierung
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
cDNA	doppelsträngige DNA-Kopie der mRNA
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
EM	Elektronen Mikroskop
EMS	Ethylmethansulfonat
E(var)	Enhancer of Variegation
GSC	ovarian germ line stem cell
HDAC	Histondeacetylase
H3K4	Lysin 4 von Histon H3
H3K9	Lysin 9 von Histon H3
H3K27	Lysin 27 von Histon H3
H4K20	Lysin 20 von Histon H4
KMTase	Histonmethyltransferase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LSM	Laser Scanning Mikroscope
me	Methylierung
NP40	Nonident P40
р	Phosphorylierung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline + 0.2% Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEV	Positionseffekt-Variegation
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
SET	Su(var)3-9 / Enhancer of zeste / Trithorax
SDS	Natriumdodecylsulfat
Su	Suppressor
Su+	Suppressor-positiv
Su(var)	Suppressor of Variegation
TRiP	Transgenic RNAi Projekt
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UAS	Upstream Activating Sequence
VALIUM	Vermillion-AttB-Loxp-Intron-UAS-MCS
X-Gal	$5\text{-}Bromo\text{-}4\text{-}chloro\text{-}3\text{-}indoxyl\text{-}\beta\text{-}D\text{-}galactosid$

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitu	ing	1
2	Materia	al und Methoden	10
2	2.1 Ge	netische Methoden	10
	2.1.1	Anzucht von Drosophila melanogaster	10
	2.1.2	Crossoveranalysen mit zwei in <i>trans</i> befindlichen <i>RSw</i> <sup>+</sup> -Insertioner	1 10
	2.1.3	Crossoveranalysen und SNP-Kartierung von Crossoverereignissen	10
	2.1.4	Duplikationskartierung von Su(var)2-8, Su(var)2-12 und Su(var)2-	<i>13</i> .11
	2.1.5	Klassifizierung in Su und Su+ Crossoverchromosomen	12
	2.1.6	Fosmidkartierung von Su(var)2-8, Su(var)2-12 und Su(var)2-13	13
	2.1.7	Herstellung transgener Drosophila-Linien	14
	2.1.8	RNAi vermittelter Genknockdown und dessen Einfluss auf die whit	e-
		Variegation in $In(1)w^{m4h}$	15
2	2.2 Mo	olekularbiologische Methoden	16
	2.2.1	Verwendete Bakterienstämme und Vektoren	16
	2.2.2	Isolation von DNA und RNA aus Drosophila melanogaster	16
	2.2.3	Molekularbiologische Standardmethoden	17
	2.2.4	Inverse PCR	17
2	2.3 Im	munzytologische Methoden	18
	2.3.1	Immunmarkierung von synaptonemalen Komplexen	18
	2.3.2	Immunmarkierung von Ovarien	19
2	2.4 Pro	oteinbiochemische Methoden	20
	2.4.1	Herstellung eines polyklonalen C(3)G Antikörpers	20
	2.4.2	Nachweis des C(3)G Antikörpertiters im Dot-Blot	20
	2.4.3	Gelelektrophorese des aufgereinigten C(3)G Antikörpers	20
2	2.5 Ge	nerierung von Fusionsproteinen in genomischen Drosophila	
	me	lanogaster Fosmid-Klonen mittels Rekombination	21
	2.5.1	Herstellung der Tagging-Kassette	21
	2.5.2	Transformation des Helper Plasmid pRedFlp4	22
	2.5.3	Herstellung elektrokompetenter Zellen	22
	2.5.4	Tagging durch Red/ET Rekombination	23
	2.5.5	Entfernung der Kanamycinkassette	23
	2.5.6	Entfernung des pRedFlp4 Plasmid	23

	2.6 Ele	ektronenmikroskopie synaptonemaler Komplexe	25
	2.6.1	Präparation von Drosphila-Ovarien für EM-Analysen	25
	2.6.2	Schneiden, Färben und elektronenmikroskopische Aufnahme	25
3	Ergebn	isse	27
	3.1 Ep	igentische Kontrolle meiotischer Rekombination in Drosophila	
	me	lanogaster	27
	3.1.1	Crossoveranalysen entlang der genomischen Sequenz von Drosophie	la
		offenbaren Regionen mit erhöhter und reduzierter Crossoverfrequen	z27
	3.1.2	Effekte von PEV-Suppressormutationen auf die Crossoverfrequenz i	in
		Region 21B4-21E2 und 37B9-42A2	30
	3.1.3	Hochauflösende Crossoverkartierung in drei genomischen Regionen	
		identifiziert "hot" und "cold" Spots für Crossover	34
	3.1.4	Epigenetische Faktoren beeinflussen die Crossoververteilung in Reg	ion
		21B4-21E2	39
	3.2 Ep	igenetische Kontrolle der Chromatinorganisation an frühen	
	syı	naptonemalen Komplexen	41
	3.2.1	Das Chromatin von frühen synaptonemalen Komplexen zeigt einen	
		heterochromatischen Charakter	41
	3.2.2	HP1α, SU(VAR)2-1 und SU(VAR)3-3 zeigen eine abundante	
		Assoziation mit dem Chromatin am synaptonemalen Komplex	44
	3.2.3	Fosmid-Transgene zur kontrollierten Expression von Fusionsprotein	en
		für Chromatinfaktoren	45
	3.2.4	Generierung eines polyklonalen C(3)G Antikörpers für	
		immunzytologische Analysen	47
	3.2.5	Die Nullmutation von dSetDB1 reduziert H3K9me3 an frühen	
		synaptonemalen Komplexen	49
	3.2.6	Überexpression von $E(z)$ führt zu einer kompakten Chromatinstruktu	ır
		am synaptonemalen Komplex	50
	3.2.7	Die globale Chromatinorganisation der taiman-Mutation ist am	
		synaptonemalen Komplex dekondensiert	52
	Identifi	zierung neuer <i>Su(var)-</i> Mutationen	54
	3.3 Seq	uenzierung von Mutantenlinien zur Identifizierung des mutierten	Gens
	-	-	54
	3.3.1	Identifizierung von Su(var)3-4	54

3.3	3.2	Sequenzierung neuer Su(var)Ubc9-Allele	59
3.4	Ka	rtierung der <i>Su(var)2-8-</i> Mutation	61
3.	4.1	Duplikationskartierung von Su(var)2-8 in Region 21E2 zwischen	
		den RS-Insertionen 5-SZ-3596 und CB-5353-3	61
3.	4.2	Hochauflösende SNP-Crossoverkartierung identifiziert elf	
		Kandidatengene für Su(var)2-8	63
3.4	1.3	Das pFlyFos028731 Transgen rettet den Suppressorphänotyp von	
		Su(var)2-8	66
3.4	1.4	Sequenzierung der Su(var)2-8-Kandidatengene	67
3.4	1.5	Keines der Su(var)2-8-Kandidatengene zeigt eine	
		Expressionsreduktion	68
3.4	1.6	Einfluss von Rescuekonstrukten auf den Suppressoreffekt von	
		$Su(var)$ 2-8 im $In(1)w^{m4h}$ -System	69
3.4	I.7	Der RNAi vermittelte Knockdown von CG2807 führt zu Letalität	. 70
3.4	1.8	Welches der fünf Kandidatengene kodiert für Su(var)2-8?	. 72
3.5	Kart	tierung der <i>Su(var)2-12-</i> Mutation	75
3.	5.1	Duplikationskartierung von Su(var)2-12 in Region 23C5 zwischen der	n
		RS-Insertionen CB-0114-3 und 5-HA-2004	75
3.5	5.2	Crossoverkartierung von Su(var)2-12	76
3.5	5.3	Der Su(var)2-12-Locus liegt zwischen pFlyFos029639 und	
		pFlyFos028970	77
3.5	5.4	Sequenzierung der Su(var)2-12-Kandidatengene	79
3.5	5.5	Expressionsanalysen der Su(var)2-12-Kandidatengene	80
3.5	5.6	RNAi vermittelter Knockdown von CG3605 führt zu Letalität	81
3.5	5.7	Welches Gen kodiert für Su(var)2-12?	81
3.6	Kart	tierung von <i>Su(var)2-13</i>	82
3.	6.1	Duplikationskartierung von Su(var)2-13 in Region 31B1-31F4	
		zwischen den RS-Insertionen 5-HA-1257 und 5-HA-1552	82
3.6	5.2	Hochauflösende SNP-Crossoverkartierung verkleinert den genomisch	ien
		Bereich von Su(var)2-13 auf sieben Gene	83
3.6	5.3	Fosmidkartierung grenzt den Su(var)2-13-Locus auf drei Gene ein	86
3.6	5.4	Sequenzierung der Su(var)2-13-Kandidatengene	86
3.6	5.5	CG31720 zeigt keinen Spleißdefekt	88
3.6	5.6	Su(var)2-13 ist offenbar ein besonderes Allel von Su(var)2-1	89

4	Dis	skussion	91	
	4.1	Das mit dem synaptonemalen Komplex assoziierte Chromatin zeigt abu	ndant	
		eine heterochromatische Modifizierung	92	
<b>4.2</b> dSETDB1		dSETDB1 kontrolliert H3K9me3 an frühen synaptonemalen Komplexen	194	
4.3 Epiger		Epigenetische Faktoren beeinflussen die Crossoverfrequenz über die		
		Modifikation der Chromatinstruktur	96	
	4.4	Die Verteilung von Crossover wird epigenetisch kontrolliert	99	
	4.5	Die Suppressormutation Su(var)2-2, Su(var)2-23 und Su(var)2-26 betre	ffen	
		Punktmutationen in Ubc9-Gen	102	
	4.6	Entwicklung einer neuen Kartierungsmethode zur Identifizierung von		
PEV-Suppressorgenen				
4.7 Der <i>Su(var)2-8</i> -Locus liegt in unmittelbarer Nähe von der				
		5-SZ-3596-Insertion	104	
4.8 4.9		CG17258  kodiert für  Su(var)2-12106 $Su(var)2-13  ist ein besonderes Allel von  Su(var)2-1108$		
5	5 Zusammenfassung			
6	Lit	eratur	112	
7	An	hang	A1	
	7.1	Primerliste	A1	
	7.2	Hochauflösende SNP-Crossoveranalysen	A11	
	7.2	.1 Region 21B4-21E2	A11	
	7.2	.2 Region 21E2-21E3	A16	
	7.2	.3 Region 21E1-21E2	A21	
	7.2	.4 Region 22A5-23C5	A22	
	7.2	.5 Region 23B8-23C5	A24	
	7.2	.6 Region 30E4-31B1	A25	
	7.2	.7 Region 30E4-31D7	A27	
	7.3	Kartierung von <i>Su(var)3-4</i>	A28	

#### 1. Einleitung

Eine Grundeigenschaft lebender Organismen ist die Reproduktion. Im Fall einer ungeschlechtlichen Fortpflanzung entstehen durch mitotische Teilung einer Ursprungsgeneration genetisch weitgehend identische Nachkommen. Dagegen wird bei der geschlechtlichen Fortpflanzung durch Neukombination verschiedener Genome die genetische Vielfalt vergrößert, wodurch diese Organismen besser und schneller an sich verändernde Umweltbedingungen angepasst sind. Die Neukombination ursprünglich väterlicher und mütterlicher Gene wird über den Prozess der homologen Rekombination während der Meiose vermittelt. Die Meiose ist eine spezielle Form der Zellteilung, bei der nach Replikation der DNA zwei Teilungsphasen stattfinden und somit aus einer diploiden Keimzelle vier haploide Gameten gebildet werden. Auf Grund der weitreichenden genetischen Konsequenz liegt ein besonderer Fokus auf der Erforschung homologer Rekombinationsmechanismen. Der Modelorganismus Drosophila melanogaster weist in diesem Zusammenhang eine Besonderheit auf, da homologe Rekombination nur in den Drosophila-Weibchen stattfindet (Morgan, 1914). Des Weiteren ist für Drosophila melanogaster, aber auch für Caenorhabditis elegans, die Existenz von Crossoverhotspots fraglich (Hey, 2004). Lediglich für Drosophila pseudoobscura konnten Variationen der Rekombinationsrate innerhalb großer Regionen gezeigt werden (Cirulli et al., 2007). Dem gegenüber wurden für Homo sapiens oder Saccharomyces cerevisiae "hot" Spots der Rekombination mit einer tausendfach erhöhten Crossoverrate und einer Größe von nur 1-2kb identifiziert (Lichten und Goldman, 1995). Weil die "hot" Spots vor allem in genreichen Regionen wie dem HLA Lokus auf Chromosom 6 bei Homo sapiens liegen (Jeffreys et al., 2001), führte dies zu der Theorie, dass Rekombinationsereignisse auftreten, um neue Genkombinationen zu erlangen (Barton und Charlsworth, 1998). Für Drosophila scheint diese Überlegung nicht zuzutreffen. Trotz der Etablierung einer umfangreichen genetischen Karte konnte bisher kein "hot" Spot für Rekombination identifiziert werden. Mit den Kreuzungsexperimenten wurde jedoch festgestellt, dass Temperatur oder Alter der Weibchen die Crossoverfrequenz in spezifischen Genombereichen beeinflussen können (Plough, 1917; Bridges, 1927; Westphal und Reuter, 2002).

Ein weiterer regulatorischer Aspekt meiotischer Rekombinationsprozesse ist das Chromatin, das aus DNA, RNAs und Proteinen besteht. Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Nukleosom (Kornberg, 1974), bei dem je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 zu einem Histon-Oktamer assemblieren, um das die DNA mit 146bp gewunden ist (Luger et al., 1997). Ein höherer Verpackungsgrad wird über das Linkerhiston H1 vermittelt, das die Nukleosomen zu einer 30nm Faser organisiert (Thoma et al., 1979). Über weitere Nichthistonproteine wird das Chromatin dichter verpackt und erreicht im Metaphasenchromosom seinen höchsten Kondensationszustand.

Funktionell wird Chromatin in das transkriptionskompetente Euchromatin und in Heterochromatin unterschieden. Das Heterochromatin lässt sich wiederum in fakultativ und konstitutiv differenzieren (Gatti und Pimpinelli, 1992). Fakultatives Heterochromatin umfasst die Bereiche des Genoms, die entwicklungsspezifisch in einem heterochromatischen Zustand vorliegen. Konstitutives Heterochromatin wird kaum exprimiert und umfasst die repetitiven DNA-Sequenzen der perizentromeren und telomeren Chromosomenregionen (Lohe et al., 1993).

Die Organisation eukaryotischer Chromatinstrukturen wird vornehmlich über Histone vermittelt. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie zeichnen sich durch einen hohen Anteil basischer Aminosäuren aus, die eine neutralisierende Wirkung auf die negativ geladene DNA haben. Die N-terminalen Enden der verschiedenen Histonproteine sind flexibel und ragen aus der Nukleosomstruktur heraus (Luger et al., 1997). Damit bieten diese eine Angriffsfläche für kovalente, posttranslationale Modifikationen. Diese umfassen die Acetylierung von Lysinen (Grunstein, 1997), die Methylierung von Lysinen und Argeninen (Allfrey et al., 1964) und die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen (Nowak et al., 2004). Weitere Histonmodifikationen sind Ubiquitinierung (Davie et al., 1990), ADP-Ribosylierung (Adamietz et al., 1984), Sumoylierung (Nathan et al., 2003), Carbonylierung (Wondrak et al., 2000) und Glycosylierung (Liebich et al., 1993). Bisher wurden elf verschiedene posttranslationale Modifikationen für über 60 verschiedene Aminosäurereste an den Histonen beschrieben (Martin und Zhang, 2007; Ruthenburg et al., 2007). Dieses Repertoire wurde durch die Identifizierung von 67 bisher unbekannten Histonmodifikationen weiter erhöht (Tan et al., 2011). Das Ausmaß und die Kombination verschieden modifizierter Nukleosomen bestimmt den Status des Chromatins und kontrolliert damit die Genexpression (Strahl und Allis, 2000; Jenuwein Chromatinzustand und Allis. 2001). Demnach ist ein durch spezifische Histonmodifikationen gekennzeichnet. Die Aufklärung dieser Muster wird parallel in mehreren Modellorganismen untersucht, wobei vor allem in Drosophila melanogaster erste grundlegende Erkenntnisse zur Identifizierung chromatinspezifischer

Histonmodifikationen gewonnen wurden. So ist transkriptionsaktives Chromatin durch alle Methylierungsstufen von Lysin 4 des Histon H3 (H3K4) und H3K36 sowie eine H3K9-Acetylierung gekennzeichnet (Ebert et al., 2006; Nowak et al., 2004). Das Heterochromatin von *Drosophila* ist durch die Methylierung von H3K27, H3K9 und H4K20 gekennzeichnet (Schotta et al. 2002; Schotta et al., 2004; Ebert et al. 2004).

Heterochromatin hat als ein regulatorischer Aspekt meiotischer Rekombinationsprozesse einen negativen Effekt auf Crossover (Baker, 1958), wodurch eine signifikante Reduktion von Rekombinationsereignissen vor allem in heterochromatischen Bereichen stattfindet (Mather, 1939; Roberts, 1965; Carpenter und Baker, 1982). Somit sollten Faktoren, die die Chromatinstruktur beeinflussen, folglich auch die Crossoverfrequenz verändern. Diese Faktoren können bei Drosophila melanogaster durch das System der Positionseffekt-Variegation (PEV) identifiziert werden. PEV resultiert aus einer Verlagerung euchromatischer Chromosomenregionen an perizentrisches Heterochromatin. In Folge einer variablen Heterochromatisierung kommt es zu einer variegierten Expression der dem Heterochromatin benachbarten euchromatischen Gene. Im speziellen Fall der Chromosomenumlagerung  $In(1)w^{m4}$  (Muller, 1930) liegt das white (w) Gen durch eine X-chromosomale Inversion in der Nähe des perizentrischen Heterochromatins (Tartof et al., 1984). Der daraus resultierende, mosaikartige Augenphänotyp wird als white-mottled bezeichnet. Weil die Lage am Heterochromatin die teilweise Inaktivierung des euchromatischen white Gens hervorruft, bietet das  $In(1)w^{m4}$ -Rearrangement die Möglichkeit, Proteine zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Chromatinstruktur haben. Diese PEV-Modifikatoren werden in zwei Klassen unterschieden. Bei den Suppressors of variegation [Su(var)] führt die Mutation einer Genkopie zu einem roten Augenphänotyp. In diesem Fall ist eine strukturelle Komponente des Heterochromatins oder ein regulatorisches Protein, das an der Etablierung von Heterochromatin beteiligt ist, betroffen (Locke et al., 1988). Führt die Mutation einer Genkopie zu einem weißen Augenphänotyp, spricht man von einem Enhancer of variegation [E(var)]. Demnach scheinen E(var) Gene für Proteine zu kodieren, die antagonistisch auf eine Heterochromatisierung euchromatischer Gene bei PEV wirken oder für die Etablierung eines euchromatischen Chromatinzustandes essentiell sind (Locke et al., 1988).

Mehrere selektive genetische *Screens* isolierten im  $In(1)w^{m4}$ -Rearrangement mehr als 380 PEV modifizierende Mutationen, die durch EMS-Behandlung oder Röntgenstrahlen induziert wurden (Reuter und Wolf, 1981; Reuter, 1984; Reuter und Spierer, 1992;

Reuter, persönliche Mitteilung). Von den 229 ausschließlich im 2. und 3. Chromosom lokalisierten Suppressoren konnten bisher 127 Mutationen als Allele von zehn Genen identifiziert werden. Dazu zählen die H3K9 spezifische Histonmethyltransferase (KMTase) SU(VAR)3-9 (Rea et al., 2000; Schotta et al., 2002; Ebert et al., 2004), das Zinkfinger Protein SU(VAR)3-7 (Reuter et al. 1990), die H3S10 Kinase Jil1 bzw. SU(VAR)3-1 (Wustmann et al., 1989; Ebert et al., 2004), die H3K4 spezifische Demethylase SU(VAR)3-3 (Rudolph et al., 2007) und die Protein Phosphatase 1 (PP1) SU(VAR)3-6 (Baksa et al., 1993). Weiterhin wurden die Su(var)2-5 Mutationen, die zur Identifizierung von HP1 führten, in unserem Labor isoliert (Eissenberg et al., 1992). Su(var)Ubc9 kodiert für das SUMO konjugierende Enzym Ubc9 (E2) (vorliegende Arbeit), das Gen Su(var)2-1 ist ein genetisch charakterisierter Suppressor für PEV (Walther, unveröffentlicht) und Suv4-20 ist eine H4K20 spezifische KMTase (Schotta et al., 2004; Phalke et al., 2009). Viele dieser Mutationen zeigen einen dominanten Effekt auf die Crossoverfrequenz im perizentrischen Heterochromatin (Westphal und Reuter, 2002). Damit ist die Kontrolle der Chromatinstruktur ein wichtiger regulatorischer Aspekt meiotischer Rekombinationsprozesse, die in einem zeitlich und räumlich spezifischen Rahmen während der Oogenese stattfinden.

Die Oogenese in *Drosophila* unterliegt einer koordinierten Differenzierung von somatischen Zellen und Keimbahnzellen und beginnt mit der asymmetrischen Teilung ovarialer Keimbahnstammzellen (GSC) in der proximalsten Struktur einer Ovariole, dem Germarium (Deng und Lin, 2001). Morphologisch ist das Germarium in vier individuelle Regionen untergliedert, die als Region-1, -2a, -2b und -3 bezeichnet werden (King, 1970). Nach Teilung einer GSC entwickelt sich die posteriore Tochterzelle zum Zystoblast und durchläuft vier synchrone Teilungen ohne vollständige Zytokinese. Der daraus resultierende Verbund von 16 Zellen wird als Zyste bezeichnet (King, 1970), deren Reifung vom anterioren zum posterioren Ende des Germariums verläuft. Sofort nach der letzen prämeiotischen Teilung setzt in zwei Zellen, die als Pro-Oocyten bezeichnet werden, die meiotische Prophase mit der Initiierung einer homologen Rekombination ein (Carpenter, 1979). Die restlichen 14 Zellen verlieren ihren meiotischen Charakter und durchlaufen die Oogenese als Nährzellen.

Die Unterteilung der meiotischen Prophase in verschiedene Stadien erfolgt an Hand der Chromosomenmorphologie. Im Leptotän sind individuelle Chromosomen erkennbar, bei denen Kondensationsvorgänge einsetzen. Die homologen Chromosomen weisen in dieser Phase noch kein *Alignment* auf. Lediglich die Schwesterchromatiden organisieren sich entlang eines Axialelementes (Page und Hawley, 2004). Im darauf folgenden Zygotän beginnt die Paarung der homologen Chromosomen über eine proteinöse Struktur, die als synaptonemaler Komplex bezeichnet wird (Walker und Hawley, 2000). Das Proteinnetzwerk des synaptonemalen Komplexes besteht aus zwei lateralen Elementen, die über transversale Filamente miteinander verbunden sind. Proteine, die am Aufbau der transversalen Filamente beteiligt sind, sind Zip1p in Saccharomyces cerevisiae (Sym et al., 1993), SCP1 in Säugern (Meuwissen et al., 1992) oder SYP-1 und SYP-2 in Caenorhabditis elegans (MacQueen et al., 2002). Diese Proteine bilden über ihre Coiled coil-reiche Domäne Homodimere, die an den N-terminalen Enden miteinander verknüpft sind (Jeffress et al., 2007). Die C-terminale Domäne interagiert mit den Proteinen des lateralen Elementes (Jeffress et al., 2007). In Drosophila melanogaster kodiert das c(3)G Gen (crossover suppressor on <u>3</u> of <u>G</u>owen) für ein Protein des transversalen Filamentes (Page und Hawley, 2001). In homozygoten c(3)GMutanten wird kein synaptonemaler Komplex gebildet (Meyer, 1964; Smith und King, 1968; Rasmussen, 1975). Eine meiotische Rekombination kann sich folglich nicht ereignen (Gowen und Gowen, 1922).

Im Pachytän ist der synaptonemale Komplex vollständig ausgebildet und der Prozess der homologen Rekombination findet statt. Die Initiierung homologer Rekombination erfolgt durch einen DNA-Doppelstrangbruch (DSB) durch das evolutionär konservierte Spo11 Protein. Spo11 wurde zuerst in der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) identifiziert und gehört zu den Typ II Topoisomerasen (Keeney et al., 1997). Spo11 ist vorzugsweise an DNase 1 hypersensitivem Chromatin aktiv, das präferentiell in der 5' nichtkodierenden Region eines Gens nachweisbar ist (Baudat und Nicolas 1997; Wu und Lichten 1994; Gerton et al., 2000). In *Saccharomyces cerevisiae* sind DSB Vorraussetzung für die Assemblierung des synaptonemalen Komplexes (Keeney et al., 1997). Dagegen werden bei *Drosophila melanogaster* erst nach der Paarung der homologen Chromosomen am synaptonemalen Komplex DSB durch das Spo11 Homolog Mei-W68 eingeführt. (McKim und Hayashi-Hagihara 1998; Vasquez et al., 2002).

Ein weiterer Faktor, der die DSB-Formation in *Drosophila* initiiert, ist MEI-P22. Das Protein lokalisiert nach der Bildung des synaptonemalen Komplexes an den meiotischen Chromosomen unabhängig von Mei-W68 (Liu et al., 2002). Deshalb wird postuliert, dass MEI-P22 die zukünftigen DSB-Stellen markiert (McKim et al., 2002). Die Rekrutierung von Mei-P22 zu diesen Stellen wird über das chromatinassozierte Protein Trade Embargo (Trem) vermittelt (Lake et al., 2011). Noch ist ungeklärt, ob Trem über seine fünf Zinkfinger mit Mei-P22 interagiert oder ob Trem eine Chromatinstrukturveränderung herbeiführt, die eine leichtere Assoziation von Mei-P22 an die Bivalente erlaubt (Lake et al., 2011).

In Säugern wurde gezeigt, dass ein DSB-Ereignis mit der Phosphorylierung des H2AX-Austauschhistons korreliert ist (Mahadevaiah et al., 2001). Bei *Drosophila* wird Serin 137 der Histonvariante H2AV an den Stellen eines DSB phosphoryliert (Madigan et al., 2002). Der Antikörper gegen das phosphorylierte Protein ( $\gamma$ -H2AV) erkennt unterscheidbare Foci an den synaptonemalen Komplexen (Jang et al., 2003; Mehrotra und McKim, 2006; Joyce et al., 2011). Dadurch wurden ca. 20 DSB-Ereignisse pro Meiose in *Drosophila* nachgewiesen, von denen sich sechs bis sieben zu einem Crossover entwickeln (Mehrotra und McKim, 2006). Demnach führt die DSB-Reparatur nicht ausschließlich zu Crossover. Der reziproke Austausch von DNA zwischen den gepaarten Nichtschwesterchromatiden (Chiasmabildung) unterstützt jedoch die akkurate Chromosomensegregation in der Meiose I (Hawley, 1988).

Eine weitere Voraussetzung für akkurate Chromosomensegregation während der Meiose ist die Schwesterchromatidenkohäsion (Lee und Orr-Weaver, 2001). Dabei werden die Schwesterchromatiden durch einen Kohäsin-Komplex zusammengehalten, der sich aus zwei SMC- und zwei nicht-SMC-Untereinheiten zusammensetzt (Lee und Orr-Weaver et al., 2001; Petronczki et al., 2003). Die α-Kleisin Untereinheit, in Drosophila von C(2)M kodiert, verbindet das SMC1-SMC3 Dimer. Dadurch wird ein Ring geformt, der die DNA der Schwesterchromatiden umhüllt (Schleiffer et al., 2003, Nasmyth et al., 2002; Shintomi und Hirano, 2007). Für die Assemblierung des die synaptonemalen Komplexes ist Zusammenlagerung der meiotischen Schwesterchromatiden ebenfalls wichtig (Klein et al., 1999; Pasierbeck et al., 2001). Durch deren Längsachsenverkürzung während der meiotischen Prophase I werden zentrale Bereiche in den Chromosomen gebildet, an denen die Axial/Lateral-Elemente des synaptonemalen Komplexes ansetzen (Revenkova und Jessberger, 2006; Stack und Anderson, 2001). Die Bildung dieser zentralen Chromsosomenbereiche ist von C(2)M abhängig (Khetani und Bickel, 2007). Somit führt eine c(2)M Mutation zu einer starken Reduktion von Crossover, obwohl die y-H2AV Färbung eine normale Verteilung von DSB nachweist (Mehrotra und McKim, 2006).

Mutationen in DSB-Reparaturgenen wie *spn-A*, das Rad51 Homologe von *Drosophila*, führen zu einer Akkumulation des  $\gamma$ -H2AV Signals, das während der meiotischen

Prophase bestehen bleibt (Mehrotra und McKim, 2006; Joyce et al., 2011). Normalerweise verschwindet das  $\gamma$ -H2AV Signal mit dem Eintritt der 16 Zell-Zyste in Region 3 des Germariums. Innerhalb dieser Region ist ebenfalls die Definition der Oocyte, erkennbar an Hand erhöhter ORB-Akkumulation in dieser Zelle, abgeschlossen (Lantz et al., 1994). Zuvor sind in der 16 Zell-Zyste, in der die Zellen durch interzelluläre Ringkanäle miteinander verbunden sind, zwei Pro-Oocyten vorhanden. Bei beiden Pro-Oocyten wird die Meiose mit der Bildung des synaptonemalen Komplexes, der Initiierung von DSB und deren Reparatur eingeleitet. Bevor jedoch das Pachytänstadium beendet ist, entwickelt sich eine der Zellen zur Nährzelle und die andere behält ihren meiotischen Charakter (in Region 3). Anschließend beginnen Follikelzellen, die den Escort Stammzellen entstammen, die Zyste zu umwachsen, wodurch diese sich als Eikammer vom Germarium abspaltet und anschließend 14 Differenzierungsstadien durchläuft (King et al., 1956).

Immunzytologisch kann das C(3)G Protein und damit ein synaptonemaler Komplex bis zum Stadium 6 der Eikammerentwicklung nachgewiesen werden (King, 1970; Page und Hawley, 2001). Im nachfolgenden Diplotän wird der synaptonemale Komplex aufgelöst und mit Stadium 14 sind sowohl die chiasmatischen als auch die achiasmatischen Chromosomen in der Metaphasenplatte der Meiose I orientiert (Gilliland et al., 2009). Die meisten meiotischen Mutationen in Drosophila wurden in Folge erhöhter X-Chromosom Nondisjunction-Rate identifiziert (Sandler et a., 1968; Baker und Carpenter, 1972; Sekelsky et al., 1999). Diese Mutationen beeinflussen primär die Initiierung eines DSB sowie dessen Reparatur. Eine Reduktion von Crossover führt zur Erhöhung des Anteils achiasmatischer Bivalente und somit zu einer Erhöhung von Nondisjunction. Andere meiotische Mutationen führen zu einem defekten Aufbau des Spindelapparates oder der Schwesterchromatidenkohäsion an den Zentromeren und den Chromosomenarmen, wodurch Fehler bei der Segregation postpachytäner Chromosomen auftreten.

Weiterhin können epigenetische Faktoren, die den Chromatinstatus etablieren, meiotische Rekombinationsprozesse beeinflussen. Der dominant rekombinogene Effekt mehrerer Su(var) Mutationen im perizentrischen Heterochromatin weist in diesem Zusammenhang auf die Bedeutung der Chromatinstruktur als Kontrollelement meiotischer Prozesse hin (Westphal und Reuter, 2002). Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Crossoverfrequenz und Crossoververteilung auch im distalen Bereich des linken Armes von Chromosom 2 unter dem Einfluss von PEV- Modifikatoren steht. Für diese Zielsetzung boten die vollständigen Sequenzdaten des *Drosophila*-Genoms (Adams et al., 2000) sowie die präzise kartierte *RSw*<sup>+</sup>-Element Kollektion des DrosDel-EU Projektes (Ryder et al., 2007) die Möglichkeit, hochauflösende Crossoveranalysen durchzuführen. Im Bereich zwischen den *RSw*<sup>+</sup>-Elementen *5-SZ-3548* und *5-SZ-3596* wurde der rekombinogene Effekt mehrerer PEV-Modifikatoren getestet. An den dabei erhaltenen Crossoverchromosomen konnten mit Hilfe von SNP-Kartierung erstmals hochauflösende Crossoveranalysen durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen, dass die Verteilung von Crossoverereignissen nicht zufallsgemäß ist und "hot" und "cold" Spots nachgewiesen werden können.

Des Weiteren wurde mit immunzytologischen Analysen der Chromatinzustand am synaptonemalen Komplex untersucht. Dabei wurde eine abundante H3K9me3 und H3K27me1 Modifizierung gefunden. Außerdem wurde eine abundante Assoziation von Heterochromatin-Protein 1 (HP1) mit dem Chromatin des synaptonemalen Komplexes nachgewiesen. Diese Ergebnisse weisen auf einen heterochromatinähnlichen Zustand des mit dem synaptonemalen Komplex assoziierten Chromatins hin.

Elektronenmikroskopische Analysen synaptonemaler Komplexe von Weibchen mit einer zusätzlichen genomischen Kopie von E(z) zeigten, dass eine Überexpression von E(z) zu einer kompakteren Chromatinstruktur führt.

Insgesamt gelang es, im Rahmen der vorliegenden Analysen, die Bedeutung epigenetischer Prozesse bei der Kontrolle von Crossover nachzuweisen und wesentliche Faktoren dieser Prozesse zu identifizieren.

Weil bei den Crossoveranalysen im distalen Bereich des 2. Chromosoms Su(var)2-8 eine bislang unbekannte Suppressormutation für PEV einen rekombinogenen Effekt zeigte, sollte dessen Su(var) Locus kartiert werden. Für Su(var)2-8 existiert ein Allel, das nach EMS-Behandlung isoliert wurde und rezessiv letal ist (Reuter, 1984; Wustmann et al., 1989). Defizienzkartierung grenzte die Su(var)2-8 Mutation auf die zytologische Region von 24F2-25A1 ein (Wustmann et al., 1989).

In der vorliegenden Arbeit kamen neue genetische Verfahren zur Anwendung, mit deren Hilfe der Su(var)-Locus von Su(var)2-8 in einem Genomintervall von ca. 20kb mit fünf Genen in 21E2 eingegrenzt werden konnte.

Auf Grund der Effizienz dieser Kartierungsmethode wurde zusätzlich der Su(var)-Locus von Su(var)2-12 und Su(var)2-13 kartiert. Su(var)2-12 ist ebenso wie Su(var)2-8 rezessiv letal. Der Locus dieser Suppressormutation wurde zwischen Df(2L) N22-3

(30A1-30D1) und Df(2L) TE301x1 (31A2-31C1) kartiert (Wustmann et al., 1989). Su(var)2-13 ist homozygot lebensfähig und fertil (Wustmann et al., 1989). Der Locus der Su(var)2-13-Mutation konnte durch Defizienzkartierung der Chromosomenregion 31A1-31C1 zugeordnet werden. Für beide Suppressormutationen gelang es mit der neuen Kartierungsmethode den Su(var)-Locus auf wenige Gene einzugrenzen.

Mit einem weiteren Verfahren erfolgte die Kartierung von Su(var)3-4, von dem fünf Allele isoliert wurden, die in jeder möglichen transheterozygoten Kombination letal sind. Die Allele  $Su(var)3-4^{01}$  und  $Su(var)3-4^{06}$  sind röntgenstrahlinduziert. Die Allele  $Su(var)3-4^{02,05,06}$  wurden nach EMS-Behandlung isoliert. Der Locus für Su(var)3-4wurde durch Crossoveranalysen am Punkt 47.7±0.2 in der genetischen Karte und in Komplementationsanalysen mit Defizienzen der Region 84-85 im zytologischen Bereich von 84D13-85E2 kartiert (Reuter et al., 1986). Für die Identifizierung von  $Su(var)3-4^{01}$  und  $Su(var)3-4^{04}$  Allele wurde ermittelt und nach bioinformatischer Auswertung Kandidatengene für Su(var)3-4 identifiziert.

### 2.Material und Methoden

#### 2.1 Genetische Methoden

#### 2.1.1 Anzucht von Drosophila melanogaster

Die Haltung von *Drosophila melanogaster* erfolgt auf einem Standardmedium (1% Agar, 2.5% Sirup, 3% Grieß, 3.5% Rosinen, 5% Hefe). Um Schimmelbildung bzw. Bakterienwachstum vorzubeugen, wurden dem Medium 0,1% Nipagin sowie 100mM Ampicillin zugegeben. Die Stammlinien wurden bei 18°C gehalten und alle 4 Wochen auf frisches Nährmedium umgesetzt. Kreuzungen wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

#### 2.1.2 Crossoveranalysen mit zwei in *trans* befindlichen *RSw*<sup>+</sup>-Insertionen

Crossoverereignisse zwischen zwei in *trans* befindlichen  $RSw^+$ -Elementen sind in der F1-Generation an Hand eines weißen (kein  $RSw^+$ -Element) bzw. wildtypähnlichen roten (beide  $RSw^+$ -Elemente in *cis*) Augenphänotyps sichtbar. Für Crossoveranalysen im Bereich zwischen zwei  $RSw^+$ -Elementen wurden  $w^{1118}{}_{iso}/w^{1118}{}_{iso}$ ;  $RSw^+A/SM6$  Weibchen mit  $w^{1118}{}_{iso}/Y$ ;  $RSw^+B/SM6$  Männchen gekreuzt. Anschließend wurden transheterozygote  $w^{1118}{}_{iso}/w^{1118}{}_{iso}$ ;  $RSw^+A/RSw^+B$  Weibchen mit  $w^{1118}{}_{iso}/Y$ ; +/+ Männchen gekreuzt und in den Nachkommen weißäugige  $w^{1118}{}_{iso}$ ; +/+ Ausnahmetiere gezählt. Das Verhältnis der doppelten Anzahl dieser Ausnahmetiere zur Gesamtzahl an Nachkommen ergibt den Prozentwert an Rekombination zwischen den beiden  $RSw^+$ -Elementen.

#### 2.1.3 Crossoveranalysen und SNP-Kartierung von Crossoverereignissen

Zur Isolation von Crossoverchromosomen wurden Chromosome verwendet, die zwei  $RSw^+$ -Elemente in *cis* tragen. Diese prägen auf Grund des additiven Effektes von zwei  $w^+$ -Transgenen einen wildtypähnlichen Augenphänotyp aus. Rekombinationsereignisse zwischen den beiden  $RSw^+$ -Elementen führen zu Chromosomen, die nur noch ein  $RSw^+$ -Element tragen. Diese können an Hand ihres ursprünglichen Augenphänotyps von den anderen Nachkommen unterschieden werden (vgl. Abb.3.2).

Die verwendeten *cis*-Kombinationen liegen auf dem zweiten Chromosom und sind mit dem Balancerchromosom *SM6a* (*Cy*) stabilisiert (Tabelle 2.1). Nach Kreuzung von  $w^{II18}{}_{iso}/w^{II18}{}_{iso}$ ;  $RSw^+A$   $RSw^+B/SM6a$  Weibchen mit  $w^{I118}{}_{iso}/Y$ ; Mutante/SM6a Männchen wurden  $w^{I118}{}_{iso}/w^{I118}{}_{iso}$ ;  $RSw^+A$   $RSw^+B/Mutante$  Weibchen der F1-Generation mit  $w^{I118}{}_{iso}/Y$ ; SM6a/Sco Männchen gekreuzt. Ein Rekombinationsereignis zwischen dem Chromosom der *cis*-Kombination und dem Mutantenchromosom wird in der F2-Generation durch die Trennung der beiden  $RSw^+$ -Elemente phänotypisch sichtbar (vgl.Abb.3.2). Diese  $w^{I118}{}_{iso}$ ; Crossoverchromosom/SM6a oder Sco Nachkommen der F2-Generation wurden mit  $w^{I118}{}_{iso}$ ; +/+ Tieren gekreuzt und DNA von  $w^{I118}{}_{iso}$ ; Crossoverchromosom/+ für die SNP-Kartierung isoliert.

 Tabelle 2.1: cis-Kombinationen zur Isolation von Crossoverchromosomen.

<i>cis</i> -Kombination zweier <i>RSw</i> <sup>+</sup> -Elemente	zytologische Region	Größe in bp
$w^{1118}_{iso}$ ; 5-SZ-3548+5-SZ-3596/Cy	21B1-21E2	360.704
$w^{1118}_{iso}$ ; CB-5081-3+5-SZ-4041/Cy	37B9-42A2	-
$w^{1118}_{iso}$ ; 5-SZ-3596+CB-5483-3/Cy	21E2-21E3	468.874
w <sup>1118</sup> <sub>iso</sub> ; CB-5083-3+5-HA-3038/Cy	21E2-21E2	89.179
w <sup>1118</sup> <sub>iso</sub> ; CB-0463-3+5-HA-1917/Cy	22A5-23C5	1.404.650
$w^{1118}_{iso}$ ; 5-SZ-3215+5-HA-1695/Cy	22B8-23C5	182.019
w <sup>1118</sup> <sub>iso</sub> ; 5-HA-1142+5-HA-1257/Cy	30E4-31B1	312.449
w <sup>1118</sup> <sub>iso</sub> ; 5-HA-1257+5-HA-1061/Cy	31B1-32E1	979.991
w <sup>1118</sup> <sub>iso</sub> ; CB-6694-3+5-HA-2868/Cy	30F5-31D7	307.508

#### 2.1.4 Duplikationskartierung von Su(var)2-8, Su(var)2-12 und Su(var)2-13

Um den Einfluss verschiedener Duplikationslinien auf den Suppressoreffekt der Su(var)Mutationen im Modellsystem  $In(1)w^{m4h}$  zu untersuchen, wurden  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)/CyRoi Weibchen mit  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; Duplikation/Sco bzw.  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; Duplikation/SM6 Männchen gekreuzt. In der F1-Generation wurde die Manifestation des Su(var)-Effektes an Tieren der genetischen Konstellation  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)/Duplikation bzw.  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; Su(var)/Duplikation untersucht. Prägen diese Tiere einen Suppressoreffekt aus, dann liegt der Suppressor nicht im Bereich der Duplikation. Nur wenn die Duplikation die Su(var) Mutation kompensiert, liegt eine zusätzliche Kopie des Su(var) Gens vor.

Die Größe des duplizierten Chromosomenbereiches ist exakt bestimmbar, weil Duplikationen mit Hilfe von Inversionen generiert wurden, die zuvor mit präzise kartierten  $RSw^+$ -Elementen etabliert wurden (Tabelle 2.2).

Duplikationsstamm	Inversionen	zytologische Region	Größe der Duplikation
$In(1)w^{m4h}: Dn3(2\cdot 2)/Sco$	5-HA-1535+CB-0304-3	23A3-25F2	2.906.168
	UM-8380-3+5-HA-1724	20110 2012	
$In(1)w^{m4h}$ :Dp5(2:2)/SM6	5-HA-1535+CB-0304-3	23A3-23C4	265.279
	CB-0114-3+5-HA-1724		
$In(1)w^{m4h}$ : Dp9(2:2)/Sco	5-HA-1706 + CB-0304-3	30B3-32A4	1.295.235
	CB-0279-3 + 5-HA-1724		
$In(1)w^{m4h}; Dp10(2;2)/Sco$	5-HA-1191 + CB-0304-3	21B1-22D3	2.129.756
	<i>CB-5692-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp11(2;2)/SM6$	5-SZ-3989 + CB-0304-3	22B2-23C4	1.280.939
	<i>CB-0114-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp12(2;2)/SM6$	5-SZ-3622 + CB-0304-3	29C3-30B12	1.166.019
	<i>CB-0473-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp16(2;2)/SM6$	5-SZ-3989 + CB-0304-3	22B2-22D3	459.656
	<i>CB-5692-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp25(2;2)/Sco$	5-SZ-3596 + CB-0304-3	21D1-22D3	1.629.026
	<i>CB-5692-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp33(2;2)/Sco$	5-HA-2004 + CB-0304-3	23D1-25B1	1.828.904
	<i>CB-0110-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp36(2;2)/SM6$	5-SZ-3596 + CB-0304-3	21D1-21D1	19.888
	<i>CB-5353-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp47(2;2)/SM6$	5-SZ-3548 + CB-0304-3	21B5-21E2	338.646
	<i>CB-5353-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp72(2;2)/SM6$	5-HA-1552 + CB-0304-3	31F4-32B1	785.511
	<i>CB-6467-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp75(2;2)/SM6$	UM-8043-3 + 5-SZ-4002	31A2-32A5	675.658
	<i>CB-0279-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp80(2;2)/SM6$	CB-6694-3 + 5-SZ-4002	30F5-31B1	226.050
	<i>5-HA-1257</i> + <i>CB-0570-3</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp91(2;2)/SM6$	UM-8043-3 + 5-SZ-4002	31A2-B1	173.595
	<i>5-HA-1257</i> + <i>CG-0570-3</i>		
$In(1)w^{m4h}; Dp100(2;2)/SM6$	5-HA-1535 + CB-0304-3	23A3-C2	156.582
	<i>CB-0916-3</i> + <i>5-HA-1724</i>		

Tabelle 2.2: Verwendete Duplikationslinien zur Kartierung von Su(var)-Mutationen.

#### 2.1.5 Klassifizierung in Su und Su+ Crossoverchromosomen

Der Einfluss eines Crossoverchromosoms auf die *white* Variegation in  $In(1)w^{m4h}$  gibt Aufschluss darüber, ob dieses Träger einer Suppressormutation ist. Das dafür verwendete Kreuzungsprinzip wird als Su/Su+-Test bezeichnet. Um zu gewährleisten, dass nicht das flankierende  $RSw^+$ -Element des Crossoverchromosoms die Augenpigmentierung im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement beeinflusst, wurde das *white* Gen durch FRT basierte Rekombination zuvor zerstört. Dafür wurden ywFLP/ywFLP; CyRoi/Sco Weibchen mit  $w^{1118}{}_{iso}/Y$ ; Crossoverchromosom $(w^+)/CyRoi$  Männchen gekreuzt. 48 bis 72 Stunden nach Eiablage erfolgte ein Hitzeschock für eine Stunde bei  $37^{\circ}$ C. Anschließend wurden  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; CyRoi/Sco Weibchen mit den ywFLP/Y; Crossoverchromosom $(w^-)/CyRoi$  Männchen der F1-Generation gekreuzt. Anschließend erfolgte die Kreuzung von  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; *CyRoi/Sco* Weibchen mit  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; Crossoverchromosom(w<sup>-</sup>)/CyRoi Männchen der F2-Generation. Der Aufbau eines stabilen Inzuchtstammes wurde durch Kreuzung von  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; Crossoverchromosom(w<sup>-</sup>)/CyRoi Weibchen der F3-Generation mit  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; Crossoverchromosom(w<sup>-</sup>)/CyRoi Männchen der F3-Generation realisiert. An diesen Tieren erfolgte die Analyse der *white*-Variegation. Sind die Tiere rotäugig, bedeutet dies, dass das Crossoverchromosom Träger einer Suppressormutation ist. Dagegen zeigen *Su*+-Tiere einen *white-mottled* Augenphänotyp. Das bedeutet, dass das jeweilige Crossoverchromosom die Suppressormutation nicht trägt.

#### 2.1.6 Fosmidkartierung von Su(var)2-8, Su(var)2-12 und Su(var)2-13

Bei der Fosmid-Bibliothek sind ca. 40-50kb große Genomabschnitte von *Drosophila melanogaster* in einem pFlyFos-Vektor kloniert (Ejsmont et al., 2009). Dieser wird über homologe Rekombination zwischen der *attP*-Stelle im *Drosophila*-Genom und der *attB*-Stelle des Vektors ortsspezifisch integriert. Weiterhin ist der pFlyFos-Vektor Träger eines *dsRed*-Selektionsmarkers. Die Möglichkeit transgene Tiere an Hand der *dsRed*-Fluoreszenz im *Drosophila*-Auge zu selektieren und die gleichzeitige Analyse dieser Tiere im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement bilden eine wichtige Voraussetzung für die genetischen Arbeiten.

Für die Kartierung von Su(var)2-8, Su(var)2-12 und Su(var)2-13 standen mehrere transgene pFlyFos-Linien zur Verfügung (Tabelle 2.3). Diese wurden von GENETIC SERVICES, INC. (Sudbury, Massachusetts USA) generiert. Anschließend wurden balancierte Stämme etabliert. Weil *attp2* (68A4) und *VK00033* (65B2) jeweils auf dem dritten Chromosom liegen, erfolgte die Stabilisierung der transgenen Linien mit dem *TM3*, *Sb Ser* Balancerstamm. Nach Kreuzung von  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; +/+; Dr/TM3, *Sb Ser* Weibchen mit  $w^{-}/Y$ ; +/+; pFlyFos/+ Männchen wurden in der F1-Generation  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; pFlyFos/TM3, *Sb Ser* Männchen mit *dsRed*-Fluoreszenz selektiert und mit  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; +/+; Dr/TM3, *Sb Ser* Weibchen gekreuzt. Anschließend wurden von der F2-Generation die  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; +/+; pFlyFos/TM3, *Sb Ser* Weibchen mit  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; pFlyFos/TM3, *Sb Ser* Männchen für den Aufbau einer stabilen Stammlinie gekreuzt (Tabelle 2.3).

Für transgene Linien, die mit der *attp40*-Stelle (25C7) generiert wurden, erfolgte die Kreuzung mit  $In(1)w^{m4h}$ ; *CyRoi/Sco* Tieren. Nach Kreuzung von  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; *CyRoi/Sco* Weibchen mit  $w^{-}/Y$ ; *pFlyFos/+* Männchen wurden in der F1-Generation

 $In(1)w^{m4h}/Y$ ; pFlyFos/CyRoi Männchen mit dsRed-Fluoreszenz selektiert und mit  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; CyRoi/Sco Weibchen gekreuzt. Anschließend wurden von der F2-Generation  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; pFlyFos/CyRoi Weibchen mit  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; pFlyFos/CyRoi Männchen für den Stammaufbau gekreuzt (Tabelle 2.3).

		<u> </u>	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	<u> </u>	
Gen bzw.	FlyFos-Vektor/	Region nach	attp-	transgene	
Su(var)	(Fosmidgröße)	http://flybase.org/ (R5.27)	Stelle <sup>†</sup>	Linien	etablierte Stammlinien
Su(var)2-8	FlyFos028731 (33613bp)	2L:547714581327	attp2	L1-L3	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (3x)
	FlyFos020405 (32567bp)	2L:563733596300	attp2	-	-
	FlyFos020907 (41517bp)	2L:571431612948	attp2	-	-
Ubc9	FlyFos027642 (42335bp)	2L:507192549527	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
Su(var)2-1	FlyFos026029 (39806bp)	2L:10201601 10241406	attp2	L1	In(1)w <sup>m4h</sup> ; TM3, Sb Ser/Flyfos
Su(var)2-12	FlyFos025098 (39551bp)	2L:29330752972625	VK00033	L1	In(1)w <sup>m4h</sup> ; TM3, Sb Ser/Flyfos
	FlyFos015972 (33642bp)	2L:29674733001114	attp40	L1	$In(1)w^{m4h}$ ; CyRoi/Flyfos
	FlyFos029639 (35295bp)	2L:29872343022528	attp2	L1	In(1)w <sup>m4h</sup> ; TM3, Sb Ser/Flyfos
	FlyFos028063 (36177bp)	2L:30097093045885	attp2	L1	In(1)w <sup>m4h</sup> ; TM3, Sb Ser/Flyfos
	FlyFos028970 (34575bp)	2L:30342923068866	attp2	L1	In(1)w <sup>m4h</sup> ; TM3, Sb Ser/Flyfos
	FlyFos023864 (35082bp)	2L:30471473082228	attp2	L1	In(1)w <sup>m4h</sup> ; TM3, Sb Ser/Flyfos
Su(var)2-13	FlyFos029378 (41038bp)	2L:1018767910228716	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
Su(var)3-8	FlyFos018355 (28348bp)	3R:1278963212817979	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
Su88	FlyFos021466 (34130bp)	2L:17354071701278	VK00033	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
Df13	FlyFos015187 (37314bp)	2L:28901242852811	attp2	-	-
	FlyFos031052 (30914bp)	2L:28756622906575	attp2	L1	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos
30E1	FlyFos017612 (37641bp)	2L:98889929926632	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
CG5381	FlyFos021711 (37756bp)	2L:1027948510317240	attp2	-	-
	FlyFos018655 (34941bp)	2L:1030225410337194	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
SamDC	FlyFos021782 (39928bp)	2L:1031041210350339	attp2	L1	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos
Dnmt2	FlyFos026437 (31963bp)	2L:1207327512105237	attp2	L1	In(1)w <sup>m4h</sup> ; TM3, Sb Ser/Flyfos
mwh	FlyFos030735 39806bp	3L:12126471245150	attp2	L1	In(1)w <sup>m4h</sup> ; TM3, Sb Ser/Flyfos

Tabelle 2.3: Verwendete Fosmid-Klone zur Kartierung von Su(var) Mutationen.

\* Als Integrationsort dienten die *attp2*-Stelle in 68A4 und die *VK00033*-Stelle in 65B2 auf dem 3. Chromosom und die *attp40*-Stelle in 25C7 auf dem 2. Chromosom.

Im PEV-Modellsystem  $In(1)w^{m4h}$  wurde der Einfluss der balancierten pFlyFos-Linien auf den Suppressoreffekt von Su(var) Mutationen untersucht. Dafür wurden  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)/CyRoi; +/+ Weibchen mit  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; pFlyFos/TM3, Sb Ser Männchen gekreuzt und anschließend in der F1-Generation  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)/+; pFlyFos/+ bzw.  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; Su(var)/+; pFlyFos/+ Tiere phänotypisch ausgewertet. Als Kontrolle dienten  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)/+; TM3, Sb Ser/+ bzw.  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; Su(var)/+; TM3, Sb Ser/+ Tiere.

#### 2.1.7 Herstellung transgener Drosophila-Linien

Über flankierende P-Element-Repeats können DNA-Sequenzen mit Hilfe einer Transposase in das Genom von *Drosophila melanogaster* integriert werden (Rubin und Spradling, 1982). Die Injektion des Transformationsvektors erfolgt während des präblastodermalen Stadiums der Embryonalentwicklung zusammen mit einer Transposasequelle (Turbo-Plasmid). Der zu transformierende Stamm selbst sollte eine Mutation für den entsprechenden Selektionsmarker des Transformationsvektors tragen.

Im Fall des pP{GS[ $v^+$ ]} wurde dementsprechend in  $v^1/v^1$ ; +/+;  $rv^{506}/rv^{506}$  bzw.  $v^1/v^1$ ;  $bw^{1}/bw^{1}$ ; +/+ und bei dem pP{RS3[w<sup>+</sup>]} in den  $w^{1118}_{iso}$ ;  $2_{iso}$ ;  $3_{iso}$  Stamm injiziert. Überlebende Tiere wurden mit dem für die jeweilige Injektion verwendeten Stamm gekreuzt und die Nachkommen auf transgene Individuen selektiert, die den Selektionsmarker ausprägen. Das Chromosom, in dem die Insertion erfolgte, wurde durch Kreuzung mit Balancerchromosomen für das zweite (CyO) und dritte (TM3, Sb Ser) Chromosom bestimmt, indem das Segregationsverhalten des Selektionsmarkers relativ zum Balancerchromosom verfolgt wurde. Ein Einbau ins X-Chromosom zeigte sich dadurch, dass der Selektionsmarker X-gekoppelt vererbt wurde (Reziprokenunterschied).

# 2.1.8 RNAi vermittelter *Genknockdown* und dessen Einfluss auf die *white* Variegation in $In(1)w^{m4h}$

Zunächst mussten Treiberstamm und RNAi-Linien (Tabelle 2.4) in das PEV Modellsystem  $In(1)w^{m4h}$  eingekreuzt werden.

Das Transgen des Treiberstammes liegt auf dem 2. Chromosom. Deshalb erfolgte die  $w^{1118}/Y;$  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h};$ Kreuzung von CyRoi/Sco Weibchen mit P{actinGAL4}/CyO Männchen. Anschließend wurden  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; CyRoi/Sco  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; P{actinGAL4}/CyRoi Männchen der F1-Generation Weibchen mit rückgekreuzt. In der F2-Generation erfolgte die Geschwisterkreuzung von  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h};$  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; *CyRoi/*P{*actin*GAL4} Weibchen mit *CyRoi*/P{*actin*GAL4} Männchen für einen stabilen Stammaufbau.

Der Insertionsort der verwendeten RNAi Konstrukte ist die *attp2*-Stelle auf dem 3. Chromosom (Tabelle 2.4). Deshalb wurden  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; +/+; *TM3*, *Sb Ser/Pr Dr* Weibchen mit  $y^lv^l/Y$ ; +/+; RNAi  $v^+$ /RNAi  $v^+$  Männchen gekreuzt. Anschließend wurden  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; +/+; *TM3*, *Sb Ser/Pr Dr* Weibchen mit  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; RNAi  $v^+/TM3$ , *Sb Ser* Männchen der F1-Generation gekreuzt und in der F2-Generation eine Geschwisterkreuzung von  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; +/+; RNAi  $v^+/TM3$ , *Sb Ser* Männchen für den Stammaufbau durchgeführt.

Die Methode der RNA-Interferenz bietet die Möglichkeit, zu überprüfen, ob mit einem spezifischen *Genknockdown* ein *Su(var)* Effekt auf *white*-Variegation in  $In(1)w^{m4h}$ -Tieren ausgeprägt wird. Dafür wurden  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; *CyRoi/*P{*actin*GAL4}; +/+ Weibchen mit  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; RNAi  $v^+/TM3$ , *Sb Ser* Männchen gekreuzt und

anschließend  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; P{actinGAL4}/+; RNAi  $v^+$ /+ bzw.  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; P{actinGAL4}/+; RNAi  $v^+$ /+ Tiere phänotypisch ausgewertet. Als Kontrolle dienten die  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; CyRoi/+; TM3, Sb Ser/+ bzw.  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; CyRoi/+; TM3, Sb Ser/+ Nachkommen.

Gen	TRiP-Linie	Vektor*	attp-Stelle
HP1	HMS00278	VALIUM20	attp2
egg	HMS00112	VALIUM20	attp2
Ubc9	HMS00067		attp2
CG2807	HM05176	VALIUM10	attp2
Ptth	JF01349	VALIUM1	attp2
Pph13	JF02200	VALIUM10	attp2
CG3542	HMS00589	VALIUM20	attp2
CG3605	HMS00056	VALIUM20	attp2
CG17219	JF03197	VALIUM10	attp2
GABPI	JF02349	VALIUM10	attp2

Tabelle 2.4: TRiP-Linien für den RNAi vermittelten Genknockdown.

\*VALIUM=Vermillion-AttB-Loxp-Intron-UAS-MCS

#### 2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1 Verwendete Bakterienstämme und Vektoren

Für die Amplifikation rekombinanter Plasmide wurde der *E.coli*-Bakterienstamm DH5 $\alpha$  (*F-, end A1, hsd R17 (rk-, mk+), Sup E44, thi- 1, I, rec A1, gyr A96, rel A1, \Phi80d, lac\DeltaZM15) von Invitrogen eingesetzt.* 

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurden die Vektoren pGEM-T (Promega) und pZero blunt (Invitrogen) verwendet. Als Transformationsvektoren (*P*-Vektoren) für *Drosophila melanogaster* dienten pP{GS[ $v^+$ ]} (Schotta und Reuter, 2000) sowie pP{RS3[ $w^+$ ]} (Golic und Golic, 1996).

#### 2.2.2 Isolation von DNA und RNA aus Drosophila melanogaster

Die Präparation von genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster* wurde nach dem "Quick Fly Genomic DNA Prep" Protokoll von E. Jay Rehm (Berkley Drosophila Genome Project; BDGB) durchgeführt.

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Fliegenmaterial erfolgte mittels TRIzol- Reagent (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die RNA nach dem Trocknen in 100 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O (1ml DEPC/ 11 bidest. H<sub>2</sub>O) gelöst.

#### 2.2.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Isolation von Plasmid DNA aus 5 ml Übernachtkultur erfolgte mittels Gene JET<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers (Fermentas). Für die Großpräparation von Plasmid DNA aus 100 ml Übernachtkultur wurde das NucleoBond High copy Plasmid Purification Protokoll (Macherey-Nagel) verwendet.

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte nach Standardprotokoll (Sambrook et al., 1989). Die Elution von DNA-Fragmenten wurde mittels NucleoSpin Extrakt II Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt.

Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (MBI/Fermentas), Restriktionsverdau (MBI Fermentas bzw. Gibco BRL) sowie Transformation in *E.coli* (Invitrogen) erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde mit M-MuLV Reverse Transkriptase (Promega) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion nach Saiki (1988). Dabei wurden die Polymerasen *Taq* (GibcoBRL), *Pfu* (Promega), *Phusion* (Finnzymes) sowie *iProof* (Bio-Rad) eingesetzt. Die Primersequenzen sind auf Grund ihres Umfangs im Anhang unter 7.1 aufgeführt.

Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der pZero blunt Kit (Invitrogen) und der pGEM-T Cloning Kit (Promega) verwendet. Mit Hilfe der *E.coli* Kolonie-PCR wurde eine Erfolgskontrolle einzelner Klonierungen durchgeführt.

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977). Die Sequenzreaktion wurde nach Herstellerangaben mit dem ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequenzing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Auswertung und Darstellung der Sequenzdaten erfolgte mit Chromas Lite Version 2.01.

#### 2.2.4 Inverse PCR

Um den Insertionsort von Transgenen (P-Element-Vektoren) zu bestimmen, wurde die inverse PCR angewandt. Dabei wurde im Wesentlichen nach dem Protokoll von Huang et al. (2000) verfahren. Für die PCR-Reaktion am Ligationsansatz bestand folgende Modifikation: Zunächst wurde mit den Primern 5P\_forw1 und 5P\_rev1 für das 5`Ende des P-Vektors bzw. 3P\_forw1 und 3P\_rev1 für das 3`Ende des P-Vektors eine PCR-Reaktion durchgeführt. Anschließend erfolgte eine geschachtelte PCR mit den Primerkombinationen 5P\_forw2 und 5P\_rev2 für den 5`Bereich bzw. 3P\_forw2 und 3P\_rev2 für den 3`Bereich. Die PCR-Fragmente wurden mit Primern, die aus dem P- Element-Repeat des Transformationsvektors in den benachbarten genomischen Bereich herauslesen, sequenziert. Diese Primer waren für den 5`P-Repeat Sp1 bzw. der Primer Pry2mod für den 3`P-Repeat. Ein Datenbankabgleich dieser Sequenz mit der Gesamtsequenz von *Drosophila melanogaster* identifizierte den Insertionsort des jeweiligen P-Element-Vektors.

#### 2.3 Immunzytologische Methoden

#### 2.3.1 Immunmarkierung von synaptonemalen Komplexen

Die Präparation von Germarien aus *Drosophila melanogaster* erfolgte in Anlehnung an die Methode von Alfageme et al. (1980). Dabei wurden folgende Modifikationen vorgenommen. Die Präparation der Ovarien erfolgte in PBS, 0.5% NP-40. In derselben Lösung wurden die Germarien von den Ovarien präpariert. Nach einminütiger Inkubation in Fixierlösung (0,7% NaCl, 3,7% Formaldehyd, 1% Triton X-100) wurden die Germarien für 2,5 Minuten in Spreitungslösung (45% Essigsäure, 3,7% Formaldehyd) überführt, welche sich auf einem silikonisierten Deckgläschen befand. Anschließend erfolgte die Spreitung der synaptonemalen Komplexe mittels mechanischem Druck. Die verwendeten Lösungen wurden auf Eis gelagert und nach 3h frisch hergestellt.

Zur Immunmarkierung des synaptonemalen Komplexes wurde ein monoklonaler C(3)G Antikörper verwendet (Tabelle 2.5). Gleichzeitig erfolgte eine Immunmarkierung mit einem polyklonalen anti-Histon-Antikörper bzw. anti-Protein-Antikörper (Tabelle 2.5). Für die Doppelfärbungen wurden zwei verschiedene fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper verwendet (Tabelle 2.5). Sowohl die primären als auch die sekundären Antikörper wurden in PBS gelöst. Die Inkubation erfolgte mit den primären Antikörpern über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Präparate drei Mal für 10 min in PBS gewaschen. Die sekundäre Antikörperfärbung erfolgte für 2 h bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Präparate mit 25 ul PBS/DAPI/Glycerol (1:500) eingedeckelt. Die Auswertung der Immunmarkierung erfolgte am konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss). Dabei wurden standardmäßig die Filtersätze für DAPI, Alexa 488 und Alexa555 genutzt.

#### 2.3.2 Immunmarkierung von Ovarien

Die Präparation und Fixierung von Ovarien erfolgte nach der Methode von Theuerkauf und Hawley (1992) mit Modifizierung. Dabei wurden die Ovarien vier Tage alter Weibchen in 0,7% NaCl präpariert. Die Fixierung erfolgte in 5% Paraformaldehyd für 30 min auf dem Drehrad. Danach wurden die Ovarien drei Mal mit PBST für je 20 min gewaschen. Nachdem die Ovarien für ca. 30 sek in Methanol geschwenkt wurden, erfolgte die Rehydrierung für 1 h in PBST auf dem Drehrad. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (in PBST) wurde auf dem Drehrad über Nacht bei 4°C durchgeführt (Tabelle 2.5). Nach dreimaligen Waschen mit PBST für je 20 min wurden die Ovarien mit dem sekundären Antikörper (in PBST) für 2 h bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert (Tabelle 2.5). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBST wurden die Ovarien in 50 µl PBS/DAPI/Glycerol (1:500) aufgenommen und auf einen Objektträger aufgetragen. Es folgte die Vereinzelung der Ovariolen mit Hilfe von Wolframnadeln und das anschließende Versiegeln des Präparats. Die Auswertung fand am konfokalen Mikroskop (LSM 510, Zeiss) mit den entsprechenden Filterkombinationen statt.

Antikörper	Hersteller	Produktnummer	Verdünnung
primäre Antikörper:			
monoklonal C(3)G	S.Hawley	-	1:500
polyklonal C(3)G	K.Gebhardt	-	1:25
polyclonal H3-K9 mono-methyl	upstate	07-450	1:100
polyclonal H3-K9 di-methyl	upstate	07-212	1:100
polyclonal H3-K9 tri-methyl	abcam	ab8898	1:100
polyklonal H3-K9 ace	abcam	ab10812	1:100
polyclonal H3-K27 mono-methyl	upstate	07-448	1:100
polyclonal H3-K27 di-methyl	millipore	07-452	1:100
polyclonal H3-K4 mono-methyl	abcam	ab88895	1:100
polyclonal H3-K4 di-methyl	abcam	ab32356	1:100
polyclonal H3-K4 tri-methyl	abcam	ab8580	1:100
polyclonal H3-K36 mono-methyl	abcam	ab9048	1:100
polyclonal H3-K36 di-methyl	abcam	ab9049	1:100
polyclonal H3-K36 tri-methyl	abcam	ab9050	1:100
polyclonal H3-K20 tri-methyl	T. Jenuwein	-	1:100
polyklonal HP1-AK	S. Elgin	-	1:50
polyklonal RPD3	abcam	ab1767	1:100
polyklonal SU(VAR)3-9 AK (As285-465)	A.Kegel	-	1:50
polyklonal SU(VAR)2-1 AK	M. Walther	-	1:50
polyklonal SU(VAR)3-3 AK	T. Rudolph	-	1:25
sekundäre Antikörper:			
GAM 555	Invitrogen	A21426	1:100
GAR 488	Invitrogen	A11008	1:100

 Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper für immunzytologische Analysen.

#### 2.4 Proteinbiochemische Analysen

#### 2.4.1 Herstellung eines polyklonalen C(3)G Antikörpers

Zunächst erfolgte die Herstellung eines C(3)G spezifischen Antigens durch die Firma INNOVAGEN AB (Lund, Schweden). Dafür wurde ein C(3)G-Peptid für die Aminosäuren 658-671 des C(3)G Proteins generiert. Anschließend erfolgte die Immunisierung eines Kaninchens mit dem C(3)G-Peptid. Die nach der Blutentnahme erhaltenen Seren wurden mittels Dotblot charakterisiert. Die Aufreinigung der Antiseren wurde mit dem SulfoLink<sup>®</sup> Immobilization Kit for Peptides (Thermo Scientific) durchgeführt. Anschließend wurde der aufgereinigte polyklonale C(3)G Antikörper in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAA-Gel) aufgetragen und immunzytologisch getestet.

#### 2.4.2 Nachweis des C(3)G Antikörpertiters im Dot-Blot

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe (1µg, 100ng, 10ng, 1ng und 0,1ng) des C(3)G Peptids hergestellt und anschließend je 10µl der verschiedenen Antigen-Konzentrationen mittels Vakuumpumpe auf eine Nitrocellulose-Membran (Macherey-Nagel) transferiert. Danach wurde die Membran mindestens 1/2h bei RT in 5% Trockenmilchpulver (Biorad) in PBS geblockt. Im Anschluss daran wurde die auf der Membran immobilisierte Verdünnungsreihe des C(3)G Antigens mit einem der Blutseren (primärer Antikörper), das in einem Verhältnis von 1:1000 in 5% Milchpulver in PBS verdünnt wurde, ü. N. bei 4 °C inkubiert. Nachdem die Membran drei Mal für 20 min in PBST (PBS, 0.2% Tween 20) gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit einem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper in 5% Trockenmilchpulver in PBS für 2h bei 37°C. Anschließend wurde die Membran drei Mal für 20 min in PBST gewaschen und es erfolgte die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Antikörper mit dem ECL Plus System (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben.

#### 2.4.3 Gelelektrophorese des aufgereinigten C(3)G Antikörpers

Die Auftrennung des aufgereingten polyklonalen C(3)G Anikörpers nach Molekulargewicht erfolgte in einem Gradienten-SDS-PAA-Gel (Invitrogen). Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1% SDS) bei 20mA. Das Molekulargewicht des C(3)G Antikörpers wurde durch einen vorgefärbten Proteinstandard (MBI Fermentas) bestimmt.

Nach der Elektrophorese erfolgte die Inkubation der Gele für 10 min in Coomassielösung (0.1% Coomassie Brilliant Blue R250, 50% Methanol, 40% H2O, 10% Essigsäure). Anschließend wurden die Gele in Aqua bidest entfärbt.

# 2.5 Generierung von Fusionsproteinen in genomischen Drosophila melanogaster Fosmid-Klonen mittels Rekombination

In der Fosmid-Genombibliothek sind ca. 30-40kb große genomische Bereiche von *Drosophila melanogaster* in einen pFlyFos-Vektor kloniert und damit alle regulatorischen Einheiten eines zu analysierenden Gens enthalten. Für 21 verschiedene Chromatinproteine sollte in einem jeweils spezifischen Fosmid-Klon ein *Tag* mittels homologer Rekombination eingeführt werden (Tabelle 2.6). Als *Tag* dienten V5 und SGFP, die entweder N- oder C-terminal an das Transkript eines Gens rekombiniert wurden. Des Weiteren wurde die V5 Taggingkassette verwendet, um bei neun Genen ein frühzeitiges Stopcodon einzuführen (Tabelle 2.6). Die Generierung von Fusionsproteinen in Fosmid-Klonen wurde im Labor von Pavel Tomancak (MPI of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden) erlernt und nach dem Protokoll von Ejsmont et al., 2009 durchgeführt. Insgesamt konnten 25 von 32 geplanten Genen erfolgreich mit einem Proteintag versehen werden (Tabelle 2.6). Von diesen wurden elf transgene Linien von GENETIC SERVICES, INC. (Sudbury, Massachusetts USA) generiert und anschließend balancierte Stämme etabliert (Material und Methoden 2.1.6; Tabelle 2.6).

#### 2.5.1 Herstellung der Tagging-Kassette

Zunächst wurden Primer entworfen, die eine 20-25bp Priming Region tragen und mindestens 50bp Homologie 5' bzw. 3' mit der genomischen Region, an deren Position der Proteintag eingeführt werden soll, zeigen. Die Sequenz der Priming Region GAAGTGCATAC CAATCAGGACCCGC, [forward (2xTY1): reverse (3xFLAG): CTTGTCGTCGTCGTCATCCTTGTAGTCA] ist für alle Tags gleich. Der homologe Teil des Primers liegt 5' vor der Priming Region. Der reverse Tag-Primer ist revers komplementär zur Target Sequenz. Die Primer sind HPLC gereinigt. Für den Ansatz einer 100µl PCR Reaktion wurde nach Herstellerangaben des PHUSION PCR Kit (Finnzymes) verfahren. Als PCR Template dienten für einen C-terminalen Tag pTagNG[2xTY1-V5-preTEV-BLRP-3xFLAG] pTagNG[2xTY1-SFGP-V5bzw.

21

preTEV-BLRP-3xFLAG] und N-terminal pTagNG[2xTY1-BLRP-pTEV-V5-SGFP-3xFLAG] bzw. pTagNG[2xTY1-BLRP-preTEV-V5-3xFLAG]. Die PCR soll nicht mehr als 25 Zyklen umfassen und wurde zunächst mit 4 Zyklen bei einer "Annealing"-Temperatur von 52°C gewählt, die anschließend auf 60°C erhöht wurde. Das PCR-Produkt wurde mit dem Pure Link<sup>TM</sup> PCR-Purification Kit (Invitrogen) gereinigt und eine Konzentrationsmessung vorgenommen.

#### 2.5.2 Transformation des Helper Plasmid pRedFlp4

Zunächst wurde für die Generierung eines Proteintags ein geeigneter pFlyFos selektiert, der Träger der zu modifizierenden Sequenz ist. Die Integration des pFlyFos in T1resistente EPI300 *E.coli* Zellen wird im Verlauf als Fosmidklon bezeichnet. Nach Ausplattierung des Fosmidklons auf LB Agar + Cm15 diente eine Einzelkolonie zur Animpfung von 1 ml LB + Cm15. Alle Schritte mit Flüssigmedium erfolgten im 2 ml Eppendorf Tube. Mit 50 µl der Übernachtkultur wurde 1 ml LB + Cm15 angeimpft und die Zellen für 2 h bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. Das Protokoll zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wird unter 2.5.3 näher beschrieben. Das Zellpellet wird nach Zugabe von 1 µl pRedFlp4 (100ng/µl) für 1 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1350V, 10µF, 600. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB aufgenommen und nach Überführung in ein neues 2 ml Eppendorf Tube bei 1000 rpm und 30°C für 2 h inkubiert. 100 µl der Zellen wurden in 1 ml LB + Cm15 + Hgr50 transferiert und bei 30°C und 1000 rpm bis zur Sättigung inkubiert.

#### 2.5.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Die folgenden Schritte sind bei 2°C durchzuführen. Das betrifft auch die Zentrifugationsschritte. Zunächst wurden die Zellen bei 10.000 g für 30 sec zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet mit 1 ml eiskaltem bidest. H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut für 30 sec bei 10.000 g zentrifugiert. Der Waschschritt wurde zwei Mal wiederholt und das Pellet anschließend in 50 $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst.

#### 2.5.4 Tagging durch Red/ET Rekombination

100 µl einer Übernachtkultur (Fosmid + pRedFlp4) wurden zur Animpfung von 1 ml LB+ Cm15 + Hgr50 verwendet und für mindestens 2 h bei 30°C und 850 rpm inkubiert. Die Red Expression wurde durch Zugabe von 70 µl rham25% induziert. Dabei wuchsen die Zellen für weitere 5 h bei 30° und 850 rpm und wurden anschließend nach den Angaben von 2.5.3 elektrokompetent gemacht. Nach Zugabe der Tagging-Kassette (500ng) und 1 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1350V, 10µF, 600. Nach Aufnahme der Zellen in 1 ml LB ohne Antibiotika wurde die Zellsuspension in ein neues 2 ml Eppendorf Tube überführt und für 4 h bei 30°C und 850 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation von 100 µl dieser Zellsuspension in 1 ml LB+ Cm15 + Hgr50 + Kan50. Die Kultur wurde für mindestens 30 h bei 30°C und 850 rpm inkubiert, bis eine Sättigung eingetreten war. Der Rest der Transformation wurde auf Low salt LB Agar mit Cm15, Hgr50, Kan50 ausplattiert.

#### 2.5.5 Entfernung der Kanamycinkassette

Die Kanamycinresistenz befindet sich auf der Taggingkassette und kann über flankierende FRT sites herausrekombiniert werden. Dafür wurden 100  $\mu$ l der gesättigten Kultur in 1 ml LB + Cm15 + Hgr50 + anhydro-Tet200nM bei 30°C und 1000 rpm über Nacht bis zur Sättigung inkubiert.

#### 2.5.6 Entfernung des pRedFlp4 Plasmid

Um pRedFlp4 aus dem rekombinanten Fosmidklon zu entfernen, wurden 10 µl der gesättigten Lösung aus 2.5.5 in 1 ml LB Cm15 überführt und über Nacht bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. Von der gesättigten Kultur wurde ein Glycerolstock angelegt und die modifizierte pFlyFos-DNA mittels Gene JET<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers (Fermentas) isoliert. Anschließend wurde eine PCR mit Primern, die jeweils 5` bzw. 3` von der Region des Proteintags binden, durchgeführt. Das PCR Produkt wurde in pGEM-T kloniert und sequenziert. Damit konnte eine erfolgreiche Integration des *Tags* überprüft werden.

abelle 2.6: Generierun	ig getaggter Gei	ne in Fosmid-Klonen.	Darion nach	$T_{\alpha\alpha*/}$		atta-	trancana	
iu(var)	Gen	(Fosmidgröße)	http://flybase.org/ (R5.27)	Mutanten	fertig	unp- Stelle†	Linien	etablierte Stammlinien
Su(var)2-8	CG2807	FlyFos028731 (33613bp)	2L:547714581327	<i>V</i> 5-C	X	attp2	L1	$In(I)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/pFlyFos (3x)
Su(var)2-8 Aa	CG2807	FlyFos028731 (33613bp)	2L:547714581327	Stop	Х	attp2	•	
Su(var)2-8 Ab	CG2813	FlyFos028731 (33613bp)	2L:547714581327	Stop	Х	attp2		1
Su(var)2-12 Aa	alpha4GTI	FlyFos028063 (36177bp)	2L:30097093045885	Stop	Х	attp2		1
Su(var)2-12 Ab	CG3542	FlyFos028063 (36177bp)	2L:30097093045885	Stop	Х	attp2	-	1
Su(var)2-12 Ac	CG3605	FlyFos028063 (36177bp)	2L:30097093045885	Stop		attp2		1
Su(var)2-12 Ad	CG17219	FlyFos028063 (36177bp)	2L:30097093045885	Stop	Х	attp2		1
Su(var)2-12 Ae	GABPI	FlyFos028063 (36177bp)	2L:30097093045885	Stop	ı	attp2	-	1
Su(var)2-12 Af	CG17258	FlyFos028063 (36177bp)	2L:30097093045885	Stop	Х	attp2		1
Suv4-20	CG13363	FlyFos023442 (32866bp)	X:541037573903	V5-C	Х	attp2		1
Suv4-20	CG13363	FlyFos023442 (32866bp)	X:541037573903	SGFP-C	X	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
Su(var)2-1	CG5496	FlyFos026029 (39806bp)	2L: 1020160110241406	<i>V</i> 5-C	X	attp2	L1	$In(1)w^{m4h}$ , TM3, Sb Ser/Flyfos
Su(var)2-1	CG5496	FlyFos026029 (39806bp)	2L: 1020160110241406	V5-N	X	attp2		
Su(var)2-1A	CG5496	FlyFos026029 (39806bp)	2L: 1020160110241406	Stop	X	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
IPI	CG8409	FlyFos030711 (35230bp)	2L:81993098234539	V5-C	X	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
CG5381	CG5381	FlyFos018655 (37756bp)	2L: 1027948510317240	<i>V</i> 5-C	X	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ , TM3, Sb Ser/Flyfos (2x)
RpD3	CG7471	FlyFos023080 (38895bp)	3L:46070674645962	V5-C	X	VK00001		
Su(var)3-9	CG6476	FlyFos026659 (37406bp)	3R:1106182511099231	<i>V</i> 5-C	X	attp40		1
Su(var)3-3	CG17149	FlyFos018270 (30752bp)	3L:2021174320242495	<i>V</i> 5-C		attp40		1
Gcn5	CG4107	FlyFos028109 (38422bp)	3L:1249352712531949	<i>V</i> 5-C	X	VK00001	L1	1
Su(var)3-6/ Pp1-87B	CG5650	FlyFos019660 (31303bp)	3R:82338148265117	V5-C	X	VK00001		1
Su(var)3-7	CG8599	FlyFos024374 (34599bp)	3R:90816409116239	V5-C	X	VK00001		1
SuUR	CG7869	FlyFos026479 (34136bp)	3L:1103943911073575	<i>V</i> 5-C	Х	attp40	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; CyRoi/Flyfos (2x)
mod(mdg4)	CG32491	FlyFos031052 (30914bp)	2L:28756622906575	<i>V</i> 5-C	Х	attp2	L1	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos
Dnmt2	CG10692	FlyFos026437 (31963bp)	2L: 1207327512105237	<i>V</i> 5-C		attp2		1
Dnmt2	CG10692	FlyFos026437 (31963bp)	2L: 1207327512105237	SGFP-C	ı	attp2		1
E(z)	CG6502	FlyFos031509 (25632bp)	3L:1061119710636829	V5-N	Х	VK00001		1
Mes-4	CG4976	FlyFos024854 (31114bp)	3R:2375459523785709	V5-N	X	attp40	L1	$In(1)w^{m4h}$ ; CyRoi/Flyfos
egg (SETDB1)	CG12196	FlyFos016198 (29361bp)	2R:2064979020679151	V5-N	X	attp2	L1-L2	$In(1)w^{m4h}$ ; TM3, Sb Ser/Flyfos
Ing2	CG7379	FlyFos026760 (40202bp)	3R:1361662913656831	<i>V</i> 5-C	1	attp40		1
Jil-I	CG6297	FlyFos030223 (32360bp)	3L:1106371011096070	<i>V</i> 5-C	Х	attp40		1
Su(var)3-8	CG8956	FlyFos018355 (28348bp)	3R:1278963212817979	<i>V</i> 5-C		attp40		1
*Als Tag wurden V5-C	= C-terminaler	· [2xTY1-V5-pre TEV-BLRP-	3xFLAG] $Tag; V5-N = N-ter$	minaler [2x]	<b>FY1-BLR</b>	P-pre TEV-	V5 -3xFLAC	] Tag und
SGFP-C = C-terminal	er [2xTY1-SGF	FP-pre TEV-BLRP-3xFLAG	Tag verwendet.					
Als Integrationsort div	enten die attp2-	Stelle in 68A4 auf dem 3. Chi	omosom, die attp40-Stelle in	25C7 auf de	em 2. Chr	oun mosomo.	I VK00001 in	59D3 auf dem 2. Chromosom.

### 2. Material und Methoden

24

#### 2.6 Elektronenmikroskopie synaptonemaler Komplexe

#### 2.6.1 Präparation von Drosphila-Ovarien für EM-Analysen

Nachdem die Ovarien des jeweils zu untersuchenden Genotyps in 1xPBS präpariert wurden, erfolgte die Fixierung auf einem Drehrad für 3 h bei RT in 3% Glutaraldehyd (Sigma) in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2; Carl Roth). Dabei befanden sich die Ovarien in "Eppendorfsieben". Anschließend wurden die Ovarien drei Mal für 10 min mit Natriumcacodylatpuffer bei RT gewaschen und ü.N. bei 4°C gelagert. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit Natriumcacodylatpuffer bei RT, erfolgte eine Inkubation für 1 h in 1% Osmiumtetroxid (Carl Roth) in Natriumcacodylatpuffer. Anschließend wurden die Ovarien drei Mal für 10 min mit H<sub>2</sub>0 gewaschen und dann für je 30 min in 10%, 30% und 50% Ethanol inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Ovarien für 1 h in 70% Ethanol + 1% Uranylacetat und dann für je 30 min in 70%, 90%, 100% und nochmals 100% Ethanol. Die Infiltration mit Epoxidharz (nach Spurr, 1969; von Science Services) wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt. Zunächst wurden die Ovarien für 4 h in einer 3:1 Lösung (Ethanol:SPURR) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation für 4 h mit einem Verhältnis von 1:1 (Ethanol:SPURR) und anschließend ü.N. mit einem Verhältnis von 1:3 (Ethanol:SPURR). Nachdem für 8 h in pures SPURR inkubiert wurde, wurden die Ovarien nochmals in reines SPURR in Silikonformen ü.N. eingebettet. Die Auspolymerisierung der Proben erfolgte bei 70°C für 24 h.

#### 2.6.2 Schneiden, Färben und elektronenmikroskopische Aufnahme

Zunächst wurden die Ovarien großzügig mit einer Säge aus dem SPURR-Block herausgeschnitten und in einen Probenhalter eingespannt. Dann erfolgte das "Zutrimmen" des SPURR-Blocks mit einer Rasierklinge bis an das Ovarium. Anschließend wurden Semi-Dünnschnitte (1-2µm) mit Glasmessern angefertigt. Für die Identifizierung eines günstig positionierten Germariums wurden die einzelnen Schnitte mit einer Metallöse auf einen Wassertropfen, der sich auf einem Objektträger befindet, transferiert. Nachdem die Semidünnschnitte auf einer Wärmestreckplatte bei 80°C aufgebacken wurden, erfolgte deren Färbung mit 1% Toluidinblaulösung für 10 sec auf der Streckplatte. Anschließend wurde die Färbelösung abgespült und die einzelnen Schnitte mit einem Lichtmikroskop untersucht. Nachdem die Struktur eines Germariums identifiziert wurde, erfolgte die Herstellung von Ultra-Dünnschnitten mit einem Ultramikrotom (Ultracut R, Leica, Wetzlar) mittels Diamantmesser. Die Schnittdicke beträgt dabei 90 nm. Anschließend wurden die Ultra-Dünnschnitte auf Cedukol-beschichteten Kupfernetzen aufgenommen. Eine Nachkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat in einem EM-Stain (Leica, Wetzlar) und die EM-Analyse mit dem EM 900 (Carl Zeiss, Oberkochen) bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV. Die Bildaufnahmen erfolgten mit einer SSCCD SM-1k-120 Kamera (TRS, Moorenweis) unter Nutzung der iTE-Software von Olympus SIS (Münster).

### 3. Ergebnisse

# 3.1 Epigenetische Kontrolle meiotischer Rekombination in *Drosophila melanogaster*

Im Rahmen des DrosDel-EU-Projektes wurde im *Drosophila*-Genom eine Kollektion von  $RSw^+$ -Element-Insertionen generiert (Ryder et al., 2004; Ryder et al., 2007), die neben der Manipulation der Chromosomenstruktur (Konstruktion von Deletionen, Duplikationen, Inversionen und Translokationen) systematische genomweite Crossoveranalysen ermöglicht. So konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Kartierung von Crossoverereignissen zwischen zwei in *trans* befindlichen  $RSw^+$ -Elementen erstmals die Crossoververteilung entlang der genomischen Sequenz auf dem linken Arm von Chromosom 2 analysiert werden (Abschnitt 3.1.1). Des Weiteren wurde die Beeinflussung der Crossoverfrequenz durch epigenetische Faktoren innerhalb einer definierten Genomregion mit Hilfe von *cis*-Kombinationen zweier  $RSw^+$ -Elemente untersucht (Abschnitt 3.1.2). Für die dabei generierten Crossoverchromosomen erfolgte anschließend die Kartierung des jeweiligen Crossoverereignisses mit SNP-Analysen, wodurch die Crossoververteilung zwischen den beiden  $RSw^+$ -Elementen dargestellt werden konnte (Abschnitt 3.1.3 und 3.1.4).

# 3.1.1 Crossoveranalysen entlang der genomischen Sequenz von Drosophila offenbaren Regionen mit erhöhter und reduzierter Crossoverfrequenz

Für die Untersuchung der Crossoververteilung entlang der euchromatischen Region des linken Armes von Chromosom 2 wurde die Crossoverfrequenz zwischen zwei präzise kartierten  $RSw^+$ -Element-Insertionen ermittelt.  $RSw^+$ -Elemente tragen ein funktionales *white* Gen, wodurch ein Crossoverereignis zwischen zwei in *trans* befindlichen  $RSw^+$ -Elementen zu weißäugigen (kein  $RSw^+$ -Element) bzw. wildtypähnlichen, rotäugigen (beide  $RSw^+$ -Elemente in *cis*) Nachkommen führt. Durch den isogenen genetischen Hintergrund der *RS*-Element-Kollektion können weitestgehend unspezifische Effekte auf Crossoverfrequenzen ausgeschlossen werden. Weil jedoch altersabhängige Effekte in verschiedenen Chromosomenregionen unterschiedlich stark ausgeprägt sind, müssen diese berücksichtigt werden. So zeigt die mittlere Region von Chromosom 2 im Vergleich zu den distal gelegenen Chromosomenregionen eine wesentlich stärkere Verringerung der Crossoverfrequenz in Abhängigkeit vom Alter der Weibchen (Plough, 1917; Bridges, 1927). Innerhalb des proximalen Euchromatins von Chromosom 3 wurde ebenfalls eine Altersabhängigkeit der Crossoverrate beobachtet (Westphal und Reuter, 2002). Um mögliche altersabhängige Effekte auf die Crossoverfrequenz auszuschließen, wurden die *RSw*<sup>+</sup>A/*RSw*<sup>+</sup>B transheterozygoten Weibchen alle fünf Tage umgesetzt und anschließend die Nachkommenschaften der Weibchen unterschiedlichen Alters bezüglich der Crossoverfrequenzen getrennt voneinander ausgewertet. In den proximalen Regionen wurden auf Grund der stärkeren altersabhängigen Effekte nur Nachkommen von Weibchen der ersten fünf Tage analysiert. Für die Darstellung der Crossoververteilung wurden Crossoverfrequenzen kleiner genomischer Bereiche gemessen, um "hot" und "cold" Spots bei *Drosophila* identifizieren zu können (Tabelle 3.1). Dafür wurden in den zytologischen Regionen 21B1-25B3 (Abb.3.1) und 26D1-29E4 (Abb.3.1) die Crossoverfrequenzen für insgesamt 27 verschiedene Intervalle mit einer durchschnittlichen Größe von 200kb analysiert (Tabelle 3.1).

Nr.*	Region	Größe in	flankierende	Crossoverfrequenz	Crossover-
		bp	<i>RSw</i> <sup>+</sup> -Elemente	in %	frequenz/bp
1	21B1-21B3	91.698	5-HA-1191/CB-0416-3	6/ 5.741 = 0.1	$1.1 \times 10^{-6}$
2	21B3-21B5	87.575	CB-0416-3/5-HA-2916	0/5.057 = <0.02	$<0.2 \times 10^{-6}$
3	21B5-21D2	244.215	5-HA-2916/5-SZ-3017	6/4.379 = 0.14	$0.9 \times 10^{-6}$
4	21D2-21E2	77.242	5-SZ-3017/5-SZ-3596	10/6.187 = 0.2	2.1x10 <sup>-6</sup>
5	21E2-21E2	284.844	5-SZ-3596/CB-6427-3	74/6.449 = 1.1	$4.0 \times 10^{-6}$
6	21E2-21E3	184.030	CB-6427-3/CB-5483-3	56/4.056 = 1.4	$7.5 \times 10^{-6}$
7	21E3-22A1	383.559	CB-5483-3/5-HA-1599	74/6.076 = 1.2	3.2x10 <sup>-6</sup>
8	22A1-22B8	565.402	5-HA-1599/5-SZ-3542	48/3.862 = 1.2	2.2x10 <sup>-6</sup>
9	22B8-22F4	508.193	5-SZ-3542/5-HA-1233	142/5.593 = 2.5	5.0x10 <sup>-6</sup>
10	22F4-23A3	259.002	5-HA-1233/5-HA-1535	30/1.772 = 1.7	6.5x10 <sup>-6</sup>
11	23A3-23B8	122.746	5-HA-1055/5-SZ-3215	70/6.618 = 1.1	8.6x10 <sup>-6</sup>
12	23B8-23C4	149.411	5-SZ-3215/5-HA-2924	40/5.337 = 0.8	5.0x10 <sup>-6</sup>
13	23C4-23D1	101.525	5-HA-2924/5-SZ-3166	20/3.203 = 0.6	6.2x10 <sup>-6</sup>
14	23D1-23F6	352.526	5-SZ-3166/5-HA-2112	148/7.923 = 1.9	5.3x10 <sup>-6</sup>
15	23F6-24A2	154.894	5-HA-2112/5-HA-5091	50/5.566 = 0.9	5.8x10 <sup>-6</sup>
16	24A2-24C3	138.994	5-HA-5091/5-SZ-4048	32/4.389 = 0.7	5.2x10 <sup>-6</sup>
17	24C3-25A3	911.591	5-SZ-4048/CB-6821-3	146/3.234 = 4.5	5.0x10 <sup>-6</sup>
18	25A7-25B3	107.205	5-HA-1531/5-HA-2327	28/3.186 = 0.9	8.2x10 <sup>-6</sup>
19	26D1-27C7	552.475	5-HA-1566/CB-0536-3	50/1367 = 3.7	$6.6 \times 10^{-6}$
20	27C7-27D3	46.308	CB-0536-3/5-HA-1999	6/1876 = 0.3	6.9x10 <sup>-6</sup>
21	27D3-28B1	566.521	5-HA-1999/UM-8100-3	60/2303 = 2.6	4.6x10 <sup>-6</sup>
22	28B1-28E9	586.431	UM-8100-3/5-HA-1278	72/1.572 = 4.6	7.8x10 <sup>-6</sup>
23	28E9-28F1	42.091	CB-0542-3/5-SZ-3127	10/2998 = 0.3	$7.9 \times 10^{-6}$
24	28F1-29C3	211.456	5-SZ-3127/5-HA-2031	36/1333 = 2.7	1.3x10 <sup>-5</sup>
25	29D4-29E4	177.905	CB-0338-3/5-SZ-4012	28/2337 = 1.2	6.7x10 <sup>-6</sup>
Α	21D2-22B8	1.495.077	5-SZ-3017/5-SZ-3542	200/3.671 = 5.4	2.8x10 <sup>-6</sup>
В	22A5-23C5	1.404.650	СВ-0463-3/5-НА-1917	74/1.231 = 6.0	$4.3 \times 10^{-6}$

**Tabelle 3.1:** Verteilung von Crossover im Bereich von 21B1-25B3 und 26D1-29E4 auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila melanogaster*.

\* Die Nr. eines Intervalls von Tabelle 3.1 entspricht der in Abbildung 3.1

Die Verteilung von Crossoverfrequenzen entlang der untersuchten Chromosomenregion zeigt, dass in verschiedenen genomischen Bereichen signifikante Unterschiede nachweisbar sind. Demnach liegt ein putativer "hot" Spot für Crossover in den Regionen 21E2-21E3 (7,5x10<sup>-6</sup>/bp), 23A3-23B8 (8,6x10<sup>-6</sup>/bp) und 28F1-29C3 (13,0x10<sup>-6</sup>/bp) (Tabelle 3.1, Abb.3.1 roter Stern). Eine niedrige Crossoverfrequenz wurde in Region 22A1-22B8 (2,2x10<sup>-6</sup>/bp) und 27D3-28B1 (4,6x10<sup>-6</sup>/bp) identifiziert (Tabelle 3.1, Abb.3.1 blauer Stern). Die Crossoverfrequenzen dieser Intervalle weichen dabei signifikant von denen der umgebenden Regionen ab. Somit ermöglicht die Analyse kleiner genomischer Intervalle Unterschiede in der Crossoverfrequenz zu identifizieren und dadurch "hot" und "cold" Spots für Crossover zu erkennen. Größere Regionen wie 21D2-22B8 (2,8x10<sup>-6</sup>/bp) und 22A5-23C5 (4,3x10<sup>-6</sup>/bp), die mit mehreren kleinen Intervallen überlappen, kompensieren offenbar lokale Differenzen der Crossoverfrequenz (Tabelle 3.1, Abb.3.1 Intervall A und B in rot). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Crossoverrate in der distalen Region 21B1-21B3  $(1,1x10^{-6}/bp)$ im Vergleich zu der proximal angrenzenden Region 21B3-21B5 (<0,2x10<sup>-6</sup>/bp) um das Fünf- bis Sechsfache erhöht ist (Tabbele 3.1, Abb.3.1), obwohl Crossover in Nähe der Telomeren signifikant supprimiert ist (Szauter et al., 1984).



**Abbildung 3.1:** Crossoverfrequenz kleiner genomischer Regionen entlang des linken Armes von Cromosom 2 in *Drosophila melanogaster*. Die Crossoverfrequenz wurde zwischen zwei präzise kartierten  $RSw^+$ -Elementen gemessen (x-Achse) und ist als Prozent an Rekombination pro Basenpaar dargestellt (y-Achse). Die Größe der untersuchten Intervalle beträgt durchschnittlich 200kb. Jede horizontale Linie zeigt die Crossoverfrequenz eines Intervalls (vgl. Tabelle 3.1). Die Analyse kleiner Intervalle offenbart putative "hot" (roter Stern) und "cold" Spots (blauer Stern) für Crossover. Bei den Analysen großer Regionen, die mit mehreren kleinen Intervallen überlappen, kompensieren sich die Unterschiede in den Crossoverfrequenzen eindeutig (Intervall A und B in rot).

#### 3.1.2 Effekte von PEV-Suppressormutationen auf die Crossoverfrequenz in Region 21B4-21E2 und 37B9-42A2

Gene, die in epigenetische Prozesse involviert sind, können mit Hilfe des  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangements, einem Modellsystem für Positionseffekt-Variegation (PEV), identifiziert werden (Reuter und Wolf, 1981; Wustmann et al., 1989). Diese Gene kontrollieren den Chromatinzustand in euchromatischen und heterochromatischen Chromosomenregionen. Typische Eigenschaften von Heterochromatin sind eine kompakte Chromatinstruktur und die Suppression meiotischen Crossovers.

In der heterochromatischen, perizentrischen Region von Chromosom 3 konnte bereits eine Beeinflussung der Crossoverfrequenz durch Suppressormutationen für PEV nachgewiesen werden (Westphal, 1999; Westpahl und Reuter, 2002). Mit der vorliegenden Arbeit sollte nun analysiert werden, ob die Crossoverfrequenz euchromatischer Regionen ebenfalls unter epigenetischer Kontrolle steht. In zwei Regionen auf Chromosom 2 wurde untersucht, ob ausgewählte Suppressormutationen für PEV einen dominanten rekombinogenen Effekt zeigen. Für diese Analysen wurden Chromosomen verwendet, die zwei  $RSw^+$ -Elemente in *cis* tragen. Chromosomen mit zwei  $RSw^+$ -Elementen prägen auf Grund des additiven Effektes von zwei  $w^+$ -Transgenen einen wildtypähnlichen roten Augenphänotyp aus (Abb.3.2 A). Rekombinationsereignisse zwischen den beiden  $RSw^+$ -Elementen führen zu Chromosomen, die nur noch ein  $RSw^+$ -Element tragen (Abb.3.2 B). Diese können an Hand ihres Augenphänotyps (gelbe oder orange Augen statt rote Augen) von den anderen Nachkommen unterschieden werden.



**Abbildung 3.2:** Crossoveranalyse innerhalb einer definierten genomischen Region. (A) Chromosomen, die zwei  $RSw^+$ -Elemente (5-SZ-3548 und 5-SZ-3596) in *cis* tragen, prägen auf Grund des additiven Effektes zweier  $w^+$ -Transgene auf die Augenfarbe einen wildtypähnlichen roten Augenphänotyp aus. (B) Crossoverchromosomen wurden als gelbe bzw. orangene Ausnahmetiere in der F1-Generation nach Kreuzung von  $w^{1118}$ ;  $RSw^+A RSw^+B/Mutante Weibchen mit <math>w^{1118}/Y$ ; *SM6/Sco* Männchen isoliert. PCR-Analysen mit einem RS-Element-spezifischen und genomischen Primer bestimmen für jedes Crossoverchromosom das flankierende  $RSw^+$ -Element.
Die Untersuchung des rekombinogenen Effektes von Suppressormutationen für PEV erfolgte in zwei euchromatischen Chromosomenregionen. In der distalen genomischen Region 21B4-21E2 wurde die *cis*-Kombination der  $RSw^+$ -Elemente *5-SZ-3548* und *5-SZ-3596* verwendet (Abb.3.3). In den proximalen Regionen von 2L (37B9) und 2R (42A2) wurde die *cis*-Kombination der  $RSw^+$ -Elemente *CB-5081-3* und *5-SZ-4041* analysiert (Abb.3.3).

5-SZ-	-3548			
Υ 5	5-SZ-3596	CB-5081-3	5-SZ-4041	
2L	7  +++++ ++++ +++++++++++++++++++++++++		/	2R
21	22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35	36 37 38 39 40	41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 6	0

**Abbildung 3.3:** Untersuchung des rekombinogenen Effekts von PEV-Suppressormutationen in zwei Regionen auf Chromosom 2. In der distalen Region 21B4-21E2 wurde die *cis*-Kombination der  $RSw^+$ -Elemente 5-SZ-3548 und 5-SZ-3596 analysiert. Für die proximale Region von 2L und 2R (37B9-42A2) wurde die *cis*-Kombination der  $RSw^+$ -Elemente *CB-5081-3* und 5-SZ-4041 verwendet.

Zunächst wurde für beide Regionen (21B4-21E2 und 37B9-42A2) untersucht, ob die Nullallele  $egg^{1473}$  (*SetDB1*<sup>1473</sup>),  $E(z)pco^{190}$  und  $E(z)^{15}$  sowie das P{ $E(z)ry^+B$ }32 Transgen dominante Effekte auf Crossover zeigen (Tabelle 3.2, Tabelle 3.3, Abb3.4). Bei dem  $egg^{1473}$  Allel handelt es sich um eine *loss-of-function* Mutation, bei der durch eine 856bp Deletion die gesamte SET Domäne des SETDB1-Proteins fehlt (Clough et al. 2007).  $E(z)^{15}$  ist eine stark hypomorphe Mutation (Shearn et al. 1978). Bei  $E(z)pco^{190}$ handelt es sich um ein Nullallel (Shearn und Garen, 1974). Das P{ $E(z)ry^+B$ }32 Transgen (Jones und Gelbart 1993) trägt eine zusätzliche genomische Kopie von E(z)und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels inverser PCR in 27D4 auf 2L (7.023.866, release 5.22) kartiert.

Zusätzlich zu den *SetDB1* und *E(z)* Mutationen wurden in Region 21B4-21E2 *Su(var)Ubc9<sup>2-2</sup>, Su(var)2-8<sup>01</sup>, Su(var)2-1<sup>06</sup>* sowie die Doppelmutanten *Su(var)Ubc9<sup>2-2</sup> Su(var)2-1<sup>04</sup>* und *Su(var)Ubc9<sup>2-2</sup> Su(var)2-10<sup>01</sup>* auf dominante rekombinogene Effekte untersucht (Tabelle 3.2, Abb.3.4). *Su(var)2-1<sup>06</sup>* und *Su(var)2-1<sup>04</sup>* sind Allele eines neuen *Su(var)* Gens, das für ein Chromatinprotein kodiert (Walther, 2003). Bei *Su(var)2-1<sup>04</sup>* führt ein Spleißdefekt zum Translationsstopp an Position 149 im Protein und *Su(var)2-1<sup>06</sup>* trägt an Position 163 der Aminosäuresequenz ebenfalls eine Stoppmutation, die durch eine 4bp Deletion im dritten Exon des Gens hervorgerufen wird. Die Mutation von *Su(var)Ubc9<sup>2-2</sup>* liegt in der UBCc Domäne des SUMO konjugierenden Enzyms Ubc9 (E2) und führt an Position 88 zu einem Aminosäureaustausch (vorliegende Arbeit, Abb.3.26). Die SUMO Ligase *Su(var)2-10* gehört zu der PIAS (E3) Proteinfamilie (Hari et al. 2001). Der Suppressormutation *Su(var)2-8<sup>01</sup>*  konnte bisher keine molekulare Funktion zugeordnet werden (vorliegende Arbeit, Abschnitt 3.4). Des Weiteren wurde im Intervall 21B4-21E2 der rekombinogene Effekt einer keimbahnspezifischen RNAi *down*-Regulation der Chromatinfaktoren *egg*, *E(z)* und *HP1* untersucht (Tabelle 3.2). Dafür wurde als keimbahnspezifischer Treiber das P{*vasa*-GAL4  $v^+$ } Transgen eingesetzt (Mietzsch, persönliche Mitteilung), weil Treiberlinien, die das  $w^+$  Gen als Marker enthalten, nicht benutzt werden können. Nach Kreuzung von  $w^{1118}$ ; *SM6/P*{*vasa*-GAL4  $v^+$ }#9; *TM6/P*{*vasa*-GAL4  $v^+$ }#10 Weibchen mit  $w^{1118}/Y$ ; *RSw*<sup>+</sup>A *RSw*<sup>+</sup>B/SM6; *TM6/UAS-RNAi* Männchen wurde der Effekt einer signifikanten *down*-Regulation von *egg*, *E(z)* und *HP1* auf die Crossoverfrequenz in  $w^{1118}/Y$ ; *RSw*<sup>+</sup>A *RSw*<sup>+</sup>B/P{*vasa*-GAL4  $v^+$ }#9; *UAS-RNAi/P*{*vasa*-GAL4  $v^+$ }#10 Nachkommenweibchen untersucht (Tabelle 3.2, Abb.3.4).

**Tabelle 3.2:** Effekte von PEV-Suppressormutationen auf die Crossoverfrequenz im Intervall von *5-SZ-3548* (21B4) + *5-SZ-3596* (21E2) auf 2L.

<i>Su(var)</i> Mutation	Crossoverchromosomen/	% an	% an Crossover
	Gesamtzahl an Nachkommen	Crossover	pro bp
Kontrolle ( $w^{m4h}$ ; $2_{iso}$ ; $3_{iso}$ )	65/20.780	0,31±0,04	0,87x10 <sup>-6</sup>
$Su(var)2-8^{01}$	90/16.495	$0,52\pm0,22$	1,51x10 <sup>-6</sup>
$Su(var)Ubc9^{2-2}$	48/13.043	0,41±0,2	$1,02 \times 10^{-6}$
$Su(var)Ubc9^{2-2} + Su(var)2-10^{01}$	37/13.459	0,26±0,06	0,76x10 <sup>-6</sup>
$Su(var)Ubc9^{2-2} + Su(var)2-1^{04}$	79/14.261	0.63±0.17	1,54x10 <sup>-6</sup>
$Su(var)2-1^{06}$	9/2.216	0.41±0.04	1,13x10 <sup>-6</sup>
<i>SetDB1</i> <sup>1473</sup>	41/8.140	$0,49\pm0,07$	$1,4x10^{-6}$
$P\{E(z)ry^+B\}32$	15/16.902	0.09±0.003	$0,1x10^{-6}$
$E(z)pco^{190} red e$	43/12.421	$0.40\pm0.1$	0,96x10 <sup>-6</sup>
<i>cis</i> /P{ <i>vasa</i> GAL4}#9; P{UAS- <i>egg</i> RNAi}/	16/4.598	0.34±0.11	0,96x10 <sup>-6</sup>
P{vasaGAL4}#10			
<i>cis</i> /P{ <i>vasa</i> GAL4}#9; P{UAS- <i>E</i> ( <i>z</i> ) RNAi}/	38/8.059	$0.49 \pm 0.04$	1,31x10 <sup>-6</sup>
P{vasaGAL4}#10			
cis/P{vasaGAL4}#9; P{UAS-HP1 RNAi}/	22/9.097	0.27±0.05	$0,67 \times 10^{-6}$
P{vasaGAL4}#10			

**Tabelle 3.3:** Untersuchung des rekombinogenen Effektes von PEV-Suppressormutationen zwischen den *RSw*<sup>+</sup>-Elementen *CB-5081-3* (37B9) und *5-SZ-4041* (42A2).

<i>Su(var)</i> Mutation	Crossoverchromosomen/	% an Crossover
	Gesamtzahl an Nachkommen	
Kontrolle ( $w^{m4h}$ ; $2_{iso}$ ; $3_{iso}$ )	52/4.551	$1,1\pm0,2$
$Su(var)2-1^{06}$	12/1.936	0,6±0,1
SetDB1 <sup>1473</sup>	85/4.217	1,9±0,4
$P\{E(z)ry^{+}B\}32$	27/2.891	0.9±0.2
$E(z)^{15}$ red e	173/9.311	1.9±0.6

Um den rekombinogenen Effekt von Chromatinfaktoren zu ermitteln, diente in den Regionen 21B4-21E2 (0,31±0,04) und 37B9-42A2 (1,1±0,2) das 2. Chromosom von  $w^{m4h}$ ; +/+; +/+ als Referenz. In der distalen Region 21B4-21E2 zeigt die zusätzliche genomische Kopie von E(z) eine signifikante Reduktion an Crossover (0,09±0,003) im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 3.2, Abb.3.4). Dieser Effekt wurde jedoch nicht in

Region 37B9-42A2 nachgewiesen (Tabelle 3.3). Für das Nullallel von *SetDB1* wurde eine Erhöhung der Crossoverfrequenz sowohl in 21B4-21E2 (0,49±0,07) als auch in 37B9-42A2 (1,9±0,4) beobachtet (Tabelle 3.2, Tabelle 3.3, Abb.3.4). Weitere Chromatinfaktoren, die die Crossoverrate in 21B4-21E2 signifikant erhöhen, sind  $Su(var)2-8^{01}$  (0,52±0,22), die Doppelmutante  $Su(var)Ubc9^{2-2} Su(var)2-1^{04}$  (0,63±0,17) und die RNAi *down*-Regulation von E(z) (0,49±0,04) (Tabelle 3.2, Abb.3.4). Keine signifikanten rekombinogenen Effekte in Region 21B4-21E2 zeigen  $Su(var)Ubc9^{2-2}$ ,  $Su(var)2-1^{06}$ ,  $E(z)pco^{190}$ , die Doppelmutante  $Su(var)Ubc9^{2-2} Su(var)2-10^{01}$  sowie eine RNAi *down*-Regulation von *egg* und *HP1* (Tabelle 3.2, Abb.3.4).



**Abbildung 3.4:** Einfluss von PEV-Suppressormutationen auf Crossover in Region 21B1-21E2. Zwischen den  $RSw^+$ -Elementen 5-SZ-3548 und 5-SZ-3596 wurde der Einfluss verschiedener Suppressormutationen für PEV auf die Crossoverfrequenz (y-Achse) untersucht. Dabei zeigen SetDB1<sup>1473</sup>, Su(var)2-8<sup>01</sup>, die Doppelmutante Su(var)Ubc9<sup>2-2</sup> Su(var)2-1<sup>04</sup> und die RNAi down-Regulation von E(z) eine signifikante Erhöhung der Crossoverrate und die Überexpression von E(z) eine signifikante Reduktion der Crossoverereignisse in 21B4-21E2.

#### 3.1.3 Hochauflösende Crossoverkartierung in drei genomischen Regionen identifiziert "hot" und "cold" Spots für Crossover

In Säugern treten "hot" Spots der Rekombination mit einer Größe von 1-2kb und einer 10 bis 1.000 fachen Erhöhung der Crossoverrate auf (Ptak et al., 2005). In *Drosophila* werden im Gegensatz zu Säugern keine "hot" Spot Regionen für Rekombinationsereignisse erwartet (Hey et al., 2004). Dennoch konnten Variationen der Crossoverrate innerhalb großer Regionen bei *Drosophila pseudoobscura* gezeigt werden (Cirulli et al., 2007). Die Analysen von Crossoverfrequenzen innerhalb kleiner ca. 200-400kb großer genomischer Bereiche entlang des linken Armes von Chromosom 2 konnten diese Aussage für *Drosophila melanogaster* bestätigen (Abb.3.1).

Mit einer hochauflösenden SNP-Crossoverkartierung sollte die Crossoververteilung innerhalb kurzer etwa 20-80kb und teilweise noch geringerer genomischer Intervalle analysiert werden, um relativ kleine "hot" und "cold" Spot Regionen für Rekombination auch in *Drosophila melanogaster* zu identifizieren. Dafür wurden Crossovererignisse zwischen einer *cis*-Kombination von zwei  $RSw^+$ -Elementen und einem Mutantenchromosom isoliert. Anschließend erfolgte für jedes Crossoverchromosom die Bestimmung des flankierenden  $RSw^+$ -Elementes durch PCR-Analysen und eine hochauflösende SNP-Crossoverkartierung. Die SNP-Kartierung von Crossoverereignissen war möglich, weil das gesamte Genom der  $w^{m4h}$ - und  $w^{iso}$ -Stammlinien zuvor sequenziert wurde. Für die Isolation von Su(var) und E(var) Mutationen wurde der  $w^{m4h}$ -Stamm verwendet (Reuter und Wolf, 1981). Der isogene  $w^{iso}$ -Stamm wurde für die Generierung der *RS*-Element-Kollektion im Rahmen des DrosDel-EU-Projektes (Ryder et al., 2004; Ryder et al., 2007) und für die DNA-Isolation der Crossoverchromosomen genutzt. Der Vergleich beider Totalsequenzierungen identifizierte Einzelnucleotidaustausche, die eine hochauflösende SNP-Crossoverkartierung ermöglichen.



**Abbildung 3.5:** Einzelnucleotidaustausche zwischen der  $w^{iso}$ - und  $w^{m4h}$ -Stammlinie in 2L. (A) Jeder SNP ist als schwarze vertikale Linie unter dem Idiogramm von Chromosomarm 2L dargestellt. (B) SNPs, die in der Region zwischen 5-SZ-3548 und 5-SZ-3596 identifiziert und analysiert wurden.

Hochauflösende Crossoverkartierungen wurden zunächst in drei genomischen Regionen durchgeführt. Diese Regionen sind 21B4-21E2 (360.704bp), 21E2-21E3 (468.874bp) und 23B8-23C5 (181.890bp).

In Region 21B4-21E2 wurden 62 Crossoverchromosomen nach Kreuzung der *cis*-Kombination 5-SZ-3548 + 5-SZ-3596 mit  $w^{m4h}$  aus 20.780 Nachkommen isoliert (Abb.3.6 B). Zwischen den  $RSw^+$ -Elementen 5-SZ-3596 und *CB-5483-3* wurden in Region 21E2-21E3 nach Kreuzung mit Su(var)2-8 insgesamt 372 Crossoverchromosmomen aus 30.895 Nachkommen isoliert (Abb.3.6 C). In Region 23B8-23C5 wurden 71 Crossoverchromsomen aus 12.493 Nachkommen nach Kreuzung von 5-SZ-3215 + 5-HA-1695 mit Su(var)2-12 isoliert (Abb.3.6 D).

Die Regionen 21B4-21E2 und 21E2-21E3 liegen jeweils in einem Bereich, in dem bei *trans-trans*-Kombination von zwei *RSw*<sup>+</sup>-Elementen bereits ein "cold" Spot (21B3-21B5, Abb.3.6 A, blauer Stern) und ein "hot" Spot (21E2-21E3, Abb.3.6 A, roter Stern) identifiziert wurde. Auch durch die hochauflösenden SNP-Crossoveranalysen der drei Regionen konnten eindeutige "hot" und "cold" Spots nachgewiesen werden.

Zunächst wurden in Region 21B4-21E2 sieben SNPs untersucht, wodurch das Crossoverereignis eines jeden Crossoverchromosoms in einem von acht genomischen Intervallen mit einer Größe von 20-80kb lokalisiert wurde (Abb.3.6 B). Dabei konnte ein "hot" Spot zwischen SNP5 und SNP12 und zwei putative "cold" Spots zwischen *5-SZ-3548* und SNP1 und zwischen SNP4 und SNP5 identifiziert werden (Abb.3.6 B). In Region 21E2-21E3 wurden insgesamt sieben SNPs untersucht und höhere Crossoverwerte in zwei Regionen (SNP26/SNP27 und SNP28/*CB-5483-3*) mit einem Genombereich von 72kb bzw. 27kb gefunden (Abb.3.6 C).

In der dritten Region 23B8-23C5 wurde ein signifikanter "hot" Spot mit zweifach erhötem Crossover in einer nur 11kb großen Region (5-SZ-3215/SNP35) und ein "cold" spot mit einer Crossoverfrequenz von >8x10<sup>-3</sup>% Rekombination (SNP41/SNP42) identifiziert (Abb.3.6 D).

Somit bestätigen die Analysen in den drei verschiedenen Regionen die Existenz von "hot" und "cold" Spots in *Drosophila melanogaster*.



**Abbildung 3.6:** Hochauflösende SNP-Crossoverkartierung in drei genomischen Regionen identifiziert "hot" und "cold" Spots der Rekombination. (A) Crossoverfrequenz kleiner genomischer Regionen entlang des linken Armes von Chromosom 2 und Lage der drei untersuchten Regionen. (B) In Region 21B4-21E2 wurden ein "hot" Spot zwischen SNP5 und SNP12 und zwei putative "cold" Spot (*5-SZ-3548*/SNP1; SNP4/SNP5) Regionen identifiziert. Die Crossoverfrequenz wird als Prozent an Rekombination pro Basenpaar angegeben. (C) In Region 21E2-21E3 ist die Crossoverfrequenz in SNP26/SNP27 und SNP28/*CB-5483-3* erhöht. (D) In Region 23B8-23C5 liegt ein signifikanter "hot" Spot für Crossover zwischen *5-SZ-3215* und SNP35 und ein "cold" Spot zwischen SNP41 und SNP42.

Eine weitere Verkleinerung der untersuchten genomischen Intervalle könnte zusätzlich die Frage beantworten, ob Unterschiede der Crossoverfrequenzen in intergenischen und in Exon- bzw. Intronbereichen bestehen. Dafür wurden zwei Regionen mit zusätzlichen SNPs genauer analysiert. Die erste Region liegt zwischen SNP5 und SNP12 in 21B4-21E2 und wurde zurvor als ein "hot" Spot für Rekombination identifiziert (Abb.3.6 B). Die zweite Region liegt zwischen *5-SZ-3596* und dem SNP22 in 21E2-21E3 (Abb.3.6 C).

In der Analyse der Crossoververteilung im putativen "hot" Spot der Region 21B4-21E2 ist nur ein Gen (*ush*) annotiert. Die Untersuchung von sechs zusätzlichen SNPs zeigt keine zufallsgemäße Verteilung der Crossoverereignisse (Abb.3.7 B). Keines der 28 Crossoverchromosomen wurde in der von den SNPs 6 und 7 flankierenden Region gefunden. Die höchste Zahl an Crossoverereignissen ereignete sich in der Region zwischen SNP8 und SNP9. Diese Region zeigt im Vergleich zu der von den SNPs 5 und 6 flankierten Region eine sechsfache Erhöhung der Crossoverfrequenz.



**Abbildung 3.7:** Crossoververteilung zwischen SNP5 und SNP12 in Region 21B4-21E2. (A) Hochauflösende Crossoverkartierung mit sieben SNPs zwischen 5-*SZ*-3548 und 5-*SZ*-3596 identifiziert einen "hot" Spot zwischen SNP5 und SNP12. (B) Analyse der "hot" Spot Region mit sechs zusätzlichen SNPs. Die Crossoverereignisse der 28 Crossoverchromosomen sind nicht zufallsgemäß verteilt. Zwischen SNP6 und SNP7 wurde kein Crossover gefunden. Der höchste Crossoverwert wurde zwischen SNP8 und SNP9 identifiziert.

In der zweiten untersuchten Region zwischen *5-SZ-3596* (21E2) und dem SNP22 wurden an 17 Crossoverchromosomen sieben zusätzliche SNPs analysiert (Abb.3.8). In dieser Region liegt ein Bereich mit hoher Gendichte (zwischen *5-SZ-3596* und SNP17),

ein intergenischer Bereich (SNP17/SNP18) und ein Gen (SNP18/SNP22) mit einem relativ großen Intronbereich (6,8kb). In diesem Gen (Gsc) konnten zwei SNPs genutzt werden, die präzise das zweite Intron flankieren. Somit war es möglich, zu prüfen, ob und mit welcher Frequenz (Crossover/bp) Crossoverereignisse im Exon und Intron von Gsc, im intergenischen Bereich zwischen Gsc und Pph13 bzw. im genreichen Intervall zwischen 5-SZ-3596 und SNP17 (6 Gene in ca. 12kb) nachgewiesen werden können. Der höchste Crossoverwert wurde im intergenischen Bereich zwischen Pph13 und Gsc (SNP17/SNP18) und im Intron 2 von Gsc (SNP19/SNP20) identifiziert (Abb.3.8 B). Im genreichen Bereich zwischen 5-SZ-3596 und SNP17 wurden geringe Crossoverwerte bzw. kein Crossover in CG2807 (5-SZ-3596/SNP15) gefunden (Abb.3.8 B). Zudem liegt kein Crossoverereignis von den 17 untersuchten Crossoverchromosmen im 3. Exon von Gsc (>1.8x10<sup>-6</sup> C/bp) (Abb.3.8 B). Dieses Ergebnis gibt eventuell einen Hinweis, dass zumindest im untersuchten Gen Gsc Crossoverereignisse bevorzugt im Intronbereich induziert werden. Für die Isolation der 372 Crossoverchromosomen wurde die cis-Kombination der RSw<sup>+</sup>-Elemente 5-SZ-3596 und CB-5483-3 mit dem Suppressor für PEV Su(var)2-8 gekreuzt. Somit könnten epigenetische Prozesse einen Einfluss auf die Crossoververteilung in diesem Bereich haben.



**Abbildung 3.8:** Crossoverkartierung in Region 21E2-21E3. **(A)** Kartierung von Crossoverereignissen in Region 21E2-21E3 durch Analyse von sieben SNPs. **(B)** Im Intervall von *5-SZ-3596*/SNP22 wurden sieben zusätzliche SNPs untersucht. Eine erhöhte Crossoverfrequenz konnte in der 3,4kb großen nicht kodierenden Region (SNP17/SNP18) und dem 6,8kb großen Intron von *Gsc* (SNP19/SNP20) nachgewiesen werden. Kein Crossoverereignis wurde im kodierenden Bereich von *CG2807* (*5-SZ-3596*/SNP15) und von den SNPs 18 und 19 präzise flankierten 3. Exon von *Gsc* identifiziert.

#### 3.1.4 Epigenetische Faktoren beeinflussen die Crossoververteilung in Region 21B4-21E2

Erste darauf orientierte Untersuchungen, inwieweit Chromatinfaktoren die Verteilung von Crossoverereignissen beeinflussen können, wurden in Region 21B4-21E2 für die Suppressormutationen  $Su(var)2-8^{01}$ ,  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  und die Doppelmutante  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  Su(var)2-10<sup>01</sup> durchgeführt (Abb.7.1, Abb.7.2, Abb7.3).

 $Su(var)2-8^{01}$  ist ein neuer Chromatinfaktor und zeigt im Vergleich zu  $w^{m4h}$  eine 1,7fache Erhöhung an Crossover für das Gesamtintervall (Tabelle 3.2; Abb.3.4). Die hochauflösende SNP-Crossoverkartierung mit sieben SNPs weist darauf hin, dass nur bestimmte Regionen eine besonders starke Reaktion zeigen. Eine signifikante Erhöhung  $Su(var)2-8^{01}$ für die der Crossoverereignisse konnte mit isolierten Crossoverchromosomen in drei Regionen im Vergleich zu  $w^{m4h}$  gefunden werden. Zwischen 5-SZ-3548 und SNP1, SNP4 und SNP5 sowie zwischen SNP12 und 5-SZ-3596 ist der Prozentwert an Rekombination pro Basenpaar um das 2,8fache bis 4,7fache erhöht (Abb.3.9 B). Die intergenische Region zwischen SNP5 und SNP10 zeigt auch bei den Crossoverchromosomen, die mit Su(var)2-8 isoliert wurden, einen putativen "hot" Spot für Crossover an (Abb.3.9 B).

Die Suppressormutation  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  zeigt keinen Unterschied in der Gesamtfrequenz zu  $w^{m4h}$  zwischen den  $RSw^+$ -Elementen 5-SZ-3548 und 5-SZ-3596 (Tabelle 3.2; Abb.3.4), aber signifikante Veränderungen in der Verteilung. Kein Crossoverereignis wurde für die 48 isolierten Crossoverchromosomen zwischen SNP2 und SNP3 gefunden (Abb.3.9 C). Die Region zwischen SNP4 und SNP5 zeigt dagegen eine 3,9fache Erhöhung von Crossover im Vergleich mit  $w^{m4h}$  (Abb.3.9 C). Der putative "hot" Spot für Crossover liegt bei den Crossoverchromosomen, die mit  $Su(var)Ubc9^{2-2}$ isoliert wurden, nicht wie bei  $w^{m4h}$  im intergenischen Bereich zwischen SNP5 und SNP10, sondern im daneben liegenden Intervall zwischen SNP10 und SNP12 (Abb.3.9 C).

Auch die Doppelmutante  $Su(var)Ubc9^{2-2} Su(var)2-10^{01}$  zeigt im Vergleich zu  $w^{m4h}$  keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtfrequenz in Region 21B4-21E2 (Tabelle 3.2; Abb.3.4). Jedoch konnte durch die Analyse von sieben SNPs eine drastische Veränderung in der Crossoververteilung festgestellt werden. Ebenso wie  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  zeigt die Doppelmutante kein Crossoverereignis zwischen SNP2 und SNP3 (Abb.3.9 D).



**Abbildung 3.9:** Chromatinfaktoren beeinflussen die Verteilung von Crossoverereignissen in Region 21B4-21E2. Das Crossoverereignis eines jeden Crossoverchromosoms wurde mittels SNP-Kartierung einem von acht Intervallen zugeordnet. Die untersuchten Genotypen sind (A)  $w^{m4h}$ ; +/+, (B)  $w^{m4h}$ ;  $Su(var)2-8^{01}/+$ , (C)  $w^{m4h}$ ;  $Su(var)Ubc9^{2-2}/+$  und (D) die Doppelmutante  $w^{m4h}$ ;  $Su(var)Ubc9^{2-2}$   $Su(var)2-10^{01}/+$ . Signifikante Unterschiede in der Crossoverfrequenz pro Basenpaar wurden zwischen den verschiedenen Genotypen beobachtet (schwarzer Pfeil).

Des Weiteren wurde kein Crossover zwischen SNP10 und SNP12 gefunden (Abb.3.9 D). Dagegen konnte eine 2,7fache Erhöhung von Crossover im Vergleich zu  $w^{m4h}$  zwischen SNP4 und SNP5 identifziert werden (Abb.3.9 D).

Somit beeinflussen Mutationen für Chromatinfaktoren wie  $Su(var)2-8^{01}$ ,  $Su(var)Ubc9^{2-2}$ und die Doppelmutante  $Su(var)Ubc9^{2-2}$   $Su(var)2-10^{01}$  die Verteilung von Crossoverereignissen in Region 21B4-21E2. Diese ersten Ergebnisse weisen darauf hin, dass noch weitere Faktoren untersucht werden müssen. Dies ist besonders wichtig auf Grundlage der Analysen epigenetischer Fakroren wie E(z) oder *SetDB1* an synaptonemalen Komplexen.

# **3.2** Epigenetische Kontrolle der Chromatinorganisation an frühen synaptonemalen Komplexen

Die Oogenese der *Drosophila melanogaster*-Weibchen ist in 14 Stadien unterteilt (King, 1970). Beginnend im Germarium, der proximalsten Struktur einer Ovariole, durchläuft eine Keimbahnstammzelle vier Teilungen mit unvollständiger Zytokinese. Eine Zelle dieser 16 Zellzyste wird später zur Eizelle. Die restlichen 15 Zellen entwickeln sich zu Nährzellen. Unmittelbar nach Bildung der germarialen Zyste wird das meiotische Programm eingeleitet. Dabei wird die Rekombination zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen vom synaptonemalen Komplex vermittelt. Der synaptonemale Komplex besteht aus Lateralelementen, an die jeweils die Schwesterchromatiden der Chromosomen anlagern und dem Zentralelement. Dieses baut sich wiederum aus dem Transversalfilament auf, das die zwei Lateralelemente miteinander verknüpft. Ein Transversalfilamentprotein in *Drosophila melanogaster* ist C(3)G (Page und Hawley, 2001).

### 3.2.1 Das Chromatin von frühen synaptonemalen Komplexen zeigt einen heterochromatischen Charakter

Für die Identifizierung von Histonmodifikationen, die im Chromatin von frühen synaptonemalen Komplexen vorhanden sind, wurden Germarien sowie die Oogenesestadien 2-3 von *Drosophila*-Ovarien präpariert. An diesem Gewebe erfolgten Doppelfärbungen mit einem monoklonalen C(3)G Antikörper und einem polyklonalen Antikörper für verschiedene Histonmodifikationen. Dabei markieren die Färbungen mit

dem für C(3)G spezifischen monoklonalen Antikörper (Page und Hawley, 2001) die Zellen im Germarium, in denen sich ein synaptonemaler Komplex befindet. Somit können Zellkerne, die einen synaptonemalen Komplex ausbilden, von den umliegenden Zellen durch ihre C(3)G Färbung unterschieden werden (Abb.3.10). Für die DNA-Färbung wurde DAPI verwendet. Weil die Präparate gespreitet wurden und die DNA mit den assoziierten Histonmodifikationen zu beiden Seiten des synaptonemalen Komplexes liegt, ist die Färbung von DNA, C(3)G und Histonmodifizierung nicht deckungsgleich (Abb. 3.10).



Abbildung 3.10: Identifizierung von Zellen mit synaptonemalem Komplex durch C(3)G Färbung. Doppelfärbung mit einem C(3)G spezifischen monoklonalen Antikörper und einem polyklonalen H3K9me3 Antikörper an Germarien von *Drosophila*-Ovarien. Färbung der DNA mit DAPI. Die Messbalken entsprechen  $2\mu$ m.

Abundante Färbungen am frühen synaptonemalen Komplex treten vor allem bei Histonmethylierungen, die charakteristisch für transkriptionsinaktives Chromatin sind, auf (Abb.3.11). Heterochromatin wird durch H3K9me2 und H3K9me3 gekennzeichnet. An larvalen Riesenchromosomen konnten diese Marks dem perizentrischen Heterochromatin zugeordnet werden (Ebert et al. 2004), wobei sich die Trimethylierung von H3K9 auf einen zentralen Bereich des Chromozentrums beschränkt (Ebert et al. 2006). Am synaptonemalen Komplex wurden H3K9me1 und H3K9me2, ähnlich wie in den somatischen Zellen, vornehmlich in Regionen mit intensiver DAPI-Färbung nachgewiesen (Abb.3.11). Ein starkes Signal konnte für H3K9me3 am gesamten synaptonemalen Komplex detektiert werden (Abb.3.11).

Ein weiterer Indikator eines inaktiven Chromatinzustandes sind die drei Methylierungsstufen von Lysin 27 am Histon 3 (H3K27). Übereinstimmend mit der abundanten H3K9me3 Färbung konnte für H3K27me1 ebenfalls eine starke Färbung am gesamten synaptonemalen Komplex beobachtet werden (Abb.3.11). H3K27me2 und H3K27me3 zeigen auch signifikante Färbungen, deren Intensität jedoch im Vergleich zu H3K27me1 schwächer ausfällt (Abb.3.11).



Abbildung 3.11: Histonmodifikationen, die heterochromatische Bereiche bzw. transkriptionsinaktives Chromatin kennzeichnen, weisen eine abundante Färbung an frühen synaptonemalen Komplexen auf. Die Färbung von H3K9me1 und H3K9me2 ist auf Regionen mit intensiven DAPI Signal beschränkt. H3K9me3 und H3K27me1 zeigen eine signifikante Färbung am gesamten synaptonemalen Komplex. Die Histonmodifikationen H3K27me2 und H3K27me3 wurden ebenfalls am gesamten synaptonemalen Komplex, jedoch mit einem schwächeren Signal dedektiert. Synaptonemale Komplexe wurden mit einem monoklonalen C(3)G Antikörper identifiziert. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Die Messbalken entsprechen  $2\mu$ m.

Histonmethylierungen, die aktives Chromatin bzw. euchromatische Regionen kennzeichnen, zeigen eine schwache Färbung an frühen synaptonemalen Komplexen (Abb.3.12). Aktives Chromatin in somatischen Zellen ist von den drei Methylierungsstufen von Lysin 4 am Histon 3 (H3K4) gekennzeichnet. Eine Färbung dieser Histonmodifikationen am synaptonemalen Komplex ist nur sehr schwach nachweisbar (Abb.3.12). Für H3K4me3 werden zwei bis drei Foci intensiver Färbung gefunden, die nicht mit DAPI-reichen Regionen kolokalisieren (Abb.3.12).

Auch für die euchromatischen Histonmarkierungen H3K36me1, H3K36me2, H3K36me3 und die Acetylierung von H3K9 ist nur eine schwache Färbung am gesamten synaptonemalen Komplex vorhanden (Abb.3.12).



Abbildung 3.12: Verteilung euchromatischer Histonmarkierungen am synaptonemalen Komplex. Histonmodifikationen, die mit aktivem Chromatin assoziiert sind, zeigen eine schwache Färbung an frühen synaptonemalen Komplexen. Einzig H4K4me3 weist in zwei Bereichen ein intensives Antikörpersignal auf. Identifizierung von synaptonemalen Komplexen durch den monoklonalen C(3)G Antikörper. DNA-Färbung mit DAPI. Die Messbalken entsprechen 2µm.

### 3.2.2 HP1α, SU(VAR)2-1 und SU(VAR)3-3 zeigen eine abundante Assoziation mit dem Chromatin am synaptonemalen Komplex

Chromatinfaktoren vermitteln die Etablierung eines spezifischen Chromatinzustandes. Für die Chromatinfaktoren HP1 $\alpha$ , SU(VAR)3-9, SU(VAR)3-3 und SU(VAR)2-1 wurde die Assoziation mit dem Chromatin am synaptonemalen Komplex mit spezifischen Antikörpern untersucht (Abb.3.13).

Das Histon Protein 1  $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) ist in somatischen Zellen vornehmlich mit perizentrischem Heterochromatin assoziiert (Eissenberg et al., 1990). Weil HP1 $\alpha$  dabei spezifisch an H3K9me2 und H3K9me3 bindet, korreliert die Bindung von HP1 $\alpha$  mit der Verteilung von H3K9me3 auch am synaptonemalen Komplex (Abb.3.11, Abb.3.13).

Die H3K4me1/me2 Demethylase SU(VAR)3-3 und das SU(VAR)2-1 Protein zeigen ebenfalls eine uniforme Assoziation mit dem Chromatin an frühen synaptonemalen Komplexen (Abb.3.13). SU(VAR)2-1 ist ein neuer Chromatinfaktor, der in larvalen Riesenchromsomen mit jeder Bande assoziiert (Walther, persönliche Mitteilung). Für die korrekte Etablierung von Heterochromatin ist SU(VAR)3-3 essentiell. Das Protein bindet während der frühen Embryonalentwicklung an der apikalen Seite der Blastodermzellkerne und somit im Bereich des späteren Heterochromatins. Dort bildet SU(VAR)3-3 zusammen mit RPD3, HP1 und SU(VAR)3-9 einen Komplex und verhindert die Etablierung der euchromatischen H3K4me2 Modifikation im prospektiven Heterochromatin (Rudolph et al., 2007).

SU(VAR)3-9 ist eine H3K9me2/me3 spezifische Histonmethyltransferase und in somatischen Zellen mit Chromozentren-Heterochromatin assoziert (Ebert et al., 2004). Am Chromatin synaptonemaler Komplexe zeigt SU(VAR)3-9 eine ähnliche Verteilung wie H3K9me2 und kolokalisiert mit DAPI intensiv gefärbten Regionen (Abb.3.13; Abb.3.11). Eine schwache Färbung wurde für die Histondeacetylase RPD3 an synaptonemalen Komplexen beobachtet (Abb3.13).



Abbildung 3.13: Assoziation von Chromatinfaktoren am frühen synaptonemalen Komplex. Durch Doppelfärbung mit einem monoklonalen C(3)G Antikörper und polyklonaler Antikörper für verschiedene Chromatinproteine wurde deren Assoziation mit dem Chromatin an synaptonemalen Komplexen untersucht. Die DNA-Färbung erfolgte mit DAPI. HP1a, SU(VAR)2-1 und SU(VAR)3-3 zeigen eine abundante Assoziation mit dem Chromatin früher synaptonemaler Komplexe. Die Färbung für SU(VAR)3-9 ist in DAPI-reichen Regionen am intensivsten. Für RPD3 wurde eine schwache Färbung am frühen synaptonemalen Komplex beobachtet. Die Messbalken entsprechen 2µm.

### 3.2.3 Fosmid-Transgene zur kontrollierten Expression von Fusionsproteinen für Chromatinfaktoren

Weil für viele Chromatinproteine keine spezifischen Antikörper für immunzytologische Analysen zur Verfügung stehen, wurden Fusionsproteine in Fosmid-Klonen generiert (Tabelle 2.6). Fosmide enthalten mit 30-40kb großen Bereichen des *Drosophila*-

Genoms alle regulatorischen Einheiten eines zu analysierenden Gens (Ejsmont et al., 2009). Mittels homologer Rekombination wurden für 16 verschiedene Chromatinproteine Fusionskonstrukte mit einem V5-Tag oder SGFP-Tag hergestellt (Tabelle 2.6). Für beide Protein-Tags existieren spezifische kommerzielle Antikörper. Anschließend konnten für zehn der 16 Fusionskonstrukte transgene Linen von GENETIC SERVICES, INC. (Sudbury, Massachusetts USA) generiert und balancierte Stämme etabliert werden (Tabelle 2.6). Diese Konstrukte sind CG2807-V5, Suv4-20-SGFP, Su(var)2-1-V5, HP1-V5, CG5381-V5, SuUR-V5, mod(mdg4)-V5, Mes4-V5, egg-V5 und Gcn5-V5. Zunächst wurden immunzytologische Analysen für das Fusionsprotein HP1-V5 an Germarien durchgeführt. Dafür wurde die Chromatin-Assoziation des Transgens mit einem monoklonalen V5-Antikörper und einem HP1 spezifischen Antikörper an homozygoten transgenen Tieren (In(1)w<sup>m4h</sup>/In(1)w<sup>m4h</sup>; pFlyFos030711HP1-V5/pFlyFos030711HP1-V5; +/+) analysiert (Abb. 3.14). Die nachgewiesenen Proteine kolokalisieren in den Zellen des Germariums. Weiterhin wurde die Chromatin-Assoziation des endogenen HP1-Proteins mit einem HP1 spezifischen Antikörper an einer Wildtypkontrolle überprüft und zeigt identische Chromatin-Assoziation wie das Fusionsprotein HP1-V5 (Abb. 3.14).



**Abbildung 3.14:** Das Fusionsprotein HP1-V5 und das endogene HP1 Protein zeigen identische Chromatin-Assoziation in Germarien von *Drosophila*. Der Nachweis des endogenen HP1 Proteins erfolgte mit einem HP1 spezifischen Antikörper an Wildtyp-Germarien  $[In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}; +/+; +/+]$ . Die Färbung des HP1-V5 Fusionsproteins wurde mit einem monoklonalen V5 Antikörper an homozygoten  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; pFlyFos030711HP1-V5/pFlyFos030711HP1-V5; +/+ Tieren durchgeführt. DNA Färbung mit DAPI. Die Messbalken entsprechen 10µm.

# 3.2.4 Generierung eines polyklonalen C(3)G Antikörpers für immunzytologische Analysen

Die Generierung von Fusionsproteinen in Fosmid-Klonen (Tabelle 2.6) eröffnet die Möglichkeit, die Assoziation neuer Chromatinfaktoren mit dem Chromatin des synaptonemalen Komplexes zu untersuchen. Dabei wurden die Gene zum Großteil mit einem V5-*Tag* fusioniert. Optimale immunzytologische Analysen sind jedoch nur mit dem kommerziellen monoklonalen V5-Antikörper möglich. Weil die Identifizierung eines synaptonemalen Komplexes ebenfalls mit einem monoklonalen C(3)G Antikörper (Page und Hawley, 2001) erfolgt, sollte für C(3)G ein neuer polyklonaler Antikörper generiert werden.

Die coiled-coil-reiche zentrale Domäne (AS 158-646) des C(3)G Proteins wird von einer N- und C-terminalen Domäne flankiert, die jeweils keine coiled-coil Proteinstrukturmotive ausbilden (Page und Hawley, 2001; Page und Hawley, 2004; Jeffress et al., 2007). Das C(3)G spezifische Antigen wurde für die C-terminale Domäne des Proteins generiert und umfasst die Aminosäuren 658-671 (Abb.3.15 A). Die Herstellung des C(3)G-Peptids erfolgte durch die Firma INNOVAGEN AB (Lund, Schweden), die auch die Immunisierung des Kaninchens zur Generierung des polyklonalen C(3)G Antikörpers durchführte. Mit einem Dot-Blot erfolgte der semiquantitative Nachweis des auf der Membran immobilisierten C(3)G Antigens mit den nach der Immunisierung erhaltenen Blutseren (Abb.3.15 B). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Antikörpertiter ab dem 3. Antiserum nicht mehr steigt, weshalb die Immunisierung des Kaninchens abgebrochen wurde. Anschließend erfolgte die Aufreinigung von Antiserum 4 mit dem SulfoLink<sup>®</sup> Immobilization Kit for Peptides (Thermo Scientific). Der aufgereinigte C(3)G Antikörper wurde mit einem Verdünnungsfaktor von 1:6 in drei Elutionsfraktionen aufgenommen. Deren Auftrennung im SDS-PAA-Gel zeigt, dass der Antikörper erfolgreich von der Säule eluiert wurde (Abb.3.15 C). Die Elutionsfraktionen wurden im Verhältnis 1:1:1 vereinigt und immunzytologisch getestet. Eine Doppelfärbung mit dem monoklonalen C(3)G Antikörper (Page und Hawley, 2001) und Antiserum 4 an gespreitetem, germarialen Gewebe zeigt für das Antiserum 4 eine starke Hintergrundfärbung (Abb.3.15 D). Die Immunzytologie mit dem monoklonalen C(3)G Antikörper und dem aufgereinigten polyklonalen C(3)G Antikörper aus Antiserum 4 zeigt eine exakte Kolokalisation beider Antikörpersignale (Abb.3.15 D). Damit erkennt der polyklonale C(3)G Antikörper ebenfalls spezifisch das C(3)G Protein in der Zentralregion des synaptonemalen Komplexes.



Abbildung 3.15: Generierung eines polyklonalen C(3)G spezifischen Antikörpers. (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur des C(3)G Proteins. Für die Herstellung eines spezifischen Antigens wurden die Aminosäuren 658-671 der C-terminalen Proteindomäne verwendet. (B) Im Dot-Blot wurde der Antikörpertiter mit einer Verdünnungsreihe des für die Immunisierung verwendeten Antigens nachgewiesen. (C) Aufreinigung des C(3)G Antikörpers über SulfoLink<sup>®</sup> Immobilization Kit for Peptides aus dem 4. Antiserum. SDS-PAA-Gel der drei Elutionsfraktionen. (D) Der polyklonale C(3)G Antikörper zeigt nach der Aufreinigung mit dem SulfoLink<sup>®</sup> Immobilization Kit for Peptides dasselbe Verteilungsprofil wie der monoklonale C(3)G Antikörper. Die Messbalken entsprechen 10µm.

### 3.2.5 Die Nullmutation von *dSetDB1* reduziert H3K9me3 an frühen synaptonemalen Komplexen

Die Methylierung von H3K9 wird in somatischen Zellen von SU(VAR)3-9 und dSETDB1 vermittelt (Schotta et al., 2002; Seum et al., 2007a). Dabei übernimmt SU(VAR)3-9 hauptsächlich die H3K9 Di- und Trimethylierung in perizentrischem Heterochromatin (Ebert et al., 2004) und dSETDB1 vermittelt am 4. Chromosom die H3K9 Dimethylierung (Seum et al., 2007a). Am synaptonemalen Komplex erfolgt offenbar die H3K9-Trimethylierung durch dSETDB1 und nicht durch SU(VAR)3-9 (Abb.3.16).

Das amorphe Allel  $Su(var)3-9^{06}$  ist aus einer Röntgenstrahl-Mutagenese hervorgegangen (Tschiersch et al., 1994). Durch eine ca. 6 kb große Insertion wird kein Su(var)3-9 spezifisches Transkript gebildet (Schotta et al., 2002). Bei immunzytologischen Untersuchungen dieser Nullmutante an frühen synaptonemalen Komplexen wurde keine Veränderung von H3K9me3 im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen (Abb.3.16). Die Mutantenovarien zeigen keine morphologischen Besonderheiten.

Die Analysen für dSETDB1 wurden an homozygoten  $egg^{1473}$ - Weibchen durchgeführt. Bei diesem Allel handelt es sich um eine *loss-of-function* Mutation, bei der es durch eine 856bp Deletion zum vollständigen Verlust der SET-Domäne im Protein kommt (Clough et al. 2007). Homozygote  $egg^{1473}$ -Ovarien sind sehr klein und degeneriert, wodurch nur eine geringe Anzahl an synaptonemalen Komplexen gefunden wurde. Deren immunzytologische Analyse zeigt eine sehr schwache Färbung von H3K9me3 (Abb.3.16).



**Abbildung 3.16:** Die H3K9-Trimethylierung wird am synaptonemalen Komplex von dSETDB1 vermittelt. Im Vergleich zum Wildtyp ( $w^{m4h}$ -Stamm) zeigt die homozygot lebensfähige Nullmutante  $Su(var)3-9^{06}$  keine Reduktion des H3K9me3 Signals am synaptonemalen Komplex. Dagegen zeigt die Untersuchung synaptonemaler Komplexe der homozygoten Nullmutante  $egg^{1473}$  eine signifikante Reduktion von H3K9me3. Die Messbalken entsprechen 2µm.

# 3.2.6 Überexpression von E(z) führt zu einer kompakten Chromatinstruktur am synaptonemalen Komplex

In Abschnitt 3.1.2 wurde der Einfluss verschiedener Chromatinfaktoren auf die Crossoverfrequenz im distalen Bereich von 2L beschrieben. In Weibchen mit einer zusätzlichen E(z)-Kopie sind Crossoverereignisse zwischen 5-SZ-3548 und 5-SZ-3596 signifikant reduziert (Tabelle 3.2; Abb.3.4). E(Z) vermittelt die H3K27 Mono-, Di- und Trimethylierung in somatischen Zellen (Ebert et al., 2004). Immunzytologische Analysen des mit dem synaptonemalen Komplex assoziierten Chromatins konnten eine abundante H3K27me1 Färbung zeigen (Abb.3.11). Um einen Zusammenhang zwischen der Crossoverfrequenz und der Chromatinstruktur am synaptonemalen Komplex nachzuweisen, wurde in Weibchen mit zwei zusätzlichen E(z)-Kopien die globale Chromatinorganisation von synaptonemalen Komplexen elektronenmikroskopisch untersucht.

Der synaptonemale Komplex assembliert in Region-2a des Germariums und dissoziiert ab Stadium 6 der Eikammerentwicklung. Weil Doppelstrangbrüche, die ein Crossoverereignis generieren können, in Region 2a des Germariums initiiert werden und deren Reparatur in Region 3 abgeschlossen ist, wurden synaptonemale Komplexe in den Germarien untersucht.

Um den Effekt von zwei zusätzlichen genomischen E(z) Kopien auf die globale Chromatinorganisation am synaptonemalen Komplex zu analysieren, wurden Ovarien von homozygoten  $w^{1118}{}_{iso}/w^{1118}{}_{iso}$ ; P{ $E(z)ry^+B$ }32/P{ $E(z)ry^+B$ }32 Weibchen in SPURR eingebettet und anschließend mit einem Mikrotom geschnitten. Die Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte am Elektronenmikroskop (EM). Nachdem bei 300facher Vergrößerung die Struktur eines Germariums identifiziert wurde (Abb.3.17 A), erfolgte dessen Analyse mit der Untersuchung eines jeden Zellkerns bei 7.500facher Vergrößerung (Abb.3.17 B). In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen weist der synaptonemale Komplex eine leiterartige Struktur von durchschnittlich 95nm auf (Abb.3.17 B). Das Chromatin der parentalen Schwesterchromatiden liegt links und rechts davon.



Abbildung 3.17: Die Untersuchung aller Zellen eines Germariums identifiziert Zellkerne, die einen synaptonemalen Komplex ausprägen. (A) Nachdem auf den einzelnen Ultradünnschnitten bei 150facher Vergrößerung Germarien identifiziert wurden, (B) erfolgte die Untersuchung aller Zellen bei 7.500facher Vergrößerung, da synaptonemale Komplexe erst bei dieser Vergrößerung erkennbar sind.

In drei Germarien von  $w^{1118}{}_{iso}/w^{1118}{}_{iso}$ ; P{ $E(z)ry^+B$ }32/P{ $E(z)ry^+B$ }32 Weibchen wurden insgesamt vier verschiedene Zellkerne mit synaptonemalen Komplexen identifiziert, die zum Teil in verschiedenen Schnittebenen wiedergefunden worden. Dabei zeigt die globale Chromatinorganisation am synaptonemalen Komplex der Überexpression von E(z) im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Verdichtung (Abb.3.18).



**Abbildung: 3.18:** Weibchen mit zwei zusätzlichen genomischen Kopien von E(z) zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine stärkere Chromatinkondensation am synaptonemalen Komplex. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Wildtyp (A), (B), (C) (S. Mietzsch) und  $w^{1118}_{iso}/w^{1118}_{iso}$ ;  $P\{E(z)ry^+B\}32/P\{E(z)ry^+B\}32$  (D), (E), (F) synaptonemalen Komplexen.

### 3.2.7 Die globale Chromatinorganisation der *taiman*-Mutation ist am synaptonemalen Komplex dekondensiert

Eine Mutation in TAIMAN identifizierte das Ecdysonrezeptor-Koaktivatorprotein als dominanten Suppressor für PEV (Lein, 2011). In somatischen Zellen führt die Mutation von *taiman* zu einer Verringerung von H3K9me2 und H3K9me3 (Lein, 2011). Dagegen sind die H3K9-Acetylierung und H3K4me3 erhöht (Lein, 2011). Zudem wurde in *taiman*-Mutanten eine verstärkte Expression von E(z) beobachtet, wodurch die H3K27-Trimethylierung ebenfalls erhöht ist (Lein, 2011).

Immunzytologische Analysen mit einem C(3)G Antikörper an Ovarien homozygoter *taiman*-Mutanten-Weibchen zeigten, dass die Organisation des synaptonemalen Komplexes offensichtlich beeinträchtigt ist und dieser nicht mehr kondensiert zu sein scheint (Mietzsch, persönliche Mitteilung).

Zunächst wurde in den Germarien die globale Chromatinorganisation an synaptonemalen Komplexen der homozygoten *taiman*-Mutation untersucht. In fünf Germarien wurden drei synaptonemale Komplexe in verschiedenen Zellkernen identifiziert, deren globale Chromatinorgansation im Vergleich zum Wildtyp offener ist (Abb.3.19).



**Abbildung: 3.19:** Das Chromatin in *taiman*-Mutanten-Weibchen ist offenbar an synaptonemalen Komplexen dekondensiert. Im Vergleich zum Wildtyp (A), (B) und (C) zeigt das Chromatin der *taiman*-Mutante  $w^{m4h}$ ; Df(2L)tai2/Df(2L)tai2 (D), (E) und (F) einen geringeren Kondensationsgrad am synaptonemalen Komplex.

Zusätzlich wurden synaptonemale Komplexe von Oocyten der Eikammerstadien 3-6 untersucht. Ab Eikammerstadium 3 beginnt das Chromatin der Oocyte zu kondensieren und liegt ab Stadium 4 als kompaktes Karyosom vor (King et al., 1970). Immunzytologische Färbungen von Ovarien homozygoter Df(2L)tai2 Weibchen zeigten bereits, dass das Eizellkern-Chromatin in den Eikammern dekondensiert vorliegt (Mietzsch, persönliche Mitteilung). Die EM-Analysen konnten diese Beobachtung bestätigen. Im Vergleich zum Wildtyp ist das Eizellkern-Chromatin der *taiman*-Mutante [Df(2L)tai2] dekondensiert. Zudem wurden keine synaptonemalen Komplexe in den sieben analysierten Oocyten von homozygoten Df(2L)tai2-Weibchen gefunden (Abb.3.20).



**Abbildung: 3.20:** In den Oocyten der Eikammerstadien 3-6 ist das Chromatin der homozygoten Df(2L)tai2-Weibchen dekondensiert. Im Vergleich zum Wildtyp (A, A`, A``) liegt das Eizellkern-Chromatin der *taiman*-Mutante  $w^{m4h}$ ; Df(2L)tai2/Df(2L)tai2 (B, B`, B``) nicht als stark kondensiertes Karyosom vor. Synaptonemale Komplexe (Pfeilkopf) wurden nur im Wildtyp gefunden.

### Identifizierung neuer Su(var)-Mutationen

Für die Kartierung neuer epigenetischer Faktoren wurden zwei verschiedene Verfahren verwendet. Die Gesamtgenom-Sequenzierung von Mutantenlinien zur Identifizierung des mutierten Gens erfolgte für Su(var)3-4 (Abschnitt 3.3). Weil Su(var)3-4 rezessiv letal ist, wurde die Sequenzierung an heterozygoten Tieren durchgeführt, die zuvor durch Kreuzung mit einer ebenfalls total sequenzierten isogenen Linie generiert wurden. Gleichzeitig wurde die Totalsequenz der Linie bestimmt, in der die Su(var)-Mutation induziert wurde. Für die Identifizierung des mutierten Gens wurden zwei Allele des zu untersuchenden Suppressors direkt miteinander verglichen, um die Gene zu erkennen, die unterschiedliche Austausche den untersuchten nicht-synonyme in Mutantenchromosomen tragen.

Weil für Su(var)2-8, Su(var)2-12 und Su(var)2-13 jeweils nur ein Allel existiert und diese ebenfalls rezessiv letal sind, eignet sich die Sequenzierungsmethode zur Identifizierung der Suppressormutation nicht für diese drei Suppressoren. Deren Kartierung erfolgte mit Hilfe genetischer Verfahren, die die Mutation auf einen definierten Genombereich eingrenzen konnten (Abschnitt 3.4; 3.5; 3.6). Nach der Kartierung des Su(var)-Locus mit Hilfe von in der genomischen Sequenz definierten Duplikationen wurden Crossoverchromosomen durch Kreuzung der Suppressormutation mit einer *cis*-Kombination von zwei *RSw*<sup>+</sup>-Transgenen isoliert. In den Crossoverchromosomen erfolgte die Kartierung der Crossoverereignisse durch SNP-Analysen. Anschließend wurde im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement analysiert, ob die Crossoverchromosomen Träger der Suppressormutation sind. Die Zusammenführung aller Ergebnisse ermöglicht die Kartierung der Mutationen in einem definierten Genombereich. Durch Rescueanalysen unter Einsatz von pFlyFos Transgenen konnten die Ergebnisse der Kartierungsexperimente bestätigt werden.

#### **3.3 Sequenzierung von Mutantenlinien zur Identifizierung des mutierten Gens**

#### 3.3.1 Identifizierung von Su(var)3-4

Die Sequenzierung des gesamten *Drosophila*-Genoms eröffnet theoretisch die Möglichkeit, Mutationen, die einen Suppressoreffekt auf PEV manifestieren, effizient zu lokalisieren. Durch den Vergleich zweier Mutantenallele, die im gleichen genetischen Hintergrund induziert wurden, sollten spezifische Nucleotidaustausche, die ein gemeinsames Gen betreffen, identifiziert werden können. Ein starker Suppressor für PEV ist Su(var)3-4 (Abb.3.21), der ursprünglich durch Komplementationsanalysen mit Deletionen in der Chromosomenregion 84D13-85E2 kartiert wurde (Reuter et al., 1986). Insgesamt sechs Su(var)-Mutationen wurden zunächst dem Su(var)3-4-Locus zugeordnet (Wustmann et al., 1989). Weil das Allel  $Su(var)3-4^{03}$  jedoch keine Allelie mit den anderen fünf Su(var)3-4 Allelen zeigt, betrifft dieses ein unabhängiges Su(var)-Gen (Tabelle 3.4). Die restlichen fünf Su(var)3-4 Allele sind in jeder möglichen transheterozygoten Kombination letal (Tabelle 3.4).

<i>Su(var)3-4</i> Allele	Männchen					
Weibchen	3-4[01]	3-4[02]	3-4[03]*	3-4[04]	3-4[05]	3-4[06]
3-4[01] (R)		- 0/75	+ 55/64	- 0/73	- 0/31	- 0/33
3-4[02] (EMS)	- 0/157	$\searrow$		- 0/71	- 0/40	- 0/41
3-4[03]* (EMS)	+ 70/124	+ 38/29	$\ge$	+ 39/63	+ 14/32	+ 37/68
3-4[04] (EMS)	- 0/210	- 0/141	+ 36/42	$\ge$	- 0/48	- 0/100
3-4[05] (EMS)	- 0/100	- 0/69	+ 8/33			- 0/56
3-4[06] (R)	- 0/128	- 0/103	+ 16/47	- 0/84	- 0/36	

Tabelle3.4 Komplementationstabelle der Su(var)3-4 Allele

\*) kein Su(var)3-4 Allel

grün) Weibchen fertil

rot) keine transheterozygoten Nachkommen

Die Su(var)3-4 Allele wurden vor mehr als 20 Jahren nach Röntgenstrahl-[ $Su(var)3-4^{01;06}$ ] und EMS-Experimenten [ $Su(var)3-4^{02;04;05}$ ] isoliert und über einen sehr langen Zeitraum mit einem *TM3* Balancerchromosom in Inzuchtlinien gehalten. In dieser Zeit können zahlreiche Sequenzpolymorphismen akkumuliert werden. Weiterhin ist es möglich, dass in Folge von Conversionsereignissen Sequenzpolymorphismen vom *TM3* Balancerchromosom auf die Mutantenchromosomen übertragen werden können (Cooper et al., 2008). Zum Ausschluss der Polymorphismen im *TM3* Chromosom wurden die Mutantenlinien mit einem ebenfalls sequenzierten  $w^{1118}$  isogenen Inzuchtstamm gekreuzt und die DNA aus den Su(var)3-4/+ heterozygoten Nachkommen isoliert (Abb.3.21).



Die Genomsequenzierung erfolgte an den Mutantenlinien  $Su(var)3-4^{01}/+$  und  $Su(var)3-4^{04}/+$ . Hochauflösende SNP-Crossoverkartierung von Crossoverchromosomen, die durch die Kreuzung von  $Su(var)3-4^{01}$  mit einer *cis*-Kombination der beiden  $RS5w^+$ -Elemente 5-HA-1514 (84D9) und 5-HA-1872 (84E5) generiert wurden, kartierten die Suppressormutation proximal von 5-HA-1514 (Anhang 7.3). Dadurch beschränkte sich die Auswertung der Sequenzdaten auf dem rechten Arm von Chromosom 3 in Region 81F6-85F1 auf ca. 5 Millionen Nucleotide. In diesem Bereich liegt eine Nucleotidkonservierung von 0.42 vor, die aus einem multiplen Alignment 15 verschiedener Spezies errechnet wurde. Der Wert 1 entspricht einer absoluten Konservierung des Nucleotids. Bei einem Wert von 0 würde keine Konservierung vorliegen. Im Vergleich zum Referenzgenom der Flybase Datenbank wurden in der Region 81F6-85F1 für  $Su(var)3-4^{01}$  insgesamt 3726 variante Positionen gefunden. Für  $Su(var)3-4^{04}$  wurden 2705 variante Positionen im Vergleich zum Referenzgenom in dem gleichen Intervall identifiziert. Um Sequenzpolymorphismen auszuschließen, wurden alle SNPs, die auch in den sequenzierten isogenen Linien  $w^{1118}_{iso}$ ;  $2_{iso}$ ;  $3_{iso}$  ( $w^{iso}$ ), Canton S, Berlin wild und  $w^{m4h}$ ; +/+ im Vergleich zum Referenzgenom gefunden wurden, eliminiert. Anschließend wurden die SNPs in synonyme und nicht-synonyme Austausche klassifiziert. Identische nicht-synonyme SNPs in den beiden Mutantenlinien wurden ebenfalls eliminiert. Diese kennzeichnen wahrscheinlich Conversionsereignisse zwischen TM3 und dem Mutantenchromosom. Insgesamt konnten 68 nicht-synonyme SNPs für  $Su(var)3-4^{01}$  und 58 nicht-synonyme SNPs für  $Su(var)3-4^{04}$  identifiziert werden, die spezifisch für das jeweilige Mutantenchromosom sind. Im abschließenden Schritt wurden die Gene ermittelt, bei denen sowohl für  $Su(var)3-4^{01}$  als auch für  $Su(var)3-4^{04}$  verschiedene nicht-synonyme Austausche gefunden wurden. Insgesamt trifft dies für acht Gene in der analysierten Region zu. Der Vergleich mit den ebenfalls sequenzierten Mutantenchromosomen von  $Su(var)3-8^{01}$  und  $Su(var)3-8^{02}$  eliminierte vier dieser Gene. Letztlich zeigen die Gene CG1041, CG14608, CG32468 und CG31544 spezifische Nucleotidaustausche in den Mutantenchromosomen von  $Su(var)3-4^{01}$  und  $Su(var)3-4^{04}$  (Tabelle 3.5).

Für die vier Kandidatengene wurde mit dem PSORT II Prediction Programm analysiert, ob die putativen Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit Kernproteine darstellen und zusätzlich die jeweilige annotierte *flybase* Funktion mit dem SMART Programm (<u>Simple Modular Architecture Research Tool</u>) überprüft (Tabelle 3.5).

Gen/	annotierte <i>flybase</i> Funktion/	Nucleotidaustausch-	Nucleotidaustausch-	
zytolog.	Kernlokalisation	position in $Su(var)3-4^{01}/$	position in $Su(var)3-4^{04}/$	
Region		Aminosäureaustausch	Aminosäureaustausch	
CG1041/	Carnitine O Acetyltransferase/	2197775/Q <b>→</b> L	2199545/T <b>→</b> I	
83E4	0% nuclear			
CG14608/	Chitinbindung/	3061399/A <b>→</b> E	3065703/G <b>→</b> A	
84D2	52% nuclear			
CG32468/	unbekannt/	3140457/A <b>→</b> A?	3140534/Y <b>→</b> S	
84D3	13% nuclear			
CG31544/	unbekannt/	3245595/Q <b>→</b> R	3245275/L <b>→</b> I	
84D6	30% nuclear		3245745/E <b>→</b> G	
			3245808/K <b>→</b> R	
			3246293/T→M	

Tabelle 3.5 Kandidatengene für Su(var)3-4

Zunächst wurden an  $Su(var)3-4^{01;02;04;05;06}$ /+ DNA der ORF und die Intron-Exon-Grenzen von *CG1041* amplifiziert und anschließend sequenziert. Eine zweifache Überprüfung verifizierte jeden identifizierten Nucleotidaustausch. In Abbildung 3.22 sind die Ergebnisse dieser Analysen zusammengefasst.



**Abbildung 3.22:** *CG1041* kodiert offenbar nicht für *Su(var)3-4.* **(A)** PCR-Fragmente. **(B)** *CG1041* bildet zwei Transkripte, die sich in den ersten fünf (RB) bzw. ersten neun (RA) Aminosäuren voneinander unterscheiden. Für alle fünf *Su(var)3-4* Allele wurde der ORF von *CG1041* sequenziert. Dabei konnte nur für *Su(var)3-4<sup>01</sup>* (Q 406 L) und *Su(var)3-4<sup>04</sup>* (T 8 I) ein spezifischer Nucleotidaustausch identifiziert werden. Die anderen Nucleotidaustausche wurden in mindestens zwei Allelen nachgewiesen. Alle dargestellten Aminosäureaustausche beziehen sich jeweils auf den RB-Klon. Einzige Ausnahme bildet der Austausch Threonin zu Isoleucin an Position 8 im RA-Klon von *CG1041*.

Offenbar kodiert *CG1041* nicht für Su(var)3-4, da teilweise die identifizierten Mutationen in mehreren Su(var)3-4 Allelen gleichzeitig auftreten. Die Sequenzierung der anderen drei Kandidatitengene steht noch aus.

#### 3.3.2 Sequenzierung neuer Su(var)Ubc9-Allele

Ein weiterer starker Suppressor für PEV ist Su(var)Ubc9. Ubc9 wird von dem Gen lwr kodiert und liegt in 21E2. Defizenz Df(2L)ED12443, die die Region 21D1-21E2 und damit den Ubc9-Locus deletiert, ist in der transheterozygoten Kombination mit vier Suppressormutionen letal (Tabelle 3.6). Diese Su(var)-Mutationen sind Su(var)2-2(Sub-46), Su(var)2-26 (Sub-47), Su(var)2-23 (Sub-37) und Su(var)2-8 (Sub50). In der transheterozygoten Kombination mit der P-Element Insertion P{PZ}lwr<sup>05486</sup> sind Su(var)2-2, Su(var)2-26 und Su(var)2-23 jedoch nicht Su(var)2-8 letal (Tabelle 3.6). Zudem zeigt Su(var)2-8 keine Allelie mit Su(var)2-2, Su(var)2-26 und Su(var)2-23 (Tabelle 3.6). Somit betrifft *Su(var)2-8* ein unabhängiges *Su(var)*-Gen in 21E2.



Tabelle3.6 Komplementationstabelle der Su(var)Ubc9 Allele

\*) kein Su(var)Ubc9 Allel

Die drei Su(var)Ubc9 Allele Su(var)2-2, Su(var)2-26 und Su(var)2-23 wurden nach EMS-Experimenten isoliert und sind homozygot nicht lebensfähig. Für die Sequenzierung des Ubc9 Gens wurden die drei Mutantenlinien mit dem bereits sequenzierten isogenen  $w^{iso}$ -Inzuchtstamm gekreuzt und DNA aus Su(var)Ubc9/+ Heterozygoten isoliert. An dieser erfolgten zwei PCR-Reaktionen, wodurch der gesamte ORF von Ubc9 analysiert werden konnte (Abb.3.23 B).

Su(var)2-26 und Su(var)2-23 zeigen einen identischen Nucleotidaustausch in Ubc9 an Stelle 297 (Abb.3.23 C, D). Dieser bedingt einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an Position 17 im Protein. In Su(var)2-2 konnte an Stelle 508 ein Nucleotidaustausch nachgewiesen werden, der zum Austausch von Prolin zu Serin an Position 88 im Protein führt (Abb.3.23 C, D).



**Abbildung 3.23:** Su(var)2-2, Su(var)2-23 und Su(var)2-26 sind Allele von Su(var)Ubc9. (A) Ein SNP dient zur Identifizierung des Suppressorchromosoms. (B) PCR-Fragmente. (C) Ubc9 bildet vier Transkripte, die sich in der 5'UTR und 3'UTR voneinander unterscheiden. Alle vier Transkripte bilden ein identisches Ubc9 Protein. Die Sequenzierung von Ubc9 ergab für die drei untersuchten Suppressormutationen einen spezifischen Nucleotidaustausch in der kodierenden Region. (D) Das Ubc9 Protein bildet eine UBCc Domäne. Innerhalb dieser liegen die spezifischen Aminosäureaustausche von Su(var)2-2, Su(var)2-23 und Su(var)2-26.

Die identifizierten Mutationen der drei *Su(var)Ubc9* Allele liegen jeweils in der UBCc Domäne von Ubc9 (Abb.3.23 D). Der Vergleich zwischen dem humanen Ubc9 Protein und dem Ubc9 Protein von *Drosophila melanogaster* zeigt, dass die Austausche konservierte Aminosäuren betreffen (Abb.3.24).



**Abbildung 3.24:** Die Proteinsequenz von Ubc9 ist hoch konserviert. Aminosäurevergleich zwischen *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens* und Lage der Aminosäureaustausche von Su(var)2-2, Su(var)2-23 und Su(var)2-26. In der Consensus-Sequenz sind identische/homologe Aminosäuren (\*) und chemisch ähnliche Aminosäuren (:) angegeben.

Mit transgenen Linien eines Konstruktes für den endogenen Locus von *Ubc9* sollte überprüft werden, ob der Suppressorphänotyp von *Su(var)2-2, Su(var)2-23* und *Su(var)2-26* kompensiert werden kann. Dafür wurde ein 3,3kb großes genomisches Fragment des *Ubc9*-Locus über PCR an  $w^{iso}$  DNA amplifiziert, in pP{RS3[ $w^+$ ]} kloniert und zwei transgene Linien generiert. Mittels inverser PCR konnte der Intsertionsort von pP{RS3[ $w^+$ (Ubc9)]}-1 in 61C8 (3L:707880) kartiert werden. Für pP{RS3[ $w^+$ (Ubc9)]}-2 war keine eindeutige Zuordnung des Insertionsortes möglich. Jedoch zeigt nur pP{RS3[ $w^+$ (Ubc9)]}-2 einen Rescueeffekt für die drei *Su(var)Ubc9* Allele. Für die Überprüfung dieses Ergebnisses stehen zwei transgene pFlyFos Linien von pFlyFos027642 zur Verfügung (Tabelle 2.4). In pFlyFos027642 sind 42kb des endogenen Locus von *Ubc9* inseriert und damit alle regulatorischen Einheiten um den Suppressorphänotyp der drei *Su(var)Ubc9* Allele kompensieren zu können.

#### 3.4 Kartierung der Su(var)2-8-Mutation

#### 3.4.1 Duplikationskartierung von Su(var)2-8 in Region 21E2 zwischen den RS-Insertionen 5-SZ-3596 und CB-5353-3

Um den Genlocus von Su(var)2-8 zu kartieren, wurde im PEV Modellsystem  $In(1)w^{m4h}$ der Einfluss verschiedener Duplikationen auf den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 untersucht. Die Generierung von Duplikationen erfolgte mit Hilfe von RSw<sup>+</sup>-Element-Insertionen des DrosDel EU-Projektes (Ryder et al., 2004; Ryder et al., 2007; C. Nickel, persönliche Mitteilung). Die mehr als 3.300 präzise kartierten  $RSw^+$ -Elemente tragen ein funktionales white Gen und eines der beiden Exone flankierende FRT-Elemente, die Rekombinationsereignisse vermittelt werden. Eine FRT über basierte Rekombination zwischen zwei zuvor generierten Inversionen kann zur Aneuploedie der Region, die zwischen den Bruchpunkten der beiden Inversionen liegt, führen. Weil der Insertionsort der RSw<sup>+</sup>-Elemente molekular bekannt ist, kann die Größe des genomischen Bereiches einer Duplikation genau charakterisiert werden. Die für die Kartierung von Su(var)2-8 verwendeten Duplikationen umfassen einen genomischen Bereich von 19.888bp bis 2.129.756bp in der zytologischen Region von 21B1 bis 23C5 (Tabelle 2.2; Abb.3.25 B).

Nach Kreuzung der Duplikationslinien mit Su(var)2-8 im  $In(1)w^{m4h}$ -System erfolgte die phänotypische Auswertung der  $In(1)w^{m4h}$ ; Dp(2;2)/Su(var)2-8 Nachkommen (Abb.3.25) B). Dp(2;2)16 rettete den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 nicht (Abb.3.25 B). Damit konnte der genomische Bereich von Dp(2;2)16 (22B2-22D3) für die Kartierung von Su(var)2-8 ausgeschlossen werden. Kann eine Duplikation die Su(var)2-8-Mutation kompensieren, liegt eine zusätzliche Kopie des Su(var)2-8-Gens vor und die zu  $In(1)w^{m4h}$ analysierenden Tiere zeigen einen white-mottled Phänotyp im Rearrangement. Nach Kreuzung von Su(var)2-8 mit Dp(2;2)10, Dp(2;2)25, Dp(2;2)47 und Dp(2;2)36 wurde an den zu analysierenden Tieren der F1-Generation ein white*mottled* Phänotyp beobachtet (Abb.3.25 B). Der Su(var)2-8-Locus muss somit in dem Bereich liegen, den alle diese Duplikationen einschließen. Die gemeinsame überlappende genomische Region liegt in 21E2 zwischen den RS-Elementen 5-SZ-3596 und CB-5353-3 (Abb.3.25, grau markiert).



**Abbildung 3.25:** Su(var)2-8 liegt in Region 21E2 zwischen den *RS*-Elementen 5-SZ-3596 und *CB*-5353-3. (A) Position der verwendeten *RS*-Elemente (Dreiecke) sowie Lage und Orientierung der Gene im genomischen Bereich von 21B1 bis 22D3 auf dem linken Arm des 2. Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. (B) Grüne Balken symbolisieren den duplizierten Bereich eines Duplikationschromosoms. Der Einfluss überlappender Duplikationen auf den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 wurde am  $In(1)w^{m4h}$ ; Dp(2;2)/Su(var)2-8 Genotyp analysiert. Befindet sich die Mutation von Su(var)2-8 innerhalb eines duplizierten Bereiches, führt dies zur Aufhebung des Suppressoreffektes und ist an einem *white-mottled* Phänotyp erkennbar. Dp(2;2)10, Dp(2;2)25, Dp(2;2)47 und Dp(2;2)36 enthalten Su(var)2-8. Der grau markierte Bereich kennzeichnet deren gemeinsame, überlappende Region in 21E2. Eine Vergrößerung dieses Bereiches ist in Abb.3.26 B dargestellt. Dp(2;2)16 kompensiert den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 nicht.

### 3.4.2 Hochauflösende SNP-Crossoverkartierung identifiziert elf Kandidatengene für Su(var)2-8

Die weitere Eingrenzung der genomischen Region, in der Su(var)2-8 liegt, erfolgte durch hochauflösende SNP-Crossoverkartierung. Dafür wurden Chromosomen genutzt, die zwei  $RSw^+$ -Elemente in *cis* tragen. Chromosomen mit zwei  $w^+$ -Transgenen prägen auf Grund des additiven Effektes der beiden  $w^+$  Kopien in den *RS*-Elementen einen wildtypähnlichen roten Augenphänotyp aus. Rekombinationsereignisse zwischen den beiden  $RSw^+$ -Elementen führen zu Chromosomen, die nur noch ein  $RSw^+$ -Element tragen. Diese können an Hand ihres Augenphänotyps (gelbe oder orange Augen statt rote Augen) von den anderen Nachkommen unterschieden werden. Das flankierende *RS*-Element eines jeden Crossoverchromosoms wurde durch PCR-Analysen bestimmt. Dabei wurde ein *RS*-Element-spezifischer mit einem genomischen Primer kombiniert (Abb.3.2). Anschließend erfolgte für jedes Crossoverchromosom die Kartierung des Crossoverereignisses durch SNP-Analysen.

Für die Generierung spezifischer Su(var)2-8-Crossoverchromosomen wurde zunächst die cis-Kombination der RSw<sup>+</sup>-Elemente 5-SZ-3548 (21B4) und 5-SZ-3596 (21E2) verwendet. Nach dessen Kreuzung mit Su(var)2-8 wurden 82 Crossoverchromosomen aus insgesamt 16.495 Nachkommen isoliert. Der Stammaufbau war für 81 dieser Crossoverchromosomen erfolgreich. Des Weiteren konnten mit Ausnahme von einem Chromosom bei allen anderen Crossoverchromosomen das flankierende RSw<sup>+</sup>-Element bestimmt werden (Tabelle 7.1). Für die Kartierung von Su(var)2-8 stehen somit 80 Crossoverchromosomen zur Verfügung, deren putativer Crossoverbruchpunkt durch SNP-Analysen auf ein definiertes genomisches Intervall eingegrenzt werden konnte. Für diese Analysen wurde ein jedes Crossoverchromosom mit  $w^{1118}_{iso}$ ;  $2_{iso}$ ;  $3_{iso}$  ( $w^{iso}$ ) gekreuzt und anschließend die DNA vom Crossoverchromosom $(w^+)/+(w^{iso})$  Genotyp isoliert. Die Voraussetzung für SNP-Analysen sind Sequenzunterschiede zwischen  $w^{iso}$ und  $w^{m4h}$ , die zuvor durch den Vergleich der Genomsequenzen beider Linien identifiziert wurden (Abb.3.5). Die Su(var)2-8-Mutation wurde im  $w^{m4h}$ -Hintergrund generiert und die  $RSw^+$ -Elemente, die für die Erstellung von *cis*-Kombinationen verwendet wurden, liegen in einem  $w^{iso}$ -Hintergrund. Crossoverchromosomen wurden nach einem Rekombinationsereignis zwischen dem Su(var)2-8-Chromosom ( $w^{m4h}$ ) und dem Chromosom der *cis*-Kombination  $(w^{iso})$  isoliert. Weil die SNP-Analysen am heterozygoten Crossoverchromosom $(w^+)/+(w^{iso})$  Genotyp durchgeführt wurden, kennzeichnet ein Einzelpeak in der Sequenz, dass das Crossoverchromosom an dieser

Stelle das Chromosom der ursprünglichen *cis*-Kombination [*w*<sup>*iso*</sup>-Chromosm] trägt (Abb.3.26 als weißes Kästchen). Ein Doppelpeak hingegen weist auf die Existenz des Su(var)2-8-Chromosoms an der untersuchten Stelle hin (Abb.3.26 als rotes Kästchen). Die Untersuchung von sieben SNPs im Bereich zwischen den RSw<sup>+</sup>-Elementen 5-SZ-3548 und 5-SZ-3596 konnte jedem der 80 Crossoverchromosomen ein spezifisches Intervall zuordnen, in dem das Crossoverereignis zwischen dem Su(var)2-8-Chromosom und dem Chromosom der cis-Kombination stattgefunden hatte (Abb.7.4). Anschließend wurde an 34 Crossoverchromosomen überprüft, ob diese die Su(var)2-8-Mutation tragen (Tabelle 7.1). Dafür wurde zunächst das white Gen des flankierenden *RSw*<sup>+</sup>-Elementes durch FRT basierte Rekombination zerstört und der Einfluss des *RSw*<sup>-</sup>-Crossoverchromosoms auf die white Variegation in  $In(1)w^{m4h}$  untersucht. Alle 12 analysierten Crossoverchromosomen, die von 5-SZ-3548 flankiert werden, prägen einen Suppressoreffekt auf PEV aus und sind damit Träger der Su(var)2-8-Mutation. Die 22 untersuchten Crossoverchromosomen mit 5-SZ-3596 zeigen ausnahmslos eine normale white Variegation. Das am meisten proximal gelegene Crossoverereignis konnte dem von 5-SZ-3596 flankierten Crossoverchromosom R47 zwischen SNP13 und 5-SZ-3596 nachgewiesen werden (Abb.3.26 C). Weil Crossoverchromosom R47 einen whitemottled Phänotyp im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement zeigt, liegt folglich der Su(var)2-8-Locus zwischen SNP13 und 5-SZ-3596 (Abb.3.26 C).

Nach Kreuzung von Su(var)2-8 mit der proximal angrenzenden *cis*-Kombination der  $RSw^+$ -Elemente 5-SZ-3596 (21E2) und *CB-5483-3* (21E3) wurden 379 neue Crossoverchromomsomen isoliert. Bei dieser *cis*-Kombination ist 5-SZ-3596 das distal flankierende  $RSw^+$ -Element. Für sechs Crossoverchromosomen (R144, R145, R196, R237, R268, R327) konnten keine balancierten Linien aufgebaut werden Einem der Crossoverchromosomen wurden beide  $RSw^+$ -Elemente nachgewiesen (Tabelle 7.2). Deshalb erfolgten die SNP-Analysen an 372 Crossoverchromosomen. Zunächst wurde für alle 372 Crossoverchromosomen der ca. 5kb proximal von *CB-5353-3* liegende SNP22 analysiert (Abb.7.5). Dabei konnten 16 der 372 Crossoverchromosomen ein Rekombinationsereignis zwischen 5-SZ-3596 und SNP22 nachgewiesen werden (Abb.3.26 D). Um den genomischen Bereich des *Su(var)2-8*-Locus weiter zu verkleinern, wurde an diesen 16 Crossoverchromosomen zusätzlich der SNP16 untersucht. Einzig bei Crossoverchromosom R109, das von *5-SZ-3596* flankiert wird, liegt das Rekombinationsereignis distal von SNP16. Weil Crossoverchromosom R109 eine normale *white* Variegation in *In(1)w<sup>m4h</sup>* zeigt und damit nicht die *Su(var)2-8*-

Mutation trägt, kann der Locus von *Su(var)2-8* zwischen dem *RS*-Element *5-SZ-3596* und SNP16 oder alternativ unmittelbar distal zu *5-SZ-3596* eingegrenzt werden (Abb.3.26 D).

Nach Kreuzung von Su(var)2-8 mit der *cis*-Kombination der  $RSw^+$ -Elemente *CB-5083-3* (21E2) und *CB-5353-3* (21E2), die den Su(var)2-8-Locus einschließt, wurden neun Crossoverchromomsomen von insgesamt 11.774 Nachkommen bestätigt (Tabelle 7.3). Durch die Untersuchung von sechs SNPs im genomischen Bereich zwischen *CB-5083-3* und *CB-5353-3* konnte die Lage des Su(var)2-8-Locus nicht weiter eingeengt werden (Abb.7.6).

Damit grenzen die hochauflösenden SNP-Crossoveranalysen den genomischen Bereich der *Su(var)2-8*-Mutation zwischen SNP13 und SNP16 ein (Abb.3.26 rot markiert). In dieser Region liegen die Gene *nAcRbeta-21C*, *Ets21C*, *rempA*, *CG2789*, *CG11835*, *CG2794*, *Nle*, *CG2807*, *Ipk2*, *CG2813* und *Ptth*.



**Abbildung 3.26:** Hochauflösende Crossoveranalysen kartieren den Su(var)2-8-Locus zwischen SNP13 und SNP16. (A) Lage der *RS*-Elemente, der Gene und der untersuchten SNPs im genomischen Bereich von 21B4-21E3. (B) In grün sind Dp(2;2)47, Dp(2;2)36 und Dp(2;2)25 dargestellt, die den Mutantenphänotyp von Su(var)2-8 in  $In(1)w^{m4h}$  retten. (C) Ausgewählte Crossoverchromosomen, die nach Kreuzung von Su(var)2-8 [Su(var)2-8-Chromosom in rot] mit der *cis*-Kombination von 5-SZ-3548 und 5-SZ-3596 [*cis*-Kombination-Chromosom in schwarz] isoliert wurden, kartieren den Su(var)2-8-Locus zwischen SNP13 und 5-SZ-3596 (grau). (D) Darstellung der 16 Crossoverchromosomen, die nach Kreuzung von Su(var)2-8 mit der *cis*-Kombination von 5-SZ-3596 und CB-5483-3 (*cis*-Kombination II) isoliert wurden und ein Rekombinationsereignis zwischen 5-SZ-3596 und SNP22 zeigen. Das am meisten distal gelegene Rekombinationsereignis wurde Crossoverchromosom R109 zwischen SNP15 und SNP16 zugeordnet. Als  $Su^+$ -Crossoverchromosom zeigt R109 eine normale *white* Variegation in  $In(1)w^{m4h}$ . Damit liegt der Su(var)2-8-Locus zwischen 5-SZ-3596 und SNP16 (grau).

#### 3.4.3 Das pFlyFos028731 Transgen rettet den Suppressorphänotyp von Su(var)2-8

Der Su(var)2-8-Locus liegt nach Duplikationskartierung (Abb.3.25) und hochauflösender SNP-Crossoverkartierung (Abb.3.26) in der genomischen Region von 21E2 zwischen 5-SZ-3596 und SNP16. Die Überprüfung dieser Region erfolgte durch Rescueanlysen mit Hilfe von pFlyFos-Transgenen, die zuvor aus einer genomischen Fosmidbibliothek (Ejsmont et al. 2009) selektiert wurden. Bei der Fosmidbibliothek sind ca. 35kb große, überlappende genomische Regionen von Drosophila melanogaster in einen pFlyFos-Vektor inseriert. Dieser vermittelt durch homologe Rekombination zwischen einer definierten attP-Stelle im Drosophila-Genom und der attB-Stelle des Vektors eine ortsspezifische Integration. Außerdem trägt der pFlyFos-Vektor einen dsRed-Selektionsmarker, wodurch transgene Tiere Hand einer an roten Augenfluoreszenz identifiziert werden können. Transgene pFlyFos-Linien wurden von SERVICES, INC. (Sudbury, Massachusetts USA) hergestellt und GENETIC anschließend balancierte Linien für jedes Transgen etabliert (Material und Methoden 2.1.6; Tabelle 2.3). Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit stand im Bereich von 21E2 das pFlyFos028731 Transgen für Rescueanalysen zur Verfügung.



**Abbildung 3.27:** Das pFlyFos028731 Transgen rettet den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 im  $In(1)w^{m4h}$ . Rearrangement. Lage und Größe der pFlyFos-Klone sind als grüne Balken dargestellt. Augen der F1-Generation aus der Kreuzung  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)2-8/CyRoi; +/+ x  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; pFlyFos028731/*TM3*, *Sb Ser*. pFlyFos028731 zeigt einen Rescueeffekt. Dabei bestätigt die rote Augenfluoreszenz die Existenz des pFlyFos-Vektors in den  $In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)2-8/+; pFlyFos028731/+ Tieren. Die  $In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)2-8/+; *TM3*, *Sb Ser*/+ Kontrolltiere zeigen keine rote Fluoreszenz und einen Suppressoreffekt im  $In(1)w^{m4h}$ -System.
Tiere mit  $In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)2-8/+; pFlyFos028731/+ Genotyp zeigen einen whitemottled Phänotyp und dsRed-Fluoreszenz (Abb.3.27). Das bedeutet, dass der Suppressoreffekt von Su(var)2-8 durch das pFlyFos028731 Transgen kompensiert wird und damit in dessen Genombereich eine zusätzliche Kopie des Su(var)2-8-Gens vorliegt. Hochauflösende SNP-Crossoverkartierung lokalisierte den Su(var)2-8-Locus zwischen SNP13 und SNP16, in dem die Gene nAcRbeta-21C, Ets21C, rempA, CG2789, CG11835, CG2794, Nle, CG2807, Ipk2, CG2813 und Ptth liegen. Die Genomregion von pFlyFos028731 schließt diese Gene bis auf nAcRbeta-21C und Ets21C vollständig ein. Damit bestätigt die Rescueanalyse die Ergebnisse der hochauflösenden SNP-Crossoverkartierung und das genomische Intervall, in dem der Su(var)2-8-Locus liegt, kann um die Gene nAcRbeta-21C und Ets21C verkleinert werden.

### 3.4.4 Sequenzierung der Su(var)2-8-Kandidatengene

Die Kartierungsergebnisse der Duplikationsanalysen (Abb.3.28 A), der hochauflösenden SNP-Crossoverkartierung (Abb.3.28 B) und Fosmidkartierung (Abb.3.28 C) überlappen in einem gemeinsamen Bereich, der den *Su(var)2-8*-Locus kennzeichnet (Abb.3.28 als roter Balken). In der genomischen Region von 568.095 bis 577.489 (http://flybase.org/; Stand April 2012) in 21E2 liegen die Gene: *Nle*, *CG2807*, *Ipk2*, *CG2813* und *Ptth* (Abb.3.28 D).



**Abbildung 3.28:** Su(var)2-8 liegt zwischen Nle und Pph13 (roter Balken). Der graue Bereich zeigt das jeweilige Kartierungsergebnis. (A) Duplikationsanalysen kartieren Su(var)2-8 innerhalb der Region von Dp(2;2)36. (B) Hochauflösende SNP-Crossoverkartierung identifiziert die Suppressor-mutation von Su(var)2-8 wischen SNP13 und SNP16. (C) pFlyFos028731 rettet den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement. (D) Der gemeinsame überlappende Bereich der drei Kartierungsergebnisse umfasst die Gene Nle, CG2807, Ipk2, CG2813 und Ptth.

Da eine weitere Einschränkung mit den gegebenen Kartierungsmethoden nicht möglich war, wurden zunächst für die Gene *Nle*, *CG2807*, *Ipk2*, *CG2813* und *Ptth* die gesamte Exon-Intron-Struktur sowie die 5'- und 3'UTR sequenziert. PCR-Reaktionen erfolgten an *Su(var)2-8/+* DNA und Sequenzen wurden mit dem *Drosophila*-Referenzgenom der Flybase Datenbank (http://flybase.org/blast/) verglichen. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils drei Mal wiederholt, um Sequenzierungsfehler auszuschließen. Anschließend wurden die identifizierten Nucleotidaustausche durch Sequenzierung des  $w^{m4h}$ ; +/+ Genotyps, in dem die Mutation von *Su(var)2-8* ursprünglich generiert wurde, überprüft. Alle ermittelten Nucleotidaustausche, die dem *Su(var)2-8*-Chromosom zugeordnet wurden, konnten auch im  $w^{m4h}$ ; +/+ Stamm nachgewiesen werden. Deletionen wurden durch Sequenzpolymorphismen, die im PCR-Produkt das *Su(var)2-8*-Chromosom anzeigen bzw. durch Überlappung der PCR-Fragmente ausgeschlossen. Damit kann die Suppressormutation von *Su(var)2-8* keinem der fünf untersuchten Kandidatengene zugeordnet werden (Abb.3.29).



**Abbildung 3.29:** Sequenzierungsergebnisse von fünf Su(var)2-8-Kandidatengenen. (A) Sequenzpolymorphismen. (B) PCR-Fragmente. (C) Genstruktur der Su(var)2-8-Kandidatengene. Die Sequenzierung erfolgte an Su(var)2-8/+ DNA für den gesamten Exon-Intron-Bereich sowie in der 5'- und 3'UTR von Nle, CG2807, Ipk2, CG2813 und Ptth. Nach Vergleich mit dem  $w^{m4h}$ -Originalstamm konnte keinem der fünf Gene ein Nucleotidaustausch, der spezifisch für das Su(var)2-8-Chromosom ist, zugeordnet werden. Deletionen und Insertionen wurden ebenfalls nicht gefunden.

#### 3.4.5 Keines der Su(var)2-8-Kandidatengene zeigt eine Expressionsreduktion

Mittels semiquantitativer RT-PCR sollte überprüft werden, ob die Expression von *Nle*, *CG2807*, *Ipk2*, *CG2813* und *Ptth* reduziert ist. Da *Su(var)2-8* homozygot nicht lebensfähig ist, erfolgten diese Analysen an adulten *Su(var)2-8/+* Tieren. Als Referenzgenom diente  $w^{1118}_{iso}$ ,  $2_{iso}$ ,  $3_{iso}$ .

Im Vergleich zur Referenz konnte bei keinem der fünf Kandidatengene eine Expressionsreduktion festgestellt werden (Abb.3.30). Des Weiteren wurden keine Spleißdefekte in Form eines größeren bzw. kleineren Transkriptes, sichtbar als

Doppelbande, gefunden (Abb.3.30). Um auszuschließen, dass Spleißdefekte direkt an der Intron-Exongrenze zu veränderten Transkripten führen, wurden die PCR-Fragmente sequenziert. Dabei konnten weder Nucleotidaustausche noch Deletionen bzw. Insertionen festgestellt werden.



**Abbildung 3.30:** Keines der fünf untersuchten Gene, die im *Su(var)2-8*-Locus liegen, zeigt eine Expressionsreduktion. Die Expressionsrate der Gene *Nle*, *CG2807*, *Ipk2*, *CG2813* und *Ptth* wurde mittels semiquantitativer PCR an cDNA von *Su(var)2-8/+* und  $w^{11/8}$ ; +/+ ermittelt. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden. Die Primer sind intronspannend abgeleitet. Als Kontrolle diente das *housekeeping*-Gen *rp49*.

# 3.4.6 Einfluss von Rescuekonstrukten auf den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 im $In(1)w^{m4h}$ -System

Da die Sequenzanalysen keine eindeutige Zuordnung der *Su(var)2-8*-Mutation ermöglichten, wurden Konstrukte für den endogenen Locus der Gene *Nle*, *CG2807*, *Ipk2*, *CG2813*, *Ptth* sowie den intergenischen Bereich zwischen *Nle* und *CG2807* (gap22) angefertigt (Abb.3.31). Für jedes Konstrukt wurde die Promotorregion sowie die gesamte Exon-Intron-Struktur des Gens mittels *iProof*-PCR amplifiziert und in das pGEM-T Vektorsystem (Promega) subkloniert. Die Größe der Fragmente variierte dabei zwischen 200bp für das intergenische Konstrukt und 7.400bp für *CG2807*. Nach Not I Verdau wurden die Fragmente in den Injektionsvektor pP{GS[ $v^+$ ]} bzw. pP{RS3[ $w^+$ ]} umkloniert (Tabelle 3.7, Abb.3.31).



**Abbildung 3.31:** Lage und Größe der Plasmid-Transgene im genomischen Bereich von Su(var)2-8. Im  $In(1)w^{m4h}$ -System wurde deren Einfluss auf den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 untersucht.

Nach Injektion der Plasmide in  $w^-$  bzw.  $v^-$ ;  $bw^-$  Fliegen wurden transgene Tiere an Hand ihres Selektionsmarkers identifiziert. Für pP{GS [ $v^+$  (*Nle*)]} konnten sechs transgene Linien isoliert werden. Die Injektion von pP{GS [ $w^+$  (*CG2807*)]} ergab ein transgenes Tier. Zwei transgene Linien wurden mit pP{GS [ $v^+$  (*gap22*)]} erzeugt. Die Injektion von pP{RS3 [ $w^+$  (*CG2813*)]} war mit zwölf transgenen Linien am erfolgreichsten. Mit pP{RS3 [ $w^+$  (*IPK2*)]} wurden sechs transgene Linien isoliert. Die Injektion von pP{RS3 [ $w^+$  (*Ptth*)]} war nicht erfolgreich. Die Stabilisierung transgener Linien erfolgte mit entsprechenden Balancerchromosomen. Der Integrationsort der Konstrukte wurde mit inverser PCR ermittelt (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Plasmid-Transgene, deren Einfluss auf den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 im  $In(1)w^{m4h}$ -System untersucht wurde

Vonstmilit	Fragment-	Transgen-	Ort der Insertion/ zytologische	Lebens-
Konstrukt	größe	Linie	Region	fähigkeit
$pP{GS [v^+(Nle)]}$	3,8kb	Nle1-2	Chr.3R: 24.979.185/ 98F13	homoz.
$pP\{RS3 [w^+(CG2807)]\}$	7,4kb	2807-1	Chr.2R: 1.560.591/41F6	-
$pP{GS [v^+(gap 22)]}$	1,1kb	Gap22-1	Chr.3R: 2.900.559/ 84B2	homoz.
$pP\{RS3 [w^+(Ipk2)]\}$	2,4kb	T1-2	Chr.3L: 17.998.639/75B2	homoz.
$pP\{RS3 [w^+(CG2813)]\}$	2,25kb	T2-3	Chr.3R: 252.697/ 82B1	homoz.
$pP{GS[v^+(Ptth)]}$	2,6kb	-	-	-

Anschließend wurde überprüft, ob eines der Transgene eine spezifische Rettung des Suppressoreffekts von Su(var)2-8 zeigt. Bei den Konstrukten pP{GS [ $v^+(Nle)$ ]}; pP{GS [ $v^+(gap22)$ ]}; pP{RS3 [ $w^+(IPK2)$ ]} sowie pP{RS3 [ $w^+(CG2813)$ ]} wurde keine Rettung des Suppressorphänotyps gefunden (Abb.3.31). Eine Analyse von Su(var)2-8/pP{GS [ $w^+(CG2807)$ ]} steht noch aus.

### 3.4.7 Der RNAi vermittelte Knockdown von CG2807 führt zu Letalität

Die Methode der transgenen RNA-Interferenz vermittelt den gezielten *Knockdown* einzelner Gene. Dafür stehen TRiP-Linien (<u>Transgenic RNAi Project</u>), die eine genspezifische RNA hairpin Struktur tragen und über das UAS/GAL4 System aktiviert werden, zur Verfügung (http://www.flyrnai.org).

Im Hintergrund des PEV-Rearrangement  $In(1)w^{m4h}$  sollte überprüft werden, ob ein RNAi vermittelter *Knockdown* eines der *Su(var)2-8*-Kandidatengene einen Suppressoreffekt hervorruft. Weil das RNAi Konstrukt der TRiP-Linien in einem VALIUM-Vektor mit *vermillion* als Selektionsmarker integriert ist, beeinflusst dieses den Augenphänotyp in  $In(1)w^{m4h}$  nicht (Tabelle 2.4). Die TRiP-Linien wurden mit Tieren gekreuzt, die ein actinGAL4 Treibertransgen enthalten und anschließend der  $In(1)w^{m4h}$ ; P{actinGAL4}/+; P{UAS TRiP RNAi  $v^+$ }/+ Genotyp ausgewertet.

Die Untersuchung drei bekannter PEV-Modifizierer sollte zunächst die Aussagekraft dieses Experimentes feststellen. Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *HP1* (HMS00278) zeigt einen dominanten Suppressoreffekt im Männchen (Abb.3.32), der auf Grund der homozygoten Letalität von *HP1*-Mutanten auf einen partiellen *Knockdown* hinweist. Bei dem RNAi vermittelten *Knockdown* von *egg* (HMS00112) wurde ein leichter Enhancereffekt beobachtet (Abb.3.32). Als heterozygote Mutante zeigt *Ubc9* (*lwr*) einen dominanten Suppressoreffekt auf PEV. Homozygot sind die *Ubc9* Mutationen nicht lebensfähig. Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *Ubc9* (HMS00067) führt zu Letalität, da von 85 ausgewerteten F1-Tieren keines dem *In(1)w<sup>m4h</sup>*; P{*actin*GAL4}/+; HMS00067/+ Genotyp entsprach (Abb.3.32).



HP1 RNAi Knockdown

egg RNAi Knockdown

**Abbildung 3.32:** RNAi vermittelter *Knockdown* von *HP1*, *egg* und *Ubc9* (*lwr*) und dessen Einfluss auf *white* Variegation im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement. Augen der F1-Generation aus der Kreuzung  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; P{*actin*GAL4}/*CyRoi*; +/+ x  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; P{UAS TriP RNAi  $v^+$ }/*TM3*, *Sb Ser*. Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *HP1* (HMS00278) zeigt einen dominanten Suppressoreffekt im Männchen. Einen Enhancereffekt weist der RNAi vermittelte *Knockdown* von *egg* (HMS00112) auf. Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *Ubc9* (HMS00067) führt zu Letalität.

Da die RNAi-Analysen von *HP1* und *Ubc9* erfolgreich waren, sollte auch für die Su(var)2-8-Kandidatengene der Einfluss eines RNAi vermittelten *Knockdowns* auf die *white* Variegation im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement untersucht werden. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit standen für die Gene *CG2807*, *Ptth* und *Pph13* entsprechende TRiP-Linien zur Verfügung (Tabelle 2.4). Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *CG2807* (HM05176) führt zu Letalität, da von 79 F1-Tieren keines mit einem

lwr RNAi Knockdown

 $In(1)w^{m4h}$ ; P{actinGAL4}/+; HM05176/+ Genotyp identifiziert wurde (Abb.3.33). Einen schwachen Suppressoreffekt im Männchen zeigt der RNAi vermittelte *Knockdown* von *Ptth* (JF01349) (Abb.3.33). Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *Pph13* (JF02200) weist im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement keinen signifikanten Effekt auf (Abb.3.33).



**Abbildung 3.33:** RNAi vermittelter *Knockdown* von *Su(var)2-8*-Kandidatengenen im *In(1)w*<sup>m4h</sup>-System. Augen der F1-Generation aus der Kreuzung *In(1)w*<sup>m4h</sup>/*In(1)w*<sup>m4h</sup>; P{*actin*GAL4}/*CyRoi*; +/+ x *In(1)w*<sup>m4h</sup>/Y; +/+; P{UAS TRiP RNAi v<sup>+</sup>}/*TM3*, *Sb Ser*. Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *CG2807* (HM05176) führt zu Letalität. Ein schwacher Suppressoreffekt wurde bei Männchen des RNAi vermittelten *Knockdowns* von *Ptth* (JF01349) beobachtet. Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *Pph13* (JF02200) zeigt keinen signifikanten Effekt auf PEV.

#### 3.4.8 Welches der fünf Kandidatengene kodiert für Su(var)2-8?

Mit Duplikationskartierung (Abb.3.25), hochauflösender SNP-Crossoverkartierung (Abb.3.26) und pFlyFos-Kartierung (Abb.3.27) wurden übereinstimmend *Nle*, *CG2807*, *Ipk2*, *CG2813* und *Ptth* als Kandidatengene für *Su(var)2-8* identifiziert. Durch Sequenzierung der gesamten Intron-Exon-Struktur sowie der 5'- und 3'UTR konnte keinem der Gene ein Nucleotidaustausch, der die Suppressormutation hervorruft, zugeordnet werden (Abb.3.29, Tabelle 3.8). Expressionsanalysen mit semiquantitativer RT-PCR konnten für die fünf Kandidatengene ebenfalls keine Veränderungen zwischen dem Referenzgenom und *Su(var)2-8* feststellen (Abb.3.30, Tabelle3.8). Daraufhin wurden Rescuekonstrukte für die fünf Kandidatengene angefertigt (Abb.3.31) und transgene Linien etabliert (Tabelle 3.7). Keinen Rescueeffekt zeigen die Plasmid-

Transgene von *Nle, Ipk2, cold* und der gap22-Region zwischen *Nle* und *CG2807*. Daher können diese als Kandidatengene für Su(var)2-8 ausgeschlossen werden (Tabelle 3.8). Die Analysen für das *CG2807*-Transgen stehen noch aus und für *Ptth* wurde bisher keine transgene Linie etabliert (Tabelle 3.8). Für den RNAi vermittelten *Knockdown* standen nur TRiP-Linien von *CG2807*, *Ptth* und dem außerhalb des *Su(var)2-8*-Locus liegenden *Pph13* zur Verfügung (Abb.3.33). Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *CG2807* führte zu Letalität und der RNAi vermittelte *Knockdown* von *Ptth* und *Pph13* zeigte keinen Suppressoreffekt im  $w^{m4h}$ -Rearrangement (Abb.3.33; Tabelle 3.8). Die hier zusammengefassten Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der Sequenzierungsergebnisse, der semiquantitativen RT-PCR Analysen, der Rescueanalysen und des RNAi vermittelten *Knockdowns* für die fünf Kandidatengene von Su(ugu)2.9

von Su(var)2-8						
Su(var)2-8-	Sequenzierungsergebnis	Semiquantitative	Plasmid-Transgen/	RNAi vermittelter		
Kandidatengen/	der Intron-Exon-	RT-PCR-	Rescueeffekt im	Knockdown		
annotierte Flybase	Struktur sowie der	Analysen	$w^{m4h}$ -			
Funktion	5`und 3`UTR		Rearrangement			
Nle/	kein	keine veränderte	vorhanden/	keine TRiP-Linie		
Notch Bindung	Nucleotidaustausch	Expression	kein Rescueeffekt			
CG2807/	kein	keine veränderte	vorhanden/	führt zu Letalität		
mRNA-spleißen	Nucleotidaustausch	Expression	steht noch aus			
Ipk2/	kein	keine veränderte	vorhanden/	keine TRiP-Linie		
Inositol-1,4,5-	Nucleotidaustausch	Expression	kein Rescueeffekt			
Trisphosphat 6-						
Kinase Aktivität						
CG2813/	kein	keine veränderte	vorhanden/	keine TRiP-Linie		
nicht bekannt	Nucleotidaustausch	Expression	kein Rescueeffekt			
Ptth/	kein	keine veränderte	kein Plasmid-	kein Suppressor-		
Prothoracicotrophe	Nucleotidaustausch	Expression	Transgen	effekt im w <sup>m4h</sup> -		
Hormon Activität				Rearrangement		

Weil die Rescueanalysen für CG2807 noch ausstehen, aber dessen RNAi vermittelter *Knockdown*, dem Su(var)2-8-Phänotyp entsprechend, zu Letalität führt, könnte CG2807 für Su(var)2-8 kodieren. Deshalb wurde in pFlyFos028731 CG2807 mit einem V5-Tag durch die Technik der homologen Rekombination generiert (Material und Methoden 2.4, Tabelle 2.6). Mit der Etablierung einer transgenen pFlyFos028731CG2807-V5-Linie konnten immunzytologische Analysen für CG2807 durchgeführt werden. Weil Su(var)2-8 einen rekombinogenen Effekt in 21B4-21E2 zeigte (Tabelle 3.2; Abb.3.4), wurde die Lokalisation von CG2807 zunächst in Ovarien untersucht (Abb.3.34). Der annotierten Flybase Funktion entsprechend liegt CG2807 offenbar zytoplasmatisch in den Germarien vor (Abb.3.34 A). In den weiteren Entwicklungsstufen der Eikammern wurde CG2807 vor allem in den Nährzellen gefunden (Abb.3.34 B,C).



**Abbildung 3.34:** Verteilung von CG2807 in Ovarien. Die Färbung des CG2807-V5 Fusionsproteins wurde mit einem monoklonalen V5 Antikörper an homozygoten  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; +/+; pFlyFos028731CG2807-V5/pFlyFos028731CG2807-V5 Tieren durchgeführt. (A) Die Färbung deutet im Germarium auf eine zytoplasmatische Verteilung von CG2807 hin. (B) Eikammerstadium 4. (C) Eikammerstadium 10. Ab Eikammerstadium 4 akkumuliert CG2807 in den Nährzellen. DNA Färbung mit DAPI. Die Messbalken entsprechen 10 $\mu$ m.

Um eines der fünf Kandidatengene, die im Su(var)2-8-Locus liegen, eindeutig Su(var)2-8 zuordnen zu können, wurde der Fosmid Klon pFlyFos028731 modifiziert. Zunächst wurde für die Gene *CG2807* und *CG2813* ein frühzeitiges Stop-Codon mittels homologer Rekombination in pFlyFos028731 eingeführt (Tabelle 2.6). Transgene Linien für beide pFlyFos-Plasmide standen zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit jedoch nicht zur Verfügung. Wenn eines der beiden Gene für Su(var)2-8 kodiert, sollte der FlyFos028731 Klon mit der entsprechenden Stop-Mutation nicht mehr den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 kompensieren können.

### 3.5 Kartierung der *Su(var)2-12*-Mutation

# 3.5.1 Duplikationskartierung von *Su(var)2-12* in Region 23C5 zwischen den *RS*-Insertionen *CB-0114-3* und *5-HA-2004*

Im PEV Modellsystem  $In(1)w^{m4h}$  wurde der Einfluss überlappender Duplikationen auf den Suppressoreffekt von Su(var)2-12 untersucht. Im genomischen Bereich von 21E2-25F2 wurden sechs Duplikationslinien mit Su(var)2-12 gekreuzt und die  $w^{m4h}$ ; Dp(2;2)/Su(var)2-12 Nachkommen phänotypisch ausgewertet. Kann eine Duplikation den Suppressoreffekt von Su(var)2-12 nicht kompensieren, wird der genomische Bereich dieser Duplikation für die Kartierung von Su(var)2-12 ausgeschlossen. Dp(2;2)25, Dp(2;2)33,Dp(2;2)5und Dp(2;2)100retten Dp(2;2)11,den Suppressoreffekt von Su(var)2-12 im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement nicht (Abb.3.35 B). Dagegen weist der *white mottled* Phänotyp der  $w^{m4h}$ ; Dp(2;2)3/Su(var)2-12 Tiere darauf hin, dass im genomischen Bereich von Dp(2;2)3 das Su(var)2-12-Gen liegt (Abb.3.35 B). Dp(2;2)11 und Dp(2;2)33 überlappen mit Dp(2;2)3, jedoch nicht miteinander. Somit konnte Su(var)2-12 zwischen den beiden Duplikationen in 23C5 zwischen den RS-Elementen CB-0114-3 und 5-HA-2004 lokalisiert werden (Abb.3.35, grau markiert).



Su(var)2-12

**Abbildung 3.35:** Der Su(var)2-12-Locus liegt in 23C5 zwischen den *RS*-Insertionen *CB*-0114-3 und 5-*HA*-2004. (A) Position der verwendeten *RS*-Elemente (Dreiecke) sowie Lage und Orientierung der Gene im genomischen Bereich von 21E2 bis 25F2. (B) Grüne Balken symbolisieren den duplizierten Bereich der Dp(2;2)-Chromosomen. Die Auswertung erfolgte an  $w^{m4h}$ ; Dp(2;2)/Su(var)2-12 Tieren. Dp(2;2)11, Dp(2;2)25, Dp(2;2)33, Dp(2;2)5 und Dp(2;2)100 retten den Suppressoreffekt von Su(var)2-12 nicht. Dp(2;2)33, Dp(2;2)5 und Dp(2;2)100. Weil diese wiederum nicht vollständig miteinander überlappen, lokalisiert Su(var)2-12 zwischen Dp(2;2)11 und Dp(2;2)33 in Region 23C5 (grau markiert). Eine Vergrößerung dieses Bereiches ist in Abb.3.36 B dargestellt.

#### 3.5.2 Crossoverkartierung von Su(var)2-12

Duplikationskartierung lokalisiert die Su(var)2-12-Mutation in Region 23C5 zwischen den *RS*-Elementen *CB-0114-3* und *5-HA-2004*. Dieser Bereich wurde mit Hilfe von hochauflösenden SNP-Crossoverkartierungen zusätzlich verkleinert. Dafür wurden Crossoverchromosomen durch Kreuzung von Su(var)2-12 mit zwei verschiedenen *cis*-Kombinationen von  $RSw^+$ -Elementen generiert, wobei das proximal flankierende *RS*-Element beider *cis*-Kombinationen in unmittelbarer Nähe zu *5-HA-2004* liegt (Abb.3.36 A).

Zunächst wurden Crossoverereignisse in Su(var)2-12/CB-0463-3 (22A5) + 5-HA-1917 (23C5) Heterozygoten isoliert. Nach Zuordnung des jeweils flankierenden RS-Elementes mittels PCR (Tabelle 7.4) erfolgte die Identifizierung des Crossoverereignisses für jedes Crossoverchromosom innerhalb eines definierten Intervalls. Dafür wurden sieben SNPs an insgesamt 51 Crossoverchromosomen im Bereich zwischen den beiden RS-Elementen untersucht (Abb.7.7). Den Crossover-chromosomen R58, R7, R8, R13 und R40 wurde das am meisten proximal liegende Crossoverereignis zwischen SNP34 und SNP36 zugewiesen (Abb.3.36 C). R58 wird von CB-0463-3 flankiert und prägt einen Suppressoreffekt auf white Variegation aus. Damit trägt dieses Crossoverchromosom die Su(var)2-12-Mutation, die demnach proximal von SNP34 liegt. Dieses Ergebnis wird von den Crossoverchromosomen R7, R8, R13 und R40, die keinen Suppressoreffekt im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement zeigen und von 5-HA-1917 flankiert werden, bestätigt. Somit lokalisiert die Su(var)2-12-Mutation in dem Intervall, das von SNP34 und 5-HA-1917 flankiert wird (Abb.3.36 C). Um diesen Bereich zu verkleinern, wurden 71 neue Crossoverchromosomen nach Kreuzung von Su(var)2-12 mit der *cis*-Kombination der *RSw*<sup>+</sup>-Elemente 5-SZ-3215 (23B8) und 5-HA-1695 (23C5) isoliert und deren flankierendes RS-Element mittels PCR-Analysen identifiziert (Weißbach, 2011). Anschließend erfolgte die Untersuchung von zehn SNPs im Bereich zwischen den beiden RS-Elementen (Abb.7.8). Durch Kreuzung mit  $In(1)w^{m4h}$ -Tieren wurde analysiert, welches der Crossoverchromosomen die Suppressormutation trägt (Weißbach, 2011). Mit diesen Analysen konnte der Su(var)2-12-Locus zwischen SNP40 und 5-HA-1695 eingegrenzt werden (Abb.3.36 D). Der distale Bruchpunkt dieses Intervalls wurde durch die Crossoverchromosomen R53, R10, R31 und R66 bestimmt (Abb.3.36 D). Diese positionieren Su(var)2-12 proximal von SNP40. Die proximale Intervallgrenze des Su(var)2-12-Locus konnte mit Hilfe der Crossoverchromosomen R26, R39, R62 und R68 ermittelt werden, die Su(var)2-12 distal von 5-HA-1695 kartieren (Abb.3.36 D). Im Bereich zwischen SNP40 und 5-HA-1695 liegen 15 Gene. Diese Region überlappt mit der Region, die durch Duplikations-kartierung bestimmt wurde (Abb.3.35 B). Su(var)2-12 konnte jedoch nicht auf ein kleineres Intervall kartiert werden. Ein wesentlicher Grund hierfür ist, dass die Crossoverfrequenz in dieser Region signifikant geringer als in anderen Regionen ist (Abb.3.6 D).



**Abbildung 3.36:** Su(var)2-12 lokalisiert zwischen SNP40 und 5-HA-1695. (A) Lage der RS-Elemente, der Gene und der SNPs im genomischen Bereich von 22A5-23C5. (B) Duplikationskartierung lokalisiert Su(var)2-12 zwischen den RS-Elementen CB-0114-3 und 5-HA-2004. Duplizierte Bereiche eines Duplikationschromosoms sind als grüne Balken dargestellt. (C) In den Crossoverchromosomen R58, R7, R8, R13 und R40, die nach Kreuzung von Su(var)2-12 mit der cis-Kombination von CB-0463-3 und 5-HA-1917 (cis-Kombination I) isoliert wurden, liegt das Rekombinationsereignis zwischen SNP34 und SNP36. R58 trägt Su(var)2-12. R7, R8, R13 und R40 sind Su+. Damit lokalisiert Su(var)2-12 mit der cis-Kombination von SNP34. (D) SNP-Analysen an Crossoverchromosomen, die nach Kreuzung von Su(var)2-12 mit der cis-Kombination II) isoliert wurden 5-HA-1695 (cis-Kombination II) isoliert wurden, kartieren die Suppressormutation zwischen SNP40 und 5-HA-1695 (grau markiert). Die Crossoverchromosomen R53, R10, R31 und R66 legen dabei die distale Intervallgrenze fest. Die proximale Intervallgrenze wird von R26, R39, R62 und R68 bestimmt.

## 3.5.3 Der Su(var)2-12-Locus liegt zwischen pFlyFos029639 und pFlyFos028970

Parallel zu den hochauflösenden SNP-Analysen der Crossoverchromosomen, die nach Kreuzung von *Su(var)2-12* mit *5-SZ3215* und *5-HA-1695* isoliert wurden, erfolgte die Untersuchung dieser Region mit Rescuekonstrukten. Sechs transgene pFlyFos-Linien

standen dafür zur Verfügung, die insgesamt den Bereich von 23B8 bis 23C5 abdecken (Tabelle 2.3). Dabei wurde die Expression des Suppressorphänotyps in  $w^{m4h}$ ; Su(var)2-12/+; pFlyFos/+ Tieren untersucht. pFlyFos031052, pFlyFos015972, pFlyFos029639, pFlyFos028970 und pFlyFos023864 retten den Suppressoreffekt von Su(var)2-12 nicht (Abb.3.37). Nur pFlyFos028063 zeigt einen Rescueeffekt (Abb.3.37). Der *white-mottled* Phänotyp der  $w^{m4h}$ ; Su(var)2-12/+; pFlyFos028063/+ Tiere weist darauf hin, dass der Suppressoreffekt auf die *white*-Variegation von  $w^{m4h}$  aufgehoben ist. Der Genombereich von pFlyFos028063 umfasst 14 Gene. Für die Kartierung von Su(var)2-12 konnten acht dieser Gene ausgeschlossen werden, weil die genomischen Bereiche von pFlyFos029639 und pFlyFos028970, die keinen Rescueeffekt zeigen, diese Gene beinhalten. Somit wurde der Bereich der Su(var)2-12-Mutation auf die sechs Gene alpha4GT1, CG3542, CG3605, CG17219, GABPI und CG17258 eingegrenzt.



**Abbildung 3.37:** Der *Su(var)2-12*-Locus liegt zwischen pFlyFos029639 und pFlyFos028970. Lage und Größe der pFlyFos Transgene sind als grüne Balken dargestellt. Nach Kreuzung von  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; *Su(var)2-12/CyRoi*; +/+ x  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; pFlyFos/*TM3*, *Sb Ser* wurde der  $In(1)w^{m4h}$ ; *Su(var)2-12/*+; pFlyFos/+ Genotyp ausgewertet. Nur pFlyFos028063 zeigt einen Rescueeffekt. Die umliegenden pFlyFos028970 teilweise mit pFlyFos028063 überlappen, liegt der *Su(var)2-12*-Locus zwischen den beiden pFlyFos Transgenen. In diesem Bereich liegen die Gene *alpha4GT1*, *CG3542*, *CG3605*, *CG17219*, *GABPI* und *CG17258*.

### 3.5.4 Sequenzierung der Su(var)2-12-Kandidatengene

Die Eingrenzung des *Su(var)2-12*-Locus erfolgte mit Duplikationsanalysen (Abb.3.38 A), der hochauflösenden SNP-Crossoverkartierung (Abb.3.38 B) und der Fosmidkartierung (Abb.3.38 C). Im gemeinsamen überlappenden Bereich der Kartierungsergebnisse befinden sich die Gene *alpha4GT1*, *CG3542*, *CG3605*, *CG17219*, *GABPI* und *CG17258* (Abb.3.38 D).



**Abbildung 3.38:** Su(var)2-12 liegt zwischen *alpha4GT1* und *CG17258* (roter Balken). Der grau markierte Bereich zeigt das jeweilige Kartierungsergebnis. (A) Duplikationskartierung lokalisiert die Suppressormutation im Bereich zwischen Dp(2;2)5 und Dp(2;2)33. (B) Hochaulösende SNP-Crossoveranalysen kartieren Su(var)2-12 zwischen SNP40 und 5-HA-1695. (C) Su(var) 2-12 liegt in der Region von pFlyFos028063, die weder mit pFlyFos029639 noch mit pFlyFos028970 überlappt. (D) Eines der Gene *alpha4GT1*, *CG3542*, *CG3605*, *CG17219*, *GABP1* und *CG17258* trägt die Suppressormutation von Su(var)2-12.

Die Sequenzierung erfolgte für die gesamte Intron-Exon-Struktur sowie die 5'- und 3'UTR für jedes der sechs im Su(var)2-12-Locus liegenden Gene an Su(var)2-12/+ DNA. Um Sequenzierungsfehler ausschließen zu können, wurden die PCR-Reaktionen mindestens zwei Mal wiederholt. Die Identifizierung von Deletionen bzw. Insertionen wäre auf Grund von Sequenzpolymorphismen, die das Su(var)2-12-Chromosom trägt, möglich. Diese wurden jedoch nicht gefunden. Alle mehrfach bestätigten Nucleotidaustausche wurden mit der Sequenz des  $w^{m4h}$ -Stammes verglichen und konnten bestätigt werden. Damit konnte keinem der sechs Kandidatengene ein Nucleotidaustausch nachgewiesen werden, der spezifisch für das Su(var)2-12-Chromosom ist (Abb.3.39).



**Abbildung 3.39:** Keines der Su(var)2-12-Kandidatengene trägt einen spezifischen Nucleotidaustausch im Su(var)2-12-Chromosom. (A) Sequenzpolymorphismen. (B) PCR-Fragmente. (C) Genstruktur der Su(var)2-12-Kandidatengene. An Su(var)2-12/+ DNA erfolgte die Sequenzierung für den gesamten Exon-Intron-Bereich sowie in der 5'- und 3'UTR von *alpha4GT1*, *CG3542*, *CG3605*, *CG17219*, *GABPI* und *CG17258*. Alle identifizierten Nucleotidaustausche wurden ebenfalls im  $w^{m4h}$ -Stamm gefunden. Damit liegt für keines der sechs Kandidatengene ein spezifischer Nucleotidaustausch, der einzig das Su(var)2-12-Chromosom betrifft, vor. Deletionen und Insertionen wurden ebenfalls nicht gefunden.

#### 3.5.5 Expressionsanalysen der Su(var)2-12-Kandidatengene

Weil Su(var)2-12 homozygot nicht lebensfähig ist, wurden semiquantitative RT-PCR Analysen an adulten Su(var)2-12/+ Tieren durchgeführt. Als Referenzgenom diente  $w^{1118}_{iso}, 2_{iso}, 3_{iso}$ .

Im Vergleich zur Wildtypkontrolle konnte für *CG17258* eine mehrfach bestätigte Expressionsreduktion festgestellt werden (Abb.3.40). Spleißdefekte in Form eines größeren bzw. kleineren Transkriptes, sichtbar als Doppelbande, wurden für keines der sechs Kandidatengene gefunden (Abb.3.40).



Abbildung 3.40: Die Expression von CG17258 ist in den Su(var)2-12/+Heterozygoten reduziert. Mittels semiquantitativer PCR wurde die Expressionsrate von alpha4GT1, CG3542, CG3605, CG17219, GABPI und CG17258 an cDNA von Su(var)2-12/+ und  $w^{1118}$ ; +/+ ermittelt. Dabei konnte eine Expressions-reduktion von CG17258 in Su(var)2-12/+Tieren nachgewiesen werden. Die Primer sind intronspannend abgeleitet. Als Kontrolle diente das housekeeping-Gen rp49.

### 3.5.6 RNAi vermittelter Knockdown von CG3605 führt zu Letalität

Im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement wurde überprüft, ob ein RNAi vermittelter *Knockdown* für Gene der Su(var)2-12-Region einen Suppressoreffekt auf  $w^{m4h}$  ausprägt. Für diese Untersuchung standen TRiP-Linien der Gene *CG3542*, *CG3605*, *CG17219* und *GABPI* zur Verfügung (Tabelle 2.4). Nach Kreuzung von  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; P{*actin*GAL4}/*CyRoi*; +/+ x  $In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; P{UAS TriP RNAi  $v^+$ }/*TM3*, *Sb Ser* erfolgte die Auswertung am  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; P{*actin*GAL4}/+; RNAi  $v^+$ /+ Genotyp.

Der RNAi *Knockdown* von *CG3605* (HMS00056) führt zu Letalität (Abb.3.41). Unter 84 F1-Tieren wurden keine  $In(1)w^{m4h}$ ; P{*actin*GAL4}/+; HMS00056/+ Nachkommen gefunden. Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *CG3542* (HMS00589), *CG17219* (JF03197) und *GABPI* (JF02349) zeigt im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren keinen signifikanten Effekt auf *white* Variegation (Abb.3.41).



**Abbildung 3.41:** RNAi vermittelter *Knockdown* von Genen der *Su(var)2-12*-Region im *In(1)w*<sup>m4h</sup>-Rearrangement. Augen der F1-Generation aus der Kreuzung *In(1)w*<sup>m4h</sup>/*In(1)w*<sup>m4h</sup>; P{*actin*GAL4}/*CyRoi*; +/+ x *In(1)w*<sup>m4h</sup>/Y; +/+; P{UAS TRiP RNAi v<sup>+</sup>}/*TM3*, *Sb Ser*. Der RNAi vermittelte *Knockdown* der Gene *CG3542* (HMS00589), *CG17219* (JF03197) und *GABPI* (JF02349) zeigt keinen Effekt auf PEV. Der RNAi *Knockdown* von *CG3605* (HMS00056) führt zu Letalität.

### 3.5.7 Welches Gen kodiert für Su(var)2-12?

Im gemeinsamen überlappenden Bereich von Duplikationskartierung (Abb.3.35), hochauflösender SNP-Crossoverkartierung (Abb.3.36) und Fosmidkartierung (Abb.3.37) liegen die sechs Gene *alpha4GT1*, *CG3542*, *CG3605*, *CG17219*, *GABPI*  und *CG17258*. Die Sequenzierung dieser Gene identifizierte keine spezifische Mutation, die einzig das *Su(var)2-12*-Chromosom betrifft. Für den RNAi vermittelten *Knockdown* standen TRiP-Linien von *CG3542*, *CG3605*, *CG17219* und *CG17257* (*GABPI*) zur Verfügung (Abb.3.41). Der RNAi vermittelte *Knockdown* von *CG3605* führte zu Letalität und der RNAi vermittelte *Knockdown* von *CG3542*, *CG17219* und *CG17257* zeigte keinen Suppressoreffekt im  $w^{m4h}$ -Rearrangement (Abb.3.41). Mittels semiquantitativer PCR konnte eine Expressionsreduktion von *CG17258* an *Su(var)2-12/*+ Tieren nachgewiesen werden (Abb.3.40). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass *CG17258* offenbar für *Su(var)2-12* kodiert.

Um eines der sechs Gene eindeutig Su(var)2-12 zuordnen zu können, wurde pFlyFos028063, der den Suppressoreffekt von Su(var)2-12 auf die *white*-Variegation bereits kompensieren konnte, modifiziert. Für jedes der sechs Kandidatengene sollte mittels homologer Rekombination ein frühzeitiges Stop-Codon in pFlyFos028063 eingeführt werden. Dieses Experiment war für *alpha4GT1*, *CG3542*, *CG17219* und *CG17258* erfolgreich (Tabelle 2.6). Transgene Linien für die vier modifizierten pFlyFos-Plasmide standen jedoch zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung. Wenn *CG17258* das Su(var)2-12-Gen ist, sollte der pFlyFos028063 Klon mit einer Stop-Mutation in *CG17258* nicht mehr den Suppressoreffekt der Su(var)2-12-Mutation retten.

# 3.6 Kartierung von Su(var)2-13

# 3.6.1 Duplikationskartierung von *Su(var)2-13* in Region 31B1-31F4 zwischen den *RS*-Insertionen *5-HA-1257* und *5-HA-1552*

Für die Kartierung von Su(var)2-13 in Region 31B1-31F4 wurden fünf überlappende Duplikationen genutzt. Wird in  $w^{m4h}$ ; Dp(2;2)/Su(var)2-13 Tieren ein Suppressoreffekt manifestiert, liegt der Suppressor nicht im Bereich der Duplikation. Keinen *Rescue*-Effekt zeigen Dp(2;2)91, Dp(2;2)80 und Dp(2;2)72 (Abb.3.42 B). Nur wenn die Duplikation die Su(var)2-13-Mutation kompensiert, liegt eine zusätzliche Kopie des Su(var)2-13-Gens vor. Dp(2;2)9 und Dp(2;2)75 retten den Suppressorphänotyp von Su(var)2-13 im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement (Abb.3.42 B). Die gemeinsame genomische Region beider Duplikationen liegt zwischen dem proximalen Bruchpunkt von Dp(2;2)91 bzw. Dp(2;2)80 und dem distalen Bruchpunkt von Dp(2;2)72. Somit konnte

*Su(var)2-13* in Region 31B1-31F4 zwischen den *RS*-Elementen *5-HA-1257* und *5-HA-1552* lokalisiert werden (Abb.3.42).



**Abbildung 3.42:** Duplikationsanalysen lokalisieren die Su(var)2-13-Mutation in 31B1-31F4 zwischen den *RS*-Insertionen 5-HA-1257 und 5-HA-1552. (A) Position der verwendeten *RS*-Elemente (Dreiecke) sowie Lage und Orientierung der Gene im genomischen Bereich von 30B3 bis 32B1 auf dem linken Arm des 2. Chromosoms von *Drosophila melanogaster*. (B) Grüne Balken symbolisieren den duplizierten Bereich eines Duplikationschromosoms. Die Auswertung erfolgte an  $w^{m4h}$ ; Dp(2;2)/Su(var)2-13 Tieren. Dp(2;2)9 und Dp(2;2)75 retten den Suppressoreffekt von Su(var)2-13. Dp(2;2)91, Dp(2;2)80 und Dp(2;2)72 können den Suppressoreffekt von Su(var)2-13 nicht kompensieren. Weil diese teilweise mit Dp(2;2)9 und Dp(2;2)75 überlappen, kann Su(var)2-13 in 31B1-31F4 zwischen den *RS*-Elementen 5-HA-1257 und 5-HA-1552 lokalisiert werden (grau markiert).

# 3.6.2 Hochauflösende SNP-Crossoverkartierung verkleinert den genomischen Bereich von *Su(var)2-13* auf sieben Gene

Die Duplikationskartierung lokalisiert Su(var)2-13 zwischen den RS-Insertionen 5-HA-1257 und 5-HA-1552. Mit der cis-Kombination der RSw<sup>+</sup>-Elemente 5-HA-1142 (30E4) und 5-HA-1257 (31B1) wurde zunächst bestätigt, dass der Su(var)2-13-Locus in unmittelbarer Nähe von 5-HA-1257 liegt. In den Nachkommen von Su(var)2-13/5-HA-1142 + 5-HA-1257 heterozygoten Weibchen wurden insgesamt 100 Crossoverchromosomen mit einem Rekombinationsereignis zwischen den beiden  $RSw^+$ -Elementen isoliert. Von 90 dieser Crossoverchromsomen konnten balancierte Linen aufgebaut werden. Anschließend wurden mit PCR-Analysen die flankierenden RS- $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement untersucht, Elemente bestimmt und im ob die Crossoverchromosomen Träger der Suppressormutation sind (Tabelle 7.5). Zudem konnte mit der Analyse von drei SNPs insgesamt 12 Crossoverchromosomen das am

proximal liegende Crossoverereignis zwischen SNP44 meisten und SNP45 nachgewiesen werden (Abb.3.43 C). Die von *5-HA-1142* flankierten Crossoverchromosmen R4, R5, R7, R9, R11, R28 und R29 zeigen alle einen Suppressoreffekt auf PEV und tragen damit die Su(var)2-13-Mutation. Die Crossoverchromosomen R6, R8, R10, R21 und R25 werden von dem RS-Element 5-HA-1257 flankiert und zeigen einen normalen white-mottled-Phänotyp im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement. Diese Ergebnisse kartieren Su(var)2-13 zwischen SNP44 und Anschließend wurden 93 *5-HA-1257* (Abb.3.43 C). neue *Su(var)2-13-*Crossoverchromosomen mit der cis-Kombination der beiden RS-Elemente 5-HA-1257 (31B1) und 5-HA-5061 (32E1) generiert. Für 89 dieser Crossoverchromosomen konnten balancierte Stämme etabliert werden. Nachdem die flankierenden RS-Elemente mittels PCR identifiziert wurden (Tabelle 7.6), standen insgesamt 81 Crossoverchromosomen für weitere Analysen zur Verfügung. Die Untersuchung von 74 dieser Crossoverchromosomen im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement charakterisierte von den 34 Crossoverchromosomen mit dem 5-HA-1257 RS-Element alle als Suppressor-positiv (Su+) (Tabelle 7.6). Die 40 Crossoverchromosomen, die von 5-HA-5061 flankiert werden, zeigen alle einen Suppressoreffekt auf PEV (Tabelle 7.6). Demnach liegt der Su(var)2-13-Locus in unmittelbarer Nähe von 5-HA-1257 (Abb.3.43 D). Das am meisten distal gelegene Crossoverereignis zeigt Crossoverchromosom R16, das von 5-HA-5061 flankiert wird und den Suppressorphänotyp im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearragement ausprägt, zwischen 5-HA-1257 und SNP47 (Abb.3.43 D). Folglich liegt in diesem Bereich der *Su(var)2-13*-Locus.

Für die Kartierung weiterer Crossoverereignisse in der Region um 5-HA-1257 wurden neue Crossoverchromosomen mit einer dritten *cis*-Kombination generiert. In den Nachkommen von Su(var)2-13/CB-6694-3 (30F5) + 5-HA-2868 (31D7) heterozygoten Weibchen wurden insgesamt 280 Crossoverchromosomen isoliert und balancierte Stämme etabliert. Anschließend wurden die flankierenden *RS*-Elemente mittels PCR identifiziert und für 253 Crossoverchromosomen im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement überprüft, ob diese Träger der Suppressormutation sind (Kröhnert, 2011). Danach erfolgte die Untersuchung von sechs SNPs im Bereich zwischen den beiden *RS*-Elementen (Kröhnert, 2011). Mit diesen Analysen konnte der Locus von Su(var)2-13zwischen SNP45 und SNP47 eingegrenzt werden (Abb.3.43 E). Der distale Bruchpunkt dieses Intervalls wurde von den Crossoverchromosomen R190 und R89 bestimmt, die Su(var)2-13 proximal von SNP45 kartieren (Abb.3.43 E). Die proximale Intervallgrenze des Su(var)2-13-Locus wurde mit den Crossoverchromosomen R5, R230, R16, R110, R137 und R195 ermittelt (Abb.3.43 E). Diese lokalisieren die Su(var)2-13-Mutation distal von SNP47. Eine Verkleinerung des Intervalls war nicht möglich, weil keine weiteren SNPs innerhalb der Region auftreten.

Im Bereich zwischen SNP45 und SNP47 liegen die sieben Gene *Npc1a*, *Pros35*, *CG4906*, *CG5706*, *CG5694*, *eEF1delta* und *CG31720* (Abb.3.43 E). Die Duplikationskartierung lokalisierte den *Su(var)2-13*-Locus zwischen *5-HA-1257* und *5-HA-1552* (Abb.3.42 B). Nur die Gene *CG5694*, *eEF1delta* und *CG31720* liegen in dem gemeinsamen Bereich von Duplikationskartierung und hochauflösender SNP-Crossoverkartierung.



**Abbildung 3.43:** Su(var)2-13 liegt zwischen SNP45 und SNP47. (A) Lage der *RS*-Elemente, der Gene und der SNPs im genomischen Bereich von 30E4-32E1. (B) Duplikationskartierung lokalisiert Su(var)2-13 zwischen den *RS*-Insertionen 5-HA-1257 und 5-HA-1552. (C) Auswertung der Crossoverchromosomen, die nach Kreuzung von Su(var)2-13 mit der *cis*-Kombination von 5-HA-1142 und 5-HA-1257 (*cis*-Kombination I) isoliert wurden. R4, R5, R7, R9, R11, R28, R29, R6, R8, R10, R21 und R25 lokalisieren Su(var)2-13 proximal von SNP44. (D) Crossoverchromosom R16, das von Su(var)2-13/5-HA-1257 + 5-HA-5061 (*cis*-Kombination II) heterozygoten Weibchen isoliert wurde, lokalisiert Su(var)2-13 zwischen 5-HA-1257 und SNP47. (E) Crossoverchromosomen, die nach Kreuzung von Su(var)2-13 mit *CB-6694-3 + 5-HA-2868* (*cis*-Kombination III) isoliert wurden, kartieren Su(var)2-13 zwischen SNP45 und SNP47 (grau gestreift). Dabei wird die distale Intervallgrenze von R190 und R89 festgelegt. R5, R16, R110, R137, R195 und R230 bestimmen die proximale Intervallgrenze.

### 3.6.3 Fosmidkartierung grenzt den Su(var)2-13-Locus auf drei Gene ein

Für Rescueanalysen wurden im Bereich von 31B1 drei überlappende pFlyFos-Klone ausgewählt. Transgene Linien konnten für pFlyFos029378 und pFlyFos026029 etabliert werden (Tabelle 2.3). Diese wurden mit Su(var)2-13 gekreuzt und am  $In(1)w^{m4h}$ ; Su(var2-13)/+; pFlyFos/+ Genotyp die Expression des Suppressorphänotyps untersucht. pFlyFos029378 zeigt keinen Rescueeffekt und der Suppressor wird ausgeprägt (Abb.3.44). Damit kann die Genomregion von pFlyFos029378 für die Kartierung von Su(var)2-13 ausgeschlossen werden. pFlyFos026029 kompensiert den Suppressoreffekt von Su(var)2-13 (Abb.3.44) und überlappt teilweise mit pFlyFos029378, der keinen Rescueeffekt zeigt. Somit kann die Su(var)2-13-Mutation in dem Bereich der Gene CG5694, eEF1delta und CG31720 kartiert werden. Um CG5694 als Kandidatengen von Su(var)2-13 ausschließen zu können, müssten Rescueanalysen mit pFlyFos021045 durchgeführt werden.



Abbildung 3.44: pFlyFos029378 und pFlyFos026029 grenzen den Su(var)2-13-Locus auf drei Gene ein. Lage und Größe der pFlyFos-Transgene sind als grüne Balken dargestellt. Nach Kreuzung von  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)2-13/CyRoi;  $+/+ \times In(1)w^{m4h}/Y$ ; +/+; pFlyFos/TM3, Sb Ser wurde der  $In(1)w^{m4h}$ ; Su(var)2-13/+; pFlyFos/+ Genotyp ausgewertet. pFlyFos029378 rettet den Suppressoreffekt von Su(var)2-13 nicht. Mit diesem überlappt teilweise pFlyFos026029, der einen Rescueeffekt zeigt. Dadurch wird der Su(var)2-13-Locus auf die drei Gene CG5694, eEF1delta und CG31720 eingegrenzt (grau markiert).

## 3.6.4 Sequenzierung der Su(var)2-13-Kandidatengene

Die Kartierungsergebnisse von Duplikationsanalysen (Abb.3.45 A), hochauflösender SNP-Crossoverkartierung (Abb.3.45 B) und Fosmidkartierung (Abb.3.45 C) überlappen in einem gemeinsamen Bereich, der den *Su(var)2-13*-Locus enthält. Innerhalb dieses Bereiches liegen die Gene *CG5694, eEF1delta* und *CG31720* (Abb.3.45 D).



**Abbildung 3.45:** Eines der drei Gene CG5694, eEF1delta und CG31720 kodiert für Su(var)2-13. Der grau markierte Bereich zeigt das jeweilige Kartierungsergebnis. (A) Duplikationskartierung lokalisiert Su(var)2-13 im Bereich von Dp(2;2)75, der nicht mit Dp(2;2)91 überlappt. (B) Su(var)2-13 liegt nach hochauflösender SNP-Crossoverkartierung zwischen SNP45 und SNP47 (C) Im nicht mit pFlyFos029378 überlappenden Bereich von pFlyFos026029 lokalisiert Su(var)2-13. (D) Der gemeinsame Bereich der drei Kartierungsergebnisse bestimmt CG5694, eEF1delta und CG31720 als Kandidatengene für Su(var)2-13.

Die Sequenzierung der Kandidatengene erfolgte an  $w^{m4h}$ ; Su(var)2-13/Df(2L)ED729; +/+ DNA. Df(2L)ED729 deletiert die Region von 31B1-31D7, in der die drei zu sequenzierenden Kandidatengene liegen. Damit war gewährleistet, dass einzig das Su(var)2-13-Chromosom zur Erzeugung 1kb großer Fragmente in der PCR amplifiziert wurde.

Bei dem Gen *CG5694* handelt es sich um den bereits identifizierten Suppressor für PEV, *Su(var)2-1*. Um ausschließen zu können, dass es sich bei *Su(var)2-13* um ein Allel von *Su(var)2-1* handelt, wurde *CG5694* vollständig sequenziert. Dabei wurde ein Nucleotidaustausch im zweiten Exon an Position 833 im RB-Klon bzw. Position 577 im RA-Klon (Genomposition 10.229.437/GTT $\rightarrow$ ATT) gefunden (Abb.3.46). Dieser führt zu einem Aminosäureaustasch von Valin zu Isoleucin an Position 141 im SU(VAR)2-1 Protein. Dem Gen *eEF1delta* konnte weder in der kodierenden noch in der Intronregion ein Nucleotidaustausch nachgewiesen werden (Abb.3.46). Bei *CG31720* wurde ein Nucleotidaustausch (C $\rightarrow$ T) an Stelle 10.238.203 (Genomposition) innerhalb der 5`UTR identifiziert. Zudem wurden eine Insertion von Adenin an Genomposition 10.236.556 und eine Insertion von Cytosin an Genomposition 10.236.610 im zweiten Intron dieses Gens gefunden (Abb.3.46).



**Abbildung 3.46:** Das Su(var)2-13-Chromosom trägt spezifische Nucleotidaustausche in den Genen CG5694 und CG31720. (A) Sequenzpolymorphismen. (B) PCR-Fragmente. (C) Genstruktur von CG5694, *eEF1delta* und CG31720. Der Nucleotidaustausch in CG5694 führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an Position 141 im Protein. *eEF1delta* zeigt weder im Exon-Intron-Bereich noch in der 5'- und 3'UTR eine Mutation. Bei dem Gen CG31720 wurde ein Nucleotidaustausch in der 5'UTR an Genomposition 10.238.203 gefunden. Weiterhin konnten zwei Nucleotidinsertionen an den Stellen 10.236.556 und 10.236.610 nachgewiesen werden.

#### 3.6.5 CG31720 zeigt keinen Spleißdefekt

Um zu überprüfen, ob die Nucleotidinsertionen im ersten Intron von CG31720 nicht zu einem Spleißdefekt führen, wurden semiguantitative RT-PCR Analysen an adulten Su(var)2-13/Df(2L)ED729 Tieren durchgeführt. Vergleich Beim mit dem Referenzgenom w<sup>1118</sup><sub>iso</sub>, 2<sub>iso</sub>, 3<sub>iso</sub> wurden keine Spleißdefekte in Form eines größeren bzw. kleineren Transkriptes, sichtbar als Doppelbande, gefunden (Abb.3.47). Die PCR-Fragmentes bestätigt zusätzlich, Sequenzierung des dass die beiden Nucleotidinsertionen zu keinem veränderten Transkript führen.



Abbildung 3.47: Su(var)2-13 bildet kein verändertes CG31720 Transkript. Die Expression von CG31720 wurde mit semiquantitativer PCR an cDNA von Su(var)2-13/Df(2L)ED729 untersucht. Der Vergleich mit  $w^{1118}$ ; +/+ zeigt eine Reduktion der Transkriptmenge, die jedoch durch die Deletion von CG31720in Df(2L)ED729 bedingt ist. Ein Spleißdefekt, sichtbar als Doppelbande, wurde nicht gefunden. Die Primer sind intronspannend abgeleitet. Als Kontrolle diente das housekeeping-Gen rp49.

### 3.6.6 Su(var)2-13 ist offenbar ein besonderes Allel von Su(var)2-1

Die Sequenzierung von CG5694 an Su(var)2-13/Df(2L)ED729 DNA identifizierte einen Aminosäureaustausch an Position 144 im Protein. Das Gen CG5694 kodiert für den Suppressor Su(var)2-1. Bereits 22 Allele konnten Su(var)2-1 zugeordnet werden (Walther, 2002). Diese zeigen einen dominanten Suppressoreffekt auf PEV, letale Interaktion mit dem heterochromatischen Y Chromosom und eine Butyratsensitivität (Reuter et al., 1982a, Reuter et al., 1982b). Zudem wurde eine rezessive Sterilität der Weibchen beobachtet (Reuter et al., 1982a, Reuter et al., 1982b). In der transheterozygoten Kombination mit Df(2L)ED729 sind die Su(var)2-1 Allele ebenfalls steril (Walther, persönliche Mitteilung). Einzige Ausnahme bilden die Allele  $Su(var)2-1^{03}$  und  $Su(var)2-1^{215}$ . Heterozygote Su(var)2-13/Df(2L)ED729 Weibchen sind ebenfalls fertil.

Um zu überprüfen, ob Su(var)2-13 ein besonderes Allel von Su(var)2-1 ist, wurden Rescueanalysen mit der transgenen Linie des modifizierten Fosmid-Klons pFlyFos026029-CG5694STOP, der im Folgenden als MW2 bezeichnet wird, durchgeführt. In dem Fosmid Klon MW2 wurde mittels homologer Rekombination ein frühzeitiges Stop-Codon in *CG5694* eingeführt (Tabelle 2.6). Dadurch bricht die Translation des SU(VAR)2-1 Proteins an Aminosäureposition 163 ab und entspricht der Suppressormutation des  $Su(var)2-1^{06}$  Allels. Weil der Wildtyp Fosmid-Klon pFlyFos026029 den Suppressoreffekt von Su(var)2-1 und Su(var)2-13 bereits kompensieren konnte, sind in dem modifizierten Fosmid-Klon MW2 alle regulatorischen Einheiten zur Rettung des Suppressoreffektes von Su(var)2-1vorhanden (Walther, persönliche Mitteilung; Abb.3.44). MW2 ist jedoch nicht mehr in der Lage, den Suppressorphänotyp der Su(var)2-1 Allele zu retten (Walther, persönliche Mitteilung).

Das ursprüngliche  $Su(var)2-13^{01}$  Allel entstammt einem Männchen, mit dem ein  $Su(var)2-13^{01}Sco/SM1$  Stamm aufgebaut wurde. Da die Männchen dieses Stammes im Gegensatz zu den Weibchen einen schwächeren Suppressoreffekt auf das  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement ausüben, wurde zusätzlich ein *CyRoi*-Stamm aufgebaut, bei dem die Suppressormutation aus dem Weibchen kommt. In diesem Fall sind die paternalen Effekte aufgehoben und Männchen wie Weibchen prägen einen starken Suppressorphänotyp aus (Reuter, persönliche Mitteilung). Beide Su(var)2-13 Stämme wurden für die Rescueanalysen genutzt.

In der Kreuzung von  $w^{m4h}/w^{m4h}$ ; +/+; MW2/MW2 X  $w^{m4h}/Y$ ; Su(var)2-13 Sco/SM1; +/+ bzw.  $w^{m4h}/w^{m4h}$ ; +/+; MW2/MW2 X  $w^{m4h}/Y$ ; Su(var)2-13/CyRoi; +/+ und der jeweils reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}$ ; Su(var)2-13 Sco/SM1; +/+ X  $w^{m4h}/Y$ ; +/+; MW2/MW2 bzw.  $w^{m4h}/w^{m4h}$ ; Su(var)2-13/CyRoi; +/+ X  $w^{m4h}/Y$ ; +/+; MW2/MW2 wurde untersucht, ob der Suppressoreffekt von Su(var)2-13 durch MW2 kompensiert werden kann. Die Nachkommen zeigen keinen Rescueeffekt und der Suppressor wurde unabhängig davon ausgeprägt, ob MW2 maternal oder paternal vererbt wurde (Abb.3.48). Somit ist Su(var)2-13 offenbar ein besonderes Allel von Su(var)2-1.



**Abbildung 3.48:**  $Su(var)^{2-13}$  ist ein Allel von  $Su(var)^{2-1}$ . MW2 ist der modifizierte Fosmid Klon pFlyFos026029-CG5694STOP. (A) Augen der F1-Generation aus der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}$ ; +/+; MW2/MW2 X  $w^{m4h}/Y$ ;  $Su(var)^{2-13}$  Sco/SM1; +/+ und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}$ ;  $Su(var)^{2-13}$  Sco/SM1; +/+ X  $w^{m4h}/Y$ ; +/+; MW2/MW2 (B) Augen der F1-Generation aus der Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}$ ; +/+; MW2/MW2 X  $w^{m4h}/Y$ ;  $Su(var)^{2-13}/CyRoi$ ; +/+ und der reziproken Kreuzung  $w^{m4h}/w^{m4h}$ ;  $Su(var)^{2-13}/CyRoi$ ; +/+ X  $w^{m4h}/Y$ ; +/+; MW2/MW2

# 4. Diskussion

Die Komplexität eines Organismus wird nicht allein von seiner genetischen Information, die in der DNA gespeichert ist, bestimmt, sondern durch die Etablierung entwicklungsspezifischer, zelltypabhängiger Genexpressionsmuster und deren stabile Weitergabe an die nächste Zellgeneration. Ein wesentlicher Regulationsmechanismus der Genexpression ist die Etablierung einer bestimmten Chromatinstruktur, die über epigenetische Prozesse aufgebaut und aufrechterhalten wird. Mit dem  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement, einem Modellsystem für Positionseffekt-Variegation (PEV), wurden in melanogaster Faktoren identifiziert. die Aufbau Drosophila am von Chromatinstrukturen beteiligt sind (Reuter und Wolf, 1981; Wustmann et al., 1989). Durch die molekulare Charakterisierung dieser PEV-Faktoren ist beispielsweise die Reaktionsfolge zur Etablierung von Heterochromatin schon sehr gut verstanden. Heterochromatische Regionen und damit transkriptionsinaktives Chromatin sind durch die Methylierung von H3K9, H3K27 und H4K20 gekennzeichnet. Euchromatische Bereiche zeichnen sich dagegen durch eine Hyperacetylierung von Lysinen aus. Die Deacetylierung von Histonen ist somit wichtige Voraussetzung für die Etablierung von Heterochromatin. Ein Protein, das diese Funktion in Drosophila übernimmt, ist RPD3, dessen Mutante als dominanter Suppressor für PEV isoliert wurde (Mottus et al., 2000). RPD3 liegt im syncytialen Blastodermstadium der Embryonalentwicklung in einem Komplex mit SU(VAR)3-3, SU(VAR)3-9 und HP1 vor (Rudolph et al., 2007). Das Genprodukt des PEV-Suppressors Su(var)3-3 ist eine H3K4me1 und H3K4me2 Demethylase (Rudolph et al., 2007). Su(var)3-9, ebenfalls ein Suppressor für PEV (Tschiersch et al., 1994), katalysiert in vivo die Di- und Trimethylierung von H3K9 (Ebert et al., 2004). HP1 wird von dem PEV-Suppressor Su(var)2-5 kodiert (James und Elgin, 1986) und kann über seine Chromodomäne H3K9me2 und H3K9me3 binden (Lachner et al., 2001). Weil die Überexpression von Su(var)3-3 epistatisch über den Suppressoreffekt von *Rpd3* ist (Rudolph et al., 2007), eine *Rpd3*-Mutante wiederum den Enhancereffekt einer zusätzlichen Su(var)3-9 Kopie dominiert (Czermin et al., 2001) und Su(var)3-9 Nullmutanten epistatisch über den Triplo-Enhancereffekt einer zusätzlichen HP1 Kopie sind (Schotta et al., 2002), kann folgender Reaktionsverlauf zur Etablierung von Heterochromatin angenommen werden. Während der frühen Embryonalentwicklung ermöglicht SU(VAR)3-3 durch die Demethylierung von H3K4me1 und H3K4me2 eine Deacetylierung von H3K9 durch RPD3. Daraufhin wird H3K9 von SU(VAR)3-9 methyliert. Anschließend werden H3K9me2 bzw. H3K9me3

über die Chromodomäne von HP1 gebunden. In *HP1-Nullmutanten* und *Su(var)3-9* Mutanten ist H4K20me3, vermittelt durch SUV4-20, reduziert (Schotta et al., 2004). *Suv4-20* ist ein starker Suppressor für PEV (Schotta et al., 2004, Phalke et al., 2009) und offenbar ein finaler Faktor in der molekularen Reaktionsfolge zur Etablierung von Heterochromatin.

Trotz der umfangreichen Daten über die bisher charakterisierten PEV-Faktoren bleiben viele Fragen wie die Zellerblichkeit epigenetischer Programme offen. Daher beschäftigt sich ein wesentlicher Teil der vorliegenden Arbeit mit der Kartierung neuer PEV-Suppressormutationen. Zudem ist kaum erforscht, inwieweit epigenetische Faktoren meiotische Rekombinationsprozesse beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Chromatinzustand am synaptonemalen Komplex immunzytologisch und mit EM-Analysen untersucht. Außerdem wurde die Regulation von Crossoverereignissen durch epigenetische Kontrollmechanismen analysiert.

# 4.1 Das mit dem synaptonemalen Komplex assoziierte Chromatin zeigt abundant eine heterochromatische Modizierung

Mit der Entwicklung spezifischer Antikörper, die gegen verschiedene Histonmodifikationen gerichtet sind, ist es möglich, die Verteilung dieser Modifizierungen in vivo zu analysieren (Perez-Burgos et al., 2004). Die immunzytologischen Analysen an Polytänchromosomen von Drosophila zeigen, dass das perizentrische Heterochromatin eine Mono-, Di- und Trimethylierung von H3K9 und H3K27 sowie die Trimethylierung von H4K20 aufweist (Schotta et al., 2002; Schotta et al., 2004; Ebert et al., 2004). Zudem wurden H3K9 Mono-, Di- und Trimethylierung an mehreren Stellen entlang der Chromosomen und Telomere gefunden (Ebert et al., 2006). Die H3K9 Trimethylierung, in Säugern eine prädominante heterochromatische Markierung (Peters et al., 2003), ist in Drosophila auf eine zentrale Region im Chromozentrum beschränkt (Ebert et al., 2004). H3K27 Mono- und Dimethylierung markieren neben dem perizentrischen Heterochromatin fast alle Banden der Polytänchromosome (Ebert et al., 2006). Dagegen wurde die H3K27 Trimethylierung nur in ca. 100 Banden und einer zentralen Region des Chromozentrums gefunden (Ebert et al., 2006). Mono-, di- und trimethyliertes H4K20 liegt ebenfalls im Chromozentrum und in einer großen Anzahl von Banden entlang der euchromatischen Arme vor (Ebert et al., 2006). Die Interbanden zeigen eine abundante Färbung für H3K4- und H3K36 Methylierung, H3K9 Acetylierung und H3S10 Phosphorylierung und damit einen aktiven Chromatinstatus (Ebert et al., 2006). Diese umfangreichen immunzytologischen Analysen beschreiben den Chromatinzustand somatischer Chromosomen. Die Chromatinorganisation meiotischer Chromosomen ist jedoch in Drosophila bisher nicht untersucht worden. Für diese Analysen erfolgte die Identifizierung des synaptonemalen Komplexes mit einem monoklonalen Antikörper, der das C(3)G Protein des transversalen Filaments erkennt (Page und Hawley, 2001). Mit der zusätzlichen Generierung eines polyklonalen C(3)G Antikörpers, der mit dem monoklonalen C(3)G Antikörper kolokalsiert und damit eine identische Spezifität aufweist, ist der histonspezifische Antikörper nun auch frei wählbar. Die Färbungen von DNA, Histonmodifikationen und C(3)G sind jedoch nicht deckungsgleich, weil das Chromatin mit den assoziierten Histonmodifikationen zu beiden Seiten des synaptonemalen Komplexes liegt.

Abundante Färbungen am synaptonemalen Komplex treten vor allem für Histonmethylierungen auf, die charakteristisch für transkriptionsinaktives Chromatin sind. Es wird eine abundante H3K9me3 und H3K27me1 Modifizierung gefunden. Zudem zeigen H3K27me2 und H3K27me3 eine intensive Färbung am gesamten synaptonemalen Komplex und H3K9me1 und H3K9me2 wurden ähnlich wie in den somatischen Zellen präferentiell in Regionen mit intensiver DAPI-Färbung nachgewiesen. Die Färbung euchromatischer Histonmidifikationen wie eine H3K4 bzw. H3K36 Mono-, Di- und Trimethylierung sowie die H3K9 Acetylierung liegen nahe der Detektionsgrenze. Damit kann ein heterochromatinähnlicher Zustand meiotischer Chromosomen angenommen werden. Die abundante Verteilung von Heterochromatin assoziierten Faktoren wie HP1 am Chromatin des synaptonemalen Komplexes bestätigt diese Aussage. HP1 bindet über seine Chromodomäne H3K9me2 und H3K9me3 (Lachner et al., 2001). Daher entspricht die abbundante Assoziation von HP1 am synaptonemalen Komplex dem Verteilungsprofil von H3K9me3.

Die immunzytologischen Analysen der Chromatinstruktur am synaptonemalen Komplex veranschaulichen erstmals den heterochromatischen Charakter meiotischer Chromosomen bei *Drosophila melanogaster*. Vergleichbare Befunde in Ratten zeigen, dass Mono- und Dimethylierung von H3K9, H3K27 und H4K20 nicht direkt am synaptonemalen Komplex, sondern in der umliegenden Region und damit in den Chromatinschleifen der homologen Chromosomen vorliegen (Hermández- Hermández et al., 2010). In Säugern kennzeichnet die Monomethylierung von H3K9, H3K27 und H4K20 einen transkriptionsaktiven Chromatinstatus (Barski et al., 2007). Konstitutives Heterochromatin und eine Vielzahl an repetitiven Sequenzen zeigen eine Trimethylierung von H3K9, H3K27 und H4K20 (Schotta et al., 2004; Martens et al., 2005; Barski et al., 2007). In Ratten lokalisieren H3K9me3 und H4K20me3 an den Endpunkten synaptonemaler Komplexe in der Kernperipherie (Hermández- Hermández et al., 2010). Diese Endpunkte zeigten das intensivste SYCP3 Signal, das mit der Telomerverankerung an die Adhäsionsplatte korrespondiert (Viera et al., 2003). SYCP3 selbst ist eine strukturelle Komponente des Lateralelementes, an das das in Schleifen organisierte Chromatin der homologen Chromosomen anknüpft. Genomische Sequenzen, die mit dem Lateralelement direkt assoziieren, sind LINE-, SINE-, LTR-, Satelliten- und einfache repeat-Sequenzen (Hermández- Hermández et al., 2008). Das Chromatin von LINE-Sequenzen ist präferenziell mit H4K20me3 assoziiert und Satellitensequenzen liegen im Chromatin vor, das eine Trimethylierung von H3K9 und H4K20 zeigt (Hermández- Hermández et al., 2010). Die Trimethylierung von H3K27 kolokalisiert mit SYCP3 an verschiedenen Punkten entlang des Lateralelementes. Das Chromatin, das mit H3K27me3 assoziiert, ist wiederum reich an SINE- und LTR-Sequenzen (Hermández- Hermández et al., 2010). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bestimmte DNA-Sequenzen auf Grund ihrer Chromatinstruktur mit spezifischen Bereichen des synaptonemalen Komplexes kolokalisieren. Der dabei dominierende Chromatinzustand ist heterochromatisch. Dementsprechend könnten die abundanten Färbungen der heterochromatischen Modifizierungen H3K9me3, H3K27me1, H3K27me2 und H3K27me3 auf eine ähnliche Funktion in Drosophila hinweisen.

## 4.2 dSETDB1 kontrolliert H3K9me3 an frühen synaptonemalen Komplexen

In *Drosophila* und anderen Organismen ist die Methylierung von H3K9 mit der Etablierung eines transkriptionsinaktiven Chromatinstatus assoziiert. Drei H3K9 spezifische Histonmethyltransferasen werden vom *Drosophila*-Genom kodiert. Su(var)3-9 wurde als dominanter Suppressor für  $In(1)w^{m4h}$  isoliert (Tschiersch et al., 1994). SU(VAR)3-9 katalysiert die H3K9 Dimethylierung am Chromozentrum und H3K9 Trimethylierung in einer zentralen Region des Chromozentrums von Polytänchromosomen, ist jedoch nicht funktionell für die H3K9 Monomethylierung am Chromozentrum und die H3K9 Dimethylierung entlang der Chromosomenarme, am 4. Chromosom und an den Telomeren (Rea et al., 2000; Schotta et al., 2002, Ebert et al., 2004, Seum et al, 2007a). Als eine weitere H3K9 spezifische KMTase katalysiert

dSETDB1 die H3K9 Di- und Trimethylierung am 4. Chromosom in *Drosophila* (Seum et al., 2007a). In Säugern vermittelt G9a die Mono- und Dimethylierung von H3K9 in euchromatischen Regionen (Rice et al., 2003; Tachibana et al., 2002; Tachibana et al., 2001). Die *in vivo* Funktion des *Drosophila* Homologen dG9a ist trotz einer *in vitro* nachgewiesenen Histonmethyltransferaseaktivität bisher unbekannt (Stabell et al., 2006). In polytänen Speicheldrüsenchromosomen wurden mit einer *dG9a*-Mutante keine Veränderungen der H3K9 Mono-, Di- und Trimethylierung festgestellt (Seum et al., 2007b). Auch in den Ovarien konnte trotz einer offensichtlichen Funktion in der Oozytendetermination keine H3K9 spezifische KMTase-Aktivität für dG9a nachgewiesen werden (Lee et al., 2009).

Im Gegensatz zu dem Homologen suv39h in Säugern prägen Su(var)3-9-Mutanten in Drosophila keine morphologischen Veränderungen aus, sind homozygot lebensfähig und fertil (Tschiersch et al., 1994). Eine Funktion in der Keimbahnentwicklung ist auch für dG9a, das zwar in den Gonaden beider Geschlechter abundant exprimiert wird (Stabell et al., 2006), auf Grund der Fertilität von dG9a-Mutanten kaum vorstellbar (Mis et al., 2006). Sogar eine Doppelmutante für dG9a und Su(var)3-9  $[dG9a^{13414}/dG9a^{13414}; Su(var)3-9^{06}/Su(var)3-9^{06}]$  ist fertil (Mis et al., 2006). Dennoch wurde zunächst überprüft, ob am synaptonemalen Komplex die H3K9 Trimethylierung von SU(VAR)3-9 vermittelt wird. Die unterschiedlichen Färbungen von H3K9me3 und SU(VAR)3-9 sprechen allerdings dagegen. Die H3K9 Trimethylierung liegt abundant am synaptonemalen Komplex vor, wohingegen SU(VAR)3-9 nur mit zwei bis drei Foci assoziiert, die gleichzeitig eine intensive DAPI-Färbung aufweisen. Zudem ist bekannt, dass Su(var)3-9 nur schwach in den Germarien exprimiert wird (Yoon et al., 2008). Folglich ist die Trimethylierung von H3K9 in den Germarien homozygoter  $Su(var)3-9^{06}$ Mutantenweibchen nicht reduziert (Yoon et al., 2008). Mit derselben Mutantenlinie wurde auch am synaptonemalen Komplex keine Reduktion von H3K9me3 gefunden. Demnach übernimmt eine andere Histonmethyltransferase die Trimethylierung von H3K9 am synaptonemalen Komplex in den Germarien.

Die Ovarien der *egg* Mutanten sind extrem reduziert und die Tiere steril (Clough et al., 2007). Das Gen *egg* kodiert für die H3K9me2, H3K9me3 KMTase dSETDB1, die am 4. Chromosom mit POF kolokalisiert (Larsson et al., 2001; Tzeng et al., 2007; Seum et al., 2007a). In Germarien konnte der *loss of function* Mutante *egg*<sup>1473</sup>, der durch eine 856bp Deletion die gesamte SET Domäne im Protein fehlt, bereits eine H3K9me3 spezifische KMTase Aktivität nachgewiesen werden (Clough et al., 2007). In der vorliegenden

Arbeit wurde gezeigt, dass dSETDB1 am synaptonemalen Komplex die Trimethylierung von H3K9 vermittelt. Damit scheint dSETDB1 eine gewebeabhängige Substratspezifität auszuüben, die, so wird vermutet, durch den N-Terminus von dSETDB1 kontrolliert wird (Yoon et al., 2008). Das Expressionsprofil von *egg* und der Proteinnachweis zeigen eine starke Akkumulation in den Germarien (Yoon et al., 2008). Mit Hilfe der transgenen Linie pFlyFos016198-dSETDB1V5, die ein dSETDB1-V5 Fusionsprotein ausprägt, sollte dieses Ergebnis bestätigt und eine direkte Assoziation von dSETDB1 mit dem Chromatin des synaptonemalen Komplexes nachgewiesen werden.

# 4.3. Epigenetische Faktoren beeinflussen die Crossoverfrequenz über die Modifikation der Chromatinstruktur

In Drosophila wurden die meisten meiotischen Mutationen in Folge einer erhöhten X-Chromosom Nondisjunction-Rate identifiziert (Sandler et al., 1968; Baker und Carpenter, 1972; Sekelsky et al., 1999). Diese Mutationen beeinflussen primär die Bildung eines Doppelstrangbruches (DSB) bzw. dessen Reparatur. Dabei führt die Reduktion von Crossover zur Erhöhung des Anteils achiasmatischer Bivalente und somit zu einer Erhöhung von Nondisjuction. Auch Temperatur oder Alter der Drosophila-Weibchen können die Crossoverrate in spezifischen Genombereichen beeinflussen (Plough, 1917; Bridges, 1927; Westphal und Reuter, 2002). Zudem zeigt Heterochromatin einen negativen Effekt auf Crossover (Baker, 1958), wodurch eine signifikante Reduktion von Rekombinationsereignissen vor allem in heterochromatischen Bereichen stattfindet (Mather, 1939; Roberts, 1965; Carpenter und Baker, 1982). Der Chromatinzustand wird wiederum über epigenetische Prozesse reguliert. In diesem Zusammenhang zeigen eine Vielzahl von PEV Suppressormutationen einen dominanten Effekt auf die Crossoverfrequenz im perizentrischen Heterochromatin (Westphal, 1999; Westphal und Reuter, 2002). Insgesamt wurde für 46 Mutationen, die für 19 verschiedene Su(var) Gene kodieren, der Effekt auf die Crossoverfrequenz in der  $ri-p^p$  perizentromeren Region auf Chromosom 3 untersucht (Westphal und Reuter, 2002). Die sechs Suppressormutationen Su(var)2-2  $[Su(var)Ubc9^{2-2}]$ , Su(var)2-10, Su(var)2-14, Su(var)2-15, Su(var)2-1 und Su(var)3-3zeigen dabei eine signifikante Erhöhung von meiotischem Crossover in dieser Region. Der Effekt der drei Heterochromatin assoziierten Proteine HP1, SU(VAR)3-9 und das Zinkfingerprotein SU(VAR)3-7 (Reuter et al., 1990) wurde ebenfalls in der  $ri-p^{p}$  Region

untersucht. Einzig die Su(var)3-7-Mutante zeigt eine signifikante Erhöhung von Crossover zwischen  $ri-p^p$ . Die beiden *loss of function* Mutationen Su(var)2-5<sup>05</sup> und Su(var)3-9<sup>06</sup> weisen nur in transheterozygoter Kombination miteinander eine signifikante Erhöhung von Crossover in der perizentrischen Region von Chromosom 3 auf (Westphal und Reuter, 2002). Weil in den vorangegangenen Analysen verdeutlicht wurde, dass die H3K9 Trimethylierung abundant am synaptonemalen Komplex vorliegt und offenbar von dSETDB1 und nicht durch SU(VAR)3-9 vermittelt wird, sollte der dominat rekombinogene Effekt einer *dSetDB1 Nullmutante* in der perizentrischen Region ebenfalls untersucht werden.

Zusätzlich wurde in der Studie von Westphal und Reuter der dominant rekombinogene Effekt von  $Su(var)2-1^{04}$ ,  $Su(var)2-1^{207}$ , Su(var)2-2,  $Su(var)2-14^{01}$ ,  $Su(var)2-15^{01}$  und  $Su(var)2-10^{01}$  auf die Crossoververteilung entlang des rechten Arms von Chromosom 3 mit einem *se ri ss e ro* markierten Chromosom untersucht (Westphal und Reuter, 2002). Dabei zeigte keine der untersuchten Suppressormutationen einen signifikanten Effekt auf Crossover in der distalen *e-ro* Region (Westphal und Reuter, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde in der distalen Region 21B4-21E2 auf dem linken Arm von Chromosom 2 der dominant rekombinogene Effekt von zehn PEV-Faktoren analysiert, die zum Teil auch in den Studien von Westphal und Reuter untersucht wurden. Für diese Analysen wurden keine Markergene, sondern eine cis-Kombination der RSw<sup>+</sup>-Elemente 5-SZ-3548 (21B4) und 5-SZ-3596 (21E2) verwendet. Vier der zehn PEV-Faktoren zeigten eine signifikante Erhöhung der Crossoverrate in Region 21B4-21E2. Eine dieser Supperssormutationen ist Su(var)2-8, die in der  $ri-p^p$  perizentromeren Region auf Chromosom 3 keinen rekombinogenen Effekt zeigte (Westphal, 1999; Westphal und Reuter, 2002). Su(var)2-8 ist ein Suppressor für PEV mit noch unbekannter Funktion (Reuter, 1984; vorliegende Arbeit). Denkbar ist, dass die Erhöhung der Crossoverrate in 21B4-21E2 durch die Nähe des Su(var)2-8-Genlocus in 21E2 bedingt sein könnte. Die Suppressormutation  $Su(var)Ubc9^{2-2}$ , deren Genlocus direkt im untersuchten Bereich liegt (vorliegende Arbeit), zeigt hingegen einen schwachen rekombinogenen Effekt auf die Region 21B4-21E2. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu dem starken rekominogenen Effekt, den Su(var)Ubc9<sup>2-2</sup> auf die perizentromere Region von Chromosom 3, die *light-rolled* heterochromatische Region von Chromosom 2 und den distalen Bereich des X-Chromosoms ausübt (Westphal und Reuter 2002).  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  kodiert für das SUMO konjugierende Enzym Ubc9. Sumoylierung ist eine essentielle posttranslationale Proteinmodifikation bei der SUMO

kovalent mit einem Proteinsubstrat konjugiert wird und dadurch dessen Aktivität bzw. dessen subzelluläre Lokalisation ändert (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Johnson, 2004; Gill, 2004). Ein prominentes Substrat für Sumoylierung ist SU(VAR)3-7 (Reo et al., 2010). Weil die Lokalisation von SU(VAR)3-7 an perizentrisches Heterochromatin, an Chromosom 4 und an die Telomeren von seiner Sumoylierung abhängt (Reo et al., 2010), zeigen die Mutationen von Su(var)3-7 und  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  auch beide eine signifikante Erhöhung von Crossover in der perizentromeren  $ri-r^p$  Region (Westphal und Reuter, 2002).

Epigenetische Faktoren, die global auf die Chromatinstruktur meiotischer Chromosomen wirken, wurden bisher nicht identifiziert. Eine solche Funktion ist jedoch für E(Z) vorstellbar. Die Überexpression von E(z) führt zu einer signifikanten Reduktion der Crossoverereignisse in Region 21B4-21E2. E(Z) katalysiert in Drosophila die H3K27 Mono-, Di- und Trimethylierung in somatischen Zellen (Ebert et al., 2004; Ebert et al., 2006). Am Chromatin des synaptonemalen Komplexes wurde eine abundante H3K27me1 Modifizierung gefunden und H3K27me2 und H3K27me3 zeigen ebenfalls eine intensive Färbung am gesamten synaptonemalen Komplex. Diese Ergebnisse weisen auf einen heterochromatinähnlichen Zustand meiotischer Chromosomen hin. Ob dabei die H3K27 Methylierung an den synaptonemalen Komplexen von E(Z) vermittelt wird, sollte immunzytologisch an den Nullallelen  $E(Z)pco^{190}$  oder  $E(z)^{15}$  untersucht werden (Shearn und Garen, 1974; Shearn et al. 1978). Weil jedoch beide Allele rezessiv letal sind, wären diese Analysen nur mit heterozygoten Tieren möglich. Eine Alternative bietet die Methode der transgenen RNA-Interferenz, die den gezielten Knockdown einzelner Gene vermittelt (Ni et al., 2009; http://www.flyrnai.org). In TRiP-Linien (Transgenic RNAi Project) wurde ein VALIUM-Vektor (Vermillion-AttB-Loxp-Intron-UAS-MCS) mit einer genspezifischen RNA hairpin Struktur ortsspezifisch über phiC31 im Drosophila Genom integriert (Ni et al., 2008; Groth et al., 2004). Zudem ermöglicht der VALIUM-Vektor eine gewebespezifische Aktivierung des RNAi Konstruktes über das UAS/GAL4 System (Brand und Perrimon, 1993). Mit den Treiberlinien P{nanosGAL4} oder P{vasaGAL4}, die für einen effizienten Knockdown maternal eingekreuzt werden müssen (Mietzsch, persönliche Mitteilung), ist somit ein keimbahnspezifischer Knockdown möglich.

Die Assoziation von E(Z) mit dem Chromatin des synaptonemalen Komplexes sollte zudem mit einem E(Z) spezifischen Antikörper (Immhof Labor) nachgewiesen werden.

98

Zudem könnte nach Generierung einer transgenen Linie für pFlyFos031509-E(Z)V5, die ein E(Z)-V5 Fusionsprotein ausprägt, die Assoziation überprüft werden.

Übernimmt E(Z) tatsächlich die H3K27 Methylierung am synaptonemalen Komplex, könnte eine zusätzliche genomische Kopie von E(z) durch das  $P\{E(z)rv^+B\}$ 32 Transgen zur Hypermethylierung von H3K27 führen. Dies würde auch die in Region 21B4-21E2 beobachtete signifikante Reduktion von Crossover bei einer Überexpression von E(z)erklären. Auf Grund der verstärkten H3K27-Methylierung würde eine extreme Verdichtung des meiotischen Chromatins einsetzen, wodurch dessen Zugänglichkeit für DSB initiierende Proteine wie MEI-W68 drastisch sinkt. Diese Vermutung bestätigend  $w^{1118}_{iso}/w^{1118}_{iso};$ elektronenmikroskopische auch Analysen von zeigen  $P{E(z)ry^+B}{32/P{E(z)ry^+B}}{32}$  Weibchen, die vier genomische Kopien von E(z)ausprägen, im Vergleich zum Kontrollstamm  $[In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}; +/+; +/+]$  eine extreme Verdichtung der globalen Chromatinstruktur am synaptonemalen Komplex. Somit besteht offensichtlich ein direkter Zusammenhang zwischen Crossover und dem Zustand des mit dem synaptonemalen Komplex assoziierten Chromatins.

### 4.4 Die Verteilung von Crossover wird epigenetisch kontrolliert

Faktoren können die Crossoverfrequenz in unterschiedlichen Epigenetische genomischen Bereichen beeinflussen und geben damit einen Hinweis für die Bedeutung des Chromatinzustandes bei der DSB-Bildung. Diese wird in Drosophila von dem Protein Trade Embargo (Trem) initiiert (Lake et al., 2011). Trem vermittelt als Chromatin assoziierendes Zinkfingerprotein die Lokalisation von MEI-P22, das für die DSB-Formation notwendig ist (Lake et al., 2011; Liu et al., 2002). Dabei ist noch nicht geklärt, ob Trem über seine fünf Zinkfingerdomäne eine direkte Protein-Protein Interaktion zu MEI-P22 herstellt oder eine Chromatinstrukturveränderung herbeiführt, die eine leichtere Bindung von Mei-P22 an das meiotische Chromosom erlaubt. Im Gegensatz zu dem humanen Homolog PR domain-containing 9 (PRDM9) besitzt Trem keine KMTase-Domäne (Lake et al., 2011). PRDM9 bindet in Säugern an DSB-"hot" Spot-Regionen, die typischerweise 1-2kb groß sind, über dessen chromatinmodifizierende Funktion (Baudat et al., 2010; Paigen und Petkov, 2010; Jeffreys et al., 2001). Als Erkennungssequenz für die Zinkfingerdomäne von PRDM9 dient wahrscheinlich ein CCNCCNTNNCCNC Motiv, das in ca. 40% von humanen "hot" Spot Regionen auftritt (Myers et al., 2010; Myers et al., 2008). Die Untersuchungen von Spermazellen, die von Männern mit verschiedenen PRDM9 Allelen stammen, weisen

auf einen starken Einfluss von PRDM9 auf die Rekombination in "hot" Spot Regionen hin (Berg et al., 2010). Im Gegensatz zu Säugern werden in *Drosophila* keine "hot" Spot Regionen erwartet (Hey et al., 2004). Dennoch konnten Variationen der Crossoverrate innerhalb großer Regionen gezeigt werden (Cirulli et al., 2007). Die Untersuchung von Rekombinationsereignissen zwischen den Markern *yellow* und *white* wurde an 370 *Drosophila pseudoobscura* Tieren durchgeführt und erlaubte die Identifizierung von "mild hot" Spot Regionen. Auch in *Drosophila* konnte mit der Untersuchung der Crossoverfrequenz zwischen zwei in *trans* liegenden *RSw*<sup>+</sup>-Elementen gezeigt werden, dass die Verteilung von Crossover entlang der genomischen Sequenz von Chromosom 2 variiert und "hot" und "cold" Spots für Crossover identifiziert werden können. Diese Unterschiede wurden erst durch die Analysen relativ kleiner durchschnittlich 200kb großer Regionen offensichtlich. Bei den Analysen großer Regionen, die mit mehreren kleinen Intervallen überlappen, kompensieren sich die Unterschiede in den Crossoverfrequenzen eindeutig.

Mit der hochauflösenden SNP-Crossoverkartierung wurde die Crossoververteilung innerhalb kurzer etwa 20-80kb und teilweise noch kleinerer genomischer Intervalle analysiert. In drei verschiedenen genomischen Bereichen konnten dabei eindeutige "hot" und "cold" Spot Regionen für Crossover identifiziert werden. Der eindrucksvollste "cold" Spot wurde in Region 23B8-23C5 mit einer Crossoverfrequenz von >8x10<sup>-3</sup> % Rekombination (SNP41/SNP42) gefunden. Die zur Identifizierung des "cold" Spot analysierten Crossoverchromosomen wurden nach Kreuzung von Su(var)2-12 mit der *cis*-Kombination 5-SZ-3215 + 5-HA-1695 isoliert. Wahrscheinlich verursacht der zwischen SNP41 und SNP42 liegende Su(var)2-12-Locus (vorliegende Arbeit) die Reduktion der Crossoverereignisse in diesem Intervall. Tatsächlich liegt die Crossover-frequenz zwischen den in *trans* befindlichen  $RSw^+$ -Elementen 5-HA-2924 und 5-HA-1917, die den Bereich von SNP41 bis SNP42 flankieren, bei einem Normalwert von 4,5x10<sup>-6</sup> % Rekombination.

Eine Feinkartierung der Crossoverereignisse in Region 21E2-21E3 mit sieben zusätzlichen SNPs zwischen 5-SZ-3596 und SNP22 zeigt, dass Crossover offensichtlich bevorzugt in der intergenischen Region zwischen *Pph13* und *Gsc* (SNP17/SNP18) und im Intron 2 von *Gsc* (SNP19/SNP20) stattfindet. Kein Crossover wurde dagegen in dem von SNP18 und SNP19 präzise flankierten 3. Exon von *Gsc* und innerhalb des ORF von *CG2807* gefunden. Inwieweit diese Ergebnisse verallgemeinert werden können, sollte

mit einer Wildtypkontrolle und einer größeren Anzahl an Crossoverchromosomen nachgewiesen werden.

In Region 21B4-21E2 erfolgte die Analyse der Crossoververteilung mit sieben SNPs an Crossoverchromosomen, die als Ausnahmetiere von 5-SZ-3548+5-SZ-3596/+  $(w^{m4h})$ Heterozygoten isoliert wurden. Zusätzlich wurde der Einfluss epigenetischer Faktoren wie  $Su(var)2-8^{01}$ ,  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  und die Doppelmutante  $Su(var)Ubc9^{2-2}$   $Su(var)2-10^{01}$ auf die Crossoververteilung in Region 21B4-21E2 untersucht. Die hochauflösende SNP-Crossoverkartierung identifizierte für alle Genotypen einen signifikant erhöhten Crossoverwert in einer 40kb großen, nicht kodierenden Region. Das daneben liegende Intervall zwischen SNP10 und SNP12 zeigt unter dem Einfluss der Suppressormutation  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  eine drastische Erhöhung von Crossover.  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  weist eine Mutation in dem SUMO konjugierenden Enzym Ubc9 auf (vorliegende Arbeit). Neben SU(VAR)3-7 wird auch dSETDB1 sumoyliert (Reo et al., 2010; Koch et al., 2009). Die dSetDB1-Mutante egg<sup>1473</sup> zeigt ebenfalls im Intervall von SNP10/SNP12 eine signifikante Erhöhung von Crossover (Daten nicht gezeigt). dSETDB1 vermittelt nachweislich die H3K9 Trimethylierung am synaptonemalen Komplex. Somit ist es vorstellbar, dass H3K9 in der genomischen Region zwischen SNP10 und SNP12 von dSETDB1 trimethyliert wird. Der funktionelle Verlust von dSETDB1, hervorgerufen durch eine Mutation in *dSetDB1* bzw. auf Grund fehlender Sumoylierung, führt zu einer Reduktion von H3K9me3 in dieser Region, wodurch die Crossoverereignisse steigen. Dass Sumoylierung das Potenzial hat, meiotische Prozesse entscheidend zu beeinflussen, zeigen die Expressionsdaten von fünf Genen, die an Sumoylierungsprozessen beteiligt sind (Hashiyama et al., 2009). Schon in den Polzellen und Gonaden von Embryonen werden Gene, die für das SUMO Protein (smt3), die SUMO-spezifische Protease (*Ulp1*), die SUMO-aktivierenden Enzyme (*Uba2/Aos1*) und das SUMO-konjugierende Enzym Ubc9 (lwr) kodieren, neben Genen, die an der Zystoblastendifferenzierung und meiotischen Prozessen (bam, bgcn, mei-P26) beteiligt sind, stark exprimiert (Hashiyama et al., 2009; Mukai et al., 2006).

Bei der Doppelmutante  $Su(var)Ubc9^{2-2} Su(var)2-10^{01}$  wurde kein einziges Crossoverereignis zwischen SNP10 und SNP12 identifiziert. Su(var)2-10 kodiert für eine SUMO Ligase (E3) der PIAS Familie (Hari et al., 2001). In der sequentiellen Reaktionskaskade agiert SU(VAR)2-10 nach Ubc9. Daher ist die drastische Crossoverreduktion zwischen SNP10 und SNP12 für die Doppelmutante nicht erklärbar. Der Einfluss epigenetischer Faktoren auf die Crossoverfrequenz und Crossoververteilung gibt jedoch erstmals einen Hinweis auf die Bedeutung des Chromatinzustands bei meiotischen Prozessen.

# 4.5 Die Suppressormutationen Su(var)2-2, Su(var)2-23 und Su(var)2-26 betreffen Punktmutationen im Ubc9-Gen

Das Gen lwr (lesswright) kodiert für das SUMO (small ubiquitin-related modifier) konjugierende Enzym Ubc9, das eine zentrale UBCc Domäne (AS 7-157) bildet. Die Proteinsequenz von Ubc9 ist hoch konserviert und zwischen Drosophila melanogaster und Homo sapiens zu 82% identisch (Joanisse et al., 1998). Für den Su(var)Ubc9-Locus konnten drei neue Allele [Su(var)2-2, Su(var)2-23 und Su(var)2-26] identifiziert werden. Die Mutationen von Su(var)2-23 und Su(var)2-26 sind identisch. Der Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin an Proteinposition 17 betrifft die nichtkovalente Interaktion zwischen SUMO und Ubc9 (Duan et al., 2009; Knipscheer et al., 2007; Capili und Lima, 2007; Duda et al., 2007). Dem Allel Su(var)2-2  $[Su(var)Ubc9^{2-2}]$ , dessen rekombingener Effekt auf meiotisches Crossover untersucht wurde, konnte ein Aminosäureaustausch von Prolin zu Serin an Position 88 im Ubc9 Protein nachgewiesen werden. Auch diese Aminosäure ist zwischen Drosophila und Homo sapiens konserviert. Kristallstrukturanalysen des humanen Ubc9 Proteins identifizierten Cystein 93 als katalytische Aminosäure (Giraud et al., 1998; Tong et al., 1997). Damit liegt die Su(var)2-2-Mutation offenbar im katalytischen Zentrum von Ubc9. Der rekombinogene Effekt dieser Mutation lieferte einen direkten Hinweis darauf, dass über Sumoylierung von Chromatinproteinen Crossoverprozesse optimiert werden.

## 4.6 Entwicklung einer neuen Kartierungsmethode zur Identifizierung von PEV-Suppressorgenen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige Methode für die Kartierung von Su(var)-Genen entwickelt, deren Effektivität mit der Eingrenzung der genomischen Region von Su(var)2-8, Su(var)2-12 und Su(var)2-13 unter Beweis gestellt werden konnte. Die Verknüpfung genetischer Kreuzungsexperimente mit einer anschließenden molekulargenetischen Analyse von Crossoverchromosomen ermöglicht eine effiziente Kartierung der Mutationen.

Zunächst wurde im PEV Modellsystem  $In(1)w^{m4h}$  der Einfluss verschiedener Duplikationen auf den Suppressoreffekt der drei Su(var)-Mutationen untersucht. Dafür
standen insgesamt 86 Duplikationen mit einer Größe von 19.888bp [Dp(2;2)36] bis 2.906.168bp [Dp(2;2)3] zur Verfügung (Stand Juni 2012), die im Vorfeld mit RSw<sup>+</sup>-Element-Insertionen aus dem DrosDel EU-Projekt erstellt wurden (Ryder et al., 2004; Ryder et al., 2007; C. Nickel, persönliche Mitteilung). Obwohl die Orientierung und die zufallsgemäße Insertion der 3.300 RSw<sup>+</sup>-Elemente die Manipulationsmöglichkeiten der Chromosomenstruktur begrenzen, können genomweit überlappende Duplikationen generiert werden. Kompensiert eine Duplikation den Suppressoreffekt einer Su(var)-Mutation, liegt eine zusätzliche Kopie des Suppressorgens vor. Dieses Ergebnis kann jedoch durch andere PEV-Modifikatoren (z.B. Enhancerfunktionen), die sich anstatt des gesuchten PEV-Faktors in dem duplizierten Bereich eines Duplikationschromosoms befinden, beeinfusst werden. Bei einigen PEV modifizierenden Genen tritt zum haploabhängigen Suppressor-Effekt ein gegensätzlicher triplo-abhängiger Enhancer-Effekt auf (Reuter und Spierer, 1992). Beispielsweise manifestieren Su(var)2-5, Su(var)3-7 und Su(var)3-9 einen haplo-Suppressor und triplo-Enhancer-Effekt (Reuter und Spierer, 1992; Schotta et al., 2002; Schotta et al., 2004). Wird in den Hintergrund eines haplo-Suppressors eine Duplikation eingekreuzt, die dessen Gen nicht abdeckt, selber aber einen triplo-Enhancer-Effekt ausprägt, führt das auf Grund der Dosisabhängigkeit von  $In(1)w^{m4h}$  zu einem white-mottled Augenphänotyp. Damit würde fälschlicherweise der gesuchte haplo-Suppressor innerhalb des duplizierten Bereiches vermutet. Die Zahl von triplo-abhängigen *E(var)*-Funktionen ist jedoch sehr gering die und Duplikationskartierung ist in der Regel eine effiziente Methode zur Kartierung von Su(var)-Genen innerhalb größerer Genombereiche von ca. 500kb.

Die Ergebnisse der Duplikationskartierungen wurden für alle drei Suppressormutationen durch die anschließende SNP-Kartierung bestätigt. Zur Generierung von Crossoverchromosomen wurden *cis*-Kombinationen von zwei  $RSw^+$ -Elementen mit der jeweiligen Suppressormutation gekreuzt. Bei der Erstellung von *cis*-Kombinationen wurden nur  $RSw^+$ -Elemente genutzt, die eine gelbe Augenfarbe ausprägen.

Insgesamt wurden für Su(var)2-8, Su(var)2-12 und Su(var)2-13 966 Crossoverchromosomen analysiert, die mit acht verschiedenen *cis*-Kombinationen generiert wurden. Die SNP-Kartierung mit insgesamt 42 verschiedenen SNPs konnte jedem der Crossoverchromosomen das Rekombinationsereignis innerhalb eines spezifischen Intervalls zuordnen. Anschließend wurde im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement analysiert, ob die Crossoverchromosomen Träger der Suppressormutation sind. Durch die Zusammenführung aller Ergebnisse konnte die genomische Region, in der die Su(var)2-8-, Su(var)2-12- und Su(var)2-13-Gene liegen, im Vergleich zur Duplikationskartierung nochmals verkleinert werden. Mit Rescueanalysen unter Einsatz von insgesamt neun pFlyFos Transgenen konnten die Ergebnisse der Kartierungsexperimente für die drei Suppressormutationen zusätzlich bestätigt werden. Der gemeinsame überlappende Bereich der drei Kartierungsergebnisse definierte die genomische Region von Su(var)2-8 in 21E2 mit fünf Kandidatengenen, von Su(var)2-12 in 23C4-23C5 mit sechs Kandidatengenen und von Su(var)2-13 in 31B1 mit drei Kandidatengenen.

### 4.7 Der Su(var)2-8-Locus liegt in unmittelbarer Nähe der 5-SZ-3596-Insertion

Die Sequenzierung der fünf Su(var)2-8-Kandidatengene (Nle, CG2807, Ipk2, CG2813 und Ptth) konnte keine Mutation identifizieren, die spezifisch für das Su(var)2-8-Chromosom ist. Zudem wurde bei Expressionsanalysen für keines der Gene ein reduziertes oder verkürztes Transkript gefunden. Notchless (Nle) kodiert für ein WD40-Domänen-Protein und fungiert als direkter Regulator von Notch (Royet et al., 1998). Das p{GS[ $v^+(Nle)$ ]} Transgen konnte den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 im In(1)w<sup>m4h</sup>-Rearrangement nicht kompensieren. CG2807 kodiert für ein U2snRNP Derivat (Herold et al., 2009) und übernimmt damit eine Funktion beim prä-mRNA Spleißen via Spleißosom. Die Mutantenrettungsanalysen von CG2807 waren zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit nicht abgeschlossen. Die Injektion von  $p\{RS3[w^+(CG2807)]\}$  war mit dem Erhalt einer transgenen Linie erfolgreich, deren Einfluss auf den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement muss jedoch noch überprüft werden. Ipk2 kodiert für eine 6-/3-Kinase, die im JAK-STAT Signalweg wirkt (Tsui et al., 2008; Muller et al., 2005) und das Proteinprodukt von cold (CG2813) ist eine septate junction Komponente in Epithelgeweben und Nervensystemen (Hijazi et al., 2011). Weil Mutantenrettungskonstrukte beider Gene den Suppressoreffekt von Su(var)2-8 im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement nicht aufheben, können diese als Kandidaten von Su(var)2-8 ebenfalls ausgeschlossen werden.

Das Proteinprodukt von *Ptth* ist ein prothorakotropes Hormon, das über Ecdyson die Metamorphose beeinflusst (Kim et al., 1997). In *Drosophila* wird *Ptth* während der larvalen Entwicklung in den bilateralsymmetrischen Neuronen (PG Neuronen) exprimiert (Mc Brayer et al., 2007). Die PG Neuronen innervieren direkt die Prothoraxdrüse, die als endokrines Organ die Produktion und Segregation von Ecdyson reguliert (Siegmund und Korge, 2001; Gilbert et al., 2002). Dabei aktiviert PTTH über die Rezeptortyrosinkinase Torso die RAS/ERK Kaskade, die die Transkription von Enzymen für die Ecdysonsynthese stimuliert (Rewitz et al., 2009). Der erste Schritt der Ecdysonsynthese wird von dem Zinkfingerprotein WOC katalysiert, das die Aktivität der 7,8-Dehydrogenase reguliert (Warren et al., 2001). Ebenfalls an der Ecdysonsynthese beteiligt ist das Cytochrom P450 Enzym Disembodied (Chávez et al., 2000). Eine Mutation in *woc* oder *dib* weist einen dominanten Suppressoreffekt im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement auf (Lein, 2011). Zudem zeigen die Temperatur-sensitive *ecdysoneless*-Mutante *ecd1* in der nicht-permissiven Temperatur (Apelt, persönliche Mitteilung) und die Mutante für den Ecdysonrezeptor *EcR* (*EcR*<sup>M554/s</sup>) einen dominanten Suppressoreffekt im PEV-Modellsystem  $In(1)w^{m4h}$  (Lein, 2011). Eine Mutation in *taiman*, das für ein Koaktivatorprotein des EcR/USP Ecdyson-Rezeptorkomplexes kodiert, prägt ebenfalls einen dominanten Suppressoreffekt aus (Apelt, 2005; Lein, 2011). Die RNAi vermittelte *down*-Regulation von *Ptth* zeigt jedoch keinen Suppressoreffekt für PEV im  $In(1)w^{m4h}$ -Hintergrund.

Für die *down*-Regulation wurden Linien des transgenen RNAi Projektes (TRiP-Linie) verwendet (Nie et al., 2009; Perimon et al., 2010). Die RNAi-Konstrukte sind in einen VALIUM-Vektor inseriert (Ni et al., 2008), der über phiC31 (Groth et al., 2003) ortsspezifisch im Drosophila Genom integriert wurde. Die meisten TRiP-Linien wurden mit der attp2-Stelle generiert, die eine optimale Expressionsrate aufweist (Markstein et al., 2008). Das UAS/GAL4 System ermöglicht außerdem eine gewebespezifische Expression der RNAi-Konstrukte (Brand und Perrimon, 1993). Für die Analysen im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement stand jedoch nur der w markierte P{actinGAL4} Treiber zur Verfügung. Die RNAi vermittelte down-Regulation von HP1 zeigte bereits einen Suppressoreffekt, der im Männchen stärker ausgeprägt ist. Weil HP1 rezessiv letal ist (Wustmann et al., 1989), spricht dieses Ergebnis für einen unvollständigen Gen-Knockdown, der den haplo-Suppressoreffekt von HP1 widerspiegelt. Deshalb sollte mit einer weiteren HP1 spezifischen TRiP-Linie (GL00531) das Experiment wiederholt werden. Stärkere Effekte bei 29°C, bedingt durch die Temperatursensitivität des UAS/GAL4 Systems (Ni et al., 2008; Mondal et al., 2007), stellen keine Alternative dar, da höhere Temperaturen die Reprimierung des white-Gens in der Inversion  $In(1)w^{m4h}$ beeinflussen würden. Eine weitere TRiP-Linie für die RNAi vermittelte down-Regulation von Ptth steht nicht zur Verfügung.

Die Zerstörung von PG Neuronen führt zu einem kompletten Verlust an PTTH, wodurch überlebende Tiere sich um etwa fünf Tage später verpuppen und auf Grund dessen größer als der Wildtyp sind (Mc Brayer et al., 2007). *Su(var)2-8* ist rezessiv letal

und wird demnach offensichtlich nicht von *Ptth* kodiert. Um diese Aussage zu bestätigen, stehen die Analysen mit dem p{ $GS[v^+(Ptth)]$ } Konstrukt noch aus.

Neben *Ptth* sind die Mutantenrettungsanalysen von *CG2807* noch nicht abgeschlossen. Um *CG2807* als Kandidatengen von *Su(var)2-8* ausschließen zu können, waren Rescueanalysen mit dem Fosmid-Klon pFlyFos020907, der den genomischen Bereich von *CG2807* nicht vollständig trägt, geplant. Die Etablierung einer transgenen Linie war jedoch nicht erfolgreich. Zudem wurde mittels Rekombination ein frühzeitiges Stop-Codon für *CG2807* in pFlyFos028731, der den Suppressoreffekt von *Su(var)2-8* bereits kompensieren konnte, eingeführt. Auch hier muss die transgene Linie noch generiert werden. Kodiert *CG2807* für *Su(var)2-8*, würde dessen gezielter *Knockout* in dem modifizierten pFlyFos028731-CG2807STOP den Suppressoreffekt von *Su(var)2-8* im *In(1)w<sup>m4h</sup>*-Rearrangement nicht mehr retten.

Mit den bisherigen Analysen konnte Su(var)2-8 keinem der fünf Kandidatengene eindeutig zugeordnet werden. Die Sequenzierungsergebnisse und Expressionsanalysen weisen zudem darauf hin, dass keines der fünf Gene für Su(var)2-8 kodiert. Weil PTTH die Ecdysonsynthese vermittelt, ist es vorstellbar, dass dieser Faktor einen triploabhängigen Enhancereffekt in Duplikation Dp(2;2)36 ausprägt, wodurch der Su(var)2-8-Locus fälschlicherweise proximal von 5-SZ-3596 kartiert worden wäre. Eine Duplikation für den Ecdysonrezeptor EcR zeigte bereits einen schwachen E(var)-Effekt im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement (C. Nickel, persönliche Mitteilung). Die Kartierungsergebnisse der SNP-Analysen und von pFlyFos028731 lokalisieren die genomische Region von Su(var)2-8 auch distal von 5-SZ-3596. Somit sollten zusätzlich die Gene Ets21C, rempA, CG2789, CG11835 und CG2794 sequenziert werden.

### 4.8 CG17258 kodiert für Su(var)2-12

Im gemeinsamen überlappenden Bereich der drei Kartierungsergebnisse für Su(var)2-12 liegen die Gene *alpha4GT1*, *CG3542*, *CG3605*, *CG17219*, *GABPI* und *CG17258*. Bei keinem der sechs Gene wurde eine Mutation gefunden, die einzig das Su(var)2-12-Chromosom betrifft.

Das Gen *alpha4GT1* kodiert für eine alpha-1,4-N-Acetylgalactosaminyl-Transferase, die die Synthese eines spezifischen Glycosphingolipids vermittelt (Hamel et al., 2010). Die Genprodukte von *CG3542* und *CG3605* sind im Kern lokalisiert und vermitteln das prä-mRNA Spleißen via Spleißosom. Dabei ist *CG3542* U1-assoziiert und *CG3605* kodiert für ein U2snRNP Derivat (Herold et al., 2009). Trotz dieser ähnlichen

Funktionen zeigen die RNAi vermittelten Knockdown-Analysen beider Gene unterschiedliche Ergebnisse. Der Funktionsverlust von CG3542 (HMS00589) zeigt im In(1)w<sup>m4h</sup>-Rearrangement keinen Suppressoreffekt. Das RNAi-Konstrukt von CG3605 (HMS00056) ist in einen VALIUM20-Vektor inseriert, der einen starken Knockdown im Soma und der Keimbahn hervorruft (Ni et al., 2011). Der RNAi vermittelte Funktionsverlust von CG3605 führt zur Letalität und entspricht damit dem Su(var)2-12-Phänotyp. Von 84 F1-Tieren konnte keines mit einem  $In(1)w^{m4h}/In(1)w^{m4h}$ : P{actinGAL4}/+; HMS00056/+ Genotyp identifiziert werden. Ein ähnlicher Sachverhalt wurde bereits bei den RNAi-Analysen von Su(var)2-8 beobachtet. Die RNAi vermittelte down-Regulation von CG2807 (HM05176) führte zur Letalität und entspricht damit dem Su(var)2-8-Phänotyp. Ebenso wie CG3605 kodiert CG2807 für ein U2snRNP Derivat (Herlod et al., 2009) und übernimmt eine Funktion im Spleißosom. Die spleißabhängige Beeinflussung einzig eines Faktors, der einen Suppressoreffekt im  $In(1)w^{m4h}$ -PEV ausübt, ist kaum vorstellbar. Als ein spezifisches Target-Gen Su(var)3-9/eIF-2gamma wäre jedoch die dicistronische Transkriptionseinheit, die die Synthese beider Proteine über alternatives Spleißen reguliert, denkbar (Krauss und Reuter, 2000). Die Funktion von CG17219 ist bisher nicht bekannt. GABPI kodiert für ein Transmembranprotein, welches die ß1,4-N-Acetylgalactosaminyl-Transferase B zum Golgiapparat translokiert (Kraft et al., 2011). Die RNAi vermittelte down-Regulation beider Gene zeigt keinen Suppressoreffekt im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement. Dem Genprodukt von CG17258 konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. Im kodierenden Bereich von CG17258 wurde wie bei den anderen fünf Kandidatengenen keine Su(var)2-12 spezifische Mutation gefunden. An Su(var)2-12/+ Tieren konnte jedoch eine mehrfach bestätigte Expressionsreduktion von CG17258 identifiziert werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass CG17258 für Su(var)2-12 kodiert. Deshalb sollte die außerhalb des Kartierungsbereiches liegende Promotorregion von CG17258 ebenfalls sequenziert werden. CG17258 ist nach dem PSORT II Prediction Programm (http://psort.hgc.jp/form2.html) zu 87% nuclear. Die Domänenstrukturvorhersage mit dem SMART-Programm (http://smart.emblheidelberg.de/) kann CG17258 jedoch keine Funktion zuordnen. Die starke Konservierung von CG17258 in der Gruppe der Drosophiliden bestätigt sich außerdem nicht für die Säuger.

In pFlyFos028063, der den endogenen Locus von CG17258 trägt und den Suppressoreffekt von Su(var)2-12 kompensieren kann, wurde eine Stop-Mutation in CG17258 eingeführt. Die Generierung einer transgenen Linie steht noch aus.

### 4.9 Su(var)2-13 ist ein besonderes Allel von Su(var)2-1

Die genomische Region von *Su(var)2-13* konnte mit den drei Kartierungsmethoden auf die Gene *CG5694*, *eEF1delta* und *CG13720* eingegrenzt werden.

Das Gen *eEF1delta* kodiert für einen Translationselongationsfaktor (Lasko, 2000) und wurde im Multiproteinkomplex von dLSD1 mittels Massenspektrometrie nachgewiesen (Börner, 2010). Bei der Sequenzierung von *eEF1delta* wurde jedoch kein Nucleotidaustausch gefunden. *CG31720* kodiert für ein Transmembranprotein mit unbekannter Funktion. Die Sequenzierung von *CG31720* ergab eine Transition von Cytosin zu Thymin im Promotorbereich und zwei Insertionen im ersten Intron. Dabei ist keine 5'- oder 3'Spleißstelle betroffen, was mittels semiquantitativer RT-PCR-Analysen an *Su(var)2-13/Df(2L)ED729* Tieren und der anschließenden Sequenzierung des PCR-Fragmentes nachgewiesen wurde.

Das dritte Gen des Su(var)2-13-Locus ist CG5694, das bereits dem Su(var)2-1-Locus zugeordnet werden konnte (Walther, 2003). CG5694 erzeugt zwei Transkripte, die sich in ihrer 5`UTR unterscheiden, jedoch dasselbe Protein mit unbekannter Funktion bilden. Der N-terminale Bereich von CG5694 ist homolog zu der EWG-Domäne von *erect wing (ewg)*, die eine Dimerisierungsdomäne und eine NLS/DNA-Bindedomäne ausbildet (Walther, persönliche Mitteilung). Die EWG-Domäne ist wiederum homolog zu dem humanen NRF-1, der als Aktivator von Cytochrom c die Kern-Mitochondrien-Interaktion beeinflusst (Virbasius et al., 1993). Su(var)2-1 ist ein starker Suppressor im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement, der Butyrat sensitiv ist und eine letale Interaktion mit dem Y-Chromosom zeigt (Reuter et a., 1982a; Reuter et al., 1982b). Zudem weist Su(var)2-1 eine Reduktion der H4 Deacetylierung auf (Dorn et al., 1986). In diesem Zusammenhang sollte in weiterführenden Arbeiten an Su(var)2-13/Df(2L)ED729 eine Hyperacetylierung am Histon H4 immunzytologisch untersucht werden.

Es existieren 22 Allele von Su(var)2-1, die in den meisten Fällen ein Stop-Codon durch eine frameshift Mutation ausbilden (Walther, 2003). Die Sequenzierung von CG5694 an Su(var)2-13/Df(2L)ED729 Tieren ergab einen Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin an Position 141 im Protein. Diese Position liegt zwar außerhalb der EWG-Domäne, ist jedoch im *Alignment* mit anderen *Drosophila*- und Insektenarten hoch konserviert. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass der Austausch einen grundlegenden Einfluss auf die Proteinfunktion besitzt. In keinem der bekannten Su(var)2-1-Gene wird ein Austausch von Valin zu Isoleucin gefunden (Krauss, persönliche Mitteilung).

Die 22 Su(var)2-1 Allele sind in der transheterozygoten Kombination mit Df(2L)ED729steril (Walther, persönliche Mitteilung). Einzige Ausnahme bilden  $Su(var)2-I^{215}$  und  $Su(var)2-1^{03}$ , die ebenso wie Su(var)2-13 fertil sind. Ein RNAi vermittelte down-Regulation von CG5694 würde im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement in erster Linie dem Su(var)2-1 Phänotyp entsprechen und wäre von Su(var)2-13 nicht zu unterscheiden. Dagegen bietet die Manipulation des Fosmidklons pFlyFos026029 eine elegante Lösung CG5694 als Kandidatengen von Su(var)2-13 zu bestätigen. Über homologe Rekombination wurde in pFlyFos026029 eine Stop-Mutation für CG5694 eingeführt, die dem Su(var)2-1<sup>06</sup> Allel entspricht. Der unmodifizierte pFlyFos026029-Klon konnte den Suppressoreffekt von Su(var)2-1 (Walther, persönliche Mitteilung) und Su(var)2-13 In(1)w<sup>m4h</sup>-Rearrangement kompensieren. Dagegen rettet pFlyFos026029im CG5694STOP (MW2) den Suppressoreffekt von  $Su(var)2-1^{06}$  nicht (Walther, persönliche Mitteilung). Dieses Ergebnis trifft gleichermaßen für Su(var)2-13 zu, unabhängig davon, ob pFlyFos026029-CG5694STOP maternal oder paternal vererbt wird. Damit ist Su(var)2-13 offensichtlich eine Punktmutation von Su(var)2-1.

#### 4.10 Neue Methoden zur Identifizierung von unbekannten PEV-Faktoren

Mit der Kartierung von Su(var)2-8, Su(var)2-12 und Su(var)2-13 wurde die Anwendbarkeit und Effizienz der neuen Kartierungsmethode unter Beweis gestellt. Dennoch sind diese Analysen arbeits- und zeitintensiv.

Eine andere Kartierungsmöglichkeit bietet der Vergleich der Gesamtgenomsequenz von zwei Mutantenallelen, wodurch spezifische Nucleotidaustausche identifiziert werden, die ein gemeinsames Gen betreffen. Diese Untersuchungen wurden erstmals für Su(var)3-4 und Su(var)3-8 (Daten nicht gezeigt) durchgeführt und konnten für beide Suppressoren spezifische nicht-synonyme Austausche für mehrere Kandidatengene identifizieren. Die zuerst durchgeführte Sequenzierung von CG1041, eines der vier Kandidatengene von Su(var)3-4, konnte keine Mutation nachweisen, die jeweils nur ein Su(var)3-4 Allel betrifft. Somit ist es unwahrscheinlich, dass CG1041 für Su(var)3-4 kodiert. Mit Rescueanalysen unter Einsatz von pFlyFos Transgenen, die den endogenen Locus der ermittelten Kandidatengene tragen, muss überprüft werden, ob der Suppressoreffekt von Su(var)3-4 im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement kompensiert werden

kann. Dass die Gesamtgenomsequenzierung von Su(var)3-4 und Su(var)3-8 das Potenzial hat, den jeweiligen Locus zu kartieren, zeigt die Identifizierung eines neues funktionales Allel für *encore*, das mit derselben Methode ermittelt wurde (Blumenstiel et al., 2009).

Um neue PEV-Modifikatoren zu identifizieren, ist ein selektiver *Screen* mit TRiP Linien im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement vorstellbar. Einen wesentlichen Vorteil bietet die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da fast alle TRiP-Linien in der attp2-Stelle ortsspezifisch integrieren und damit die gleiche Expressionsrate aufweisen. Im Gegensatz dazu führt die zufällige P-Element vermittelte Integration von RNAi-Konstrukten zu Positionseffekten, wodurch beispielsweise nur 60% der RNAi-Bibliothek von Dietzel (2007) eine Aktivität zeigen. Des Weiteren ermöglicht der Umfang an TRiP-Linien falsch positive Ergebnisse mit einem zweiten RNAi Konstrukt für dasselbe Gen zu überprüfen. Weil jedoch ein Großteil der PEV-Modifikatoren homozygot letal ist (Wustmann et al., 1989), würden bei einer effizienten *down*-Regulation, wie bereits für *Ubc9* beobachtet, keine Tiere mit dem entsprechenden Genotyp auftreten. Die zeit- und arbeitsintensive Kreuzung aller TRiP-Linien in das PEV System  $In(1)w^{m4h}$  liefert einen weiteren Grund dafür, dass die RNAi vermittelte *down*-Regulation als eine ergänzende Analyse genutzt werden sollte, nachdem der Locus einzelner Suppressoren auf einen definierten Genombereich festgelegt wurde.

Eine andere Möglichkeit eines systematischen *Screens* bietet die Untersuchung von  $RSw^+$ -Elementen des DrosDel EU Projektes (Ryder et al., 2004). Nachdem das *white* Gen durch FRT basierte Rekombination zerstört wurde, könnte der Einfluss des  $RSw^-$ -Elementes auf die *white* Variegation in  $In(1)w^{m4h}$  untersucht werden. *RS*-Elemente inserieren präferentiell in der 5'UTR von Genen (Spradling et al., 1995). In diesem Zusammenhang zeigt das  $RSw^-$ -Element (*Remnant*-Element) von *5-SZ-4008* (31D6), das in der 5'UTR von *CG5381* liegt, einen starken Suppressoreffekt im  $In(1)w^{m4h}$ -Rearrangement (Sharma, persönliche Mitteilung).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, neue PEV-Modifikatoren durch die Transposition eines Mutator-Elementes zu isolieren. Über inverse-PCR kann im Anschluss der neue Insertionsort und damit das den PEV-Effekt hervorrufende Gen identifiziert werden. Dieses Experiment war bereits mit der Isolation dominanter Enhancermutationen für  $In(1)w^{m4h}$  erfolgreich (Dorn et al., 1993).

## 5. Zusammenfassung

In Drosophila-Weibchen findet die Initiierung meiotischer Prozesse in der proximalsten Struktur einer Ovariole, dem Germarium, statt, wenn die aus 16 Zellen bestehende Zyste gebildet wird. Unmittelbar nach Entstehung dieser Zyste wird das meiotische Programm mit der Assemblierung eines synaptonemalen Komplexes und der DSB-Bildung eingeleitet. Immunzytologische Analysen des Chromatinzustandes am synaptonemalen Komplex weisen mit einer abundanten H3K27me1 und H3K9me3 Modifizierung auf einen heterochromatinähnlichen Zustand des mit dem synaptonemalen Komplex assoziierten Chromatins hin. Die H3K9 Trimethylierung wird dabei von dSETDB1 vermittelt. Weiterhin wurde eine abundante Assoziation von HP1 mit dem Chromatin des synaptonemalen Komplexes gefunden. Die Identifizierung des synaptonemalen Komplexes erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das im transversalen Filament liegende C(3)G Protein (Page und Hawley, 2001). Zusätzlich wurde ein polyklonaler C(3)G Antikörper mit identischer Spezifität generiert. Um die Assoziation von PEV-Faktoren mit dem Chromatin des synaptonemalen Komplexes zu untersuchen, wurden für 16 verschiedene Chromatinproteine Fusionskonstrukte mit einem V5-Tag oder SGFP-Tag in Fosmid-Klonen hergestellt.

In der distalen Region 21B4-21E2 von Chromosom 2 wurde der dominant rekombinogene Effekt von zehn PEV-Faktoren analysiert. Hochauflösende SNP-Crossoveranalysen an den dabei erhaltenen Crossoverchromosomen weisen erstmals nach, dass die Verteilung von Crossover nicht zufallsgemäß ist und "hot" und "cold" Spots der Rekombination auch in *Drosophila* existieren. Somit werden die Crossoverfrequenz und Crossoververteilung von epigenetischen Prozessen kontrolliert.

Die zusätzliche genomische Kopie von E(z) durch das P{ $E(z)ry^+B$ }32 Transgen führt zu einer signifikanten Reduktion von Crossover in 21B4-21E2. EM-Analysen am synaptonemalen Komplex der E(z) Überexpression bestätigen diesbezüglich eine stärkere Chromatinkondensation. Die Mutanten SetDB1<sup>1473</sup>, Su(var)2-8<sup>01</sup>, Su(var)Ubc9<sup>2-2</sup> Su(var)2-1<sup>04</sup> und die RNAi down-Regulation von E(z) zeigen dagegen eine Erhöhung der Crossoverereignisse in 21B4-21E2.

Mit der Etablierung einer neuen Kartierungsmethode zur effizienten Identifizierung neuer PEV-Faktoren wurde der Locus von Su(var)2-8 in 21E2 kartiert. Außerdem kodiert CG17258 offenbar für Su(var)2-12 und bei Su(var)2-13 handelt es sich um ein besonderes Allel von Su(var)2-1. Durch den Sequenzvergleich von  $Su(var)3-4^{01}$  und  $Su(var)3-4^{04}$  konnte erstmals Kandidatengene für Su(var)3-4 ermittelt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adamietz P und Rudolph A (1984) ADP-ribosylation of nuclear proteins in vivo. Identification of histone H2B as a major acceptor for mono- and poly(ADP-ribose) in dimethyl sulfate-treated hepatoma AH 7974 cells. *J Biol Chem* **259(11)**: 6841-6.
- Adams et al. (2000) The Genome Sequence of Drosophila melanogaster. *Science* **287**: 2185-2195.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-94.
- Apelt C (2005) Genetische Analyse neuer Chromatingene von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ashburner M (1989) *Drosophila*: A Laboratory Handbook. *Cold Spring Habor Laboratory Press*.
- Baker WK (1958) Crossing over in heterochromatin. Am. Nat. 92: 59-60.
- Baker BS und Carpenter ATC (1972) Genetic analysis of sex chromosomal meiotic mutants in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **71**: 255–86.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129(4): 823-37.
- Baudat F und Nicolas A (1997) Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94(10)**: 5213-8.
- Baudat F, Buard J, Grey C, Fledel-Alon A, Ober C, Przeworski M, Coop G, de Massy B (2010) PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* **327(5967)**: 836-40.
- Berg IL, Neumann R, Lam KW, Sarbajna S, Odenthal-Hesse L, May CA, Jeffreys AJ (2010) PRDM9 variation strongly influences recombination hot-spot activity and meiotic instability in humans. *Nat Genet* 42(10): 859-63.
- Blumenstiel JP, Noll AC, Griffiths JA, Perera AG, Walton KN, Gilliland WD, Hawley RS, Staehling-Hampton K (2009) Identification of EMS-induced mutations in Drosophila melanogaster by whole-genome sequencing. *Genetics* 182(1): 25-32.
- Börner K (2010) Charakterisierung von Multiproteinkomplexen und kovalenten Modifizierungen der Histondemethylase dLSD1. Diplomarbeit,
  - Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.

- Brand AH und Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415.
- Bridges CB (1927) The relation of age of the female to crossing over in the third chromosome of Drosophila melanogaster. *J.Gen.Physiol.* **8**: 689-700.
- Capili AD und Lima CD (2007) Structure and analysis of a complex between SUMO and Ubc9 illustrates features of a conserved E2-Ubl interaction. *J. Mol. Biol.* **369(3)**: 608-18.
- Carpenter ATC (1975) Electron microscopy of meiosis in Drosophila melanogaster females. I. Structure, arrangement, and temporal change of synaptonemal complex in wild- type. *Chromosoma* **51**: 157-82.
- Carpenter ATC (1979) Synaptonemal complex and recombination nodules in wild-type Drosophila melanogaster females. *Genetics* **92**: 511-41.
- Carpenter ATC und Baker BS (1982) On the control of distribution ofmeiotic exchange in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **101**: 81-89.
- Chávez VM, Marqués G, Delbecque JP, Kobayashi K, Hollingsworth M, Burr J, Natzle JE, O'Connor MB (2000) The *Drosophila disembodied* gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development* 127: 4115-4126.
- Cirulli ET, Kliman RM, Noor MA (2007) Fine-scale crossover rate heterogeneity in Drosophila pseudoobscura. *J Mol Evol.* **64(1)**: 129-35.
- Clough E, Moon W, Wang S, Smith K, Hazelrigg T (2007) Histone methylation is required for oogenesis in *Drosophila*. *Development* **134**: 157-165.
- Cooper JL, Greene EA, Till BJ, Codomo CA, Wakimoto BT, Henikoff S (2008) Retention of induced mutations in a Drosophila reverse-genetic resource. *Genetics* **180(1)**: 661-7.
- Czermin B, Schotta G, Hülsmann BB, Brehm A, Becker PB, Reuter G, Imhof A (2001) Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila. *EMBO Rep.* **2(10)**: 915-9.
- Davie JR und Murphy LC (1990) Level of ubiquitinated histone H2B in chromatin is coupled to ongoing transcription. *Biochemistry* **29(20)**: 4752-7.
- Deng W und Lin H (2001) Asymetric germ cell division and oocyte determination during Drosophila oogenesis. *Int Rev Cytol* **203**: 93-138.

- Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oppel S, Scheiblauer S et al. (2007) A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in Drosophila. *Nature* **448**: 151–156.
- Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM (1998) Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* **94**: 387-98.
- Dorn R, Heymann S, Lindigkeit R, Reuter G (1986) Suppressor mutations of positioneffect variegation affecting chromatin properties. *Chromosoma* **93**: 398-403.
- Dorn R, Szidonya J, Korge G, Sehnert M, Taubert H, Archoukieh E, Tschiersch B, Morawietz H, Wustmann G, Hoffmann G, Reuter G (1993) *P* transposon-induced dominant enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 133(2): 279-90.
- Duan X, Trent JO, Ye H (2009) Targeting the SUMO E2 Conjugating Enzyme Ubc9 Interaction for Anti-Cancer Drug Design. *Anticancer Agents Med Chem.* **9(1)**: 51-4.
- Duda DM, van Waardenburg RC, Borg LA, McGarity S, Nourse A, Waddell MB, Bjornsti MA, Schulman BA (2007) Structure of a SUMO-binding-motif mimic bound to Smt3p-Ubc9p: conservation of a non-covalent ubiquitin-like protein-E2 complex as a platform for selective interactions within a SUMO pathway. *J. Mol.Biol.* **369(3)**: 619-30.
- Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T, Reuter G (2004) *Su(var)* genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**: 2973-2983.
- Ebert A, Lein S, Schotta, G, Reuter G (2006) Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromos. Res.* **14**: 377-392.
- Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87(24)**: 9923-7.
- Eissenberg JC, Morris GD, Reuter G, Hartnett T (1992) The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in Drosophila with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics* **131**: 345-352.
- Ejsmont RK, Sarov M, Winkler S, Lipinski KA, Tomancak P (2009) A toolkit for highthroughput, cross-species gene engineering in Drosophila. *Nature Methods* 6(6): 435-7.

- Gatti M und Pimpinelli S (1992) Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu Rev Genet.* **26**: 239-275.
- Geiss-Friedlander R und Melchior F (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. Nat Rev *Mol Cell Biol* **8**: 947–956.
- Gerton JL, DeRisi J, Shroff R, Lichten M, Brown PO, Petes TD (2000) Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97(21)**: 11383-90.
- Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT (2002) Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu Rev Entomol.* **47**: 883-916.
- Gill G (2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev.* **18(17)**: 2046-59.
- Gilliland WD, Hughes SF, Vietti DR, Hawley RS (2009) Congression of achiasmate chromosomes to the metaphase plate in Drosophila melanogaster oocytes. *Dev Biol.* 325(1): 122-8.
- Giraud MF, Desterro JM, Naismith JH (1998) Structure of ubiquitinconjugating enzyme 9 displays significant differences with other ubiquitin-conjugating enzymes which may reflect its specificity for sumo rather than ubiquitin. *Acta Crystallogr.* **54(Pt 5)**: 891-8.
- Golic KG und Golic MM (1996) Engineering the Drosophila genome: chromosome rearrangements by design. *Genetics* 144(4): 1693-711.
- Gowen MS und Gowen JW (1922) Complete linkage in *Drosophila melanogaster*. *Amer. Naturalist* **61**: 286-288.
- Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004) Construction of transgenic Drosophila by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics* **166**: 1775-1782.
- Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389(6649)**: 349-52.
- Hamel S, Fantini J, Schweisguth F (2010) Notch ligand activity is modulated by glycosphingolipid membrane composition in *Drosophila melanogaster*. J. Cell Biol. 188(4): 581-594.
- Hari KL, Cook KR, Karpen GH (2001) The *Drosophila Su(var)2-10* locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev.* **15(11)**: 1334-48.
- Hashiyama K, Shigenobu S, Kobayashi S (2009) Expression of genes involved in sumoylation in the Drosophila germline. *Gene Expr Patterns*. **9(1)**: 50-3.

- Hawley RS (1988) Exchange and chromosomal segregation in eucaryotes. *Genetic recombination*, ed. R Kucherlapati, G Smith, pp. 497-527.
- Henikoff S, Ahmad K, Platero JS, van Steensel B (2000) Heterochromatic deposition of centromeric histone –like proteins. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* **97**: 716-721.
- Hernández-Hernández A, Ortiz R, Ubaldo E, Martínez OM, Vázquez-Nin GH, Recillas-Targa F (2010) Synaptonemal complex stability depends on repressive histone marks of the lateral element-associated repeat sequences. *Chromosoma* **119(1)**: 41-58.
- Hernández-Hernández A, Rincón-Arano H, Recillas-Targa F, Ortiz R, Valdes-Quezada C, Echeverría OM, Benavente R, Vázquez-Nin GH (2008) Differential distribution and association of repeat DNA sequences in the lateral element of the synaptonemal complex in rat spermatocytes. *Chromosoma* **117(1)**: 77-87.
- Herold N, Will CL, Wolf E, Kastner B, Urlaub H, Lührmann R (2009) Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of Drosophila melanogaster and human spliceosomal complexes. *Mol Cell Biol.* 29(1): 281-301.
- Hey J (2004) What's so hot about recombination hotspots? Plos Biol 2: e190.
- Hijazi A, Haenlin M, Waltzer L, Roch F (2011) The Ly6 protein coiled is required for septate junction and blood brain barrier organisation in *Drosophila*. *PLoS One*. 6(3): e17763.
- Huang AM, Rehm EJ, Rubin GM (2000) Drosophila Protocols, Kap. Recovery of DNA Sequences Flanking P-element insertions: Inverse PCR and Plasmid Rescue, Seiten 429-447. Cold Spring Harbor Lab Press.
- James TC und Elgin SC (1986) Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in Drosophila melanogaster and its gene. *Mol Cell Biol.* **6(11)**: 3862-72.
- Jang JK, Sherizen DE, Bhagat R, Manheim EA, McKim KS (2003) Relationship of DNA double-strand breaks to synapsis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **116**: 3069–3077.
- Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R (2001) Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat Genet* **29**: 217–222.
- Jeffress JK, Page SL, Royer SM, Belden ED, Blumenstiel JP, Anderson LK and Hawley RS (2007) The formation of the central element of the synaptonemal complex may occur by multiple mechanisms: The roles of the N- and C-terminal domains of the *Drosophila C(3)G* protein in mediating synapsis and recombination. *Genetics* **177**: 2445-2456.
- Jenuwein T und Allis CD (2001)Translating the Histone Code. Science 293: 1074-1080.

- Joanisse DR, Inaguma Y, Tanguay RM (1998) Cloning and developmental expression of a nuclear ubiquitin-conjugating enzyme (DmUbc9) that interacts with small heat shock proteins in Drosophila melanogaster. *Biochem Biophys Res Commun.* **244(1)**: 102-9.
- Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. Annu Rev Biochem. 73: 355-82.
- Jones RS und Gelbart WM (1993) The Drosophila Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol.* 13(10): 6357-66.
- Joyce EF, Pedersen M, Tiong S, White-Brown SK, Paul A, Campbell SD, McKim KS (2011) *Drosophila* ATM and ATR have distinct activities in the regulation of meiotic DNA damage and repair *J. Cell Biol.* **195(3)**: 359-367.
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88: 375-384.
- Khetani RS, Bickel SE (2007) Regulation of meiotic cohesion and chromosome core morphogenesis during pachytene in *Drosophila* oocytes. *J Cell Sci.* **120 (Pt17)**: 3123-37.
- Kim AJ, Cha GH, Kim K, Gilbert LI, Lee CC (1997) Purification and characterization of the prothoracicotropic hormone of Drosophila melanogaster. *Proc Natl Acad Sci* USA. 194(4): 1130-5.
- King RC, Rubinson AC, Smith RF (1956) Oogenesis in adult *Drosophila melanogaster*. *Growth* **20**: 121-157.
- King RC (1970) Ovarian development in Drosophila melanogaster. Academic Press
- Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, Nasmyth K (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**: 91-103.
- Knipscheer P, van Dijk WJ, Olsen JV, Mann M, Sixma TK (2007) Noncovalent interaction between Ubc9 and SUMO promotes SUMO chain formation. *EMBO J*. 26(11): 2797-807.
- Koch CM, Honemann-Capito M, Egger-Adam D, Wodarz A (2009) Windei, the Drosophila homolog of mAM/MCAF1, is an essential cofactor of the H3K9 methyl transferase dSETDB1/Eggless in germ line development. *PLoS Genet.* 5(9): e1000644.

- Kornberg RD (1974) Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**: 868-871.
- Kraft B, Johswich A, Kauczor G, Scharenberg M, Gerardy-Schahn R, Bakker H (2011)
  "Add-on" domains of *Drosophila* β1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase B in the stem region and its pilot protein. *Cell. Molec. Life Sci.* 68(24): 4091-4100.
- Krauss V und Reuter G (2000) Two genes become one: the genes encoding heterochromatin protein Su(var)3-9 and translation initiation factor subunit eIF-2gamma are joined to a dicistronic unit in holometabolic insects. *Genetics* **156(3)**: 1157-67.
- Kröhnert U (2011) Kartierung und molekulargenetische Analyse eines neuen *Su(var)*-Gens von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Lachner, M., O'Caroll, D., Rea, S., Mechtler, K. und Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**: 116-120.
- Lake CM, Nielsen RJ, Hawley RS (2011) The Drosophila zinc finger protein trade embargo is required for double strand break formation in meiosis. *PLoS Genet.* **7(2)**: e1002005.
- Larsson J, Chen JD, Rasheva V, Rasmuson-Lestander A, Pirrotta V (2001) Painting of fourth, a chromosome-specific protein in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6273–6278.
- Lasko P (2000) The *Drosophila melanogaster* genome: translation factors and RNA binding proteins. *J. Cell Biol.* **150(2)**: F51-F56.
- Lee JY und Orr-Weaver TL (2001) The molecular basis of sister-chromatid cohesion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**: 753-777.
- Lee KS, Yoon J, Park JS, Kang YK (2009) Drosophila G9a is implicated in germ cell development. *Insect Mol Biol.* **19(1)**: 131-9.
- Lein S (2011) Differentielle Kontrolle von Histon-Methylierung und Demethylierung bei der Etablierung des heterochromatischen *Gensilencings* in *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Liebich HM, Gesele E, Wirth C, Wöll J, Jobst K, Lakatos A. (1993) Non-enzymatic glycation of histones. *Biol Mass Spectrom* **22(2)**: 121-3.
- Liu H, Jang JK, Kato N, McKim KS (2002) mei-P22 encodes a chromosome-associated protein required for the initiation of meiotic recombination in Drosophila melanogaster. *Genetics* **162(1)**: 245-58.

- Locke J, Kotarski MA, Tartof KD (1988) Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* **120(1)**: 181-98.
- Lohe AR, Hilliker AJ und Roberts PA (1993) Mapping simple repeated DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**: 1149-1174.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 A resolution. *Nature* **389(6648)**: 251-60.
- MacQueen AJ, Colaiacovo MP, McDonald K, Villeneuve AM (2002) Synapsisdependent and -independent mechanisms stabilize homolog pairing during meiotic prophase in *C. elegans. Genes Dev.* **16**: 2428-42.
- Madigan JP, Chotkowski HL, Glaser RL (2002) DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. *Nucleic Acids Res.* **30**: 3698-3705.
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodríguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS (2001) Recombinational DNA doublestrand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet.* (3): 271-6.
- Markstein M, Pitsouli C, Villalta C, Celniker S und Perrimon N (2008) Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nature Genetics.* **135**: 1439-1449.
- Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T (2005) The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J.* **24(4)**: 800-12.
- Mather K (1939) Crossing over and heterochromatin in the X chromosome of *Drosophila melanogaster. Genetics* 24: 413-435.
- Mc Brayer Z, Ono H, McBrayer, H. Ono, M. Shimell, J. Parvy, R. Beckstead, J. Warren, C. Thummel, C. Dauphinvillemant, L. Gilbert, M. Oconnor (2007) Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in Drosophila. *Dev. Cell* **13(6)**: 857-71.
- McKim KS und Hayashi-Hagihara A (1998) *mei-W68* in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes Dev.* **12**: 2932-42.
- McKim KS, Jang JK, Manheim EA (2002) Meiotic recombination and chromosome segregation in Drosophila females. *Annu Rev Genet.* **36**: 205-32.

- Mehrotra S und McKim KS (2006) Temporal analysis of meiotic DNA doublestrand break formation and repair in *Drosophila* females. *PLoS Genet.* **2**: e200.
- Meuwissen RL, Offenberg HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M et al., (1992) A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* **11**: 5091-5100.
- Meyer GF (1964) A possible correlation between the submicroscopic structure of meiotic chromosomes and crossing over. In *Proceedings of the 3rd European regional conference on electron microscopy* (ed. M. Titlbach), pp. 461–462. Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia.
- Mis J, Ner SS, Grigliatti TA (2006) Identification of three histone methyltransferases in Drosophila: dG9a is a suppressor of PEV and is required for gene silencing. *Mol Genet Genomics* **275**: 513-526.
- Morgan TH (1914) No crossing over in the male of Drosophila of the genes in the second and third pairs of chromosomes. *Biol.Bull. Wood's Hole* **26**: 195-204.
- Mottus, R., Sobel, R.E. und Grigliatti, T.A. (2000). Mutational analysis of a histone deacetylase in *Drosophila melanogaster*: missense mutations suppress gene silencing associated with position effect variegation. *Genetics* **154(2)**: 657-68.
- Muller HJ (1930) Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet* **22**: 299-334.
- Muller P, Kuttenkeuler D, Gesellchen V, Zeidler MP, Boutros M (2005) Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* 436(7052): 871-875.
- Mummery-Widmer JL, Yamazaki M, Stoeger T, Novatchkova M, Bhalerao S, Chen D, Dietzl G, Dickson BJ, Knoblich JA (2009) Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* 458: 987-92.
- Mukai M, Kitadate Y, Arita K, Shigenobu S, Kobayashi S (2006) Expression of meiotic genes in the germline progenitors of Drosophila embryos. *Gene Expr Patterns* 6(3): 256-66.
- Myers S, Freeman C, Auton A, Donnelly P, McVean G (2008) A common sequence motif associated with recombination hot spots and genome instability in humans. *Nat Genet.* **40(9)**: 1124-9.
- Myers S, Bowden R, Tumian A, Bontrop RE, Freeman C, MacFie TS, McVean G, Donnelly P (2010) Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science* **327(5967)**: 876-9.

- Nasmyth K (2002) Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* **297**: 559-565.
- Nathan D, Sterner DE, Berger SL (2003) Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100(23)**: 13118-20.
- Ni JQ, Markstein M, Binari R, Pfeiffer B, Liu LP, Villalta C, Booker M, Perkins L A, Perrimon N (2008) Vector and Parameters for Targeted Transgenic RNAi in Drosophila melanogaster. *Nature Methods* 5: 49-51.
- Ni JQ, Liu LP, Binari R, Hardy R, Shim HS, Cavallaro A, Booker M, Pfeiffer B, Markstein M, Wang H, Villalta C, Laverty T, Perkins L, Perrimon N (2009) A Drosophila Resource of Transgenic RNAi Lines for Neurogenetics. *Genetics*. 182(4): 1089-100.
- Ni JQ, Zhou R, Czech B, Liu LP, Holderbaum L, Yang-Zhou D, Shim HS, Tao R, Handler D, Karpowicz P, Binari R, Booker M, Brennecke J, Perkins LA, Hannon GJ, Perrimon N (2011) A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat Methods*. 8(5): 405-7.
- Nowak SJ und Corces VG (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet.* (4): 214-20.
- Page SL und Hawley RS (2001) *c*(*3*)*G* encodes a *Drosophila* synaptonemal complex protein. *Genes Dev.* **15**: 3130-3143.
- Page SL und Hawley RS (2004) The genetic and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**: 525–58.
- Page SL, Khetani RS, Lake CM, Nielsen RJ, Jeffress JK, Warren WD, Bickel SE, Hawley RS (2008) Corona Is Required for Higher-Order Assembly of Transverse Filaments into Full-Length Synaptonemal Complex in Drosophila Oocytes *PLoS Genet.* 4(9): e1000194.
- Paigen K und Petkov P (2010) Mammalian recombination hot spots: properties, control and evolution. *Nat Rev Genet.* **11(3)**: 221-33.
- Perez-Burgos L, Peters AH, Opravil S, Kauer M, Mechtler K, Jenuwein T (2004) Generation and characterization of methyl-lysine histone antibodies. *Methods Enzymol.* **376**: 234-54.
- Perrimon N, Ni JQ, Perkins L (2010) In vivo RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2(8)**: a003640.

- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Moll Cell* 12: 1577-1589.
- Petronczki M, Siomos MF und Nasmyth K (2003) Un Menage a Quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* **112**: 423-440.
- Phalke S, Nickel O, Walluscheck D, Hortig F, Onorati MC, Reuter G (2009) Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of Drosophila depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet.* **41(6)**: 696-702.
- Plough HH (1917) The effect of temperature on crossingover in *Drosophila*. J. of *Experimental Zoölogy* 24: 148-209.
- Ptak SE, Hinds DA, Koehler K, Nickel B, Patil N, Ballinger DG, Przeworski M, Frazer KA, Pääbo S (2005) Fine-scale recombination patterns differ between chimpanzees and humans. *Nat Genet.* **37(4)**: 429-34.
- Rasmussen SW (1975) Ultrastructural studies of meiosis in males and females of the  $c(3)G^{17}$  mutant of *Drosphila melanogaster* Meigen. *Compt.Rend.Trav.Lab.Carlsberg* **40**: 163-173.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Stahl BD et al. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599.
- Reo E, Seum C, Spierer P und Bontron S (2010) Sumoylation of Drosophila SU(VAR)3-7 is required for its heterochromatic function. *Nucleic Acids Research*, 38(13): 4254-62.
- Reuter G und Wolff I (1981) Isolation of Dominant Suppressor Mutations for Position-Effect Variegation in Drosophila melanogaster. *Mol. Gen Genet*, **182**: 516-519.
- Reuter G, Werner W, Hoffmann HJ (1982a) Mutants affecting Position-Effect Heterochromatinization in Drosophila melanogaster. *Chromosoma* **85**: 539-551.
- Reuter G, Dorn R, Hoffmann HJ (1982b) Butyrate sensitive suppressor of positioneffect variegation mutations in Drosophila melanogaster. *Mol. Gen. Genet.* **188**: 480-485.
- Reuter G (1984) Zur Genetik der Positionseffekt-Variegation bei Drosophila melanogaster. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Reuter G, Dorn R, Wustmann G, Friede B, Rauh G (1986) Third Chromosome suppressor of position-effect varieagtion loci in Drosophila melanogaster. *Mol Gen Genet* **202**: 481-487.

- Reuter G, Giarre N, Farah J, Gausz J, Spierer A, Spierer P (1990) Dependence of position-effect variegation in Drosophila on dose of a gene encoding an unusual zincfinger protein. *Nature* 344: 219-223.
- Reuter G und Spierer P (1992) Position effect variegation and chromatin Proteins. *BioEssays* 14: 605-612.
- Revenkova E und Jessberger R (2006). Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma* **115**: 235-240.
- Rewitz KF, Yamanaka N, Gilbert LI, O'Connor MB (2009) The insect neuropeptide PTTH activates receptor tyrosine kinase torso to initiate metamorphosis. *Science* 326(5958): 1403-5.
- Roberts PA (1965) Difference in the behavior of eu- and heterochromatin: crossing over. *Nature* **205**: 725-726.
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD (2003) Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell* 12: 1591-1598.
- Royet J, Bouwmeester T, Cohen SM (1998) Notchless encodes a novel WD40-repeatcontaining protein that modulates Notch signaling activity. *EMBO J*. **17(24)**: 7351-60.
- Rubin GM und Spradling AC (1982) Genetic transformation of Drosophila melanogaster with transposable element vectors. *Science*, **218**: 348-353.
- Rudolph T, Yonezawa M, Lein S, Heidrich K, Kubicek S, Schäfer C, Phalke S, Walther M, Schmidt A, Jenuwein T, Reuter G (2007) Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol. Cell* 26(1): 103-115.
- Ryder E, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Drummond J, Webster J, Johnson G, Morley T, Chan YS, Blows F, Coulson D, Reuter G, Baisch H, Apelt C, Kauk A, Rudolph T, Kube M, Klimm M, Nickel C, Szidonya J, Maróy P, Pal M, Rasmuson-Lestander A, Ekström K, Stocker H, Hugentobler C, Hafen E, Gubb D, Pflugfelder G, Dorner C, Mechler B, Schenkel H, Marhold J, Serras F, Corominas M, Punset A, Roote J, Russell S (2007) The DrosDel deletion collection: a Drosophila genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics* 177(1): 615-29.
- Ryder E, Blows F, Ashburner M, Bautista-Llacer R, Coulson D, Drummond J, Webster J, Gubb D, Gunton N, Johnson G, O'Kane CJ, Huen D, Sharma P, Asztalos Z, Baisch H, Schulze J, Kube M, Kittlaus K, Reuter G, Maroy P, Szidonya J, Rasmuson-Lestander A, Ekström K, Dickson B, Hugentobler C, Stocker H, Hafen E, Lepesant

JA, Pflugfelder G, Heisenberg M, Mechler B, Serras F, Corominas M, Schneuwly S, Preat T, Roote J, Russell S (2004) The DrosDel collection: a set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in Drosophila melanogaster. *Genetics* **167(2)**: 797-813.

- Saiki RK, Gelfrand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis K und Erlich HA (1988) Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-489.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989) Molecular Cloning- A laboratory manual, Second Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Sandler L, Lindsley DL, Nicoletti B, Trippa G. (1968) Mutants affecting meiosis in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **60**: 525–58.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Schleiffer A, Kaitna S, Maurer-Stroh S, Glotzer M, Nasmyth K, Eisenhaber F (2003)
  Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners. *Mol. Cell* 11: 571-575.
- Schotta G und Reuter G (2000) Controlled expression of tagged proteins in Drosophila using a new modular P-element vector system. *Mol Gen Genet*, **262(6)**: 916-920.
- Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, Jenuwein T, Dorn R, Reuter G (2002) Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J* 21(5): 1121-31.
- Schotta G, Ebert A, Reuter G (2003) SU(VAR)3-9 a conserved key function in heterochromatic gene silencing. *Genetica* **117**: 149-158.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* 18(11): 1251-62.
- Sekelsky JJ, McKim KS, Messina L, French RL, Hurley WD, et al. (1999) Identification of novel Drosophila meiotic genes recovered in a P-element screen. *Genetics* 152: 529-42.
- Seum C, Reo E, Peng H, Rauscher FJ, Spierer P, Bontron S (2007a) Drosophila SETDB1 Is Required for Chromosome 4 Silencing. *PLoS Genet* **3**: e76.
- Seum C, Bontron S, Reo E, Delattre M, Spierer P (2007b) Drosophila G9a is a nonessential gene. *Genetics* 177: 1955-1957.

- Shearn A und Garen A (1974) Genetic control of imaginal disc development in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71(4)**: 1393-7.
- Shearn A, Hersperger G, Hersperger E (1978) Genetic analysis of two allelic temperature-sensitive mutants of Drosophila melanogaster both of which are zygotic and maternal-effect lethals. *Genetics* **89**: 341-353.
- Shintomi K und Hirano T (2007) How are cohesin rings opened and closed? *Trends Biochem Sci.* **32**: 154-157.
- Siegmund T und Korge G (2001) Innervation of the ring gland of Drosophila melanogaster. *J Comp Neurol.* **431(4)**: 481-91.
- Smith PA und King RC (1968) Genetic control of synaptonemal complexes in *Drosophila melanogaster. Genetics* **60**: 335–351.
- Spradling AC et al. (1995) Gene disruptions using *P* transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10824-10830.
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26: 31-43.
- Stabell M, Eskeland R, Bjorkmo M, Larsson J, Aalen RB (2006) The Drosophila G9a gene encodes a multi-catalytic histone methyltransferase required for normal development. *Nucleic Acids Res* **34**: 4609-4621.
- Stack SM und Anderson LK (2001) A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosome Res.* **9**: 175-198.
- Strahl BD und Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
- Sym M, Engebrecht J, Roeder GS (1993) ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* **72**: 365-378.
- Szauter P (1984) An analysis of regional constraints on exchange in Drosophila melanogaster using recombination-defective meiotic mutants. *Genetics* **106(1)**: 45-71.
- Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y (2001) Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem.* 276(27): 25309-17.
- Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant

role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* **16(14)**: 1779-91.

- Tartof KD, Hobbs C, Jones M (1984) A structural basis for variegating position effects. *Cell* **37(3)**: 869-78.
- Theurkauf WE und Hawley RS (1992) Meiotic spindle assembly in Drosophila females: behavior of nonexchange chromosomes and the effects of mutations in the nod kinesin-like protein. *J Cell Biol*, **116(5)**: 1167-1180.
- Thoma F, Koller T, Klug A (1979) Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent super-structure of chromatin. *J.Cell Biol*, **83**: 403-427.
- Tong H, Hateboer G, Perrakis A, Bernards R, Sixma TK (1997) Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system. J. Biol. Chem. 272(34): 21381-7.
- Tschiersch B, Hofmann A, Krauss V, Dorn R, Korge G, et al. (1994) The protein encoded by the Drosophila position-effect variegation suppressor gene Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J* **13**: 3822–3831.
- Tzeng TY, Lee CH, Chan LW, Shen CK (2007) Epigenetic regulation of the Drosophila chromosome 4 by the histone H3K9 methyltransferase dSETDB1. *Proc Natl Acad Sci* USA 104: 12691–12696.
- Tsui MM, Seeds A, York J (2008) A Role for Ipk2 Kinase Activity in Regulating Cell Proliferation and Apoptosis of Imaginal Disc Tissue During Drosophila Melanogaster Development. A. Dros. Res. Conf. 49: 354C.
- Vazquez J, Belmont AS, Sedat JW (2002) The dynamics of homologous chromosome pairing during male *Drosophila* meiosis. *Curr.Biol.* **12**: 1473-83.
- Viera A, Parra MT, Page J, Santos JL, Rufas JS, Suja JA (2003) Dynamic relocation of telomere complexes in mouse meiotic chromosomes. *Chromosome Res.* 11(8): 797-807.
- Virbasius CA, Virbasius JV, Scarpulla RC (1993) NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev.* **7(12A)**: 2431-45.
- Walker MY und Hawley RS (2000) Hanging on to your homolog: The roles of pairing, synapsis and recombination in the maintenance of homolog adhesion. *Chromosoma* **109**: 3–9.

- Walther M (2003) Molekulare Analyse von SU(VAR)3-98B und des interagierenden SU(VAR)2-1-Proteins von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Warren JT, Wismar J, Subrahmanyam B, Gilbert LI (2001) *Woc (without children)* gene control of ecdysone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Endocrinol* 181: 1-14.
- Weißbach J (2011) SNP-Kartierung und molekulare Analyse neuer Su(var)-Gene bei Drosophila melanogaster. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Westphal T (1999) Chromatinstruktur und die Kontrolle von meiotischem Crossover bei *Drosophila*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Westphal T und Reuter (2002) Recombinogenic Effects of Suppressors of Position-Effect Variegation in *Drosophila*. *Genetics* **160**: 609-621.
- Wondrak GT, Cervantes-Laurean D, Jacobson EL, Jacobson MK (2000) Histone carbonylation in vivo and in vitro. *Biochem J* **351** Pt **3**: 769-77.
- Wu TC und Lichten M (1994) Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* **263**: 515-518.
- Wustmann G, Szidonya J, Taubert H, Reuter G (1989) The genetic of position-effect variegation modifying loci in Drosophila melanogaster. *Mol Gen Genet* **217**: 520-527.
- Yoon J, Lee KS, Park JS (2008) dSETDB1 and SU(VAR)3–9 Sequentially function during Germline-Stem Cell Differentiation in *Drosophila melanogaster PLoS One*. 3(5): e2234.

# 7.Anhang

# 7.1 Primerliste

Allgemeine Primer:

AR-Primer	5`-TAT TTA GGT GAC ACT ATA G -3`
T7-Primer	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG -3'
pGEM-T forw	5'-GCG AAT TGG GCC CGA CGT CGC ATG CTC -3'
pGEM-T back	5`-GTG AGC GAG GAA GCG GAA GAG CGC CC -3`
rp49 forw	5'-TGT CCT TCC AGC TTC AAG ATG ACC ATC -3'
rp49 reverse	5'-CTT GGG CTT GCG CCA TTT GTG -3'
5`P_rev2	5'- CAC ACA ACC TTT CCT CTC AAC -3'
3`P_F2	5'- GCA TAC GTT AAG TGG ATG TCT -3'

Primer zum Nachweis von *RSw*<sup>+</sup>-Elementen:

5-SZ-3548_F	5`- AGT GCT TGT GCT TTG TCC GAC GTT C -3`
5-SZ-3596_F	5`- GGA TAC GCA CAG AAC CCA CTG -3`
$CB-5483-3_F$	5`- TCC GTA ACA CGA AGA GCG CC -3`
$CB-5083-3_F$	5`- CGC ACC GTT TGG CTT TAT TGG -3`
$5 \rightarrow 3^{\circ} \rightarrow 5^{\circ} \rightarrow 3^{\circ}$	5'- CTC GTC GCA TTC CCT GTT TCC -3'
$\begin{array}{c} CB-0403-5\_F\\ \hline \hline$	5`- GTT TTG CAA CAC TCA CGA CGC -3`
5-⊓A-1917_F 	5`- CAC ACA GGA CCT TCC TCA AGG AG -3`
5-52-5215_1 5-HA-1695_F	5`- GAG GAA AGT TCC CCG AAG AGC C -3`
5-HA-1514	5'- CAC ACA GGA CCT TCC TCA AGG AG -3'
5-HA-1872	5'- TGA CAA CAA CTT GAG TGT GCG AAG -3'
5-HA-1142 F	5'-GAC GCT GCT CTG GTC TTG AAT G -3'
5-HA-1257 F	5`- GGT GGA GAA GAG CGA CAG AG -3`
5-HA-5061 F	5`- AGA TGT TTG CGT CAG CTG TG -3`
3 - 5 → 3 CB-6694-3 F	5`- GAG AGC GCA CAT TTT ATC GCA C -3`
	5'- GGT GGC CTG CAA GCG AAT ATC -3'
	5`- TTG GCC ATC GAC TGA CGT CC -3`

Primer für hochauf	lösende SNP-Crossoverkartierung:
SNP1_F	5'- TTT AAT GGG CCG AGG GAC AGT C -3'
SNP1_R	5'- ATG CGA TGC GGT TTC ATT GC -3'
SNP2_F	5'- CGT GTG TGT TTC TCC GGT TGT C -3'
SNP2_R	5'- CCA AGT GCT TGT CAA ACT GCG -3'
SNP3_F	5`- CGG AGA GCG TCG CAT TGT TTA C -3`
SNP3_R	5'- AGC GAA ATA ATG GCG GAG CTG -3'
SNP4_F	5`- GCC GTC ACC AAA GTG GGC TTA G -3`
SNP4_R	5'- GAA GTA GTC CAG CTC CAG AGT CG -3'
SNP5_F	5'- GAG CGA AGG CGA ACC GTT GC -3'
SNP5_R	5'- GGC AAT GCT CCC CGT CAA CTG -3'
SNP6_F	5'- TGG GTG AAG TAC CGA AAT ACC ACT G -3'
SNP6_R	5'- TCA TGT GCA GGG CGT TCT CCA TTA G -3'
SNP7_F	5`- CAA CTG GAG AGC TTT CGT GTC G -3`
SNP7_R	5'- GTG CAT TTG TTC GTT GAG GC -3'
SNP8_F	5'- TCG TGT GGC TTT TGT GGA TCG -3`
SNP8_R	5`- ACG GGA TCC CAA GCA GAC CAA C -3`
SNP9_F	5'- CAG AGC TAT CAG CAC TTG GCA TC -3'
SNP9_R	5'- TCA TCT CCG CGA GGT GCA TTT G -3'
SNP10_F	5`- CTT CGA CGT AGT GCA ATC AG -3`
SNP10_R	5'- CTG TGG ACG CAT ATG GTC GGA TC -3'
SNP11_F	5'- GCT TTA GGA GCA TCC TCA AGA C -3'
SNP11_R	5'- AGT GCA CCG CCA ACA ACA AAG C -3'
SNP12_F	5'- GAT TTG AGT GCT GCC AGA TTA G -3'
SNP12_R	5'- GCT TAT TAT TTA AGT AAC ATG AC -3'
SNP13_F	5'- GCT GTG CTG TCC AAT CCA ATC -3'
SNP13_R	5'- CGA TGT CTA TGT AGG TGA CCA C -3'
SNP14_F	5'- GTT AAG AGT AGC GCC GTA TTC -3'
SNP14_R	5'- GTG AGT TCA AGT GAC CGA CGT C -3'
SNP15_F	5'- CGG TAC GAG TTG GAC TAC ACG C -3'
SNP15_R	5'- GTT CGG TCT CCA GAG CCT GAT AG -3'
SNP16_F	5'- CAT CAT GCT CGA TCT GTG CCT G -3'
SNP16_R	5'- CAG CTG TGC ATG TCC AAC CTT G -3'
SNP17_F	5'- TCC TTG ACT ACG AGC ACG GGT AC -3'
SNP17_R	5'- CCT TAC CTC TGT CGG GCC TTT C -3'
SNP18_F	5'- GGG AGG TGA AGT AAG TCA AAC CG -3'
SNP18_R	5'- GAA GCT TTC ACA CCT GCC ACT C -3'
SNP19_F	5'- CGG TTC TTG AAC CAC ACC TGG -3'
SNP19_R	5'- CTA AAG TAC GCC CTT CTG CTC CTC -3'
SNP20_F	5'- CTT CCT TGG TGA CCT CTC AAT TTG -3'
SNP20_R	5'- CAC TAC CCA GAT GTG GTG CTC C -3'

SNP21_F	5'- GCA GCG TGC ATG TAG TTT GGA TAG -3'
SNP21_R	5'- CTG CAT CTG GGT CAC TTG GC -3'
SNP22_F	5'- GAA CCC TTC TTG TCC GCT CG -3'
SNP22_R	5'- CAA GCT CCC AAC GTC TGC AAG -3'
SNP23_F	5'- CAA TCC AGG TGG CTT CGT CG -3'
SNP23_R	5'- GGC AAC AAG GGA AGG GAA GAA C -3'
SNP24_F	5'- GCC GCAT ACC AAA CAC TCC AAG -3'
SNP24_R	5'- TGC GAT TCT CCA ATG TGG CTG -3'
SNP25_F	5'- ACG CCT CCT GAT TCT GCT TCT G -3'
SNP25_R	5'- ATC GGC GAA GGA ACT TGC AAC -3'
SNP26_F	5'- CGC AAC CGC ACA AAT GTC TTT C -3'
SNP26_R	5'- GGG TGG CAA CAC TTC GGT TCA C -3'
SNP27_F	5'- GGG TCC TGG CCA TCT CAT AAC C -3'
SNP27_R	5'- TGG CTG GCC CAC AAA GCT AAC -3'
SNP28_F	5'- TTC TTC GAG TGT CGG TGT TCG G -3'
SNP28_R	5'- ACC AGC AAC AAC GGA CGG AC -3'
SNP29_F	5'- AGG ATT ATC ATC CCG CCG ATG GCG -3'
SNP29_R	5'- TCG ATG TGC ATT TGA ATC GGG AGT G -3'
SNP30_F	5'- TGA GTG GCA CAA CAG GAT TTC ATG G -3'
SNP30_R	5'- AGG AAC TCG TCA GCA AAT TGG CAG -3'
SNP31_F	5`- TGT GGC AGG CAA TAG GCA AAC CG -3`
SNP31_R	5`- TGA TGA TGA CAT CTG TGC CAT CG -3`
SNP32_F	5'- TCG CGA TCG TCA CGA TCT CAC CTA TG -3'
SNP32_R	5'- TCG TTG GCT GCT TCA TTA ATT CGC -3'
SNP33_F	5'- AGA GGA GAA ACT TGG ACA ACT GG -3'
SNP33_R	5'- ACT GAT ACT GCA AGA TGT GTG CAC -3'
SNP34_F	5'- CAG TTC CAG CAT GTT GTA CAC GAG G -3'
SNP34_R	5`- TCT CTG AAA CGC AGG TGA GC -3`
SNP35_F	5'- TGA TTC CAA GAC GCC ATT CCG -3'
SNP35_R	5'- CGA GGG TTA AGG CCA CGT TAG C -3'
SNP36_F	5'- CGT AGA ATG GGC AAA GGA CCG -3'
SNP36_R	5'- CTA CTT CTC AGA GCG CTT GAG C -3'
SNP37_F	5'- GGT CTG ATT TGG GAT CTG TGA TTG -3'
SNP37_R	5'- CGT AAA TGC ACA ACT CCG TAATGC -3'
SNP38_F	5'- GTG AAT CGG GAC GGT GGA TC -3'
SNP38_R	5'- CTC AAG CGG CAC TCG CAA CT -3`
SNP39_F	5'- CGG GCT GTT ACG TTG TAC C -3'
SNP39_R	5'- GGC TGG CTG GTT GGG AAA CGC -3'
SNP40_F	5'- CCG GCA GTT GCA GTC GTT GGT C -3'
SNP40_R	5'- GCC ATA GGT TGC CTC CGT CC -3'
SNP41_F	5'- GGC ACA CAG CGA AGA ACC ACA AC -3'

SNP41_R	5'- GCG TCT TGT AGG CAT TGA ATG -3'
SNP42_F	5'- TTG ACA CAG CCA GGA TAA CAC G -3'
SNP42_R	5'- GGA TGG GAG TGT GAG TTT GTG G -3'
SNP43_F	5'- AG AGA TAG TAG TGC CTC TGC CG -3'
SNP43_R	5'- TCT GCC ATA CTC GTC TGC CGA G -3`
SNP44_F	5'- GAC CCT AAA CAG AAT CCT TTG ACG -3'
SNP44_R	5'- CGT AGC TCA AAT TGA ATT GCT CG -3'
SNP45_F	5'- CAA GGT AGC TGG GCA TGG AG -3'
SNP45_R	5'- GTT TGT CGA GGG TAT ATG CTC -3'

Sequenzierungsprimer von Genen:

CG1041_F1	5'- AGC ACA GTT AAA CCA ACA ACA GGG -3'
CG1041_R1	5`- TTT GCT TGG GAA AGG TCA TGC -3`
CG1041_F2	5`- GAA ACC GGC AGC AAG GAG AAG -3`
CG1041_R2	5'- CAG GTG GTT CCG AGT GCA TTC -3'
CG1041_F3	5'- CCG ATG CTC TCC AAA TGA AGG -3'
CG1041_R3	5'- TTT CAA GTG CAG CAA GTG TTT GTC -3'
CG1041_F4	5`- GGA TCG CCA AGA AAG TGC TGC -3`
CG1041_R4	5`- CTT CTG GGA ATC CGA CAT GTG C -3`
Ubc9_F1	5`- CAG CAG CGA ATG CTA CCA GAT C -3`
Ubc9_R1	5`- GAA CAT CAA GGA CCC AGC CCA G -3`
Ubc9_F2	5`- CGC TTA CCG GCT AGA TGT GTG -3`
Ubc9_R2	5`- GGA ATG TAA CGG CTT AAG AG -3`
Nle_F1	5'- CCC GCA ACG TAC TTC TCA AAT C -3'
Nle_R1	5`- GCA CAA GAA ACA CAT CAA CTG CC -3`
Nle_F2	5'- CAT CTT CAC TGT GCG ATC TTT GG -3'
Nle_R2	5'- TCG TAC TAG CAG CTA TCG GGA AAC -3'
CG2807_F1	5'- GTT CGT TAG TGA TGA GCA ATC GG -3'
CG2807_R1	5'- TTC CCA GAA TAC TCA CAT CTT CCC -3'
CG2807_F2	5'- GAC CGT TAC ATC GTC GTC AAC TTC -3'
CG2807_R2	5'- TCC TGC TCC GAA TTC CCT TG -3'
CG2807_F3	5'- CTA CTG CTG ACC ATC AAG AAC GG -3'
CG2807_R3	5'- CCA CCA CAC GAT TGA TAA TCT CAG -3'
CG2807_F4	5'- GAA CCG CAG TAC ATC AAA GAG GAG -3'
CG2807_R4	5`- GAA GTG GAC AGA CGG CGT ATA TG -3`
CG2807_F5	5'- CTC AAC GTT CAG AAT GGT GTG TTG -3'
CG2807_R5	5'- CGG CAG GAA AGA TCA ATT AAG AAC -3'
CG2807_F6	5`- GCG AGT GGA TGC GAA TTT GTT -3`
CG2807_R6	5'- AAG CAT CCT CGC AGC CGA A -3'
CG2807_F7	5'- AAT CCT TCG ATT CCG TGC T -3'
CG2807_R7	5'- CA CAT CCT CAG TGG TCT GCT -3'C

CG2807_F8	5'- CCC CAG CCG GTT TCT TCA TC -3'
CG2807_R8	5`- GGC CAG GTT GGA TAT GAT TTC -3`
CG2807_F9	5'- TAC ACG GAC ATC ATG CGG GAG -3'
CG2807_R9	5'- TCT CGT GTC CTG GGG TCA CAG C -3'
Ipk2_F1	5'- GGG AAA TAA TTG CCT CGC AAT G -3'
Ipk2_R1	5'- ATC ACT GGT TCA GAG CGG TAA GTG -3'
CG2813_F1	5'- GAT CCA ATT GCA GGC CAC TG -3'
CG2813_R1	5'- ATA AGC AAG CGC CAC AGG TG -3'
Ptth_F1	5'- CGT TCT AGC CGG GCT TGT TAT G -3'
Ptth_R1	5'- GAA TCC GAA TAG GGC ACT GAG C -3'
Ptth_F2	5`- TGA CAA ATA AAG GAA TCG CCA GTC -3`
Ptth_R2	5`- CTC GTG CAT CAA TGA CAA CAA GAG -3`
Ptth_F3	5'- ATA AAA GTA TGG CGA CTC CTT G -3'
Ptth_R3	5'- GAT AGT TGC TCA CAT CCT TTC A-3'
alpha4GT1_F1	5'- CTA CGA TGT GGG GAC ACG GGC G -3'
alpha4GT1_R1	5'- CCC ATG ATG TCG AAG CCT CC -3'
alpha4GT1_F2	5`- GCG ATG ATG AGG ATG ACG ACG G -3`
alpha4GT1_R2	5'- CGC CCG GTG CAA GGA CTC GTA TG -3'
alpha4GT1_F3	5'- CGC CAG CAG CCT TGT ACG ATC TC -3'
alpha4GT1_R3	5'- GCT CCT CTG GTT GCC CAT TGC G -3'
alpha4GT1_F4	5'- GCG CCT GCT GAG TTG CCA GTA C -3'
alpha4GT1_R4	5`- GGC CTG ATC CAT CGC TGA TGA CG -3`
alpha4GT1_F5	5'- CCC GCT GCC CTG CCT GTT GCC C -3'
alpha4GT1_R5	5'- CGC GCT CGT CCT TAA TCT TC -3'
CG3542_F1	5'- GGC ACA CAG CGA AGA ACC ACA AC -3'
CG3542_R1	5'- GCG TCT TGT AGG CAT TGA ATG -3'
CG3542_F2	5'- CCA CGT TAG CGG CTA TAG AGG TG -3'
CG3542_R2	5`- CTG ATC TCG AGA CGG ACC GTA C -3`
CG3542_F3	5`- CGG ATG AAA GAG GAG GTG CG -3`
CG3542_R3	5'- CGA TTG TCA AGG ATG TCA TTA AAC -3'
CG3605_F1	5`- GAA TGA CGC GAA CTT ATT GTA G -3`
CG3605_R1	5'- CGA GAG GAC GCC AAG ACA CTC AAG -3'
CG3605_F2	5'- CGG CCC GTA GCG CTG TTG AGC -3'
CG3605_R2	5`- CGG CGA CGA AGC GGA TGT GGG CG -3`
CG3605_F3	5'- CGC TGC CAT GGG CTT TTG TCT -3'
CG3605_R3	5'- GCA TTG TTA AAC TGG TAA TCT ATG -3'
CG17219_F1	5'- CCA CAA TTC TAG TGA TGC GCG -3'
CG17219_R1	5'- CGT CTG CCT GCC AAA CAC TCT C -3'
CG17219_F2	5`- CCT GCT AAA TTT GGA CGA CTC -3`
CG17219_R2	5`- GCC GGC TGT CAT CAA GAA CAT C -3`
CG17257_F1	5'- GTT GGC AGC CCA CTT TAC ACG -3'

CG17257_R1	5`- GCC AGA TCG CTC AGC AGT GTC C -3`
CG17257_F2	5'- GCT GGC TCC GGA GGA GAA CTA CG -3'
CG17257_R2	5'- GGT CCT GGA CTG CTG GCG ACG -3`
CG17258_F1	5'- CGC AAC AGA ATC TGG AGC AAC TG -3'G
CG17258_R1	5'- GCC CTG CTC CAG CCA CGG TTT C -3'
CG17258_F2	5'- CCT CGT CCT CCT GGC GCT GTT TAC -3'
CG17258_R2	5'- CTC TGT AAT ATC CGA TTT GGC CG -3'
CG17258_F3	5'- GGC TCC ACA TCC GAC TCA TCT TC -3'
CG17258_F4	5'- CTG TGC CAG ACT CTT CAC CAA CGG -3`
CG17258_R4	5'- CGA TTA AAC TGG ATC AAG CTG TGC -3'
CG5694_F1	5'-AGC AAC AAG AGC CAG CAA -3'
CG5694_R1	5'- GAG TGG AAC AGT GTG GGA -3'
CG5694_F2	5'- TCA TCA GGA CGG ACA GGC A -3'
CG5694_R2	5'- GGC TCA GGG GAA TCA CAA -3'
CG5694_F3	5'- GCC ATT TAG CAG TCA GTT CTC -3'
CG5694_R3	5'- TCG TAT AAT CGT AAA GCC CTC A -3'
CG5694_F4	5'- GCA TAA CAG GAA CAC GAA AAC -3'
CG5694_R4	5'- AGC ACA TTT ACT TGG CTC GAC -3'
eEF1delta_F	5'- CAG TAC GCA CCA AGA ATT CGC A -3'
eEF1delta_R	5'- TGC GAT TTC GCT TAC TAA TGG G -3'
eEF1delta_F2	5'- GCA TGC TTG CAT GAC AAC AGA C -3'
eEF1delta_R2	5'- GTA GAG CCT TAT GAA ACT AGT C -3'
CG31720_F1	5'- TCG CAT TTG TCT TGC CGT CAG -3`
CG31720_R1	5'- CTT TCG CCC GGT TTG CAT G -3`
CG31720_F2	5'- TGT AAA CAA GTG CTG CCC ACA GG -3'
CG31720_R2	5'- TGC AAG CCG TGA ACA ATA CCG -3`
CG31720_F3	5'- GGC AAT TGA ACG CAG TAA TCG C -3'
CG31720_R3	5'- CAG ATG TCG TCA TTC GAT GTG GG -3'
CG31720_F4	5'- TTT GCC TTC GTT CCT TTC AGA GC -3`
CG31720_R4	5'- CGT AAA CCA GCA ACG ACC ATG TC -3'
CG31720_F5	5'- CGA CCT GAG AAG GCA GTT TAT TTG -3'
CG31720_R5	5'- TCC AGG TCA CAG CTA AAT TAT GCA C -3'

Nle_RT_right_F	5'- CAT CCG CAT GTC CAG GCA GCT C -3'
Nle_RT_right_R	5'- CAC CGA CTA CGT CCT GCG CAC T -3'
CG2807_RT_F	5'- TGG AAA ATA TTC CGC GAA CAC ATG -3'
CG2807_RT_R	5'- TCT CGT GTC CTG GGG TCA CAG C -3'
IPK2_RT_F2	5'- TGT TCT GCC GGG TAA ACA TGA G -3'
IPK2_RT_R2	5'- GGA AGA CCT CAC GCG ATC GTA C -3'
Ptth_RT_F	5'- ATA AAA GTA TGG CGA CTC CTT G -3'
Ptth_RT_R	5`- GAA TCC GAA TAG GGC ACT GAG C -3`
alpha4GT1_RT_F	5'- CGC CAG CAG CCT TGT ACG ATC TC -3'
alpha4GT1_RT_R	5'- GCT CCT CTG GTT GCC CAT TGC G -3'
CG3542_RT_F	5'- CCC GCT GCC CTG CCT GTT GCC C -3'
CG3542_RT_R	5'- CGC GCT CGT CCT TAA TCT TC -3'
CG3605_RT_F	5'- TCC TTG ACA ATC GCA CAA ATG G -3'
CG3605_RT_R	5`- CGG CTC GGT TTG GGT TTT TAA AG -3`
CG17219_RT_F	5`- CAG TCG AGA GCG ATC CCA CAT C -3`
CG17219_RT_R	5'- GAG GCA GTA CAA AGC GGC ACA G -3'
CG17257_RT_F	5'- TCG TAT TTC GCC ACA TCC CTT G -3'
CG17257_RT_R	5'- CAT CTT GTG GCC GGG TTT CTG -3'
CG17258_RT_F	5'- TCA GAT CCT CGC GGG CCT CC -3'
CG17258_RT_R	5`- CTC TGT AAT ATC CGA TTT GGC CG -3`
CG17320_RT_F	5'- TGT AAA CAA GTG CTG CCC ACA GG -3'
CG17320 RT R	5`- TGC AAG CCG TGA ACA ATA CCG -3`

Primer für semiquantitative RT-PCR Analysen:

## Primer für Rescuekonstrukte:

Nle_Mut_Forw	5`- ATA GCG GCC GCT GTG CGA TCT GGC TTT GG -3`
Nle_Mut_Rev	5'- ATA GCG GCC GCA ACC AAG AAC ATA CGC CTG ATC -3'
2-8_MutrescF	5'- ATA TAG GGT ACC AGT GCG CAG GAC GTA GTC GGT GC -3'
2-8_MutrescR	5'- ATA TAG GCG GCC GCA CAA GTG ATT CCA AGA GCA G -3'
SZ-3596_forw	5'- GGA TAC GCA CAG AAC CCA CTG -3'
LETH_R	5'- CGA AGA ATC CTC CGC TGT CC -3'
2-8_MUTgap_F	5'- TAT TCT AGA GCA TCT TGT CAC TGG GCG CAC TTT G -3'
2-8_MUTgap_R	5'- ATA GCG GCC GCT GTA CCC CTC GTA ACG CCC CTT -3'
IPK2_Kpn_F	5'- CAT GGT ACC CAC CGA TCT CCC TTG CAG CAC TCG T -3'
IPK2_Not_R	5'- GTA TGC GGC CGC CTG CTA GTG GTA GGA TTC TCT AAG -3'
CG2313_Kpn_F	5'- ATA GTG GTA CCC TGA GTG TGC TCC TCC TTG GGA AG -3'
CG2313_Not_R	5'- ATA GTG CGG CCG CAC AGA CCT CTC AGT CCG ATC ACC -3'
Ptth_Mutresc_F	5'- ATA GCG GCC GCG TCG GAA TTG TTA CAG AGT GGC -3'
Ptth_Mutresc_R	5'- ATA GCG GCC GCG GAT GAA GTC TTT GGA GAC AGG -3'
KpnI_forwMutr(lwr)	5'- ATA TAG GGT ACC TGA TCT CCT CGG CGA TCG GAG -3'
NotI_backMutr(lwr)	5'- ATA TAG GCG GCC GCA CAT CGG ACA TAT TAC CGG ATC -3'

Fosmidtagging-Primer:

C_CG2807_F	5'- GAT TAC TAA TGA TCC CAA GAA CCA GTA CGA GCG GTA CGA GTT
	GGA CTA CAC GCT AGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
C_CG2807_R	5'- ATT GGT ATC TTA GAG AAT CCT ACC ACT AGC AGA TAA GCT ATT
	ACA ATT TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3`
C_Suv4-20_F	5'- CAA CGG GCG CAG TTA CAT CTC ACC ATC ATA CAA ACA ACC ATC
	ACG GCC AGA AAG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3`
C_Suv4-20_R	5'- CTC ATG GAA ATG GCA ACT GTG CTT AGT CAA TTT GCT TGG AGA
	TCA GTC GTT GGT TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'
C_Ubc9_F	5'- GAG TAC GAG AAG CGC GTG CGT GCC CAG GCC CGC GCC ATG GCG
	GCC ACT GAG GAA GTG CAT ACC AAT CAG GAC CCG C -3'
C_Ubc9_R	5'- GAT GTG TGT ATT TGT TAA TGT CTA TGT GGT AAA GGT GGT TGG
	CAG GAG CCC GAC TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3`
N_CG5694_F	5'- CTA TCG ATA ACA TGG CAA TAA AAT ATA ACA TTT TAA TTC ACT
	TGC AGT GAC AAT GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
N_CG5694_R	5'- CAA ACA AAA GTG GTA GGT TGG ATA TCA TGT TGT GTT GAG CTT
	TAT CTT TTT CAT CCT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`
C_CG5694_F	5'- CTC CGC CTT TCA ATG GCA CTG GGC GTA TAA TTT CCA TTG ATT
	TAA CTT CTG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3`
C_CG5694_R	5'- AGG TTT TCT TGT AAA ATA ACA ATT TCT TAA CTT AAC TAT GGA
	TTA AAA TGT CTA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3`
C_CG5694_def_F	5'- GGT TAT TTT GCA GTC ATA TGA TAG ACA ACA AAA GAA CAG AAA
	GTG CTT GTT GCT GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3'
C_CG5694_def_R	5'- GCT CAA CCA TCA TAT GCT GTA CGT TTT CGC TAA TGG AAC TGT
	TGT TCT TTT GCT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`
C_CG5381_F	5'- CAA GTC GAG CGC ATA ACT CAG CTA GTT CTA ACT TCA ACA ACG
	GCT CGT GCG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3`
C_CG5381_R	5'- GAC TCA TTA ATT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CAT TTA
	ATA TAA ATA TTA TTT GTG TAC AGC GTA ATT AAT TGC -3`
C_RPD3_F	5'- CGG GAT CAG GTT CCG GTG CCG GGG CCA AGG GCG CCA AGG
	AGA ACA ACA TTG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3`
C_RPD3_R	5'- GTA CTT CGG CGG TCG CTT AAT TGG CTT CTA TAA CCA ATT GCG
	GCC GCC ACG TCA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3`
$N_E(z)_F$	5'- CAG TGT TTT TTA TAC GTA AAA TCA ACA AAT ATA AAG TCC CTC
	GAA GGC ATT ATG GAA GTG CAT ACC AAT CAG GAC CCG C -3`
$N_E(z)_R$	5'- ATG TAC TCC GAC TTG ACA CGC CTC TTC CAC TCG GGC GGC ACT
	TTA GTG CTA TTC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3`
C_Jil1_F	5'- CTC GAG TTC AGC CGG AGA GGG CGC GGG CAA TGC GTC AAC TTT
	ATC AGT TCC AAG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3`
C_JIL1_R	5'- CCT CCT TGA TTT CCA CCA CCT CCA CAT CAT CGC CGT CGT CAT
	CCT CAT GTC ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`

C_Su(var)3-7_F	5'- GGT TGT CAA ATC ACA ACA TTT CGG ACA ATG GTG AAC CAT AAC
	CGC AGG CCA GAA GTG CAT ACC AAT CAG GAC CCG C -3`
C_Su(var)3-7_R	5`- GAC AGT GAT AAA GTC TTA AGT TAC GTT TGA TTC ATA TTT CCT
	AGG AGC TCT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`
N_Ahyc89_F	5`- CGA GCA TAC TTT ATA ACC TGT TTC GGA TCC GTC TAA GTC GCC
	TAC AGA ATG GAA GTG CAT ACC AAT CAG GAC CCG C -3`
N_Ahyc89_R	5`- GCA GTC TTA TCA GCC AGA CTC AGG TCG GCA AAC GTT GTC TCC
	GGC ATT TTG GCC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3`
N_SetDB1_F	5`- GTC TCG CAA ATT TGC ATT AAT GTG TAA AGT TAA GTA AAC TCA
	TTA AAA CTA TGG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3'
N_SetDB1_R	5'- CTC CAC TGT GCT TCC ACT GCT CTC TAA GCA GTC CAC GGC TGT
	TGG CTG CCC AGA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3`
C_HP1_F	5`- TAA TCC ACT TCT ACG AAG AGC GCC TAT CCT GGT ACT CTG ATA
	ATG AAG ATG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3`
C_HP1_R	5`- TCG TTA AAT GTA TAA TCG TTC TTT TTC GCT TTC GAT GAT CCA
	ACT GTT TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3`
C_Dnmt2_f	5`- GTA TTA ATG TAA AGG TTG TCG GTG AAC TTA TTA AAT TGC TGA
	CGA TAA AAG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3`
C_Dnmt2_b	5`- TAA ATG TAT TAA AGT GAA AAT AAG CAA GCA AAT ATG TTG TAT
	TTT GTT TTA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3`
C_3_9_f	5`- GAT CTT CGG AGG CAA GAC AAT CAC ACC CGT TCT GGA CAG CCA
	GGT GGC AAA GAA GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
C_3_9_b	5`- TTG CCG CTG ATG TTG TTC TTA AAA GTA GAA CCA TTC GGA TCC
	TAA CTA AAT TCT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`
C_3_3_f	5`- GAA GTC GGA GGA GAA TTC AAA CTC AAA CAC TGC CGA CTC TAC
	GGA GCT ACA GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
C_3_3_b	5`- AAC GCT CTA GGA GTA ACT GCT GGG GAC CAA ATC CAT CAC GCT
	AAA TAC ATT GTT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`
C_Gcn5_f	5`- CTC CCT GGA GCG CTA CTT CCA GAC CAA GAT GCG CGA GCT GGG
	GCT GTG GGA CAA AGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
C_Gen5_b	5`- TTA GTT CGA TTA AAT GTT CGG CCT TAT GCA GGG CTC CTC GGA
	ATC ACT GCA TCA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3`
C PP1 f	5`- CGA TAC GCT GAT GTG CTC GTT CCA AAT CCT CAA GCC AGC CGA
	CAA GCG TAA AAA GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
C PP1 b	5`- TGA TCT GTT TTA GAT AGA AAA AGA CTG CTC GTG GTG CTG CAG
	TTG TGT GAT ATT ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`
N dMES4 f	5`- GAA TTA ACG GTA GTG TTT AAT TGA CGA GAG CGC GAT TAA ACT
	GGA CCG CAG AAT GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
N dMES4 b	5`- CAT TGC CGT GGG CAG CGT CGC CCT CGA TCT CGG AGT GCG CGT
	CCG TGC TCA GCT TCT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`
C Lid f	5`- GCG TGG CGT CCA CGA CGA CGC CGG GCA AGC AGC GGG CGG TGC

	AAT CGG CGC GGG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3`
C_lid_b	5'- GCG TAA AAC ACA ATC GGC TGT TAC TGC ACC TCC TGG ACT CTA
	TAT ACG TTA CTC TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3`
C_ing2_f	5'- GGCGCAGTTCCTCAAAGAACTGGAGCGCTACAACAAGG
	AAAAGGAGGAGAAGACCGAAGTGCATACCAATCAGGACCCGC-3`
C_ing2_b	5'- ACA GAG CCT GGT GTT AGA CAC AGA GCA ATG GGT TGG ATA GGC
	TGG CCT AAT AGA CTA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3`
C_SUUR_f	5'- GAG AAG TGG TGG AGC ATC AGG ACC GAC CAA AAG AAA GCG
	ATT GGA ACT GTT CAA GGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
C_SUUR_b	5'- TAA TTG GAT TTG ATT TGA TTT GGT TTT TGT CAT TTT CAT TGA
	TTG CTG TTC ATC ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`
C_mod58f	5'- GTT CAT TGA CCA CAA GCT GTC TAC TCT TAA ACT TAT GCC TAT
	AAA GGA GGG GAA AGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
C_mod58b	5'- TCT AGT ACA GGC ATT TAT TTC GGT TTA CGA ATG CAA CAA TCA
	ATTT AAAC TAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3`
CG2813_STOP_F	5'- AGG GTG CTC TTA AGC AAT ACT ACG TGT CCA AGA GGT GCA TGA
	CCA AGG AGC AGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
CG2813_STOP_R	5'- CAG ATG TGG GTG CAG TAC AGC TGC ATA TAG CGC TTC CTC TTG
	GAC TGG CAC TCA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3`
alpha_STOP_F	5'- CTG CAG ATG GCG AAA CAA ATC TAT TGG GCG ACG TCC TCC AGG
	CGG ATC CCA GAA GTG CAT ACC AAT CAG GAC CCG C -3`
alpha_STOP_R	5'- ATA GGC GGC AGC TGG TCT CGT GAA AGA AGA TAC TGT TTC CGG
	GCG AGG GTT TCA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3`
CG3542_STOP_F	5'- TCC CTG GAA GGA GTA TCG CTC GGA TAC GGG CAA AGT GTA CTA
	CCA CAA CGG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3'
CG3542_STOP_R	5'- CTT CAT ATC CAC GTA CTC CGG CGG CGG CTC CCA GCA GGT CTC
	CTT GGT GGC CAT CAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3'
CG3605_STOP_F	5'- GCG TAA CAA AAA GAA GAA GAA GCG AAA GAA GCA GAA CAG
	GAA GAT ACG CCA CGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
CG3605_STOP_R	5'- GTT CGT TCT CCT CCG CTT GGG CCA ACT GCT GCC GTG CGA
	ACT CAA TCT GTC ACT TGT CGT CGT CAT CCT TGT AGT CA -3`
CG17219_STOP_F	5'- TAT CAC AAA GGA TAT AGA TTG GTA CAA TTC GGA GAA AGT ACA
	ACC ACT GGA TAG AAG TGC ATA CCA ATC AGG ACC CGC -3`
CG17219_STOP_R	5'- CCT CCA TTT CCT TGG CGT TAA GCT CAT AGA AAT CCA TTG CCG
	AAA TTA GGT TCA CTT GTC GTC GTC ATC CTT GTA GTC A -3`
GABP1_STOP_F	5'- ACA TGA TCA TCA TAT TTG AGT TTC AGG TTC CTC TGC TGG AGC
	TGG CTC CGG AGA AGT GCA TAC CAA TCA GGA CCC GC -3`
GABP1_STOP_R	5'- AAT AGA GGC AGT ACA AAG CGG CAC AGG AGA AGA ACA TTA
	ACG CGT AGT TCT CCT CAC TTG TCG TCG TCA TCC TTG TAG TCA -3`

## 7.2 Hochauflösende SNP-Crossoveranalysen



## 7.2.1 Region 21B4-21E2




**Abbildung 7.2:** SNP-Crossoverkartierung von 48 Crossoverchromosomen, die in  $Su(var)Ubc9^{2-2}/5$ -SZ-3548 + 5-SZ-3596 heterozygoten Weibchen isoliert wurden. vgl. Abbildung 7.1



**Abbildung 7.3:** SNP-Crossoverkartierung von 33 Crossoverchromosomen, die in  $Su(var)Ubc9^{2-2}$  $Su(var)2-10^{01}/5-SZ-3548 + 5-SZ-3596$  heterozygoten Weibchen isoliert wurden. vgl. Abbildung 7.1

Rekombinante	P-Element	Su/	Rekombinante	P-Element	Su/
		Su+			Su+
Su(var) 2-8 R1	5-87-3548	Su	Su(var)2-8 R51	5-87-3596	Ju
$Su(var)^2 \cdot Su(var)^2 \cdot Su(v$	5-SZ-3548	Du	Su(var) 2-8 R52	5-SZ-3596	
$Su(var)^2 \cdot Su(var)^2 \cdot Su(v$	5-SZ-3548	Su	$Su(var)^{2-8}$ R53	5-SZ-3596	Su+
$Su(var)^2 \cdot Su(var)^2 \cdot Su(v$	5-SZ-3596	Su+	$Su(var)^{2-8}$ R54	kein Stamm	5u.
$Su(var)^2 - 8$ R5	5-87-3548	Su	$Su(var)^2 \cdot \delta_R = R55$	5-S7-3548	
$Su(var)^2 - 8 R6$	5-87-3548	Su	$Su(var)^{2} - 8 R56$	5-SZ-3548	
$\frac{Su(var)^2 - 8 R7}{Su(var)^2 - 8 R7}$	5-87-3548	Su	$Su(var)^{2-8}$ R57	5-87-3596	
$\frac{Su(var)^2 - \delta_R}{Su(var)^2 - \delta_R}$	5-87-3548	Su	$Su(var)^{2-8}$ R58	5-87-3548	
$\frac{Su(var)^2 - \delta_{\rm R0}}{Su(var)^2 - 8 R0}$	5-87-3596	Su+	$Su(var)^{2-8}$ R50	5-52-3596	
$\frac{Su(var)^2 - \delta_{\rm R}}{Su(var)^2 - 8 R^{10}}$	5-87-3548	Su	$Su(var)^{2-8}$ R60	5-52-35/8	
$Su(var)^{2-8}$ R11	5-87-3548	Su	$Su(var)^{2-8}$ R61	5-52-3596	
$\frac{Su(var)^2 \cdot \delta_{\rm R11}}{Su(var)^2 \cdot 8 \cdot {\rm P12}}$	5 87 3548	Su	$Su(var)^2 = Rot$	5 S7 3548	
$\frac{Su(var)2-0}{Su(var)2-8}$	5 87 2540	Su	Su(var) 2-8 $P63$	5 \$7 2506	
$\frac{Su(var)2-0}{Su(var)2} \approx D14$	5 57 2540	Su	$\frac{Su(var)2-6}{Su(var)2} \approx D64$	5 87 2506	
$\frac{Su(var)2-8_R14}{Su(var)2-8_R14}$	5.57.2548	Su	$Su(var)2-8$ _R64	5-5Z-3390	C.,
Su(var)2-8_R15	5.57.2548	Su	Su(var)2-8 R65	5-5Z-3548	Su
$Su(var)2-8$ _R16	5-52-3548	Su+	$Su(var)2-8$ _R66	5-5Z-3596	
$Su(var)2-8$ _R1/	5-8Z-3596	Su+	$Su(var)^{2-8}$ _R67	5-SZ-3548	
Su(var)2-8_R18	5-8Z-3596	Su+	$Su(var)2-8$ _R68	5-8Z-3548	
Su(var)2-8_R19	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8_R69	5-8Z-3596	
Su(var)2-8_R20	5-SZ-3548	Su	Su(var)2-8_R/0	5-SZ-3596	
Su(var)2-8_R21	5-SZ-3548	Su	<i>Su(var)2-8</i> _R71	5-SZ-3596	
Su(var)2-8_R22	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R72	5-SZ-3548	
<i>Su(var)2-8</i> _R23	5-SZ-3548	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R73	5-SZ-3596	
<i>Su(var)2-8</i> _R24	5-SZ-3548	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R74	5-SZ-3548	
<i>Su(var)2-8</i> _R25	5-SZ-3548	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R75	5-SZ-3596	
<i>Su(var)2-8</i> _R26	5-SZ-3548	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R76	5-SZ-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R27	Beide		<i>Su(var)2-8</i> _R77	5-SZ-3596	
<i>Su(var)2-8</i> _R28	5-SZ-3548	Su	<i>Su(var)2-8</i> _R78	5-SZ-3548	
Su(var)2-8_R29	5-SZ-3548	Su	<i>Su(var)2-8</i> _R79	5-SZ-3596	
<i>Su(var)2-8</i> _R30	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R80	5-SZ-3548	
<i>Su(var)2-8</i> _R31	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R81	5-SZ-3596	
<i>Su(var)2-8</i> _R32	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R82	5-SZ-3596	
<i>Su(var)2-8</i> _R33	5-SZ-3596	Su+			
<i>Su(var)2-8</i> _R34	5-SZ-3596	Su+			
<i>Su(var)2-8</i> _R35	5-SZ-3548				
<i>Su(var)2-8</i> _R36	5-SZ-3596				
<i>Su(var)2-8</i> _R37	5-SZ-3596				
<i>Su(var)2-8</i> _R38	5-SZ-3596				
<i>Su(var)2-8</i> _R39	5-SZ-3596				
Su(var)2-8_R40	5-SZ-3596				
<i>Su(var)2-8</i> _R41	5-SZ-3596				
Su(var)2-8 R42	5-SZ-3596				
Su(var)2-8 R43	5-SZ-3596				
Su(var)2-8 R44	5-SZ-3596				
Su(var)2-8 R45	5-SZ-3596				
Su(var)2-8 R46	5-SZ-3548	Su			
Su(var)2-8 R47	5-SZ-3596				
Su(var)2-8 R48	5-SZ-3596				
Su(var)2-8 R49	5-SZ-3548				
Su(var)2-8 R50	5-SZ-3596				

 Tabelle 7.1: Crossoverchromosomen, die in Su(var)2-8/5-SZ-3548 + 5-SZ-3596 Heterozygoten isoliert wurden



**Abbildung 7.4:** SNP-Crossoverkartierung von 80 Crossoverchromosomen, die in Su(var)2-8/5-SZ-3548 + 5-SZ-3596 heterozygoten Weibchen isoliert wurden. vgl. Abbildung 7.1

# 7.2.2 Region 21E2-21E3

Rekombinante	P-Element	Su/	Rekombinante	P-Element	Su/
		Su+			Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R1	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R51	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R2	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R52	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R3	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R53	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R4	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R54	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R5	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R55	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R6	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R56	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R7	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R57	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R8	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R58	CB-5483-3	Su
<i>Su(var)2-8</i> _R9	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> R59	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R10	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R60	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R11	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R61	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R12	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R62	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R13	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R63	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R14	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R64	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R15	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R65	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R16	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R66	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R17	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R67	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R18	5-SZ-3596	-	Su(var)2-8 R68	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R19	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R69	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R20	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R70	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R21	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R71	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R22	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R72	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R23	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R73	5-SZ-3596	Su+
Su(var) 2-8 R24	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R74	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R25	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R75	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R26	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R76	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R27	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R77	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R28	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R78	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R29	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R79	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R30	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R80	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R31	Beide	-	Su(var)2-8 R81	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R32	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R82	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R33	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R83	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R34	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R84	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R35	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R85	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R36	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R86	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R37	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R87	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R38	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R88	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R39	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R89	CB-5483-3	Su
Su(var) 2-8 R40	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R90	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R41	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R91	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R42	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R92	CB-5483-3	Su
Su(var) 2-8 R43	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R93	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R44	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R94	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R45	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R95	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R46	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R96	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R47	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R97	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R48	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R98	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R49	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R99	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R50	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R100	CB-5483-3	Su

**Tabelle 7.2:** Crossoverchromosomen, die in Su(var)2-8/5-SZ-3596 + CB-5483-3 Heterozygotenisoliert wurden

Rekombinante	P_Element	Su/	Rekombinante	P_Element	Su/
Recombinance	I -Liement	Su+	Recombinance	I -Liement	Su/
G ( )2 0 D101	5.07.250(	G	G ( )2.0 D151	CD 5402.2	Su
Su(var)2-8_R101	5-8Z-3596	Su+	Su(var)2-8_R151	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8_R102	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8_R152	CB-5483-3	Su
<i>Su(var)2-8</i> _R103	CB-5483-3	Su	<i>Su(var)2-8</i> _R153	CB-5483-3	Su
<i>Su(var)2-8</i> _R104	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R154	5-SZ-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R105	CB-5483-3	Su	<i>Su(var)2-8</i> _R155	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8_R106	5-SZ-3596	Su +	<i>Su(var)2-8</i> _R156	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8_R107	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8_R157	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8_R108	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R158	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R109	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R159	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R110	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R160	CB-5483-3	-
Su(var)2-8 R111	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R161	CB-5483-3	Su
$Su(var)^{2-8}$ R112	5-SZ-3596	Su+	$Su(var)^{2-8}$ R162	CB-5483-3	Su
Su(var) 2-8 R113	5-SZ-3596	Su+	$Su(var)^2 = R162$ Su(var)^2-8 R163	CB-5483-3	Su
Su(var) 2-8 R114	5-87-3596	Su+	$Su(var)^2 - 8 R = 164$	5-87-3596	Su+
$Su(var)^{2-8}$ R115	5-87-3596	Su+	$Su(var)^{2-8}$ R165	5-SZ-3596	Su+
$Su(var)^{2-0}$ R115 Su(var)^2 8 D116	5 87 2506	Su+	$Su(var)^{2-0}$ R105	5 SZ 2506	Su+
Su(var) 2-0 K110	3-5Z-3390	Su+	Su(var) 2-8 R100	3-32-3390	Su⊤
Su(var)2-8 R11/	CB-5483-5	Su	$Su(var)2-8$ _R167	CB-5485-5	Su
Su(var)2-8_R118	5-8Z-3596	Su+	Su(var)2-8_R168	5-8Z-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R119	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R169	5-SZ-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R120	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R170	5-SZ-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R121	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R171	5-SZ-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R122	CB-5483-3	Su	<i>Su(var)2-8</i> _R172	5-SZ-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R123	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R173	5-SZ-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R124	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R174	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8_R125	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8_R175	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8_R126	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R176	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8_R127	5-SZ-3596	-	<i>Su(var)2-8</i> _R177	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R128	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R178	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R129	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R179	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R130	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R180	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R131	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R181	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R132	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R182	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R133	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R183	5-SZ-3596	Su+
$Su(var)^{2-8}$ R134	CB-5483-3	Su	$Su(var)^{2-8}$ R184	5-SZ-3596	<u>Su+</u>
$Su(var)^{2-8}$ R135	CB-5483-3	Su	$Su(var)^2 - 8 R185$	5-SZ-3596	
$Su(var)^{2-8}$ R136	CB-5483-3	Su	$Su(var)^2 - R186$	5-SZ-3596	Su+
Su(var) 2-8 R137	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R187	5-87-3596	Su+
Su(var)2-8 R137	5-S7-3506	Su+	Su(var)2-8 R188	CB-5483-3	Su
$Su(var)^{2-8}$ R138	5 87 2506	Su+	$Su(var)^{2-0}$ R188	5 S7 2506	Su_
$Su(var)^{2-0}$ R139	5 87 2506	Su	$Su(var)^{2-0}$ K189	5 SZ-3390	Su
Su(var) 2-0 K140	3-5Z-3390	Su+	Su(var)2-8_R190	3-32-3390	Su⊤
$Su(var)2-8$ _R141	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8_R191	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R142	5-8Z-3596	Su+	Su(var)2-8_R192	CB-5483-3	Su
<i>Su(var)2-8</i> _R143	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8_R193	CB-5483-3	Su
<i>Su(var)2-8</i> _R144	kein Stamm	-	<i>Su(var)2-8</i> _R194	CB-5483-3	Su
<i>Su(var)2-8</i> _R145	kein Stamm	-	<i>Su(var)2-8</i> _R195	5-SZ-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R146	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R196	kein Stamm	-
<i>Su(var)2-8</i> _R147	CB-5483-3	Su	<i>Su(var)2-8</i> _R197	5-SZ-3596	Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R148	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R198	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8_R149	CB-5483-3	Su	<i>Su(var)2-8</i> _R199	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R150	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R200	5-SZ-3596	Su+

Rekombinante	P-Element	Su/	Rekombinante	P-Element	Su/
		Su+			Su+
Su(var)2-8 R201	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R251	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R202	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R252	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R203	CB-5483-3	-	Su(var)2-8 R253	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R204	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R254	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R205	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R255	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R206	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R256	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R207	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R257	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R208	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R258	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R209	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R259	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R210	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R260	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R211	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R261	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R212	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R262	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R213	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R263	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R214	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R264	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R215	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R265	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R216	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R266	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R217	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R267	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R218	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R268	kein Stamm	-
Su(var) 2-8 R219	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R269	5-SZ-3596	Su+
Su(var) 2-8 R220	CB-5483-3	Su	$Su(var)^{2-8}$ R270	5-SZ-3596	Su+
$Su(var)^{2-8}$ R221	CB-5483-3	Su	$Su(var)^{2-8}$ R271	CB-5483-3	Su
$Su(var)^2 - R^2$	5-SZ-3596	Su+	$Su(var)^{2-8}$ R272	CB-5483-3	Su
$Su(var)^2 - R^2$	5-SZ-3596	Su+	$Su(var)^{2-8}$ R273	5-SZ-3596	Su+
$Su(var)^{2-8}$ R224	CB-5483-3	Su	$Su(var)^{2-8}$ R274	CB-5483-3	Su
$Su(var)^{2-8}$ R225	CB-5483-3	Su	$Su(var)^{2-8}$ R275	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R226	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R276	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R227	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R277	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R228	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R278	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R229	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R279	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R230	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R280	5-SZ-3596	Su+
Su(var) 2-8 R231	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R281	CB-5483-3	Su
Su(var) 2-8 R232	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R282	5-SZ-3596	Su+
Su(var) 2-8 R233	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R283	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R234	CB-5483-3	_	Su(var)2-8 R284	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R235	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R285	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R236	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R286	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R237	kein Stamm	-	Su(var)2-8 R287	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R238	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R288	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R239	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R289	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R240	5-SZ-3596	-	Su(var)2-8 R290	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R241	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R291	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R242	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R292	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R243	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R293	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R244	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R294	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R245	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R295	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R246	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R296	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R247	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R297	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R248	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R298	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R249	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R299	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R250	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R300	5-SZ-3596	Su+

Rekombinante	P-Element	Su/	Rekombinante	P-Element	Su/
		Su+			Su+
Su(var)2-8 R301	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R351	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R302	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R352	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R303	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R353	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R304	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R354	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R305	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R355	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R306	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R356	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R307	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R357	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R308	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R358	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R309	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R351	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R310	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R352	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R311	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R353	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R312	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R354	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R313	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R355	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R314	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R356	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R315	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R357	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R316	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R358	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R317	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R359	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R318	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R360	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R319	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R361	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R320	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R362	CB-5483-3	Su
Su(var)2-8 R321	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R363	CB-5483-3	-
Su(var)2-8 R322	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R364	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R323	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R365	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R324	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R366	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R325	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R367	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R326	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R368	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R327	kein Stamm	-	Su(var)2-8 R369	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R328	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R370	CB-5483-3	-
Su(var)2-8 R329	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R371	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R330	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8 R372	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R331	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R373	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8 R332	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8 R374	5-SZ-3596	-
Su(var)2-8 R333	CB-5483-3	-	Su(var)2-8 R375	CB-5483-3	-
Su(var)2-8_R334	5-SZ-3596	Su+	Su(var)2-8_R376	CB-5483-3	-
Su(var)2-8_R335	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8_R377	5-SZ-3596	Su+
Su(var)2-8_R336	5-SZ-3596	Su+	<i>Su(var)2-8</i> _R378	5-SZ-3596	-
<i>Su(var)2-8</i> _R337	CB-5483-3	Su	Su(var)2-8_R379	5-SZ-3596	-
<i>Su(var)2-8</i> _R338	5-SZ-3596	Su+			
Su(var)2-8_R339	5-SZ-3596	-			
Su(var)2-8_R340	5-SZ-3596	Su+			
Su(var)2-8_R341	5-SZ-3596	Su+			
<i>Su(var)2-8</i> _R342	5-SZ-3596	Su+			
<i>Su(var)2-8</i> _R343	CB-5483-3	Su			
<i>Su(var)2-8</i> _R344	CB-5483-3	Su			
<i>Su(var)2-8</i> _R345	CB-5483-3	Su			
<i>Su(var)2-8</i> _R346	5-SZ-3596	Su+			
<i>Su(var)2-8</i> _R347	5-SZ-3596	Su+			
<i>Su(var)2-8</i> _R348	5-SZ-3596	Su+			
<i>Su(var)2-8</i> _R349	5-SZ-3596	Su+			
Su(var)2-8_R350	5-SZ-3596	Su+			



**Abbildung 7.5:** SNP-Crossoverkartierung von 372 Crossoverchromosomen, die in Su(var)2-8/5-SZ-3596+ *CB5483* heterozygoten Weibchen isoliert wurden. vgl. Abbildung 7.1

#### 7.2.3 Region 21E1-21E2

15011011	wurden				
Rekombinante	P-Element	Su/	Rekombinante	P-Element	Su/
		Su+			Su+
<i>Su(var)2-8</i> _R1	5-HA-3038	-	<i>Su(var)2-8</i> _R10	5-HA-3038	-
<i>Su(var)2-8</i> _R2	CB-5083-3	-	<i>Su(var)2-8</i> _R11	beide	-
<i>Su(var)2-8</i> _R3	Beide	-	<i>Su(var)2-8</i> _R12	CB-5083-3	-
<i>Su(var)2-8</i> _R4	Beide	-	<i>Su(var)2-8</i> _R13	beide	-
<i>Su(var)2-8</i> _R5	5-HA-3038	-	<i>Su(var)2-8</i> _R14	beide	-
<i>Su(var)2-8</i> _R6	Beide	-	<i>Su(var)2-8</i> _R15	beide	-
<i>Su(var)2-8</i> _R7	5-HA-3038	-	<i>Su(var)2-8</i> _R16	5-HA-3038	-
<i>Su(var)2-8</i> _R8	Beide	-	<i>Su(var)2-8</i> _R17	5-HA-3038	-
<i>Su(var)2-8</i> _R9	Beide	-	<i>Su(var)2-8</i> _R18	5-HA-3038	_

**Tabelle 7.3:** Crossoverchromosomen, die in *Su(var)2-8/CB-5083-3* + *5-HA-3038* Heterozygoten isoliert wurden



Abbildung 7.6: SNP-Crossoverkartierung von 9 Crossoverchromosomen, die in *Su(var)2-8/CB-5083-3* + *5-HA-3038* heterozygoten Weibchen isoliert wurden. vgl. Abbildung 7.1

# 7.2.4 Region 22A5-23C5

Rekombinante	P-Element	Su/	Rekombinante	P-Element	Su/
		Su+			Su+
Su(var)2-12 R1	CB-0463-3		Su(var)2-12 R51	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R2	5-HA-1917		Su(var)2-12 R52	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R3	CB-0463-3		Su(var)2-12 R53	CB-0463-3	
Su(var)2-12 R4	5-HA-1917		Su(var)2-12 R54	CB-0463-3	Su
Su(var)2-12 R5	CB-0463-3		Su(var)2-12 R55	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R6	5-HA-1917	Su+	Su(var)2-12 R56	kein Stamm	
Su(var)2-12 R7	5-HA-1917	Su+	Su(var)2-12 R57	CB-0463-3	
Su(var)2-12 R8	5-HA-1917	Su+	Su(var)2-12 R58	CB-0463-3	Su
Su(var)2-12 R9	kein Stamm		Su(var)2-12 R59	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R10	Beide		Su(var)2-12 R60	CB-0463-3	
Su(var)2-12 R11	CB-0463-3		Su(var)2-12 R61	CB-0463-3	Su+
Su(var)2-12 R12	CB-0463-3		Su(var)2-12 R62	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R13	5-HA-1917	Su+	Su(var)2-12 R63	kein Stamm	
Su(var)2-12 R14	CB-0463-3		Su(var)2-12 R64	kein Stamm	
Su(var)2-12 R15	Beide		Su(var)2-12 R65	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R16	5-HA-1917		Su(var)2-12 R66	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R17	5-HA-1917		Su(var)2-12 R67	kein Stamm	
Su(var)2-12 R18	Beide		Su(var)2-12 R68	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R19	CB-0463-3		Su(var)2-12 R69	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R20	Beide		Su(var)2-12 R70	kein Stamm	
Su(var)2-12 R21	CB-0463-3	Su+	Su(var)2-12 R71	5-HA-1917	Su+
Su(var)2-12 R22	CB-0463-3		Su(var)2-12 R72	CB-0463-3	Su+
Su(var)2-12 R23	5-HA-1917		Su(var)2-12 R73	CB-0463-3	
Su(var)2-12 R24	5-HA-1917		Su(var)2-12 R74	5-HA-1917	
Su(var)2-12 R25	CB-0463-3		· · · · -		
Su(var)2-12 R26	5-HA-1917				
Su(var)2-12 R27	CB-0463-3				
Su(var)2-12 R28	5-HA-1917	Su+			
Su(var)2-12 R29	5-HA-1917				
Su(var)2-12 R30	5-HA-1917	Su+			
Su(var)2-12 R31	5-HA-1917				
Su(var)2-12 R32	CB-0463-3				
Su(var)2-12 R33	kein Stamm				
Su(var)2-12 R34	kein Stamm				
Su(var)2-12 R35	Beide				
Su(var)2-12_R36	5-HA-1917				
Su(var)2-12_R37	CB-0463-3	Su			
<i>Su(var)2-12</i> _R38	CB-0463-3				
Su(var)2-12_R39	5-HA-1917				
Su(var)2-12_R40	5-HA-1917	Su+			
Su(var)2-12_R41	5-HA-1917				
Su(var)2-12_R42	5-HA-1917				
Su(var)2-12_R43	5-HA-1917				
Su(var)2-12_R44	CB-0463-3				
Su(var)2-12 R45	5-HA-1917				
<i>Su(var)2-12</i> _R46	kein Stamm				
<i>Su(var)2-12</i> _R47	5-HA-1917				
Su(var)2-12_R48	5-HA-1917				
Su(var)2-12_R49	CB-0463-3				
Su(var)2-12_R50	5-HA-1917				

 Tabelle 7.4: Crossoverchromosomen, die in Su(var)2-12/CB-0463-3 + 5-HA-1917 Heterozygoten isoliert wurden.



**Abbildung 7.7:** SNP-Crossoverkartierung von 51 Crossoverchromosomen, die in Su(var)2-12/CB-0463-3 + 5-HA-1917 heterozygoten Weibchen isoliert wurden. Für die SNP-Analysen zur Kartierung des Crossoverereignisses von R1, R3, R22, R 27, R47, R53, R58 und R73 war der Vorrat an genomischer DNA nicht ausreichend. vgl. Abbildung 7.1

#### 7.2.5 Region 23B8-23C5



**Abbildung 7.8:** SNP-Crossoverkartierung von 71 Crossoverchromosomen, die in *Su(var)2-12/5-SZ-3215* + *5-HA-1695* heterozygoten Weibchen isoliert wurden. vgl. Abbildung 7.1

# 7.2.6 Region 30E4-31B1

Deleambinente	D Element	S/	Deleguidence	D Elamant	C <sub>ee</sub> /
Rekombinante	P-Element	Su/	Rekombinante	P-Element	Su/
C ( ) 2 I 2 D 1	5 11 4 11 40	Su+	$C \left( \right) 2 12 D51$	5 114 1140	Su+
$Su(var)2-13$ _R1	5-HA-1142	Su	Su(var)2-13_R51	5-HA-1142	
Su(var)2-13_R2	5-HA-1257	~	Su(var)2-13_R52	5-HA-1142	
<i>Su(var)2-13</i> _R3	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R53	beide	
<i>Su(var)2-13</i> _R4	5-HA-1142	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R54	beide	
<i>Su(var)2-13</i> _R5	5-HA-1142	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R55	5-HA-1257	
<i>Su(var)2-13</i> _R6	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R56	5-HA-1142	
<i>Su(var)2-13</i> _R7	5-HA-1142	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R57	5-HA-1142	
<i>Su(var)2-13</i> _R8	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R58	beide	
Su(var)2-13_R9	5-HA-1142	Su	Su(var)2-13_R59	beide	
Su(var)2-13 R10	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R60	beide	
Su(var)2-13 R11	5-HA-1142		Su(var)2-13 R61	beide	
Su(var)2-13 R12	5-HA-1257		Su(var)2-13 R62	beide	
Su(var)2-13 R13	5-HA-1142		Su(var)2-13 R63	5-HA-1142	
$Su(var)^{2}-13$ R14	5-HA-1257	Su+	$Su(var)^{2-13}$ R64	5-HA-1142	
$Su(var)^2 - 13$ R15	5-HA-1257	Su	$Su(var)^2 - 13 R65$	5-HA-1142	
$Su(var)^2 - 13 R16$	5-HA-1257		$Su(var)^2 - 13 R65$	5-HA-1142	
$Su(var)^{2-13}$ R10	5 HA 1257		$Su(var)^2 - 13 R00$	5 HA 1142	
$Su(var)^2 - 13$ R17 Su(var)^2 12 P19	Join Stomm		Su(var) 2 - 13 R07	5 HA 1142	
Su(var)2-13 K10	Isain Stamm		$Su(var)^2 - 13 R00$	<u>3-ПА-1142</u> haida	
Su(var)2-15 K19	kein Stamm		$Su(var)2-15_R09$	beide	
Su(var)2-13_R20	kein Stamm	<b>G</b>	$Su(var)2-13$ _R/0	beide	
Su(var)2-13_R21	5-HA-1257	Su+	$Su(var)2-13$ _R/1	5-HA-1142	
Su(var)2-13_R22	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R72	5-HA-1142	
<i>Su(var)2-13</i> _R23	5-HA-1142	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R73	5-HA-1142	
<i>Su(var)2-13</i> _R24	kein Stamm		<i>Su(var)2-13</i> _R74	5-HA-1142	
<i>Su(var)2-13</i> _R25	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R75	5-HA-1142	
<i>Su(var)2-13</i> _R26	kein Stamm		<i>Su(var)2-13</i> _R76	beide	
<i>Su(var)2-13</i> _R27	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R77	beide	
Su(var)2-13_R28	5-HA-1142	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R78	beide	
Su(var)2-13_R29	5-HA-1142	Su	Su(var)2-13_R79	beide	
Su(var)2-13 R30	kein Stamm		Su(var)2-13 R80	beide	
Su(var)2-13 R31	5-HA-1142		Su(var)2-13 R81	5-HA-1257	
Su(var)2-13 R32	5-HA-1142		Su(var)2-13 R82	beide	
Su(var)2-13 R33	Beide		Su(var)2-13 R83	beide	
Su(var)2-13 R34	Beide		Su(var)2-13 R84	beide	
Su(var)2-13 R35	Beide		Su(var)2-13 R85	beide	
$Su(var)^{2-13}$ R36	Beide		$Su(var)^{2-13}$ R86	beide	
$Su(var)^2 - 13$ R37	5-HA-1142		$Su(var)^{2-13}$ R87	beide	
$Su(var)^2 - 13$ R38	Beide		$Su(var)^2 - 13 R88$	beide	
$Su(var)^2 - 13 R_{30}$	5-HA-1142		$Su(var)^2 - 13 R80$	beide	
$Su(var)^2 - 13 R3^3$	5 HA 1142		$Su(var)^2 - 13 R0^2$	5 HA 1142	
$Su(var)^{2-13}$ R40	5 UA 1142		Su(var) 2 - 13 R 90	5 HA 1142	
$Su(var)^2 - 13$ R41 Su(var)^2 12 P42	5 UA 1142		Su(var) 2 - 13 R 91 Su(var) 2 12 R 92	5 HA 1142	
$Su(var)2-15_K42$	<u>Э-ПА-1142</u> Daida		$Su(var)2-13_R92$	5-ПА-1142 5-ЦА-1142	
$\frac{Su(var)2-13}{Su(var)^2-13}$	Belde		Su(var)2-13_K95	<u>3-пА-1142</u>	
Su(var)2-13_K44	5-HA-125/		Su(var)2-13_K94	Deide	
Su(var)2-13_R45	5-HA-1142		Su(var)2-13_R95	<u>5-нА-1257</u>	
Su(var)2-13_R46	Beide		Su(var)2-13_R96	kein Stamm	
Su(var)2-13_R47	Beide		Su(var)2-13_R97	kein Stamm	
<i>Su(var)2-13</i> _R48	Beide		Su(var)2-13_R98	kein Stamm	
<i>Su(var)2-13</i> _R49	5-HA-1257		<i>Su(var)2-13</i> _R99	kein Stamm	
<i>Su(var)2-13</i> _R50	5-HA-1257		Su(var)2-13 R100	5-HA-1257	

 Tabelle 7.5: Crossoverchromosomen, die in Su(var)2-13/5-HA-1142 + 5-HA-1257 Heterozygoten isoliert wurden.



**Abbildung 7.9:** SNP-Crossoverkartierung von 58 Crossoverchromosomen, die in Su(var)2-13/5-HA-1142 + 5-HA-1257 heterozygoten Weibchen isoliert wurden. Für die SNP-Analysen zur Kartierung des Crossoverereignisses von R73 und R81 war der Vorrat an genomischer DNA nicht ausreichend. vgl. Abbildung 7.1

# 7.2.7 Region 30E4-31D7

Rekombinante	P-Element	Su/	Rekombinante	P-Element	Su/
		Su+			Su+
Su(var)2-13 R1	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R51	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R2	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R52	5-HA-1257	Su+
<i>Su(var)2-13</i> R3	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R53	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R4	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R54	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R5	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R55	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R6	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R56	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R7	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R57	5-HA-5061	Su
<i>Su(var)2-13</i> R8	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R58	5-HA-5061	Su
Su(var)2-13 R9	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R59	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R10	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R60	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R11	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R61	5-HA-5061	Su
Su(var)2-13 R12	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R62	5-HA-5061	Su
Su(var)2-13 R13	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R63	5-HA-5061	Su
Su(var)2-13 R14	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R64	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R15	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R65	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R16	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R66	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R17	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R67	beide	Su+
Su(var)2-13 R18	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R68	5-HA-5061	Su
Su(var)2-13 R19	5-HA-5061	Su	Su(var)2-13 R69	beide	Su+
Su(var)2-13 R20	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R70	5-HA-5061	Su
Su(var)2-13 R21	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R71	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R22	kein Stamm		Su(var)2-13 R72	5-HA-5061	Su
Su(var)2-13 R23	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R73	5-HA-5061	Su
Su(var)2-13 R24	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13 R74	5-HA-1257	Su+
Su(var)2-13 R25	Beide		Su(var)2-13 R75	5-HA-5061	
<i>Su(var)2-13</i> R26	5-HA-5061	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R76	5-HA-5061	Su
<i>Su(var)2-13</i> R27	Beide	Su+	Su(var)2-13_R77	5-HA-1257	Su+
<i>Su(var)2-13</i> R28	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R78	5-HA-5061	Su
Su(var)2-13_R29	5-HA-1257	Su+	Su(var)2-13_R79	5-HA-1257	
Su(var)2-13_R30	Beide	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R80	kein Stamm	
<i>Su(var)2-13</i> _R31	5-HA-5061	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R81	beide	Su
<i>Su(var)2-13</i> _R32	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R82	5-HA-5061	
<i>Su(var)2-13</i> _R33	5-HA-5061	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R83	5-HA-5061	Su
<i>Su(var)2-13</i> _R34	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R84	5-HA-5061	Su
<i>Su(var)2-13</i> _R35	5-HA-5061	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R85	5-HA-1257	Su+
<i>Su(var)2-13</i> _R36	5-HA-5061	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R86	5-HA-1257	
<i>Su(var)2-13</i> _R37	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R87	5-HA-5061	Su
<i>Su(var)2-13</i> _R38	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R88	5-HA-1257	
<i>Su(var)2-13</i> _R39	5-HA-5061	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R89	5-HA-5061	
<i>Su(var)2-13</i> _R40	5-HA-1257	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R90	kein Stamm	
<i>Su(var)2-13</i> _R41	5-HA-5061	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R91	5-HA-1257	Su+
<i>Su(var)2-13</i> _R42	Beide	Su+	<i>Su(var)2-13</i> _R92	5-HA-5061	Su
<i>Su(var)2-13</i> _R43	5-HA-5061	Su	<i>Su(var)2-13</i> _R93	5-HA-5061	Su
<i>Su(var)2-13</i> _R44	Beide	Su+			
<i>Su(var)2-13</i> _R45	5-HA-5061	Su			
<i>Su(var)2-13</i> _R46	Beide				
<i>Su(var)2-13</i> _R47	5-HA-5061	Su			
<i>Su(var)2-13</i> _R48	5-HA-1257	Su+			
Su(var)2-13_R49	5-HA-1257	Su+			
<i>Su(var)2-13</i> _R50	5-HA-1257	Su+			

**Tabelle 7.6:** Crossoverchromosomen, die in *Su(var)2-13/5-HA-1257 + 5-HA-5061* Heterozygoten isoliert wurden.

### 7.3 Kartierung von *Su(var)3-4*

15011011	i al acti.				
Rekombinante	P-Element	Su/	Rekombinante	P-Element	Su/
		Su+			Su+
<i>Su(var)3-4</i> _R1	5-HA-1514	Su+	<i>Su(var)3-4</i> _R7	5-HA-1514	Su+
<i>Su(var)3-4</i> _R2	5-HA-1514	Su+	<i>Su(var)3-4</i> _R8	5-HA-1872	Su
<i>Su(var)3-4</i> _R3	5-HA-1872	Su	<i>Su(var)3-4</i> _R9	5-HA-1872	Su
<i>Su(var)3-4</i> _R4	5-HA-1872	Su	<i>Su(var)3-4</i> _R10	5-HA-1872	Su
<i>Su(var)3-4</i> _R5	5-HA-1514	Su+	<i>Su(var)3-4</i> _R11	5-HA-1514	-
Su(var)3-4 R6	5-HA-1872	Su			

**Tabelle 7.7:** Crossoverchromosomen, die in Su(var)3-4/5-HA-1514 + 5-HA-1872 Heterozygoten isoliert wurden.



**Abbildung 7.10:** Su(var)3-4 liegt proximal von 5-HA-1514. Darstellung der 11 Crossoverchromosomen, die nach Kreuzung von  $Su(var)3-4^{01}$  mit der *cis*-Kombination von 5-HA-1514 und 5-HA-1872 isoliert wurden. Weil alle von 5-HA-1514 flankierten Crossoverchromosomen Su+ sind und alle von 5-HA-1872 flankierten Crossoverchromosomen Su sind, liegt die Suppressormutation von Su(var)3-4 proximal bzw. in unmittelbarer Nähe von 5-HA-1514.

#### Publikationsliste

Rudolph T, Yonezawa M, Lein S, Heidrich K, Kubicek S, Schäfer C, Phalke S, Walther M, Schmidt A, Jenuwein T, Reuter G (2007) Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell* 26: 103-115.

#### Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Prof. Dr. Gunter Reuter für die Überlassung des interessanten Themas und die stetige Hilfe bei der Durchführung genetischer Arbeiten. Außerdem möchte ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielseitige Förderung meiner Arbeit bedanken.

Dr. Pavel Tomancak und Dr. Radoslaw Ejsmont danke ich für die Nutzung der pFlyFos-Bibliothek und den Aufenthalt in Dresden, der mir ermöglichte, *in vivo* Rekombinationstechniken zur Generierung von Fusionsproteinen in Fosmid-Klonen zu erlernen.

Prof. Dr. Thomas Jenuwein und Dr. Inti Alberto De la Rosa möchte ich für die Gesamtgenom-Sequenzierung von insgesamt acht Genotypen danken. In diesem Zusammenhang danke ich auch Prof. Dr. Peter F. Stadler und Steve Hoffmann für die bioinformatische Auswertung der Sequenzdaten und die Bereitstellung dieser Ergebnisse im UCSC-Genome-Browser.

Dr. Gerd Hause und seinen technischen Angestellten danke ich für die umfangreiche Hilfestellung bei der Durchführung der elektronenmikroskopischen Analysen.

Amit Sharma und meinen Diplomandinnen Julia Weißbach und Ulrike Kröhnert danke ich für die produktive und intensive Zusammenarbeit bei der Kartierung neuer Su(var)-Mutationen. Außerdem möchte ich mich bei Sandy Mietzsch, Matthias Walther und Sandro Lein für die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Sandy Mietzsch möchte ich besonders für die Hilfe bei immunzytologischen Arbeiten danken. Hervorheben möchte ich auch die Zusammenarbeit mit Matthias Walther, der mir vielseitige Hilfestellungen bei der Bearbeitung von Su(var)2-13 geben konnte.

Claudia Nickel, Olaf Nickel, Kristina Irmler, Heiko Baisch, Stefanie Beuch, Thomas Rudolph und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Einwicklungsgenetik danke ich für das harmonische und freundschaftliche Arbeitsklima. Katrin Kittlaus, Melanie Klimm, Maria Kube und Ramona Abe danke ich außerdem für die Sequenzanalysen und die stete Bereitstellung von Fliegenmaterialien.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern dafür, dass sie meinen langen Ausbildungsweg immer begleitet haben. Ihnen, meinem Mann und meiner Familie danke ich außerdem für ihre Liebe und Unterstützung.

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit "Epigenetische Kontrolle meiotischer Rekombination und Kartierung neuer *Su(var)*-Gene in *Drosophila melanogaster*" selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Die den genutzten Werken wörtlich bzw. inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde von mir an keiner anderen wissenschaftlichen Institution vorgelegt.

Halle, den 11.07.2012

### Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name, Vorname:	Gebhardt (geb.Heidrich), Kathleen
Geburtsdaten:	17.08.1981 in Halle (Saale)
Nationalität:	deutsch
Zivilstand:	verheiratet

### Werdegang

1988-1992	Grundschule "Dorothea Erxleben" Halle
1992-2000	Südstadtgymnasium Halle-Süd; Abitur 2000
2000-2005	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-
	Wittenberg
2004-2005	Diplomarbeit: "Molekulargenetische Analyse von Mutanten der
	putativen Histondemethylase SU(VAR)3-3 in Drosophila
	melanogaster" am Institut für Genetik der Martin-Luther-
	Universität Halle-Wittenberg
2005-2006	vier Monate Praktikum an der UCD, Dublin
2006-2012	Promotionsstudium am Institut für Genetik der Martin-Luther-
	Universität Halle-Wittenberg