

**Molekulare und histologische
Charakterisierung der
Neurodegenerations–Mutante *Vam* in
*Drosophila melanogaster***

Dissertation zur Erlangung des Doktgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer .nat.) der naturwissenschaftlichen
Fakultät III – Biologie und
Vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von:

Heiko Stephan Walch

aus Roding Opf..

2001

Promotionsgesuch eingereicht am :.....

Die Arbeit wurde angeleitet von : Prof. Dr. Stephan Schnewly

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender :.....

1.Prüfer (1. Gutachter) :.....

2.Prüfer (2. Gutachter) :.....

3.Prüfer :.....

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	2
1.1 Der Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>.....	2
1.1.1 Das visuelle System von <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.1.1.1 Das Komplexauge.....	4
1.1.1.2 Die optischen Neuropile.....	5
1.1.2 <i>Vam</i> – Eine strukturelle, nervensystemspezifische Mutation.....	8
1.2 Genome und ihre Annotation.....	10
1.3 Die Transkriptions-Regulation in Eukaryoten.....	13
1.3.1 Der Core-Promotor.....	13
1.3.2 Enhancer, Repressor und Boundary-Element.....	16
1.3.2.1 Enhancer und Silencer können promotorspezifisch wirken.....	16
1.3.2.2 DNA-Schleifen und der Mediator-Komplex.....	18
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Organismen.....	22
2.1.1 Fliegenstämme.....	22
2.1.1.1 <i>Vam</i> -Rekombinationsstämme.....	23
2.1.2 Bakterienstämme.....	23
2.2 Molekulare Methoden.....	23
2.2.1 Molekulare Standardmethoden.....	23
2.2.2 Vektoren	23
2.2.3 Primer.....	23
2.2.4 Klonierung des <i>Vam</i> -Bereichs aus <i>Vam</i> ^{KS74} Fliegen.....	24
2.2.5 RT-PCR.....	25
2.2.6 Sequenzierungen.....	26
2.2.7 Keimbahntransformation von <i>Drosophila melanogaster</i>	26
2.3 Histologische Methoden.....	26
2.3.1 Paraffinschnitte.....	26
2.3.2 Kryostatschnitte.....	27
2.3.3 Semidünn- und Ultradünnschnitte.....	27
2.4 Röntgenmutagenese.....	27
2.4.1 Bestrahlungs- und Kreuzungsprotokoll für Röntgenmutagenese	27
2.5 Computer-Programme.....	28

3 Ergebnisse und Diskussion.....	30
3.1 Charakterisierung des <i>Vam</i> -Phänotyps.....	30
3.1.1 Der <i>Vam</i> -Phänotyp.....	30
3.1.2 Nachweis von Zelltod im optischen System von <i>Vam</i> -Fliegen.....	32
3.1.2.1 Toluidinblau-Färbungen an Plastik Semidünnschnitten.....	33
3.1.2.2 TUNEL Färbung an Kryostatschnitten.....	34
3.1.2.3 Ultrastrukturelle Untersuchungen an <i>w Vam f</i> Fliegen.....	35
3.1.3 Einfluß der <i>Vam</i> Mutation auf verschiedene zelltypspezifische Marker im ZNS.....	37
3.1.3.1 <i>Vam</i> reprimiert alle untersuchten <i>lacZ</i> Enhancer-Trap Linien	37
3.1.3.2 <i>Vam</i> beeinflusst nicht die Expression des Glia-Markers <i>repo</i>	40
3.1.3.3 Eine mögliche Funktion des <i>Vam</i> -Genprodukts.....	41
3.2 Molekulare Identifizierung des <i>Vam</i> Gens.....	42
3.2.1 Die Semidominanz des <i>Vam</i> Gens und Implikationen für dessen Identifizierung.....	42
3.2.1.1 Induktion des Phänotyps in wildtypischen Fliegen.....	43
3.2.1.2 Reversion des Phänotyps durch Ausschalten des defekten Gens.....	44
3.2.2 Keimbahntransformationen.....	44
3.2.2.1 PC3-G- β 13F.....	45
3.2.2.2 PC3-UBL3.....	45
3.2.2.3 PC3-Genie.....	46
3.2.2.4 Diskussion der P-Element Transformationsexperimente.....	47
3.2.3 Die Transkripte der <i>Vam</i> -Region.....	48
3.2.3.1 <i>D-myb</i> und <i>G-β</i>	49
3.2.3.2 Das <i>Drosophila</i> UBL3.....	49
3.2.3.3 CG15914.....	52
3.2.3.4 ATP & Untereinheit	63
3.2.3.5 CG8578.....	63
3.2.4 Röntgeninduzierte Revertanten der <i>Vam</i> -Mutation.....	63
3.2.4.1 Experimentelle Durchführung der Röntgenmutagenese.....	64
3.2.4.2 Neue Röntgeninduzierte X-Chromosomale Defizienzen.....	66
4 Zusammenfassung und Ausblick.....	70
4.1 CG15914 ist <i>Vam</i>	70
4.2 VISTA – Eine neue Genfamilie.....	71
4.2.1 Mögliche Funktionen der VISTA – Proteine.....	71

5 Anhang.....	74
5.1 Sequenzen.....	74
5.1.1 human_con.....	74
5.1.2 xeno_con.....	74
5.1.3 mus_con1.....	75
5.1.4 mus_con2.....	75
5.1.5 Ergänzungen zu bestehenden Genbank Einträgen.....	75
5.2 Vektor und Restriktions-Karten.....	76
5.2.1 Die 18 kb des <i>V_{am}</i> -Bereichs.....	76
5.2.2 PSNE.....	76
5.2.3 p{CoSpeR-3}.....	77
6 Quellenangaben.....	80
7 Abbildungsverzeichnis.....	88
8 Dank.....	89

There is a theory that states: "If anyone finds out what the universe is for it will disappear and be replaced by something more bizarrely inexplicable." There is another theory that states: "This has already happened."
Douglas Adams (1952 – Apr. 2001)

EINLEITUNG

1 Einleitung

Mehr oder weniger reflektiert füllen BSE, Creutzfeld-Jakob, Alzheimer, Parkinson und viele andere degenerative Nervensystem-Erkrankungen die Schlagzeilen der Medien. Und in einer hochtechnisierten, zigfach abgesicherten und kontrollierten Welt müssen wir erkennen, daß die Funktionsweise des menschliche Gehirns in vielen Bereichen noch zur „*Terra Incognita*“, zum unbekannten Territorium gehört. Und das bereitet Unbehagen. Mögen die Chancen noch so gering, wenn überhaupt vorhanden sein sich mit BSE zu infizieren, der Verlauf dieser und vieler anderer neuronaler Krankheiten geht an die Substanz. Tödlich sind viele Krankheiten, aber der Verlauf von neurodegenerativen Krankheiten, die häufig einhergehende Einbuße der kognitiven Fähigkeiten, der scheinbare Verlust dessen, was einen Menschen ausmacht, läßt die Betroffenen und ihr soziales Umfeld meist in Hilflosigkeit zurück. Die Antworten sind rar, der Druck auf die Forschung groß. Die Erforschung von Neurodegenerations-Mutanten bei *Drosophila*, wie z.B. *Vam*, wird höchstwahrscheinlich nicht in der Entwicklung eines Anti-Alzheimer Medikamentes münden. Aber wir wissen inzwischen, daß wir mit den Fliegen auf molekularer Ebene wohl mehr Gemeinsamkeiten als Divergenzen haben. Grundlagenforschung an relativ einfachen und überschaubaren Modellorganismen scheint mir die einzige Möglichkeit auch die Funktionen im menschlichen Gehirn besser zu verstehen.

Ein biologischer Modellorganismus sollte zwei Grundvoraussetzungen erfüllen. Im Vergleich zum eigentlich interessierenden Organismus, letztendlich meistens dem Menschen, muß er einen möglichst guten Zugriff auf das zu untersuchende Problem offerieren. Trotz aller Vereinfachung muß neben einer guten experimentellen Handhabbarkeit gewährleistet sein, daß eine höchstmögliche Übertragbarkeit der gewonnen Erkenntnisse erhalten bleibt. Somit stellt die Auswahl eines geeigneten Modells für eine bestimmte Fragestellung immer eine Gratwanderung zwischen diesen beiden sich eigentlich ausschließenden Forderungen dar.

1.1 Der Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Ungeachtet der vielen biologischen Sonderlösungen und Eigenarten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und der damit eingebüßten Allgemeingültigkeit von erworbenem Wissen kann man doch eines klar feststellen: Seit Thomas Hunt Morgan 1915 durch die Publikation seiner Versuche zur Vererbungslehre in „*The Mechanisms of Mendelian Heredity*“ den Grundstein gelegt hat, erfreut sich die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* einer wachsenden Beliebtheit als Modell. Kaum ein anderer Organismus wurde zur Beantwortung von so vielen unterschied-

lichen, jeweils zur Zeit aktuellen, biologischen Fragestellungen eingesetzt. Dies beginnt Ende des 19. Jahrhunderts mit den bereits erwähnten Arbeiten zur Vererbungslehre von Thomas Morgan, die er in „The Theory of the Gene“ 1926 zusammenfaßte und für die er 1933 den Medizin-Nobelpreis erhielt. 1946 ging die gleiche Auszeichnung an Morgans Schüler Hermann Joseph Muller für seine Arbeiten zur Auswirkung von Röntgenstrahlen auf das Erbgut der Fruchtfliegen (Muller 1927). Damit konnten erstmalig Mutationen in großer Anzahl generiert und für die Forschungsarbeit eingesetzt werden (z.B. in Lindsley et al. 1972). Auch der Schritt weg von der klassischen Kreuzungsgenetik, hin zu molekularen biochemischen Fragestellungen, konnte mit *Drosophila melanogaster* äußerst erfolgreich vollzogen werden. 1980 führten Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus als erste eine genom-weite gesättigte Mutagenese durch, um neue Gene zu finden, die für die Embryonalentwicklung relevant sind. Dieser Ansatz wurde mit großem Erfolg und erstmalig bei mehrzelligen Organismen angewandt. So erfolgreich, daß sie zusammen mit Edward Lewis 1995 den Nobelpreis für ihre Arbeiten zur Embryonalentwicklung und Segmentation bei *Drosophila melanogaster* erhielten. In ihren Arbeiten konnten sie zeigen, daß neben den Homeobox-Genen auch viele andere der regulatorischen Bausteine und der damit verbundenen Entwicklungsmechanismen von *Drosophila* in ähnlicher Form auch im Menschen vorhanden sind. Häufig können mutante *Drosophila*-Fliegen durch das Einbringen und die Fremdexpression des betroffenen humanen Homologs gerettet werden. Der letzte spektakuläre Erfolg für die *Drosophila*-Forschung war im Frühjahr 2000 die Bekanntgabe, daß der euchromatische Anteil des Genoms von *Drosophila melanogaster* durchsequenziert sei (Adams et al. 2000).

Die zur Verfügung stehenden genomischen Daten sind mit Sicherheit von ähnlicher fundamentaler Bedeutung wie die Entdeckung der Restriktionsenzyme oder die Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis & Faloona 1987). Aber analog zu diesen Meilensteinen und inzwischen unverzichtbaren Methoden der Molekularbiologie sind auch die Sequenzdaten, gleich welcher Organismus, als wissenschaftliche Erkenntnis an sich nur von kurzzeitiger Bedeutung. Aber sie geben der Forschung ein neues Werkzeug zur Hand, dessen Potential noch nicht ansatzweise erschöpft ist. Ein Werkzeug um andere interessante Probleme neu zu beleuchten und über die Organismengrenzen hinweg neue Vergleiche anstellen zu können.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Struktur und der Funktion des Nervensystems von *Drosophila melanogaster*, im speziellen auf einem Fliegenstamm, der innerhalb des optischen Systems sowohl histologische als auch funktionelle Defekte aufweist. Um später die Terminologie und die Topologie dieses Gehirn-Bereichs verwenden zu können, soll im folgenden das optische System der Fruchtfliegen soweit nötig erörtert werden.

1.1.1 Das visuelle System von *Drosophila melanogaster*

Die optischen Loben nehmen den größten Teil des zentralen Nervensystems ein und betonen so rein anteilmäßig die Relevanz und die Komplexität des optischen Inputs. Zugleich stellen sie den Bereich höchster histologischer Ordnung innerhalb des Nervensystems der Fruchtfliegen dar. Dieser hoher Grad an Organisation und Ordnung der optischen Neuropile leitet sich aus den vorgeschalteten, geometrisch präzisen Komplexaugen der Fliegen ab. Deren Komplexität und Ordnung wiederum ist eine physikalische Grundvoraussetzung, um aus einem vielzelligen Mosaik an Farb- und Intensitätswerten ein kohärentes Abbild der Umwelt zu erhalten. Das formgebende Element dieser Kette sind schließlich die ebenfalls exakt ausgerichteten Rezeptorzellen der einzelnen Omatidien. Deren Axone bilden die Grundstruktur des gesamten optischen Systems, welches im folgenden ausführlicher beschrieben wird.

1.1.1.1 Das Komplexauge

Das adulte Komplexauge von *Drosophila melanogaster* besteht aus ca. 750 gleichmäßig hexagonal angeordneten Facetten. Die Cornea, der äußere Abschluß eines Einzelauges oder *Omatidiums*, wird als durchsichtige chitinhaltige Substanz von den vier Kegelzellen und den zwei primären Pigmentzellen sezerniert. Aufgrund ihrer bikonvexen Form wirkt die Cornea zusammen mit der sogenannten Pseudocornea für die darunterliegenden acht Photorezeptoren als Sammellinse. Ein Omatidium einer adulten Fliege stellt die kleinste sich wiederholende Einheit im Aufbau des Komplexauges dar. Dieses

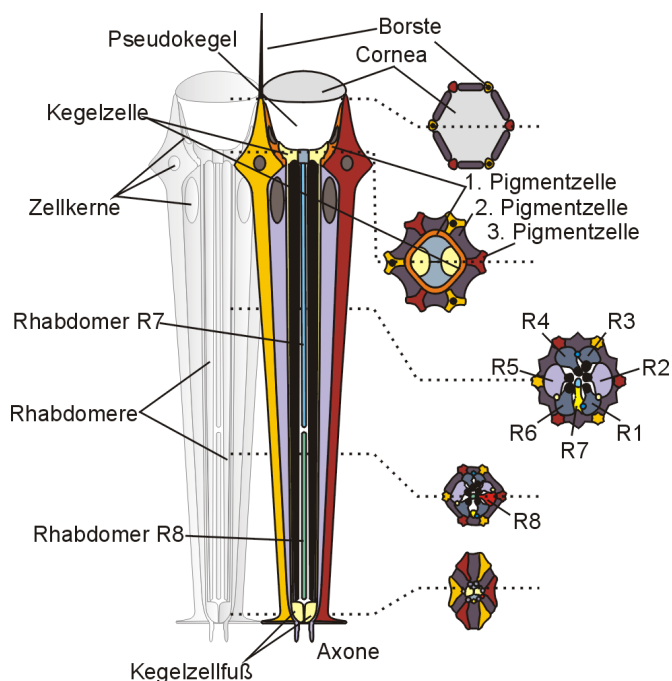


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Omatidiums

Diese Abbildung zeigt schematisch einen Längsschnitt und mehrere Querschnitte durch verschiedene Ebenen eines Omatidiums. (modifiziert nach Wolff in Bate & Arias 1993)

Einzelauge besteht aus dem präzisen Zusammenschluß von je 8 Photorezeptoren (R1-R8) mit unterschiedlichen Wirkungsspektren und Aufgaben und 11 weiteren Zellen, die keine photorezeptiven Aufgaben haben (siehe Abbildung 1). Der palisadenartige Aufbau eines Auges erklärt sich durch die Entstehung aus einer monoepithelialen Zellschicht. Proximal zur sog. „*fenestrated membrane*“, die den eigentlichen Abschluß des *Omatidiums* zum nachgeschalteten und Signal verarbeitenden optischen Lobus bildet, beginnen die optischen Neuropile.

1.1.1.2 Die optischen Neuropile

Im adulten ZNS von *Drosophila melanogaster* werden drei optische Neuropile unterschieden: die direkt proximal an die Retina anschließende *Lamina ganglionaris* (im folgenden Lamina), die nachfolgende *Medulla ganglionaris* (im folgenden Medulla) und letztlich der Lobularkomplex. Abweichend zu anderen Ordnungen innerhalb der Insekten wird letzterer bei den Dipteren in eine anteriore Lobula und eine posteriore Lobulaplatte unterteilt. Wie generell bei Neuropilen besteht deren Inneres nur aus Nervenfortsätzen, Synapsen und vereinzelt Gliazellen. Die gesamten neuronalen Somata sind zusammen mit weiteren Gliazellen im umgebenden Zellkortex angeordnet. Vor allem durch verschiedene zelltypspezifische Enhancer-Trap Linien konnten bei *Drosophila melanogaster* viele der Zellen identifiziert und charakterisiert werden.

a) Die Lamina

Wie das Komplexauge ist auch das erste optische Neuropil modular organisiert. Die einzelnen Module werden als *Cartridge* bezeichnet und setzen sich aus je 5 neuronalen Zellen, verschiedenen Gliazellen und den Termini der Photorezeptoren R1-R6 zusammen (zusammengefaßt in Meinertzhagen & O'Neil 1991; Straußfeld 1976). Die Axone von R7 und R8 terminieren erst in der Medulla. Alle neuronalen Superpositionsäugen sind dadurch gekennzeichnet, daß die von einem *Omatidium* stammenden Rezeptoraxone nicht innerhalb der selben Laminacartridge terminieren. Vielmehr werden Axone von benachbarten Einzelaugen, die entlang der gleichen optischen Achse blicken, auf eine *Cartridge* verschaltet. Dadurch ist gewährleistet, daß innerhalb jedes Moduls 6 Axone terminieren und so eine erste Aufsummierung der eingehenden Signale erreicht werden kann. Anatomisch führt dies dazu, daß sich die Axone von R1-R6 eines *Omatidiums* nach dem Austritt aus der Retina innerhalb des Laminakortex um 180° verdrillen und in verschiedenen Säulen terminieren. So enthält jede Säule für sich wieder Termini von 6 Photorezeptoraxonen. Zusammen mit den Axonen von R7 und R8 ziehen die Fortsätze der Laminamonomolarzellen L1-5 weiter über das äußere optische Chiasma in die Medulla.

Histologisch kann die Lamina von außen nach innen in drei Bereiche unterteilt werden, die sich aus jeweils spezifischen Zellpopulationen zusammensetzen. Direkt unterhalb der Retina befindet sich die Fensterschicht. Dieser Bereich beinhaltet neben vielen Tracheen zwei prominente Gliazelltypen. Zum einen die Fensterglia, die durch ihre sehr langgestreckte Zellmorphologie gut identifizierbar ist und zum anderen die *pseudocartridge* Glia, die nur vereinzelt vorkommt und auffallend große Zellkerne besitzt. Die Zellfortsätze der *pseudocartridge* Glia dringen auch in den der Fensterschicht folgenden Bereich, dem Laminakortex, ein.

Innerhalb des Laminakortex sind alle neuronalen Somata der Laminaneurone und einige Gliazelltypen lokalisiert (Neurone siehe Fischbach & Ditrich 1989; Glia siehe Saint Marie & Carlson 1983). Der proximalen Satellitenglia wird eine Rolle bei der Nährstoffversorgung der Laminamonopolarzellen zugeschrieben (Saint Marie & Carlson 1983) und die distale Satellitenglia bildet histologisch den Abschluß des Zellkortex hin zum proximal gelegenen Laminaneuropil.

Wie alle Neuropile ist auch das der Lamina frei von jeglichen neuronalen Somata (vgl. Abbildung 2). Neben den Zellfortsätzen von R7 und R8, denen der Laminamonopolarzellen, sowie denen einiger weiterer Neurone kommen dort als Zellkörper nur die der Epithelial- und der Marginalgia vor (Meinertzhagen & O'Neil 1991; Saint Marie & Carlson 1983).

b) Die Medulla

Die Axone von R7 und R8 wechseln, während sie von der Lamina in die Medulla projizieren, die Seite. Dadurch entsteht eine abermalige Verdrillung der Zellfortsätze, das äußere optische Chiasma. Dabei wachsen die Zellfortsätze der Rezeptorzellen während der Entwicklung nicht über Kreuz, sondern die gesamte Lamina verdreht sich gegen die Medulla. Am histologisch gut erkennbaren Kreuzungspunkt befinden sich die Zellkörper der Riesenglia. Analog zur Lamina ist auch die Medulla in einen Zellkortex und einen Neuropilbereich unterteilt. (Fischbach & Ditrich 1989; vgl. Abbildung 2).

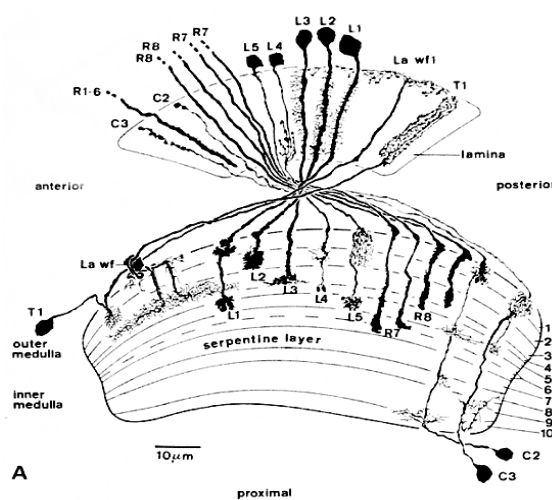


Abbildung 2: Neuronale Zelltypen der Lamina und Medulla

Abbildung aus Fischbach & Dittrich 1989. In diesem Bild sind die Neurontypen, deren Position und ihr jeweiliges Arborisierungsmuster gut zu erkennen. Den Hauptteil der Nervenfortsätze innerhalb der Lamina stellen die Photorezeptoren, deren Termini in engem Kontakt zu den Laminamonopolarzellen stehen (hier nicht gezeigt). Die T1 Zelle, deren Soma zum Medullakortex gehört verzweigt sowohl in der Lamina als auch der Medulla. Die einzigen Zelltypen, die sowohl in der proximalen Medulla, als auch in der Lamina verzweigen, sind die Neurone C3 und C2. Gut zu erkennen ist auch, daß die gezeigten Axone von R7 und R8 anterior beginnen, dann über das optische Chiasma kreuzen und posterior in der Medulla terminieren.

Bisher ist die gesamte vorgestellte Aufteilung nur histologischer Natur und gibt kaum Aufschluß über Funktionszusammenhänge. Unabhängig von der funktionellen Basis gibt die strenge geometrische Architektur des optischen Systems dem neurobiologisch Interessierten ein hervorragendes Werkzeug zur Hand, um die Mechanismen und letztendlich auch die Funktionalität der am Aufbau dieses Systems beteiligten Komponenten zu ergründen.

Hervorragend demonstriert wurde dies unter anderem bei der Aufklärung des *sevenless* Signaltransduktionswegs. Der Photorezeptor R7 ist der letzte der acht Rezeptoren, der aus dem Zellverband der embryonalen Augenscheibe ausdifferenziert. Wegen der UV-Sensitivität ließen sich Fliegen ohne R7 aufgrund ihrer UV-Blindheit leicht ausselektionieren. Der molekulare Defekt der Verhaltensmutante *sevenless* konnte auf einen für R7 spezifischen Rezeptor zurückgeführt werden (Basler & Hafen 1989; Simon et al. 1989). Die klare Struktur des Komplexauges und damit verbunden die leichte Identifizierung der R7 Zellen ermöglichte es nun die Interaktionspartner des Rezeptors zu finden. Dieser einfache Ansatz führte nicht nur zu einem inzwischen fundierten Modell der *sevenless* Signalkaskade, sondern zu weitreichenden Erkenntnissen von Rezeptor-Signalkaskaden generell (zusammengefaßt in Yamamoto 1994).

Die klare Struktur des optischen Systems ist auch der Grund warum in zunehmenden Maße *Drosophila* als Modellorganismus für neurodegenerative Erkrankungen herangezogen wird. Nicht um die neurodegenerativen Effekte, die die Krankheiten haben, nachzubilden, dazu wären die Systeme Mensch und Fliege wohl doch zu verschieden, sondern weil im Fliegenmodell bereits kleine Veränderungen gut verfolgt werden können. Da viele neuronale Bausteine zwischen

Fliegen und Menschen zumindest funktionsanalog sind, können so Wechselwirkungen mit anderen Zelltypen oder Genen gut untersucht werden (vgl. Feany & Bender 2000; Fernandez-Funez et al. 2000).

Eine Störung des Systems sind z.B. die in dieser Arbeit beschriebenen Löcher in Lamina und Medulla. Es steht kaum anzunehmen, daß *in vivo* im optischen System der Fliegen Löcher vorhanden sind. Wahrscheinlich entstehen diese erst sekundär bei den verschiedenen Wasch- und Fixierungsschritten, oder beim Schneiden der Fliegenköpfe. Aber sie sind im Wildtyp nicht vorhanden und somit ist dieser histologische Befund ein Indiz dafür, daß ein oder mehrere Prozesse innerhalb des optischen Systems derangiert sind. Eine Aufklärung der *Vam*-Mutation wird somit das Verständnis der Neuron- und oder Glia-Funktion im optischen System von *Drosophila melanogaster* erweitern.

1.1.2 *Vam* – Eine strukturelle, nervensystemspezifische Mutation

Der Fliegenstamm *Vam* (**VA**cuolar **Me**dulla) entstammt einer EMS-Mutagenese (**E**thyl-**M**ethano-**S**ulfonat), bei der die entstandenen Mutanten auf strukturelle Defekte innerhalb des Nervensystems von adulten Fliegen untersucht wurden (Heisenberg & Böhl 1978). Als mutagenes Agens wurde EMS zuerst 1968 von Lewis und Bacher angewendet (Lewis & Bacher 1968). Wegen der leichten Applikation als Futterbeigabe, seiner für die Fliegen geringen Toxizität und der hohen mutagenen Wirkung ist EMS seitdem eines der meist verwendeten Mutagene der

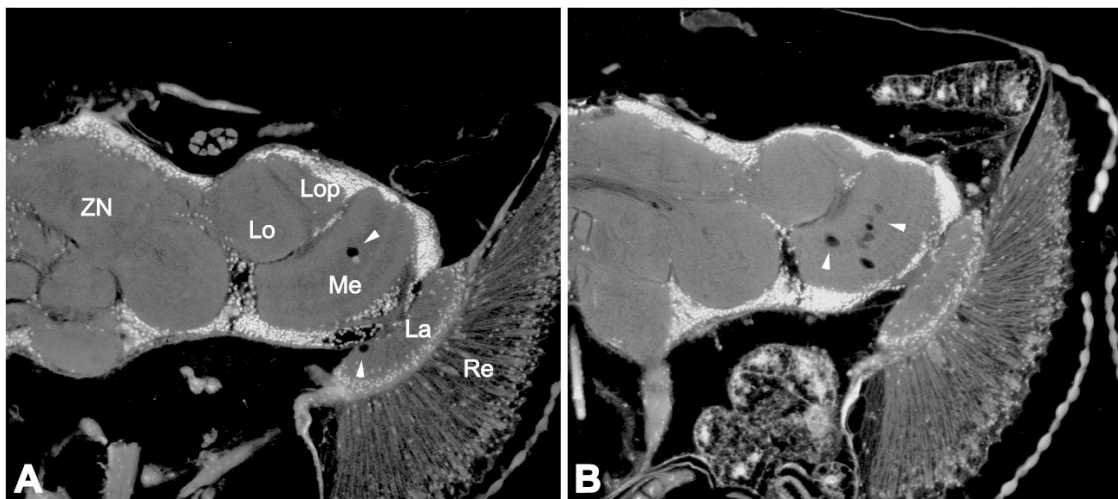


Abbildung 3: Der *Vam*-Phänotyp

Autofluoreszenzaufnahmen von zwei horizontalen Paraffinschnitten durch einen Kopf einer *Vam*^{K574} Fliege. In **A** ist ein 7 Tage altes heterozygoten Weibchen und in **B** ein gleichaltriges hemizygoten Männchen gezeigt. Die Vakuolen sind durch weiße Pfeilspitzen markiert. **Re**: Retina; **La**: Lamina; **Me**: Medulla; **Lop**: Lobulaplatte; **Lo**: Lobula; **ZN**: Zentralhirn

Drosophila-forschung. Durch den alkylierenden Effekt von EMS kommt es vornehmlich zu einer Fehlpaarung von O⁶-Alkyl-Guanidin mit Thymidin und folglich zu einer GC- zu AT-Transition im nachfolgenden DNA-Replikationszyklus (Snow et al. 1987). In weitaus geringerem Maße sind jedoch auch Transitionen von AT zu GC (O⁴-Ethyl-Thymidin Bildung und Paarung mit Guanidin) und kleinere Chromosomenaberrationen, hauptsächlich kurze Deletionen beschrieben (siehe Ashburner 1989a). Der für den Phänotyp verantwortliche Defekt ist somit höchstwahrscheinlich eine Punktmutation, die zu einem neomorphen Genprodukt führt. Die Mutation im Ursprungstamm *Vam*^{KS74} ist nicht letal, wodurch jedoch nicht ausgeschlossen ist, daß das Gen *Vam* an sich letal mutierbar ist (siehe auch 3.2.4.1).

Fliegen mit der X-chromosomalen Mutation *Vam* zeigen als semidominanten Phänotyp eine altersabhängige Ausbildung von Vakuolen in der Lamina und der Medulla (siehe Abbildung 3). Bereits ein mutantes *Vam*-Chromosom reicht im ansonsten genetisch wildtypischen Hintergrund aus, um zu einer Ausprägung des *Vam*-Phänotyps zu führen (Coombe & Heisenberg 1986). Die Semidominanz ergibt sich aus der Tatsache, daß hemizygoten Männchen von homozygoten Weibchen phänotypisch nicht zu unterscheiden sind, bei heterozygoten Tieren die Effekte jedoch mit leichter zeitlicher Verzögerung auftreten. Die Mutation kann also nicht durch Einbringen von Duplikationen, die den fraglichen Bereich abdecken, gerettet werden (Schleip 1997; Glück 1996). Daraus ergibt sich die Schlußfolgerung, daß es sich bei dem Ursprungsallel *Vam*^{KS74} um ein Neomorph handeln muß, welches das optische System störend beeinflusst. Sowohl eine Nullmutante als auch eine hypomorphe Mutation müßten sich durch wildtypische Kopien des Gens bzw. des gesamten Genlocus retten lassen. Dies ist vor allem für die Identifizierung des betroffenen Gens von essentieller Bedeutung (siehe auch 3.2.2.2).

Coombe und Heisenberg konnten zeigen, daß zusätzlich zur Vakuolenbildung die Lamina-monopolarzellen L2 und L5 absterben und die Fliegen kurz nach dem Schlüpfen bereits ein defektes ERG-Signal (**E**lektro**R**etino**G**ramm) aufweisen (Coombe & Heisenberg 1986).

Als diese Linie 1978 generiert wurde waren die molekulargenetischen Mittel, die zur Verfügung standen noch sehr begrenzt. Die ersten Charakterisierungen, die von Coombe und Heisenberg (Coombe & Heisenberg 1986) publiziert wurden, beschäftigen sich demzufolge vornehmlich mit der physiologischen und histologischen Beschreibung der Mutante. Die *Vam*-Mutation wurde in der Arbeit von Coombe und Heisenberg über Rekombinationskartierung zwischen *vermillion* und *forked* auf die genetische Position 50.6 +/- 1.2 eingegrenzt. Dies entspricht zytologisch in etwa dem Bereich 13E-14B auf dem X-Chromosom von *Drosophila melanogaster*. Durch weitere

Einleitung

klassisch genetische Experimente konnte gezeigt werden, daß die Mutation innerhalb des von der Defizienz Df(1)sd^{72b26} abgedeckten Bereichs liegen muß (Glück 1996). RFLP-Analysen (**R**estriktions **F**ragment **L**ängen-**P**olymorphismus) schränkten den möglichen Bereich in dem die Mutation lokalisiert sein muß, auch distal auf einen Bereich von ca. 18 kb ein (Schleip 1997; vgl. Abbildung 4).

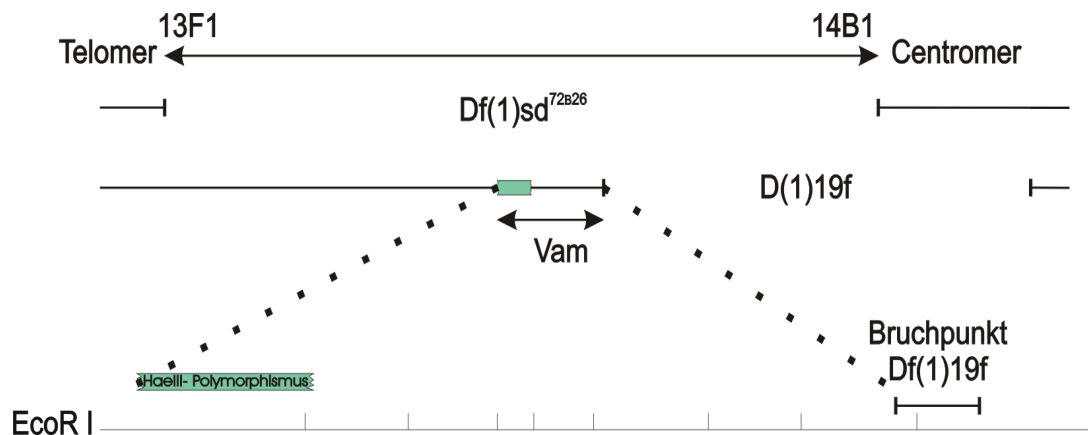


Abbildung 4: Kartierung der *Vam*-Mutation

Die *Vam*-Mutation liegt auf dem X-Chromosom im Bereich 13F/14B und wird proximal (Centromer) durch den Bruchpunkt der Defizienz Df(1)19f und distal (Telomer) durch einen HaeIII-RFLP begrenzt.

1.2 Genome und ihre Annotation

Das haploide *Drosophila* Genom besteht aus ca. $1,8 \times 10^6$ Nukleotiden. Knapp ein Drittel davon gehört zum Heterochromatin. Dieser Teil ist demzufolge, von einigen Ausnahmen abgesehen (Berghella & Dimitri 1996; Lu et al. 2000), nicht kodierend. Die Bezeichnung Heterochromatin bezieht sich abweichend von ihrer ursprünglichen histologischen Definition inzwischen auf genomische Bereiche, die, wegen ihres hohen Anteils an repetitiven Sequenzabschnitten, schwer klonier- und sequenzierbar sind (Hartl et al. 1992). Die verbleibenden 120 Megabasen Euchromatin kodieren für insgesamt gut dreizehntausend Gene (Adams et al. 2000; Myers et al. 2000).

Für einen der Protagonisten des Sequenzierprojekts, der Biotech-Firma Celera unter Leitung von Graig Venter, war das Genom der Fruchtfliegen nur ein Probedurchlauf. Dabei sollte getestet werden inwieweit sich ein WGS-Verfahren (**W**hole-**G**enomic-**S**hotgun) für das relativ große und sehr komplex organisierte Genom eines höheren Eukaryoten eignet (Weber & Myers 1997; Venter et al. 1998). Das humane Genom ist im Vergleich zu *Drosophila* in etwa um den Faktor 10 größer. Einer der visionären Aspekte, schon bei der Sequenzierung des *Drosophila*- und vor allem bei der des humanen Genoms, war die Annahme, daß die Rechenleistung der Computer ausreichen würde, um die durch das *Shotgun*-Verfahren angefallenen 14,8 Milliarden

Basen aus 27,3 Millionen Sequenzreaktionen in die richtige Reihenfolge zu bringen. Für das humane Genom benötigte allein dieser Prozeß ca. 10.000 CPU Stunden auf einem parallel arbeitenden Netz aus 40 hochleistungsfähigen Einzelrechnern (Venter et al. 2001) – zu Beginn des „*Human Genome Projects*“ im Jahr 1990 eine utopische Rechenleistung. Nicht zuletzt deswegen kam bei den öffentlichen Organisationen kein *Shotgun*-Verfahren zum Einsatz, sondern ein Prozedere, bei dem die Sequenzen bereits mehr oder minder geordnet produziert werden.

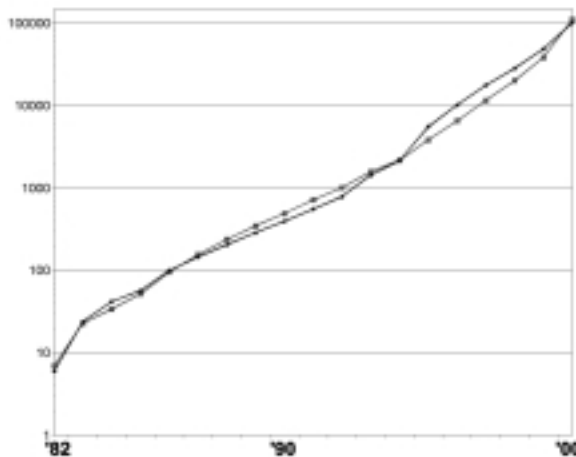


Abbildung 5: Einträge in GenBank 1982-2000

In diesem Graphen sind die publizierten Einträge in der öffentlichen Sequenzdatenbank GenBank logarithmisch aufgetragen. Der abgedeckte Zeitraum geht von 1982 bis 2000. Die blaue Kurve gibt die Anzahl der Einträge $\times 100$ und die lila Kurve die Nukleotide $\times 100000$ wieder. Dabei zeigt sich, dass über die Jahre hinweg zwar die Anzahl der veröffentlichten Sequenzen exponentiell wächst, die Basen pro Eintrag jedoch, technisch bedingt, nahezu konstant bleiben. Seit 1994 kann man grob eine Verdopplung der Sequenzdaten pro Jahr feststellen.

Inzwischen sind mehrere gut etablierte Modellorganismen durchsequenziert und aufgrund der Leistungsfähigkeit der Sequenzier-Einheiten von öffentlichen und privaten Anstalten verdoppelt sich alleine die Anzahl der in GenBank (URL 9) veröffentlichten Sequenzen pro Jahr (siehe Abbildung 5). Dabei bleiben viele Daten, die von pharmazeutischen Unternehmen produziert werden, noch unberücksichtigt, da Firmen inzwischen häufig in Eigenregie für sie interessante Modellorganismen sequenzieren, ohne die Daten zu publizieren.

Die Information über die lineare Abfolge der Nukleotide bildet das Grundgerüst, aber die eigentlich interessante Aussage, wo sind welche Gene lokalisiert, bleibt dabei zunächst

noch unberührt. Erst ein weiterer, ebenso rechenintensiver Vergleich mit bekannten cDNAs und deren Lokalisation, sowie das Aufspüren neuer bis dato unbekannter Gene, ermöglicht Rückschlüsse über die Organisation des Genoms. Die fertige Annotation, also die Lokalisation bekannter und die Vorhersage neuer Gene, wird von ausgeklügelten Programmen und Algorithmen vorgenommen.

Vor allem das Erkennen eines Genlocus *de novo*, seines Promotors und der zugehörigen Exon/Intron-Strukturen ist eine der Hauptschwierigkeiten bei der Annotation. Entsprechend schwanken die Vorhersagen für die beim Menschen tatsächlich vorhandenen Gene zwischen 142.634 (Dickson 1999) und knapp 27.000 (Venter et al. 2001). Die erste Schätzung beruht auf

teilweise nicht veröffentlichten cDNA- und EST-Daten, die zweite auf den öffentlich zugänglichen cDNA-Sequenzen und der anhand von genomischen Sequenzen neu prognostizierten Genen.

Die Festlegung eines DNA-Abschnitts als Gen ist als eindeutig definiert, sobald für diesen Bereich eine entsprechende cDNA vorliegt. Die Neu-Annotation eines Gens aufgrund von Homologien und Konsensussequenzen ist im Gegensatz dazu stark von den Kriterien abhängig, ab denen ein Bereich als Gen definiert wird. Im Falle der Annotation des Humangenoms heißt dies im Detail, daß zunächst ein Bereich, z.B. anhand von Konsensussequenzen, als putatives Gen gekennzeichnet wurde. Bei allen Kandidaten wurden dann die prognostizierten Exon/Intron Strukturen überprüft, ob sie folgenden Ansprüchen genügen (Venter et al. 2001):

- a. Konservierung der Exon/Intron Übergänge in 3 Maus DNA Abschnitten
- b. 1 Humane cDNA- oder EST-Homologie
- c. konservierte Bereiche zu Nager cDNAs oder ESTs
- d. Ähnlichkeiten zu anderen bekannten Proteinen

Sind mindestens zwei dieser vier Kriterien erfüllt, wird der Bereich als Gen mit Exon/Intron Struktur annotiert. Obwohl diese Kriterien durchaus sinnvoll erscheinen, ist die Zahl der derzeit annotierten Gene innerhalb des Humangenoms somit mehr oder minder willkürlich. Die Festlegung eines Sequenzabschnitts als Gen ist entsprechend definitionsabhängig und fließend, solange sie nicht durch eine cDNA experimentell bestätigt werden kann – Für die hoch technisierte und computergestützte Annotations-Maschinerie eine unlösbare Aufgabe. Jede Zelle in einem Organismus steht jedoch vor einem ähnlich gelagerten Problem.

Welcher DNA-Abschnitt kodiert für ein Protein? Wie kann eine Zelle innerhalb der Unmenge an Daten die für sie in ihrem Kontext und Entwicklungsstand relevante Information extrahieren und ihre Aufgabe im Zellverband erfüllen? Dieses Basisproblem der Genregulation, das für *Vam* eine besondere Relevanz zu haben scheint (vgl. 3.1.3), soll im folgenden kurz beleuchtet werden.

1.3 Die Transkriptions-Regulation in Eukaryoten

Anders als bei Prokaryoten, bei denen die Repression eines generell aktiven Grundzustandes den Hauptteil der Genregulation ausmacht, (zusammengefaßt in Hochschild & Dove 1998) ist bei Eukaryoten der Grundzustand eines Gens inaktiv. Promotoren können zwar eine räumliche und örtliche Spezifität der Genexpression steuern (Schwyter et al. 1995; Eichbaum et al. 1994),

aber der Expressionslevel eines typischen eukaryotischen Core-Promotors ist meist nur sehr schwach. Entsprechend werden Enhancer benötigt, die den geringen Basislevel der Transkription anheben und die Bindung der RNA-Polymerasen, zusammen mit anderen Faktoren, an den Promotor begünstigen.

Anders als in Prokaryoten gibt es in Eukaryoten drei RNA-Polymerasen. Jede für sich ist ein komplexes Gefüge aus Protein-Untereinheiten, das teilweise aus den gleichen, teilweise aus nur für die jeweilige Polymerase spezifischen Proteinen, zusammengesetzt ist. Wurden die Polymerasen früher aufgrund ihrer Anfälligkeit für α -Amanitin, der toxischen Substanz des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, unterschieden (Wieland & Faulstich 1991), stellte sich bald heraus, daß sie in der Zelle völlig unterschiedliche Genklassen transkribieren. Die RNA-Polymerase I produziert ribosomale RNAs (siehe Grummt 1999) und die RNA-Polymerase III eine Reihe kleiner stabiler RNAs, unter anderem die kleine ribosomale 5S RNA. Die proteinkodierenden Gene werden bis auf wenige Ausnahmen ausschließlich von der RNA-Polymerase II (RNAP-II) transkribiert. Der isolierte RNAP-II Komplex ist nicht in der Lage *in vitro* an den Promotor eines DNA Templates zu binden und die Polymerisation zu initiieren. Erst die Zugabe von insgesamt sechs Proteinkomplexen, den generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH, ermöglicht einen geordneten Transkriptionsstart (zusammengefaßt in Orphanides et al. 1996; Nikolov & Burley 1997).

1.3.1 Der Core-Promotor

Der Bereich von - 50 bis ca. + 50 Nukleotide bezogen auf die RNA-Transkriptionsstartstelle wird als Core-Promotor bezeichnet (Blackwood & Kadonaga 1998). Für die präzise Transkriptionsinitiation werden in wechselnden Kombinationen mindestens vier Elemente benötigt: die TATA-Box, das **TFIIB-Recognition-Element** (BRE), das **INitiatioR-Element** (Inr) und das **Downstream-Promotor-Element** (Dpe). Dabei bilden die Paare TATA-Box und BRE, sowie Inr und Dpe, jeweils eine Einheit mit eng gekoppelter Funktionalität. Je nach Konstellation dieser Motive kann man verschiedene Promotor-Typen unterscheiden: Promotoren mit TATA-Box oder mit Inr/Dpe, Promotoren mit beiden Strukturen (Composite Promotoren) und zuletzt solche, die weder TATA-Box noch Inr/Dpe aufweisen (Null-Promotoren) (Lee & Young 2000). Die TATA-Box und das Inr sind Funktionsanaloge (Smale et al. 1990) und dienen *in vivo* beide als Bindungsstellen für den 700 kD Protein-Komplex TFIID (Burke & Kadonaga 1996). Dessen Bindung definiert den Eintrittspunkt für die anderen GTFs (**Generellen Transkriptions Faktoren**) und die RNAP-II und stellt innerhalb der Regulation der Transkriptionsinitiation einen geschwin-

digkeitsbestimmenden Schritt dar (zusammengefaßt in Burley und Roeder 1996). Die Beobachtung, daß Null-Promotoren häufig mehrere Transkriptionsstartstellen aufweisen, bekräftigt die Bedeutung von TATA-Box und Inr als Fixpunkte für die Transkriptionsinitiation und ist zudem ein Hinweis auf einen ungenauen Transkriptionsstart beim Fehlen dieser Elemente (Geng & Johnson 1993; Ince & Scotto 1995).

Einen Hauptbestandteil von TFIID bildet das in seiner Proteinstruktur bisher einmalige und hochkonservierte DNA-bindende Protein TBP (**T**A**T**A-**B**ox **B**inding **P**rotein). Neben der eigentlichen Konsensussequenz der TATA-Box (TATAAAA) bindet TBP auch an andere AT-reiche Sequenzen. Daraus folgt, daß seine Bindungsspezifität für die alleinige Festlegung des Transkriptionsstarts nicht ausreichen kann (Hahn et al. 1989; Cormack et al. 1992). Shen und Green (Shen & Green 1997) konnten zeigen, daß weitere Bestandteile von TFIID, die sogenannten TAFs (**T**BP-**A**ssociated **F**actors), die Sequenzbereiche in unmittelbarer Umgebung des TATA-Motivs erkennen und so eine Feinjustierung der TBP-Bindungsaktivität vornehmen können. Eine ähnlich Funktion kann auch der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors TFIIB zugesprochen werden (BRE Konsensussequenz: SSRCGCC), die direkt oberhalb der TATA-Box liegt und ebenfalls die Transkriptionsinitiation begünstigt (Lagrange et al. 1998; Wollner & Gralla 2001). Bei Promotoren ohne TATA-Box wird die Feinabstimmung des Transkriptionsstarts durch die Inr/Dpe-Bereiche vorgenommen (zusammengefaßt in Smale 1997). Das Initiator-Element (Konsensussequenz Säuger: YYA₊₁NWYY; Konsensussequenz *Drosophila*: TCA₊₁KTY; A₊₁ entspricht jeweils dem Transkriptionsstart) befindet sich direkt am Transkriptionsstart, der konservierte Dpe-Bereich (Konsensussequenz: RGWCGTG) liegt unterhalb davon. Bei *Drosophila*-Promotoren scheint das Dpe-Motiv sogar ähnlich weit verbreitet zu sein wie die TATA-Box (Kutach und Katonaga 2000). Allerdings beschränkt sich die Wirkung auf Core-Promotoren, die auch ein Inr-Element beinhalten. So konnte gezeigt werden, daß ein aufgereinigter TFIID-Komplex sowohl Inr als auch Dpe *in vitro* binden kann, eine effiziente Transkriptionsinitiation jedoch beider Elemente bedarf (Burke & Kadonaga 1997). Burke und Kadonaga konnten des weiteren zeigen, daß in den bisher untersuchten TATA-Box freien Promotoren beide Elemente enthalten sind und Dpe die Effizienz von Inr-Promotoren, nicht aber die eines TATA-Box Promotors erhöhen kann (Burke & Kadonaga 1997). Als möglicher Mittler zur Inr-Bindung wurde innerhalb der TAFs ein Komplex aus TAFII250 und TAFII150 identifiziert (Chalkley & Verrijzer 1999). Die Bindung an Dpe wird in *Drosophila* anscheinend durch dNC2, einem Ortholog zu dem als humanen Transkriptionsrepressor beschriebenen Protein NC2, vermittelt. Willy und Mitarbeiter (Willy et al. 2001) konnten zeigen, daß dieser Komplex, der bei TATA-Box

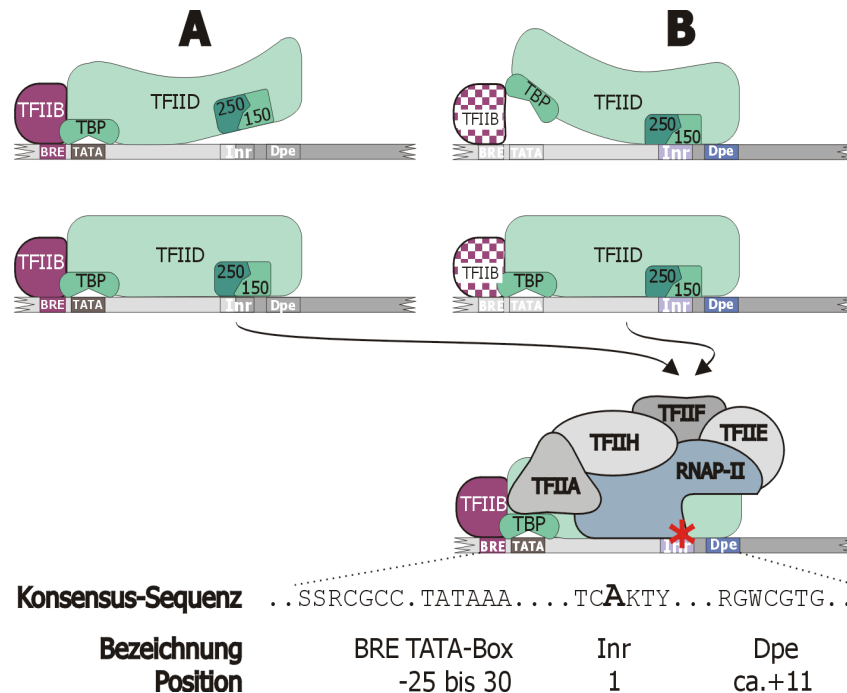


Abbildung 6: Die Transkriptionsinitiation

Die Transkriptionsinitiation geht an den beiden Core-Promotoren mit und ohne TATA-Box zwar unterschiedliche Wege, das Ergebnis ist jedoch dasselbe. In **A** ist ein typischer TATA-Box Promotor gezeigt. Die Sequenzbereiche, die von ihrer Position her Inr und Dpe entsprechen, sind hier nicht konserviert und farblos dargestellt. Die ersten Schritte zur Auffindung der Transkriptionsstartstelle werden von TFIIB, das an das konservierte BRE-Motiv bindet und der TATA-Box, die von TBP erkannt wird eingeleitet. Die Positionierung des TFIID-Komplexes ist somit auch ohne konservierten Inr und Dpe fixiert. Im Falle **B**, eines Promotors ohne TATA-Box, binden TAF250 und TAF150, die beide Komponenten von TFIID sind, an den Initiator. Die Sequenzbereiche, die von ihrer Position her der TATA-Box (-30) und BRE entsprechen, sind bei diesen Promotoren nicht konserviert und werden in **B** farblos dargestellt. Nach wie vor bindet TBP jedoch diesen Sequenzbereich und trägt so zur zusätzlichen Stabilität bei. Inwieweit TFIIB bei Promotoren des Typs B bei der Zielfindung und Stabilität des TFIID-Komplexes beiträgt, ist noch unklar (TFIIB hier nur kariert dargestellt). Als Endergebnis können in beiden Fällen die restlichen Komponenten des Transkriptionsinitiationskomplexes rekrutiert werden (TFIIA-TFIIF) und die RNAPII beginnt an Position 1 mit der Transkription (roter Asterix). In einer schematischen Ausschnittsvergrößerung ist der Corepromotor mit den beteiligten Konsensussequenzen und ihren jeweiligen Positionen bezüglich des Transkriptionsstarts dargestellt. (nähere Erläuterungen siehe Text)

Promotoren als Repressor wirkt, an Dpe bindet und bei Inr/Dpe-Promotoren aktivierend wirkt. Eine graphische Zusammenfassung und mögliches Modell der Transkriptionsinitiation bei den zwei häufigsten Promotor-Typen zeigt Abbildung 6.

Bereits ein Core-Promotor mit TATA Box und/oder Initiator-Element kann für eine zeitliche und räumliche Spezifität der Genexpression sorgen (Schwyter et al. 1995; Eichbaum et al. 1994), die Hauptregulation bei eukaryotischen Organismen obliegt jedoch sogenannten Enhancern oder Repressoren.

1.3.2 Enhancer, Repressor und Boundary-Element

Ursprünglich wurden Enhancer als cis-wirkende DNA-Bereiche definiert, die unabhängig von ihrer Orientierung die Transkription von Genen positiv beeinflussen können (Khoury & Gruss 1983). Innerhalb des Genoms von Eukaryoten sind die Gene relativ weitläufig verstreut und ent-

sprechend können Enhancer-Bereiche in unmittelbarer Nähe der Transkriptionseinheit oder aber auch mehrere Kilobasen davon entfernt liegen. Während zum Beispiel der Enhancer für das Gen des Immunglobulins H- α innerhalb des ersten Introns liegt, ist der kontrollierende Bereich für das *Drosophila* Protein *CUT* 85 kb oberhalb des Promotors lokalisiert (Jack & DeLotto 1995). Diese Kontrollbereiche sind bis zu mehrere hundert Basen lang und enthalten meist die Erkennungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Diese einzelnen Module können so zu einer differenzierteren Kontrolle von nachgeschalteten Genen beitragen. (zusammengefaßt in Blackwood & Kadonaga 1998). Zwar kann auch bei Prokaryoten der aktivierende Transkriptionsfaktor in einiger Entfernung des Promotors binden, (Buck et al. 1986; Reitzer & Magasanik 1986) die eigentliche Aktivierung geschieht dort jedoch durch eine direkte Interaktion der aktivierenden Domäne des Transkriptionsfaktors mit dem Transkriptionsinitiationskomplex (Wedel et al. 1990). Die Transkriptionsregulation bei Eukaryoten ist deutlich komplexer und Coulson (Coulson et al. 2001) konnte zeigen, daß die bei der Transkription beteiligten Protein-Familien, in den verschiedenen Taxa (Eukaryota Prokaryota und Archea) weitgehend unabhängig voneinander sind. Der tatsächliche Mechanismus, mit dem eine aktivierende Domäne auf die Transkriptionsinitiation wirkt, ist noch unklar. Es gibt jedoch einige Modelle und Hinweise wie Teilschritte dieses Mechanismus ablaufen könnten.

1.3.2.1 Enhancer und Silencer können promotorspezifisch wirken

Die Arbeiten von Li und Noll (Li & Noll 1994) zeigten, daß auch in *Drosophila melanogaster* Enhancer bestimmte Promotoren bevorzugt aktivieren. Die Gene *dpp* (*decapentaplegic*), *oaf* (*out at first*) und *slb* (*SLY1 homologous*) liegen in unmittelbarer Nachbarschaft. Ein Transposon, mit eigenem Promotor, das innerhalb des *oaf*-Locus inseriert, steht fortan unter der Kontrolle der verschiedenen *dpp*-Enhancer. Die zu den Enhancern näher liegenden Gene *oaf* und *slb* bleiben jedoch nach wie vor unbeeinflusst und werden durch die *dpp* Enhancer nicht aktiviert (Merli et al. 1996). Andererseits kann man den Promotorbereich von *oaf* durch den von *dpp* austauschen und erhält somit ein *dpp*-Expressionsmuster für *oaf*. Damit wird gezeigt, daß der *dpp*-Enhancer seinen Zielpromotor erkennt und bei seiner spezifischen Wirkung sogar andere Gene überspringen kann. Analog dazu konnten Ohtsuki und Mitarbeiter (Ohtsuki et al. 1998) zeigen, daß der Enhancer *AE1* (Autoregulatory Element1) innerhalb des *Antennapedia*-Komplexes bei *Drosophila* nur das Gen *ftz* (*fushi tarazu*), nicht aber das gleich weit entfernte Gen *scr* (*sex combs reduced*) aktiviert. Der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Gen-Loci ist, daß der Core-Promotor von *ftz* eine optimale TATA-Box Konsensussequenz besitzt während der *scr*-Promotor über ein

Inr/Dpe-Motiv verfügt. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß *AE1* unabhängig vom kontrollierten Gen TATA-Box Promotoren denjenigen Promotoren vorzieht, die dieses Motiv nicht haben. Andere Kontrollbereiche wie zum Beispiel *NEE*, der Enhancer für das Gen *rho* (*rhomboid*) zeigen hingegen keine solchen Präferenzen (Ohtsuki et al. 1998).

Eine andere Möglichkeit, den Wirkungsbereich eines Enhancers zu fokussieren, bieten als Insulator oder Boundary-Element bezeichnete DNA-Bereiche. Das transposable Element *gypsy* trägt flankierend Bindestellen für das Zink-Finger Protein SUHW (*suppressor of Hairy-wing* [*su(Hw)*]). Geyer und Corces (Geyer & Corces 1992) konnten zeigen, daß es bei einer Insertion von *gypsy* innerhalb der 5'-kontrollierenden Region des *Drosophila*-Genlocus *yellow* zu Ausfällen im Expressionsmuster des Gens kommt. Interessanterweise sind von der *gypsy*-Insertion nicht alle Enhancer von *yellow*, die sowohl 5' als auch 3' liegen, betroffen. Die abblockende Wirkung des transposablen Elements entfaltet sich nur, wenn *gypsy* zwischen Enhancer und Promotor liegt. Dieser Effekt von *gypsy* ist auch bei anderen Genloci zu beobachten und konnte auf ein Stück von 420 bp eingegrenzt werden, daß die Bindungsstelle für SUHW enthält (Drosett 1993; Geyer & Corces 1992). In einer Vielzahl anderer Organismen konnten inzwischen neben diesem Zink-Finger Protein auch weitere DNA-bindende Proteine klassifiziert werden, deren Bindungsstellen als Insulator wirken (zusammengefaßt in Sun & Elgin 1999; Bell et al. 2001). Dieser abschirmende oder begrenzende Effekt beschränkt sich nicht nur auf Enhancer und Silencer, sondern ähnliche Mechanismen scheinen auch bei der Unterteilung eines Chromosoms in einzelne funktionelle Kompartimente (z.B. Euchromatin/Heterochromatin) eine Rolle zu spielen (Fourel et al. 1999).

Eine schematische Zusammenfassung der Möglichkeiten, um die Spezifität eines Enhancers oder Silencers zu gewährleisten, zeigt Abbildung 7.

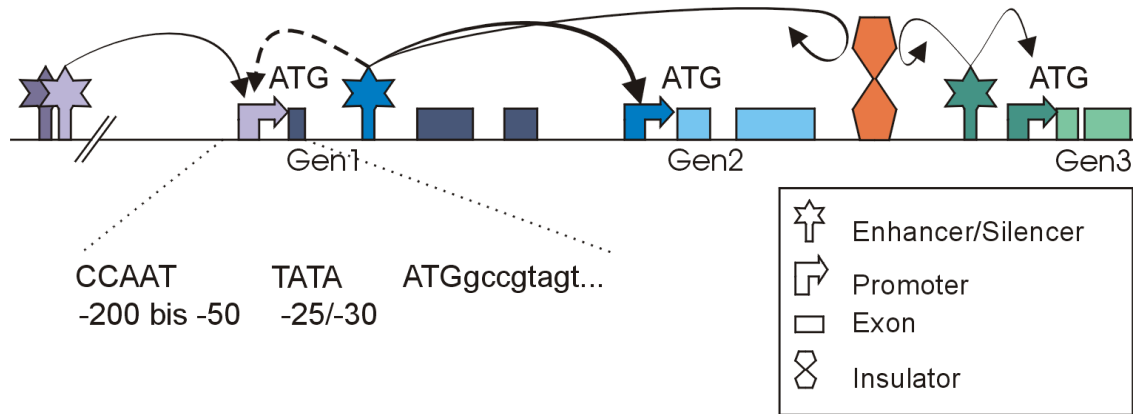


Abbildung 7: Modell zur Enhancer Spezifität

Die Wirkung eines Enhancers ist prinzipiell zunächst ungerichtet. Der Blaue Enhancer könnte auf alle drei skizzierten Gene wirken, die Wirkung auf Gen 3 wird jedoch durch ein „Boundary-Element“ abgeblockt, ebenso die Wirkung des grünen Enhancers auf die Gene 1 und 2. Wenn sich die Gene 1 und 2 bezüglich ihrer Promotoren unterscheiden (z.B. TATA-Box oder Inr/Dpe-Promotor) ist es möglich, daß der blaue Enhancer nicht auf Gen 1, sondern präferentiell auf Gen 2 aktivierend wirkt.

Vor allem die Promotor-Selektivität einiger Enhancer, die teilweise mehrere Kilobasen entfernt liegen, wirft die Frage auf, welcher Natur diese Interaktion mit dem Promotor ist.

1.3.2.2 DNA-Schleifen und der Mediator-Komplex

Das Kernproblem bei der Regulation durch weit entfernte Kontrollbereiche ist es, den Enhancer bzw. die an den Enhancer gebundenen Proteine in räumliche Nähe zu dem Promotor zu bringen. Bei den derzeit diskutierten Modellen, die dies bewerkstelligen könnten, kommt es zunächst zur Ausbildung einer DNA-Schleife. Nachfolgend können die an den Enhancer gebundenen Proteine und Aktivatoren in einem als „Tracking“ oder „Scanning“ bezeichneten Suchvorgang den passenden Promotor aufspüren. Sowohl die Ausbildung von DNA-Schleifen als auch die direkte Interaktion von Enhancer-Proteinen mit Teilen des Transkriptionsinitiationskomplexes konnte in mehreren Arbeiten bewiesen werden (zusammengefaßt in Wang & Giaevar 1988; Blackwood & Kadonaga 1998). Um eine derartige Schleife auszubilden, muß in einem ersten Schritt die sehr kompakte nukleosomale Verpackung der DNA gelockert werden. Diese „Auflockerung“ der DNA erleichtert, bzw. ermöglicht erst eine Bindung der Transkriptions-Maschinerie an den Promotor (siehe z.B. Imbalzano et al. 1994). Häufig geschieht dies durch eine Acetylierung von Histonen. Dadurch wird die Affinität der Nukleosomen-Bausteine zur DNA vermindert und so die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren gesteigert, ohne jedoch die nukleosomale Organisation ganz aufzulösen (zusammengefaßt in Stuhl 1998). Sind durch diese Überführung der DNA in eine Art „kompetenten“ Zustand die Bindungsstellen für die Transkriptions-Aktivatoren und der Promotor „freigelegt“, kann die genspezifische Regulation beginnen (vgl. Abbildung 8).

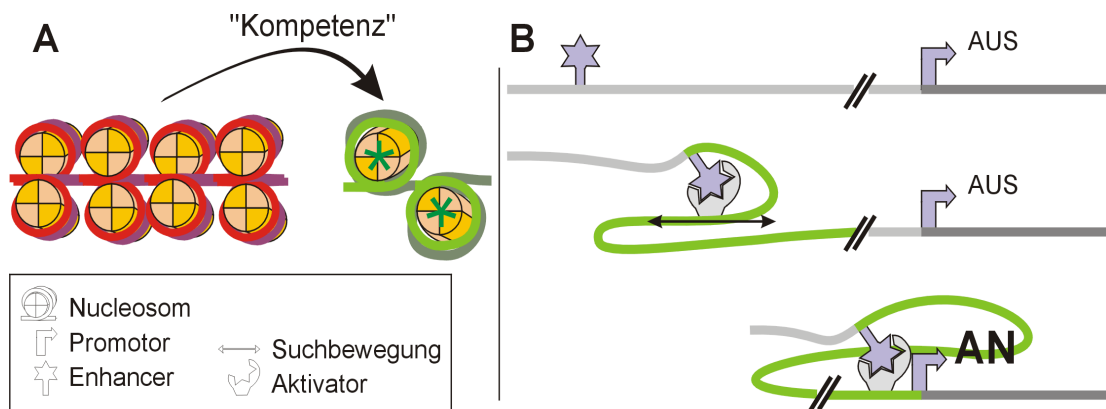


Abbildung 8: DNA-Schleifen zur Enhancer Promotor Findung

A) Die Nucleosomen bilden die kleinste Untereinheit der DNA Verpackung. Die Bindung an die Histone der Nucleosomen kann z.B. durch Acetylierung gelockert werden. Dadurch wird die DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglicher (Kompetenz; grüner Asterix). **B)** Modell für den Suchmechanismus des Enhancers. Ein Enhancer wird durch einen Komplex aus DNA-bindenden Proteinen und Co-Aktivatoren gebunden. Dieser Komplex bewegt sich in einem als „Tracking“ oder „Scanning“ bezeichneten Modus über die DNA, bis er an einen passenden Promotor binden kann und dort die Transkription initiiert. Der DNA-Bereich, über den sich der Enhancer/Aktivator-Komplex bewegt, wird dabei, wie in A gezeigt, gelockert.

An der Initiation der Transkription sind ca. 30 verschiedenen Proteine obligat beteiligt. Mindestens die doppelte Anzahl spielt allerdings bei der *in vivo* Regulation des Prozesses eine Rolle. Immer neue beteiligte Proteine können in unterschiedlichen Modellsystemen identifiziert werden. So galten TBP beziehungsweise TFIID lange als die alleinigen Mittler zwischen Aktivatoren und der RNAP-II. Erst in der jüngeren Vergangenheit mehren sich die Hinweise, daß ein als Mediator bezeichneter Komplex als zwischengeschaltetes Element sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Repression dienen kann (zusammengefaßt in Myers und Kornberg 2000). Der Proteinkomplex wurde zunächst in Hefen durch die Beobachtung gefunden, daß bei einem *in vitro* Transkriptionssystem sowohl RNAP-II als auch die bis dato bekannten generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) im Überschuß zugegeben werden können, und die Reaktion immer noch durch einen unbekannten Bestandteil limitiert ist (Kellehrer et al. 1990; Flaherty et al. 1991). Letztendlich konnte der aus 20 Proteinen bestehende Komplex gereinigt werden und ist inzwischen in mehreren Organismen funktionell nachgewiesen (Kim et al. 1994; Park et al. 2001). Der gereinigte Komplex bindet unter anderem den carboxylständigen Bereich, der RNAP-II (CTD) von dem bekannt ist, daß er vor der Transkriptionsinitiation massiv durch TFIID phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung wird durch den Mediator-Komplex um das 30-50 fache gesteigert. Entsprechend wird auch die Transkriptionsinitiation um das 10 fache erhöht (Kim et al. 1994; Myers et al. 1998). Eine der neusten Arbeiten geht sogar soweit, die Rolle von TFIID als zentralem Bindeglied zwischen Aktivatoren und RNAP-II Initiationskomplex in Frage zu stellen (Park et al. 2001). Park und Mitarbeiter folgern aus ihren Ergebnissen, die für den

Einleitung

Drosophila Mediator-Komplex gewonnen wurden, daß *d-mediator* als zentraler Coaktivator in einer Vielzahl von Genen wirkt und die TAFs, als Bestandteile des TFIID eher als Promotor Spezifizierungs- und Positionierungs-Werkzeuge tätig sind (Park et al. 2001).

Die Relevanz dieses kurzen Abrisses über die Transkription in eukaryotischen Organismen für die vorliegende Arbeit ergibt sich aus den Ergebnissen von 3.1.3. Hier wird gezeigt werden, daß *Vam* die Transkription eines bestimmten Reportergens spezifisch beeinflußt.

MATERIAL & METHODEN

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Fliegenstämme

<i>Stamm</i>	<i>Details & Phänotyp</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Literatur</i>
<i>Vam</i> ^{KS74}	Ursprüngliches <i>Vam</i> Allel	Lehrstuhl Stammsammlung	Coombe & Heisenberg 1986
Df(1)19f ; Dp1(1:4)r ⁺ f ⁺	Defizienz und Duplikation im Bereich 13F/14B	Lehrstuhl Stammsammlung	Katzen 1996, Steller 1987
attX, <i>y w f</i>	Marker-Stamm	Lehrstuhl Stammsammlung	
attX, <i>y w f</i> /Dp(1:Y) <i>sd</i> ^{B'} , <i>shi</i> ⁺ <i>y</i> ⁺	Dp(1:Y) <i>sd</i> ^{B'} , <i>shi</i> ⁺ <i>y</i> ⁺	diese Arbeit	
Df(1) <i>sd</i> ^{F2b} / FM7c, su[+26]		Lehrstuhl Stammsammlung	
attX/ <i>y cv v f</i>	Für Rekombinations-Kartierungen	Lehrstuhl Stammsammlung	
attX / <i>y w sn f</i>	Für Rekombinations-Kartierungen	Lehrstuhl Stammsammlung	
<i>Vam f</i> 13	Neue Rekombinante; Mutagenese	diese Arbeit 2.1.1.1	
<i>Vam f</i> 7	Neue Rekombinante	diese Arbeit 2.1.1.1	
<i>Vam f</i> 13 ^{R[#]}	Röntgeninduzierte <i>Vam</i> Revertante Nummer [#]	diese Arbeit 3.2.4.1	
PC ₃ -[#]	pP{CoSpeR-3} mit Insertion Nummer [#]	diese Arbeit 2.2.7	
<i>w</i> ^{f^{CS}}	Wildtyp Canton Spezial	Lehrstuhl Stammsammlung	Lindsey Zimm 1992
<i>w</i> ¹¹¹⁸	white mutanter „Wildtyp“	Lehrstuhl Stammsammlung	
<i>sd un</i> /attX	<i>scalloped</i> und <i>uneven</i> Markerlinie	Lehrstuhl Stammsammlung	
<i>sd Vam</i> 16	Stamm mit Scalloped markiertem <i>Vam</i> -Chromosom	Lehrstuhl Stammsammlung	Glück 1996
P{w ⁺ Δ2-3}SB/TM3Ser	Transposasequelle	Lehrstuhl Stammsammlung	Robertson et al. 1988
<i>w</i> , <i>CyO</i> / <i>Sco</i>	II.Chromosom Balancer für P-Element Linien	Lehrstuhl Stammsammlung	
<i>w</i> , TM3 <i>Sb</i> / <i>Ser</i>	III.Chromosom Balancer für P-Element Linien	Lehrstuhl Stammsammlung	
<i>w</i> , <i>CyO</i> / <i>Sco</i> , TM3 <i>Sb</i> / <i>Ser</i>	II & III Chromosom Balancer für P-Element Linien	Lehrstuhl Stammsammlung	
P{β-gal} A254	Expressionsmuster wie <i>argos</i>	Lehrstuhl Stammsammlung	Kretzschmar et al. 1992
repo ⁴	lacZ Enhancer-Trap für Gliazellen	Lehrstuhl Stammsammlung	Xiong et al. 1994

<i>Stamm</i>	<i>Details & Phänotyp</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Literatur</i>
ter ¹	lacZ Enhancer-Trap für Terminalzellen der Tracheen	Lehrstuhl Stammsammlung	Samakovlis et al. 1996
A 509	lacZ Enhancer-Trap für Lamina-monopolarzellen	Lehrstuhl Stammsammlung	

Alle Stämme wurden zur Aufzucht auf Standard *Drosophila*-Medium (Maismehl, Agar, Sojamehl, Melasse, Malz-extrakt, Hefe und 3g/l Nipagin als Fungizid) bei 25 °C, bzw. 18 °C und 65% relativer Luft feuchtigkeit gehalten.

2.1.1.1 Vam-Rekombinationsstämme

Der Ausgangsstamm *Vam*^{KST4} wurde mit verschiedenen X-chromosomalen Markerstämmen gekreuzt und alle Nachkommen, bei denen ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat zunächst als Stamm neu etabliert und histologisch untersucht. Aus diesen Stämmen wurden diejenigen mit der stärksten histologischen Ausprägung des *Vam* Phänotyps ausgewählt und weiterverwendet.

2.1.2 Bakterienstämme

Plasmide wurden in *E.coli* XL1-blue der Firma Stratagene transformiert und amplifiziert (Genotyp: siehe Sambrook et. al., 1989).

2.2 Molekulare Methoden

2.2.1 Molekulare Standardmethoden

Soweit nicht anders angegeben wurde bei allen molekularbiologischen Methoden nach den „Current Protocols for molecular biology“ (Ausubel et al. 1989) verfahren.

2.2.2 Vektoren

<i>Vektor Kurzbezeichnung</i>	<i>Vollständiger Name</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Anmerkungen</i>
pSK	pBluescript SK (+/-)	Stratagene	
pSNE	pSamstagNachmittags-Experiment	diese Arbeit (siehe auch Abbildung 42)	siehe 5.2
pC ₃	pP{CoSpeR-3}	Lehrstuhl Stammsammlung (Abbildung 43)	<i>Drosophila</i> Transformations-Vektor
„helper“-Plasmid	pUC $\pi\Delta$ (2-3)	Lehrstuhl Stammsammlung	Nicht integrierbares Transposon als aktive Transposasequelle zur Transformation von Fliegen.

2.2.3 Primer

Name	Sequenz	TM mit/ohne Restriktionsschnittstelle
KIX	ATCTAGACTCTGAAGTGTAATGTTC	47/38
SIX	ATCTAGACAACTTAACACTAAATTCAC	47/39
KEP	CACTGCAGGGTACCCCTTTGCTTTTG	56/42

Name	Sequenz	TM mit/ohne Restriktionsschnittstelle
SEP	CACTGCAGCACTCTATTTGTATTACGTAGC	55/44
UNI	GTAAAAGGACGGCCAGT	41/-
REV	AACAGCTATGACCATG	35/-
Genie1up	TTTTTCCCGTGCGCTAAGTTTTC	48/-
Genie1low	GTGCTCGCCAGTGCCATTTC	50/-
Genie2up	CGACAGCGAGATATTCAGCCTTCC	53/-
Genie2low	CTCGCCCTTTACGCACTCCTTC	53/-
Genie3up	TGAATATGCAGCCAGACTTTA	43/-
Genie3low	AGCGCATTGGAGGTGTTGTAGAGG	53/-
Genie4up	AATGCTGGAGGCCGCTTTTTC	49/-
Genie4low	CCGCTTTGGTTCCGCTCTAA	48/-

Die Berechnung der Schmelztemperatur der einzelnen Primer erfolgte nach dem Algorithmus von Rychlik (Rychlik 1993).

2.2.4 Klonierung des *Vam*-Bereichs aus *Vam*^{KS74} Fliegen

Alle relevante Bereiche aus *Vam* Fliegen wurden über PCR kloniert. Wegen der Redundanz der Experimente wird hier nur exemplarisch ein wichtiger Schritt der Klonierungshistorie aufgeführt. Alle injizierten Konstrukte sind aus zuvor teilweise sequenzierten PCR-Klonen entstanden. Als PCR Enzym wurde Expand HiFi von Roche Diagnostics verwendet. Bei diesem Enzymmix aus Taq-Polymerase mit hoher Prozessivität und Pwo-Polymerase mit 3'-5' Exonucleaseaktivität (Fehlerkorrektur) ergeben sich Produkte mit sehr geringer Fehlerrate (Barnes 1994; Eckert und Kunkel 1991).

a. Subklonierung eines 9 kb Kpn/Sph Fragment aus cos83 (wt^{OR}-DNA).

- 1. Ligation des Fragmentes in einen Kpn/Sma geschnittenen pSK-Vektor
- „Blunting“ des Ligationsprodukts mit T₄-Polymerase
- 2. Ligation
- Transformation in elektrokompenten XL1blue *E. coli* Stamm
- Selektion der richtigen Klone und Ansequenzierung der Enden über Vektor spezifische Primer

b. Design von Primern anhand der neuen Sequenzdaten (hier KIX, SIX, KEP & SEP)

c. Long PCR mit *Vam*^{KS74}-genomischer DNA

Primerpaar: KIX/SIX

Enzym: Expand High-Fidelity von Roche Diagnostics

Ansatz:

1,5	µl	KIX	10	µM
1,5	µl	SIX	10	µM
100	ng	Template	<i>Vam</i> ^{KS74} DNA	
5	µl	Puffer #1	10x	Expand-Hifi Kit
0,2	µl	Expand-HiFi	0,7	U
add:		H ₂ O	PCR-Wasser	
50	µl			

Temperaturprofil:

<i>Zeit</i>	<i>Temp. °C</i>	<i>Anzahl x</i>	<i>Anmerkungen</i>
2'	93	1	Hot-Start Erster Denaturierungsschritt
10"	93		
30"	65	5	Anfangszyklen
8'	68		
10"	93		
30"	60	5	
8'	68		
10"	93		
30"	55	20	Alle zwei Zyklen wird die Polymerisationszeit um 40" verlängert.
8'	68		

d. Klonierung des PCR-Fragments

- Reinigung des Fragments über Quiagen PCR Extraction Kit
- Phenol-Reinigung nach Verdau mit BamHI oder EcoRI
- Ligation in pSK BamHI oder pSK EcoRI geschnitten
- Transformation in elektrokompente XL1blue *E.coli* Zellen
- Selektion der richtigen Klone und Ansequenzierung der Enden über Vektor spezifische Primer

e. Aufarbeitung der neuen Daten

- Erstellung einer Restriktionskarte
- Subklonierung ausgewählter Fragmente
- Sequenzierung und Erstellung von Contigs aus den Subklonen
- Abgleich mit den elektronischen Datenbanken über BLAST Suchen (URL 3).

2.2.5 RT-PCR

Um Aufschluß über einzelne mRNAs der *Vam*-Region zu erhalten, wurden RT-PCR Reaktionen durchgeführt.

a. Erststrangsynthese:

- 30 Köpfe von CO₂ betäubten *sd Vam16* Fliegen bei RT entfernt.
- mRNA (nach Quiagen RNA mini Kit) in 30 µl H₂O eluiert.

Ansatz:

10 µl	RNA lsg.	
75 pMol	Primer	Je nach Produkt spezifisch oder Oligo-dT ₁₂
10'	65°C	Denaturierungsschritt
3 µl	0,1 M DTT	
3 µl	Expand-Hifi 10xPuffer #2	
1,5 µl	dNTPs	10 µM Lösung GibcoBRL
1 µl	SuperScript II	GibcoBRL
30'	42°C	Synthese
10'	68°C	Hitzeinaktivierung

Material und Methoden

b. PCR:

Nachfolgende PCR nach Bedarf und jeweiliger Spezifikation der Primer und der erwarteten Produktlänge mit 3 µl cDNA in 50 µl Reaktionsansätzen.

2.2.6 Sequenzierungen

Der Großteil der Sequenzierreaktionen wurde mit dem *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit* von Pharmacia/Amersham und dem halbautomatischen ALFexpress der gleichen Firma nach Anleitung durchgeführt. Meist wurden die zu sequenzierenden Stücke in passenden Längen subkloniert (max.1 kb) und dann mit Standard Primern (UNI & REV) von beiden Seiten der MCS des Vektors sequenziert. In Ausnahmefällen wurde die Firma DelphiSeq (Frank Pfannschmidt) mit der Sequenzierung beauftragt.

2.2.7 Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster*

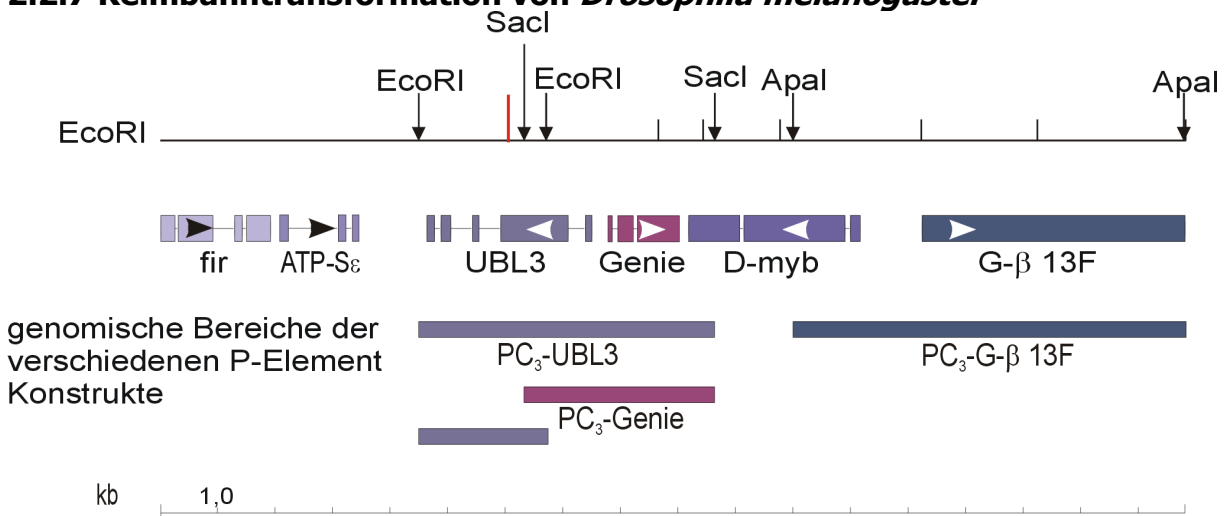


Abbildung 9: P-Element Konstrukte

Die drei PC₃-Balken repräsentieren die aus *Vam*-Fliegen stammenden genomischen Bereiche, die in den P-Elementvektor pP{Casper3} kloniert wurden. Anschließend wurden für jedes Konstrukt weit über 1000 *w*¹¹¹⁸ Embryonen mit je einem dieser Konstrukte transformiert und in den Folgegenerationen auf eine stabile Insertion des jeweiligen P-Elements im sonst wild-typischen Fliegen-genom selektioniert. Zur Orientierung sind oberhalb der in der *Vam*-Region bekannten Transkriptionseinheiten zusätzlich zur EcoRI Restriktionskarte noch die jeweiligen Hauptklonierungsschnittstellen der einzelnen Konstrukte angegeben. fir ≡ FBgn0030699; ATP-Se ≡ FBgn0040875; ubl3 ≡ FBgn0026076; Genie ≡ CG15914 ≡ FBgn0030700; D-myb ≡ FBgn0002914; G-β 13f ≡ FBgn0001105.

Die Transformation zur stabilen Insertion der P-Elemente in *w*¹¹¹⁸-Fliegen wurde nach Rubin & Spradling (Rubin & Spradling 1982) durchgeführt. Als Transformationsvektor wurde das Plasmid pP{Casper3} ≡ PC₃ mit den entsprechenden Insertionen verwendet (siehe auch 2.2)

2.3 Histologische Methoden

Erfahrungsgemäß bedürfen alle histologischen Methoden einer sorgfältigen Anpassung und müssen für die einzelne Fragestellung optimiert werden. Deswegen werden in diesem Abschnitt nur grundsätzliche Verfahrensweisen der Methoden und dazu gehörige publizierte Basis-Protokolle angeführt. Details soweit für das einzelne Experiment von essentieller Bedeutung, sind bei den jeweiligen Abbildungen in der Arbeit vermerkt.

2.3.1 Paraffinschnitte

(Nach Jäger und Fischbach in Ashburner; Ashburner 1989b Protokoll 112).

Für die Paraffin-Massenhistologie wurden bis zu 20 Fliegen nebeneinander in Krägen aufgefädelt und für 3 h 45min in CARNOY (Romeis 1948) Fixans inkubiert. Nach einer steigenden Alkoholreihe (70, 80, 90, 100%) mit abschließend EtOH p.a. (über Molekularsieb) wurden die Krägen über Nacht in Methylbenzoat inkubiert und am darauffolgenden Tag in Paraffin eingebettet. Bei zu langen Inkubationszeiten in den einzelnen Alkoholbädern erhöht sich die Bildung von artifiziellen kleineren Löchern im Gehirn. Die Dicke der Schnitte beträgt standardmäßig 7 µm.

Während des Schneidens und den darauffolgenden Xylol-Waschschritten zur Entfernung des Paraffins werden die Augenfarbstoffe über den gesamten Schnitt verteilt und lagern sich am Gewebe an. Unter der Beleuchtung mittels einer Hg-Lampe lassen sich diese Pigmente zur Autofluoreszenz anregen. Die so gewonnen grün fluoreszierenden Aufnahmen sind hervorragend geeignet, um sich einen Überblick über den histologischen Zustand eines Drosophilagehirns zu verschaffen.

2.3.2 Kryostatschnitte

- a. Immunohistochemie nach S. Buchner und A. Hofbauer in Ashburner (Ashburner 1989b Protokoll 115)
- b. X-Gal Färbungen nach D. Kankel und G. Fitzgerald in Ashburner (Ashburner 1989b Protokoll 74 „alternate procedure“; Der in diesem Protokoll angegebene McIlvaine Puffer wurde durch den Standard-Puffer PBS (siehe Ashburner 1989b) ersetzt)

2.3.3 Semidünn- und Ultradünnschnitte

- Rüssel in PPSö pH 7,4 (Phosphatpuffer nach Sörensen) auf Eis entfernt
- Fixierung in 5% Glutaraldehyd (EM-tauglich) über Nacht bei 4°C
- Waschen in PPSö pH 7,4
- Für Ultradünnschnitte weitere Fixation für 4h 4% Osmiumtetroxid in PPSö pH 7,4 auf Eis
- Entwässern über steigende Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 95%, 3x100% EtOH je 10 min)
- Waschen für 10 min in Propylenoxid, Einbettung in Durcupan
- Aushärtung für ca. 12h bei 60°C

Semidünnschnitte mit 2 µm Schnittdicke, Ultradünnschnitte mit ca. 50 – 100 nm Schnittdicke

2.4 Röntgenmutagenese

2.4.1 Bestrahlungs- und Kreuzungsprotokoll für Röntgenmutagenese

- modifiziert nach Carthew - (Rubin laboratory Manual 1990)
- frisch geschlüpfte Männchen des Genotyps *Vam f13* absammeln
- für zwei weitere Tage bei 25°C altern lassen
- jeweils ca. 50 Stück in Bestrahlungsgläser geben (Abbildung 10)
- vor der Bestrahlung auf Eis stellen und ca. 5 min. abkühlen lassen
- 22 min. bestrahlen (ca. 5000 Rad); 0,2 cm Aluminium-Abschirmplatte direkt vor dem Beryllium-Fenster der Röntgenröhre befestigen
- Fliegen sofort auf frische warme Gläser mit Brei und viel Hefe überführen
- ca. 2-3 h erholen lassen
- mit mindestens 2- bis 3facher Menge an drei Tage alten Jungfrauen kreuzen
- am zweiten Tag nach der Bestrahlung umsetzen, danach jeden Tag auf frische Gläser
- am sechsten Tag alle Fliegen verwerfen

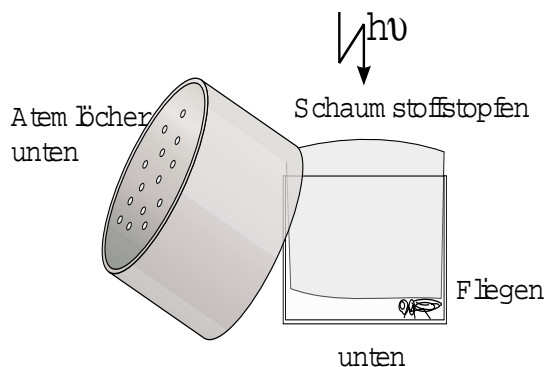


Abbildung 10: Bestrahlungsschema

Die von oben kommende Röntgenstrahlung (hv) durchdringt einen eng auf die Fliegen aufgesetzten Schaumstoffstopfen. So konnte erreicht werden, daß alle Männchen der gleichen Strahlungsdosis ausgesetzt werden. Die Atemlöcher sollen während der insgesamt ca. halbstündigen Prozedur eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Fliegen gewährleisten.

2.5 Computer-Programme

Zur Bildbearbeitung wurden folgende Programme eingesetzt:

Adobe Photoshop V5.0; Corel Draw Graphics Suite v9.0; GIMP 2.0

Zur DNA-Sequenzbearbeitung wurden folgende Programme eingesetzt:

LaserGene DNASTar v3.x; Internetbasierende Werkzeuge soweit angegeben.

Zur Textverarbeitung wurden folgende Programme eingesetzt:

UltraEdit v2.0; StarOffice 5.2

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3 Ergebnisse und Diskussion

Aus der in der Einleitung erwähnten Arbeit von Coombe und Heisenberg (Coombe & Heisenberg 1986; siehe 1.1.2), die *Vam* als semidominantes EMS-Allel charakterisiert haben, waren zur Beschreibung des *Vam*-Phänotyps bislang nur zwei Phänomene bekannt. Zum einen, daß in *Vam*-Fliegen altersabhängig die namensgebenden Vakuolen in der Medulla und der Lamina auftreten und zum anderen, daß dies mit der Degeneration von Laminamonopolarneuronen des Typs L2 und L5 einherzugehen scheint. Wie bzw. in welchem Maße diese Zellen degenerieren, ob noch weitere Zelltypen betroffen sind und welches Gen in der *Vam*-Mutante defekt ist, war noch ebenso unklar, wie die Frage nach der Funktion, die das *Vam*-Protein in den Fliegen wahrnimmt. Diese Fragen zu beantworten war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Entsprechend läßt sich der experimentelle Teil in drei Hauptabschnitte gliedern, deren Bearbeitung parallel erfolgte und deren Ergebnisse teilweise ineinander übergreifen.

- a) Charakterisierung des *Vam*-Phänotyps
- b) Einfluß der *Vam* Mutation auf verschiedene zelltypspezifische Marker im ZNS
- c) Identifikation des in *Vam* betroffenen Gens

3.1 Charakterisierung des *Vam*-Phänotyps

3.1.1 Der *Vam*-Phänotyp

Für die nachfolgenden Versuche wurde der Ausgangsstamm *Vam*^{KS74} mit einer X-Chromosom markierten Linie gekreuzt. Aus den Nachkommen, bei denen ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat, wurden Einzellinien etabliert und Stämme mit einem histologisch deutlichen *Vam*-Phänotyp weiter untersucht (vgl. 2.1.1.1). Exemplarisch für diese Linien ist hier ein Stamm des Genotyps *w Vam f* dargestellt (siehe Abbildung 11).

Der Großteil der frisch geschlüpften *Vam*-Fliegen verfügt über ein histologisch nicht von wildtypischen Fliegen unterscheidbares Gehirn (vgl. Abbildung 11 A). Nur in sehr wenigen Ausnahmen kommt es zu diesem frühen Zeitpunkt bereits zur Ausbildung vereinzelter Vakuolen, die in Zahl und Größe mit steigendem Alter deutlich zunehmen (siehe Abbildung 11 B-D). Als Besonderheit in der hier gezeigten Linie *w Vam f* fällt auf, daß Fliegen nach ca. 40 Tagen reproduzierbar kaum noch Vakuolen in den optischen Neuropilen aufweisen. In Abbildung 11 E ist einer dieser Extremfälle dargestellt, bei denen nach 40 Tagen Alterung keine Degeneration mehr festzustellen ist. Die in Abbildung 11 C-E markierten Defekte im Komplexauge sind keine Folge der

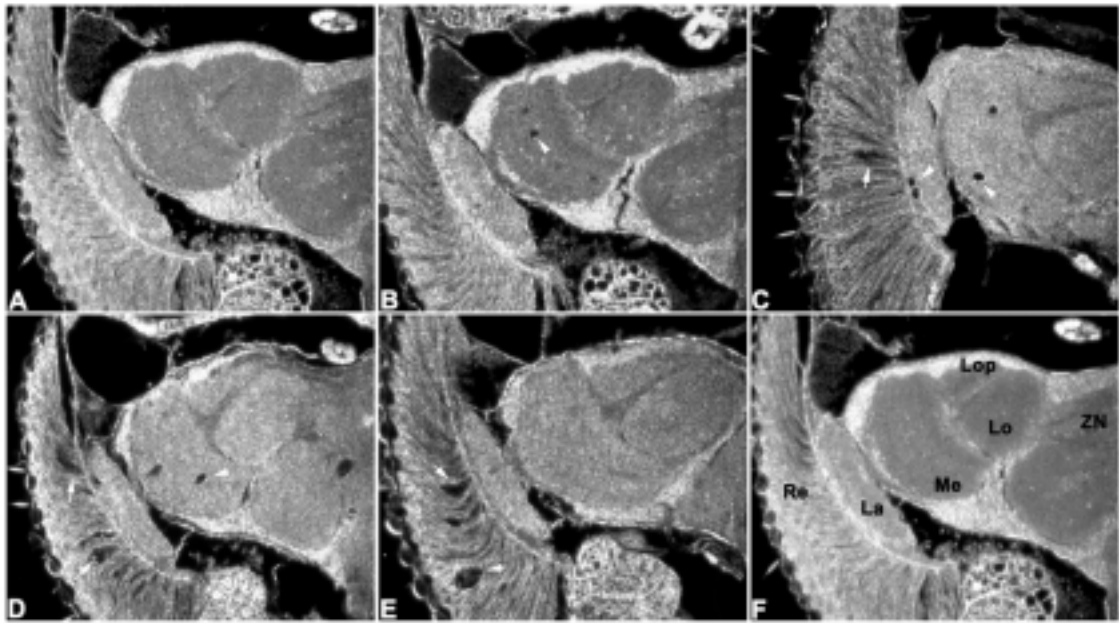


Abbildung 11: Dunkelfeldaufnahmen von Paraffinschnitten von Männchen

Horizontale Paraffinschnitte durch den Kopf je eines Männchens des Genotyps *w Vam f #7* (300fache Vergrößerung). Gezeigt ist jeweils eine Hemisphäre. Weiße Pfeilspitzen bedeuten Vakuolen innerhalb des optischen Systems, weiße Pfeile zeigen auf Degenerationserscheinungen des Komplexauges. In **F** sind die einzelnen Bereiche des Gehirns und des Auges eines phänotypisch wildtypischen Gehirns zur besseren Übersicht eingefärbt. Von Distal nach Proximal: **Re**: Retina; **La**: Lamina; **Me**: Medulla; **Lop**: Lobulaplatte; **Lo**: Lobula; **ZN**: Zentralhirn.

A) Phänotypisch wildtypisches Männchen **B)** *w Vam f#7* Männchen frisch geschlüpft: Durch die weiße Pfeilspitze markiert, sind innerhalb der Medulla bereits vereinzelt kleine Vakuolen zu erkennen. Nicht alle Männchen zeigen zu diesem frühen Zeitpunkt bereits einen eindeutigen Phänotyp. **C)** 7 Tage altes Männchen: Die weißen Pfeilspitzen deuten wieder auf Vakuolen in der Medulla und der Zellkörperschicht am Übergang zwischen Lamina und Retina, dem Laminakortex. Durch den weißen Pfeil wird eine leichte Degenerationserscheinung innerhalb der Retina markiert, die nicht typisch für den *Vam*-Phänotyp ist, sondern allgemein bei Fliegenstämmen mit defektem *white* Gen auftaucht (vgl. *w Vam f*). **D)** 21 Tage altes Männchen **E)** 41 Tage altes Männchen

Vam Mutation, sondern tauchen häufiger bei Fliegenstämmen ohne intaktes *white*-Gen auf. Entsprechend sind diese Auffälligkeiten in allen hier aufgeführten Fliegen zu sehen und zeigen tendenziell mit zunehmenden Alter der Fliegen eine Verstärkung. Im Rahmen dieses Experiments wurde jedoch die Lebensdauer der Fliegen nicht statistisch protokolliert, so daß nicht ausgeschlossen werden kann, daß nur die Fliegen, die keine Vakuolenbildung zeigen, 40 Tage überleben und den Eindruck der Entwicklung des Phänotyps verfälschen. In einem, von dieser histologischen Versuchsreihe unabhängigen, Experiment konnte jedoch mit einem anderen rekombinanten *Vam*-Fliegenstamm gezeigt werden, daß dieser Stamm über 60 Tage hinweg im Vergleich zum *w^f^{CS}* keine gesteigerte Mortalität aufweist. Selbst wenn nur Fliegen ohne Degenerationserscheinungen 40 Tage überleben, so zeigt dies doch deutlich, daß die Ausprägung des *Vam*-Phänotyps innerhalb eines Fliegenstammes starken Fluktuationen unterliegt.

Die Beobachtung von Coombe und Heisenberg (Coombe & Heisenberg 1986), daß *Vam*-Fliegen bereits 30 min nach dem Schlüpfen deutliche Degeneration in der Lamina und Löcher in der Medulla zeigen, konnte weder im Ausgangsstamm *Vam*^{KS74} noch in anderen durch Rekombinationsereignisse entstandenen Stämmen reproduziert werden. Zwar bilden alle genotypischen *Vam*-Fliegen Vakuolen in Medulla und Lamina aus, Zeitpunkt, Ort und Stärke des Phänotyps sind jedoch sehr variabel. Auch konnte nachgewiesen werden, daß innerhalb eines Zeitraums von ca. 5-10 Generationen der Phänotyp eines einzelnen Stamms deutlich nachläßt. Wird der genetische Hintergrund des Stamms ausgetauscht, z.B. durch Rekombination der *Vam*-Mutation auf ein neues markiertes X-Chromosom, wie im Falle der in Abbildung 11 gezeigten *w Vam f* Linie, tritt der *Vam*-Phänotyp wieder deutlicher auf (Daten nicht gezeigt).

Daß sich ein Phänotyp verändert, ist bereits für mehrere strukturelle Gehirnmутanten beschrieben worden. Dabei kann die Zeitspanne bis zur Revertierung zum scheinbar wildtypischen Zustand von vielen Jahren bis zu nur 2 Generationen reichen (Heisenberg 1980). Die Mutation auf Sequenzebene bleibt dabei jedoch erhalten, nur die Auswirkungen derselben werden unterdrückt. Im Falle des EMS Allels von *mushroom body miniature mbm*¹ konnte gezeigt werden, daß der Verlust der Pilzkörper-Kenyon Neurone im Ausgangsstamm von mindestens einem X-chromosomalen dosisabhängigen Modifier abhängt (de-Belle & Heisenberg 1996). Bei einem Austausch des genetischen Hintergrunds hin zu *wt*^{CS} wird der Phänotyp sogar völlig revertiert. Deswegen wurde für jeden größeren Block von Experimenten jeweils ein Set neuer markierter *Vam*-Stämme generiert und eine Linie mit dem robustesten Phänotyp ausgewählt (vgl. 2.1.1.1).

Um aufzuklären, worin die Ursache der Vakuolenbildung liegt, wurden mit der gleichen Linie wie in Abbildung 11 weitere Untersuchungen durchgeführt, die degenerative Erscheinungen und Zelltod nachweisen können.

3.1.2 Nachweis von Zelltod im optischen System von *Vam*-Fliegen

Defekte oder nicht mehr benötigte Zellen werden in multizellulären Eukaryoten häufig durch Auslösen eines apoptotischen Zelltodprogramms aus dem Zellverband entfernt (Jacobsen et al. 1997; Hengartner 1998). Diese auch histologisch sehr geordnet ablaufende Form des Absterbens von Zellen (Wyllie et al. 1972; Kerr et al. 1972) entpuppte sich bald als grundlegender und hochkonservierter Entwicklungsmechanismus (Jacobsen et al. 1997). Um zu zeigen, daß es sich um apoptotischen Zelltod handelt, können verschiedene Nachweise geführt werden.

Der Farbstoff Toluidinblau lagert sich präferentiell in Membranen ein. Wegen der Auflösung der Zellintegrität und der Formierung von Kernbruchstücken können absterbende Zellen, speziell deren Zellkerne, angefärbt werden. Eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen kann jedoch meist nicht getroffen werden.

Bei der DNA-Degradation durch die **Caspase-3 Aktivierte DNase** (CAD; Liu et al. 1997; Enari et al. 1998) entsteht die für die Apoptose typische nucleosomale Leiter. Diese vielen freien DNA Enden können im TUNEL-Assay (**T**erminal deoxynucleotidyltransferase-mediated **U**TP Nick-End **L**abeling) nachgewiesen werden (Gavrieli et al. 1992).

3.1.2.1 Toluidinblau-Färbungen an Plastik Semidünnschnitten

In einer ersten Versuchsreihe wurden Plastik-Semidünnschnitte von *Vam* Fliegen mit Toluidinblau angefärbt (siehe Abbildung 12).

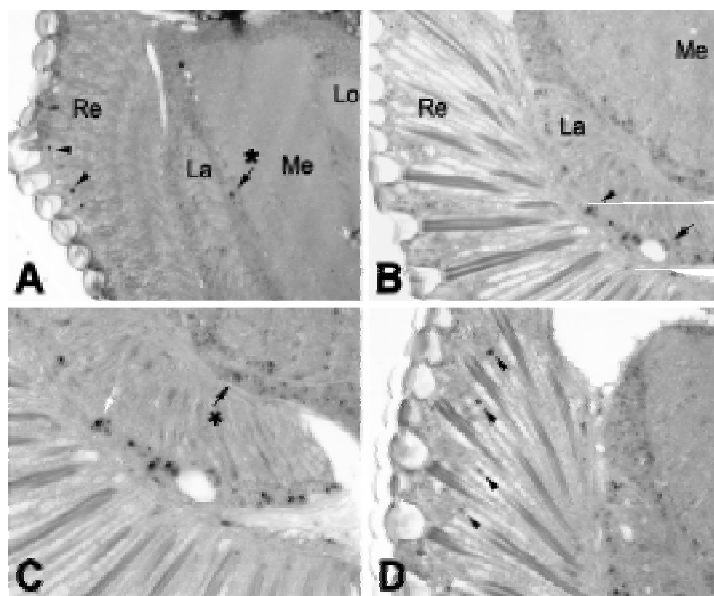


Abbildung 12: Toluidinblau gefärbte Plastik-Semidünnschnitte von *w Vam f* Männchen

A) Horizontaler Schnitt durch den Kopf eines 0 Tage alten Männchens (400fache Vergrößerung): Die optischen Neuropile sind intakt. Innerhalb des Laminakortex werden keine Zellen durch den blauen Farbstoff markiert. Färbung tritt in der Nähe des äußeren Chiasmas (Pfeil mit Asterix) und im äußeren Drittel des Komplexauges (Pfeilspitzen) auf.

B) Horizontaler Schnitt durch einen Kopf eines 7 Tage alten Männchens (640fache Vergrößerung): Innerhalb des Laminakortex werden einige Zellen stark angefärbt (Pfeilspitzen). Es ist bereits eine Vakuole in der Lamina zu sehen (Pfeil).

C) Ausschnittsvergrößerung aus B (800fache Vergrößerung): Die Färbung stellt deutlich die Zellkerne dar (weißer Pfeil). Das Zytoplasma ist nur schwach gefärbt. Auch hier gibt es eine schwache Färbung in der Nähe des äußeren Chiasmas (Pfeil mit Asterix).

D) Horizontaler Schnitt durch einen Kopf eines 7 Tage alten Männchens (800fache Vergrößerung). Neben der Färbung im Laminakortex treten auch hier wie in A gefärbte, regelmäßig angeordnete Zellen im Komplexauge auf (Pfeilspitzen). **Re:** Retina; **La:** Lamina; **Me:** Medulla; **Lo:** Lobula

Bereits bei frisch geschlüpften Männchen des Stammes *w Vam f*, der über ein Rekombinationsexperiment (siehe 2.1.1.1) frisch erzeugt wurde, ist eine spezifische Anfärbung von einzelnen Zellen zu sehen (Abbildung 12 A). Der Laminakortex weist keinerlei Färbung auf. Dies ist insofern erstaunlich, als Coombe und Heisenberg für den Ursprungstamm *Vam*^{KS74} bereits 30 min nach dem Schlüpfen das erste Auftreten von Vakuolen beschreiben (Coombe & Heisenberg 1986). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den im vorherigen Abschnitt beobachteten Verlauf des Auftauchens der ersten Vakuolen im optischen System. Nach ca. 5-7

Tagen zeigen sich die ersten Vakuolen (vgl. Abbildung 12 B). Die fortschreitende Degeneration spiegelt sich auch in der Anfärbung mehrerer nicht näher bestimmbarer Zellen innerhalb des Laminakortex wider. Die restlichen Neuropile und Zellkörperschichten sind frei von Färbung. In der Ausschnittsvergrößerung (Abbildung 12 C) wird deutlich, daß die Färbung kernspezifisch ist. Aufgrund der Lage und Größe der Zelle handelt es sich wahrscheinlich um ein Laminamonomopolarneuron (Fischbach & Dittrich 1989; Meinertzhagen & O'Neil 1991). In Abbildung 12 D sind in einer Ausschnittsvergrößerung nochmals, wie auch in Abbildung 12 A, Zellen innerhalb des Komplexauges markiert.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, daß sowohl im Laminakortex als auch in anderen Bereichen des optischen Systems von *Vam*-Fliegen verschiedene Zelltypen degenerieren. Die Toluidinblau-Färbung kann jedoch keinen Aufschluß über die Art des Zelltodes oder die tatsächlich betroffenen Zellen geben. Um diese Fragen aufzuklären sind spezifischere Nachweismethoden nötig.

3.1.2.2 TUNEL Färbung an Kryostatschnitten

Um exakter zu ermitteln wie die Zellen innerhalb des Laminakortex und des optischen Systems absterben, wurde an horizontalen Kryostat-Kopfschnitten von 7 Tage alten *w Vam f* Männchen eine TUNEL-Färbung angefertigt. Dieser Nachweis gilt als eines der Indizien zum Nachweis von apoptotischem Zelltod und ist als Standard-Methode etabliert (Gavrieli et al. 1992).

Der Fliegenstamm *w Vam f* zeigt wie erwartet nach 7 Tagen eine massive Anfärbung innerhalb des Laminakortex (Abbildung 13 C & D). Direkt nach dem Schlüpfen (0 Tage) ist dort keine Färbung detektierbar (Abbildung 13 A). Auch nach 11 Tagen ist keine TUNEL-Färbung mehr nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Damit ergibt sich ein Zeitfenster von max. 0-11 Tagen, während dessen innerhalb der zur Lamina gehörenden Zellkörperschicht massiv Zellen absterben. Dies korreliert in etwa mit dem Auftreten der Vakuolen in den optischen Neuropilen (vgl. 3.1.1). Im Laminakortex gibt es Bereiche, in denen alle Zellkörper angefärbt sind (Abbildung 13 C&D). Die größten und prominentesten Zellkörper, die auch in der höchsten Anzahl im Bereich des Laminakortex vorhanden sind, sind die Monopolarzellen L1-L5. Die in diesem Bereich beschriebenen Gliazellen sind deutlich kleiner (Fischbach & Dittrich 1989; Meinertzhagen & O'Neil 1991). Entsprechend kann gefolgert werden, daß zusätzlich zu den bereits von Coombe und Heisenberg beschriebenen Laminamonomopolarneuronen L2 und L5 auch die Laminamonomopolarzellen L1, L3 und L4 von der Degeneration betroffen sind.

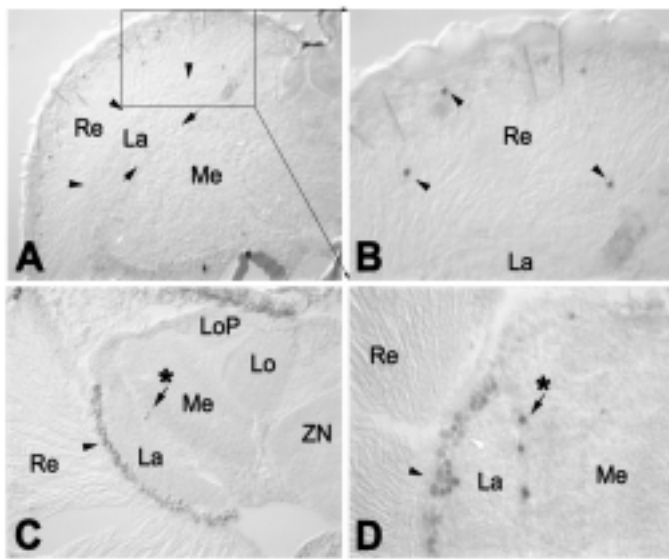


Abbildung 13: TUNEL Färbung an horizontalen Kryostatschnitten durch Köpfe von *w Vam f#7* Männchen

A) Frisch geschlüpft σ (300fache Vergrößerung): In dieser Übersicht tritt an keiner der durch die Pfeilspitzen markierten Stellen eine TUNEL positive Färbung auf.

B) Ausschnittsvergrößerung aus A (800fache Vergrößerung): Analog zu der Toluidinblau-Färbung aus Abbildung 12 A werden durch den TUNEL – Nachweis eindeutig Zellen innerhalb des Komplexauges dargestellt. Dies fungiert gleichzeitig als interne Kontrolle, daß das Nachweisverfahren funktioniert und somit innerhalb des restlichen zentralen Nervensystems tatsächlich keine TUNEL positiven Zellen vorhanden sind.

C) Übersicht über das optische System einer Hemisphärenhälfte eines 7 Tage alten σ (300fache Vergrößerung): Innerhalb des Laminakortex tritt massiv TUNEL positive Färbung auf. Der Rest des Nervensystems scheint unbeeinflusst.

D) 7 Tage altes σ (600fache Vergrößerung): Von der Intensität der Färbung her scheinen sich die betroffenen Zellen in unterschiedlichen Stadien des Zelltodes zu befinden (Schwarze und weiße Pfeilspitze). Innerhalb des Laminakortex gibt es Bereiche, in denen alle Zellkörper gefärbt sind. Zwischen Lamina und Medullakortex werden ebenfalls einige Zellkörper sehr stark angefärbt (Pfeil mit Asterix). **Re:** Retina; **La:** Lamina; **Me:** Medulla; **LoP:** LobulaPlatte; **Lo:** Lobula; **ZN:** Zentralhirn

Beim Abbau der DNA durch CAD (**C**aspase-3 **A**ktiviert **D**NAse; Liu et al. 1997; Enari et al. 1998) entstehen Vielfache von 180-200 bp. Bei einer Auftrennung dieser Bruchstücke in einem Agarosegel ergibt sich das für die Apoptose als typisch beschriebenes Bild einer nucleosomalen Leiter (Wyllie 1980; Wyllie et al. 1980). Auch die während des apoptotischen Zelltodes von anderen Endonucleasen generierten DNA-Fragmente von 150-500 kb (Oberhammer et al. 1993; Bortner et al. 1995) dienen der enzymatischen Reaktion der TUNEL-Färbung als nachweisbares Substrat. Andererseits entstehen auch in den späten Stadien des nekrotischen Zelltodes DNA-Bruchstücke (Dong et al. 1997) und gibt es auch Formen des apoptotischen Zelltodes, bei denen es nicht zur Ausprägung einer nucleosomalen Leiter kommt (Oberhammer et al. 1993). In beiden Fällen würde die TUNEL Methode als Apoptose-Indikator versagen und einmal falsch-positive, im anderen Fall falsch-negative Daten liefern (zusammengefaßt in Ansari et al. 1993 und Stadelmann & Lassmann 2000). Der letztendliche Beweis, ob Zellen tatsächlich apoptotisch aus dem Zellverband entfernt werden, wird deswegen häufig über eine Untersuchung der Ultrastruktur der degenerierenden Zellen durchgeführt.

3.1.2.3 Ultrastrukturelle Untersuchungen an *w Vam f* Fliegen

Durch die ultrastrukturelle Analyse von Ultradünnschnitten konnten die Ergebnisse der TUNEL-Färbung klar verifiziert und erweitert werden. So zeigt z.B. Abbildung 14 C einen stark fragmentierten Zellkern, eines der histologischen Phänomene, die für einen apoptotischen Zelltod als charakteristisch beschrieben sind. In Einklang mit den bisherigen Ergebnissen (vgl.

Ergebnisse und Diskussion

3.1.1 & 3.1.2.2) ist bei sehr jungen Fliegen (Abbildung 14 B) eine Degeneration von Nervenzellen im Laminakortex nur vereinzelt nachweisbar. Im gleichen Bereich ist die Degeneration nach 8 Tagen weit fortgeschritten und es scheinen alle Laminamonopolarzellen betroffen zu sein (vgl. Abbildung 14 A&D). Die hier gezeigten Daten sprechen dafür, daß zumindest alle Monopolarzellen und evtl. auch Gliazellen des Laminakortex durch die *Vam*-Mutation betroffen sind und apoptotisch absterben (Abbildung 14 C&D). Eine genauere Spezifikation der beteiligten Zellen und eine exakte Chronologie der degenerativen Erscheinungen ist mit den bisherigen Daten nicht möglich und könnte ultrastrukturell nur durch eine sehr aufwendige statistische Auswertung vieler Schnitte und Gehirne erreicht werden.

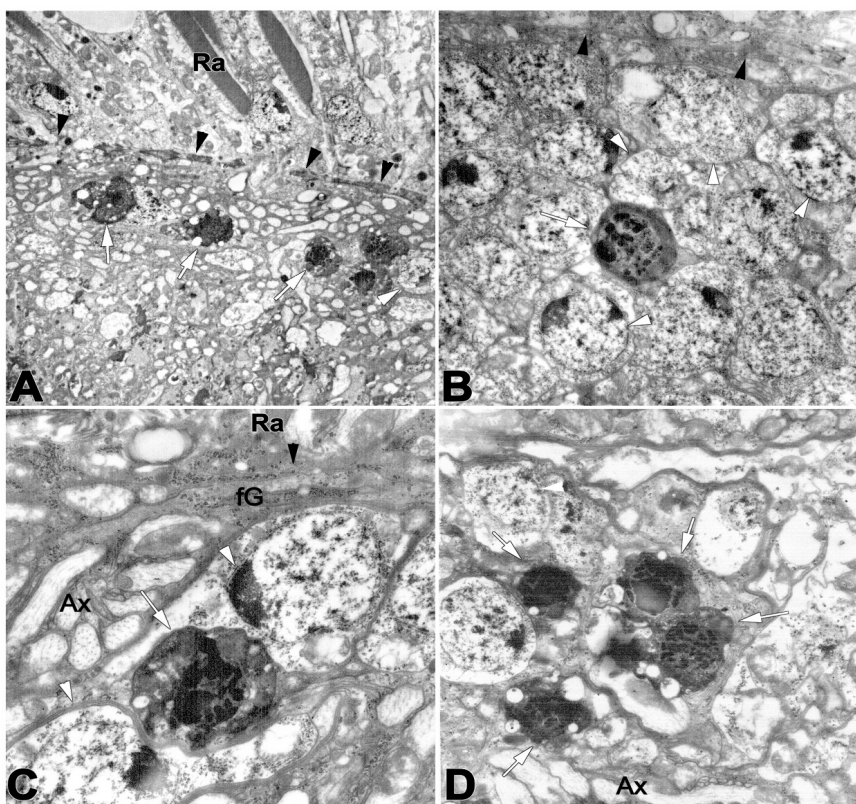


Abbildung 14: Ultrastruktur – EM-Aufnahmen von *w Vam f* Männchen

A) Übersichtsaufnahme über den distalen Laminakortex eines 8 Tage alten Männchens (1600fache Vergrößerung): Die schwarzen Pfeilspitzen markieren die Basallamina, die Abgrenzung zwischen Komplex- und Neuropilen. Die weißen Pfeile zeigen auf die deutlich degenerierten Zellen. Es sind kaum noch intakte Laminamonopolar-Somata zu erkennen (weiße Pfeilspitze; **Ra**: Rhabdome eines Photorezeptors). **B)** 4000fache Vergrößerung eines 0 Tage alten Männchens: Symbole wie in A. Bei diesem jungen Männchen treten nur sehr vereinzelt apoptotische Zellen auf und der Großteil der Laminamonopolarneurone ist intakt. **C)** 6300fache Vergrößerung eines 8 Tage alten Männchens: (**fG** fenestrated Glia). Unterhalb der Basallamina sind in dieser Schnittebene Axone und als kleine Punkte die darin verlaufenden Microtubuli zu erkennen (**Ax** Axon). Zwei Monopolarzellen, die eine apoptotische Zelle flankieren haben ihren

an der dunklen Färbung erkennbaren Nukleolus zu der degenerierenden Zelle hin ausgerichtet. Diese Zellkernpolarisation ist ein bekanntes Phänomen, wenn Nachbarzellen apoptotisch sterben. Gut zu erkennen sind auch die starke Fragmentierung des apoptotischen Zellkerns. **D)** 5000fache Vergrößerung eines 8 Tage alten Männchens. Hier ist ein ganzes Cluster an toten bzw. degenerierenden Zellen zu sehen. In der Mitte der vier betroffenen Zellen befindet sich eine amorph erscheinende Masse, die auch von einer bereits entfernten toten Zelle herrühren könnte. Ob auch Gliazellen betroffen sind läßt sich nicht mit endgültiger Sicherheit feststellen. Da die Laminamonopolar-Zellen jedoch so massiv degenerieren, ist davon auszugehen, daß auch Gliazelltypen zumindest stark beeinträchtigt werden.

Eine andere funktionell orientierte Standardmethode um Information über den physiologischen Zustand von klar definierten Zelltypen zu gewinnen, ist die Verwendung von Enhancer-Trap Linien. Diese Linien exprimieren zelltypspezifisch ein Reportergen, dessen Expressionsstatus einfach histologisch verfolgt werden kann.

3.1.3 Einfluß der *Vam* Mutation auf verschiedene zelltypspezifische Marker im ZNS

Ein Enhancer-Trap-Konstrukt ist ein autark nicht mehr mobilisierbares P-Element, das neben den Transposon-Sequenzen auch ein Markergen trägt (O'Kane & Gehring 1987). Dieses Markergen steht üblicherweise nur unter der Kontrolle eines schwachen Promotors. Um den Marker in nachweisbaren Mengen zu exprimieren muß das P-Element im *Drosophilagenom* in der Nähe eines endogenen Enhancers inserieren. Dadurch kann der Reporter zeitlich und räumlich analog zu dem eigentlich von diesem Enhancer kontrollierten Gen exprimiert werden. (Wilson et al. 1989; McCall 1994; Casares 1997). In 5-10% der Fälle, bei denen ein einzelnes Enhancer-Trap Konstrukt stabil im Genom integrierte, konnte auch gezeigt werden, daß das Expressionsmuster des Markers eine hohe Zell- und Gewebsspezifität aufweist (Hartenstein & Jan 1992; Bier 1989; Bellen et al. 1989; Perrimon et al. 1991).

In Enhancer Trap Linien mit lacZ als Reporter kann die β -Galaktosidase dazu benutzt werden, das artifizielle Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff umzuwandeln. Während der ersten Anwendungen wurde lacZ noch als Fusionsprotein mit dem P-Protein des P-Elements exprimiert (O'Kane & Gehring 1987). Diese Methode war vor allem dadurch eingeschränkt, daß aufgrund von N-terminalen Sequenzabschnitten des P-Proteins das gesamte Fusionsprotein in den Kern transportiert wurde. Demzufolge sind mit diesen Enhancer-Trap-Konstrukten auch nur die Zellkerne über die Blaufärbung darstellbar. Dieser Nachteil konnte durch die Einführung anderer lacZ-Konstrukte jedoch behoben werden. Für die Darstellung von Axonen und anderen Zellfortsätzen wurden z.B. ein kinesin-lacZ- (Giniger et al. 1993) und ein tau-lacZ-Konstrukt (Callahan et al. 1994) erfolgreich eingesetzt.

3.1.3.1 *Vam* reprimiert alle untersuchten lacZ Enhancer-Trap Linien

Enhancer-Trap Linien werden häufig eingesetzt, um Hinweise auf in Mutanten gestörte Funktionen zu erhalten. Im Falle von *Vam*, mit seinen degenerativen Auswirkungen auf Teile des zentralen Nervensystems, wurden verschiedene Linien mit nervensystemspezifischer lacZ Expression untersucht. Dazu wurden jeweils homozygote *Vam*^{KS74} Jungfrauen mit Männchen der entsprechenden Enhancer-Trap Linien verpaart. In der Folgegeneration wurden diejenigen Männchen aussortiert, die neben dem *Vam*-Chromosom auch ein Enhancer-Trap-Chromosom tragen. Die Köpfe dieser Männchen wurden nach unterschiedlichen Alterungsperioden am Kryostaten geschnitten und eine X-Gal Färbung durchgeführt (siehe 2.3; Ashburner 1989b). In allen

Ergebnisse und Diskussion

untersuchten Enhancer-Trap Linien (siehe auch 2.1.1) geht im *Vam*-Hintergrund die X-Gal Färbung deutlich zurück (vgl. Abbildung 15). Exemplarisch sind hier nur drei Linien gezeigt, die aber in etwa die Bandbreite der betroffenen Zellen verdeutlichen.

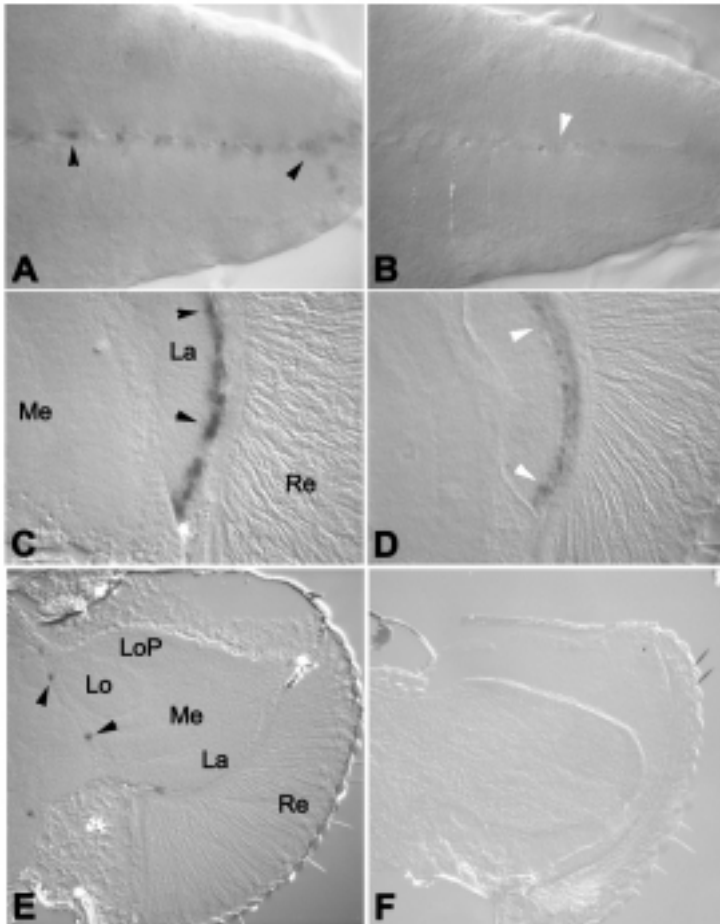


Abbildung 15: LacZ Enhancer Trap Linien

Gezeigt sind verschiedene zellspezifische Enhancer-Trap Linien, die lacZ als Markergen exprimieren. Der Nachweis erfolgte über eine X-Gal Färbung (siehe Ashburner 1989b; 2.1.1; 2.3). Links sind bei jedem Paar die wildtypischen Kontrollen aufgetragen. Rechts die entsprechenden *Vam*-Linien.

A) *wt^{ES}/Y;A254/+* (400fache Vergrößerung):
B) *Vam^{ES}/Y;A254/+* (400fache Vergrößerung):
 A und B zeigen eine Färbung der Enhancer-Trap Linie A254. Diese Linie spiegelt das Expressionsmuster von *Argos* wider (Kretschmar et al 1992, Meier 2000). Gezeigt ist nur ein kleiner Ausschnitt der Expression im Ventralganglion einer Larve im 3. Larvenstadium. (Schwarze Pfeilspitzen). Die Färbung fehlt in *Vam* fast vollständig (B) und ist entlang der Linie der midline Glia nur noch als leichter blauer Schimmer auszumachen (weiße Pfeilspitze).

C) X-Gal-Färbung an horizontalem Kryostat-schnitt durch den Kopf einer 7 Tage alten *wt^{ES}/Y;A509/+* Fliege (380fache Vergrößerung):

D) X-Gal Färbung an Kryostat-schnitt durch den Kopf einer 7 Tage alten *Vam^{ES74}/Y;A509/+* Fliege (400fache Vergrößerung): Beide Köpfe (C und D) wurden parallel auf dem selben Objektträger gefärbt. Auch hier ist zu sehen, daß die Färbung innerhalb des Laminakortex deutlich zurückgeht (*wt* schwarze, *Vam* weiße Pfeilspitzen).

E) X-Gal-Färbung an horizontalem Kryostat-schnitt durch den Kopf einer 7 Tage alten

wt^{ES}/Y;ter1/+ Fliege (200fache Vergrößerung):

F) X-Gal-Färbung an horizontalem Kryostat-schnitt durch den Kopf einer 7 Tage alten *wt^{ES}/Y;ter1/+* Fliege (200fache Vergrößerung): Terminal-1 ist ein Enhancer-Trap des gens *pruned*, daß in den Terminalzellen während der Tracheenentwicklung exprimiert wird (Guillemin et al. 1996). Diesmal ist die Färbung im *Vam* Hintergrund vollständig verschwunden (*wt* Schwarze Pfeile).
Re: Retina; **La:** Lamina; **Me:** Medulla; **LoP:** LobulaPlatte; **Lo:** Lobula.

Wie in Abbildung 15 A und B gezeigt, geht die X-Gal Färbung der Enhancer-Trap Linie A254 innerhalb des Ventralganglions von Larven des dritten Larvalstadiums bei *Vam*-Larven im Vergleich zu *wt* deutlich zurück. Dadurch wird gezeigt, daß sich die Auswirkung der *Vam*-Mutation nicht nur auf adulte Tiere beschränkt, sondern erste Effekte bereits während der larvalen Entwicklung einsetzen. Die Färbungen in allen Linien werden mit zunehmendem Alter der Fliegen immer schwächer und konnten in Abhängigkeit von der jeweiligen Enhancer-Trap-Linie ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr nachgewiesen werden (siehe auch Abbildung 15 E und F).

a) Schlußfolgerung aus den allgemeinen Enhancer-Trap Experimenten

Die zellspezifischen X-Gal Färbungen können Informationen über den physiologischen Zustand der Zellen liefern. Sind die Zellen nicht vorhanden, unterbleibt natürlich auch die Färbung. Einen differenzierteren Ansatz bildet die Beobachtung, daß manche Zellen nicht mehr oder aber erstmalig im Laufe der Entwicklung durch die X-Gal Färbung dargestellt werden können. Dafür kommen zunächst zwei mögliche Ursachen in Frage:

Viele Genprodukte werden nur in bestimmten Entwicklungsabschnitten benötigt. Die kontrollierenden Enhancer sind somit neben ihrer räumlichen Spezifität auch nur in engen zeitlichen Fenstern aktiv (Bellen et al. 1989; Bellen et al. 1990; Hartenstein et al. 1992).

Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die Zellen in ihrer Entwicklung gestört werden und entsprechend den physiologischen Zustand, den sie zur Aktivierung oder Abschaltung eines bestimmten Enhancers benötigen, nicht mehr erreichen.

In Abbildung 15 wurde gezeigt, daß sich der von der *Vam* Mutation ausgeübte Effekt offenbar nicht nur auf die bislang histologisch nachweisbar betroffenen Regionen der optischen Neuropile beschränkt, sondern scheinbar alle Zellen innerhalb des Drosophilagehirns betrifft. Träfe man nun die übliche Schlußfolgerung, daß eine schwache X-Gal Färbungen ein Indiz für den schlechten physiologischen Gesamtzustand der Zellen ist, so wäre zu erwarten, daß das *Vam*-Allel *Vam*^{KS74} deutlich massivere Störungen auch außerhalb des optischen System hervorruft. Der Fliegenstamm *Vam*^{KS74} weist jedoch außerhalb des optischen Systems keine Degenerationerscheinungen auf und innerhalb eines Zeitraums von 60 Tagen ist die Mortalität gegenüber *w^{ts}* Fliegen nicht signifikant erhöht (Daten nicht gezeigt).

Aus dem Experiment von Abbildung 15 läßt sich somit zweierlei schließen. Wegen der Spannweite der untersuchten Zelltypen kann gefolgert werden, daß das *Vam*-Gen nahezu ubiquitär, zumindest jedoch in den über Enhancer-Trap überwachten Linien, exprimiert wird und aktiv ist. Da es, wie oben ausgeführt, unwahrscheinlich erscheint, daß alle Zelltypen degenerieren oder physiologisch so stark beeinträchtigt werden, scheint die *Vam*-Mutation den Reporter der Enhancer-Trap Linien, die β -Galaktosidase, zu beeinflussen. Um diese Hypothese zu testen und zu überprüfen, ob *Vam* spezifisch auf die Enhancer-Trap Konstrukte wirkt, oder aber doch die normale Genexpression aller Gene beeinträchtigt, wurde eine der Linien, ein Enhancer-Trap für *repo*, näher untersucht (siehe Abbildung 16).

3.1.3.2 *Vam* beeinflusst nicht die Expression des Glia-Markers *repo*

Der Stamm *repo*⁴ trägt eine homozygot letale P-Element-Insertion innerhalb des *repo*-Genlocus (Karpen & Spradling 1992, Xiong et al. 1994; Halter et al. 1995). Die Expression des im P-Element enthaltenen Reportergens *lacZ* entspricht auf zellulärer Ebene bis auf wenige Ausnahmen dem Muster der Anti-REPO-Antikörperfärbung (Halter et al. 1995). REPO ist ein auf das optische System beschränkter, gliaspezifischer Transkriptionsfaktor (Xiong et al. 1994, Halter et al. 1995). Das Protein wird ab dem 9. Embryonalstadium exprimiert und ist für die Ausdifferenzierung und das Überleben der Gliazellen essentiell (Halter et al. 1995). Der Verlust der *repo*-Expression hat eine Degeneration der Gliazellen und der Laminaneurone zur Folge (Xiong & Montell 1995). Es ist jedoch noch ungeklärt, ob die Neurone absterben und die Gliazellen folgen oder umgekehrt.

Wie in Abbildung 16 A und B gezeigt geht die Färbungsintensität des glialen Enhancertraps *repo*⁴ in Übereinstimmung mit allen bisher getesteten Enhancer-Trap Linien und somit erwartungsgemäß zurück. Eine schwächere *lacZ* Färbung kann molekular gesehen zunächst zweierlei Ursachen haben. Bei gleicher Menge an Enzym könnte die Aktivität und damit in diesem Fall die

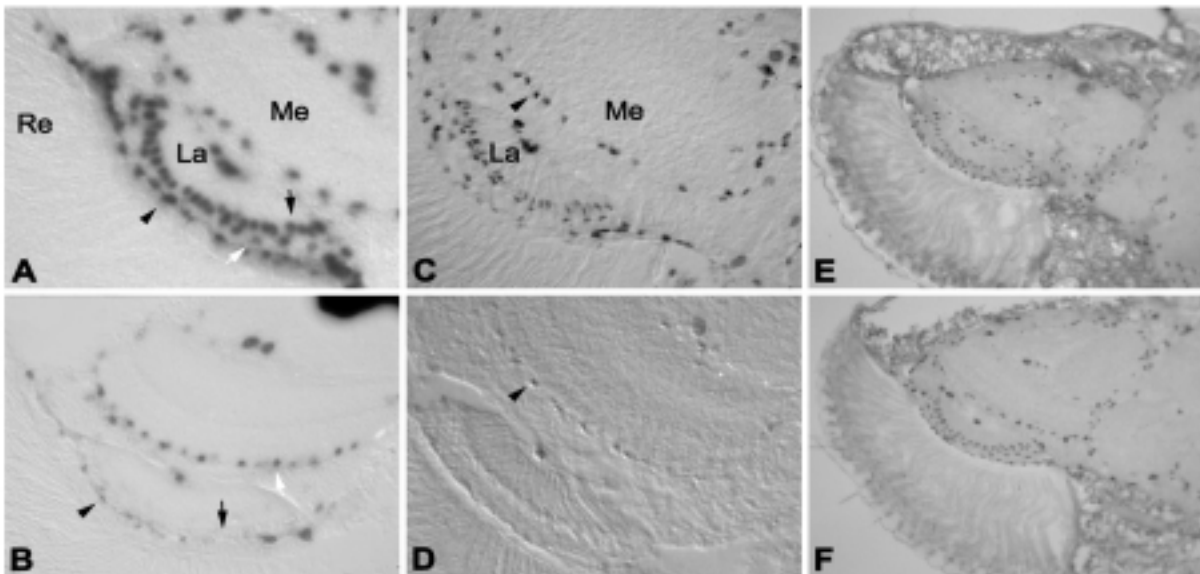


Abbildung 16: Horizontale Kryostatschnitte der glialen Enhancer-Trap Linie *repo*⁴

Die obere Reihe Bilder (**A, C & E**) entspricht *w^{ts}/Y; repo⁴/+*. **B D & F** zeigen Aufnahmen von *Vam^{KS74}/Y; repo⁴/+*. **A**) X-Gal Färbung an 7 Tage alten ♂ (400fache Vergrößerung): Die einzelnen Typen von Gliazellen im Laminakortex sind stark und gleichmäßig gefärbt. Der schwarze Pfeil weist auf die innere, die schwarze Pfeilspitze auf die äußere Satelliten-Glia. Die durch den weißen Pfeil markierte Zelle gehört wahrscheinlich zur Pseudocartridgeglia. **B**) (300fache Vergrößerung): Im *Vam^{KS74}*-Hintergrund fällt auf, daß innerhalb des Laminakortex die Färbung insgesamt zurückgeht (Schwarze Pfeilspitze und Pfeil). Die Färbung der Interfacemedullaglia scheint, obwohl im Vergleich zum *w^{ts}* in A auch abgeschwächt, weniger beeinträchtigt zu sein, als die Färbung im Laminakortex (weißer Pfeil). **C & D**) (200fache Vergrößerung) Antikörperfärbung gegen β -Galaktosidase. (Prim. Antikörper 1:5000 in PBS siehe auch 2.3). Ein erwartungsgemäß sehr ähnliches Bild zur X-Gal Färbung zeigt sich bei einer Anti- β -Gal Färbung. Auch hier erscheint die Interfacemedullaglia im Vergleich zur Lamina-Glia stärker gefärbt (Pfeilspitzen in C und D). **E & F**) Antikörperfärbung gegen REPO. (prim. Antikörper 1:150 in PBS mit Larven präadsorbiert). Zwischen *Vam^{KS74}* und *w^{ts}* bestehen keine signifikanten Unterschiede. **Re:** Retina; **La:** Lamina; **Me:** Medulla

Umsetzung von X-Gal in einen blauen Farbstoff gehemmt werden. Ebenso wäre es denkbar, daß die Menge an lacZ in den betroffenen Zellen im Vergleich zum Wildtyp verringert wird und die Enzymaktivität unbeeinflusst bleibt. Der Versuch zeigt, daß wohl die zweite Alternative zutrifft, da in *Vam*^{KS74} Fliegen der Level an durch Anti- β -Gal nachweisbarem Enzym verringert wird (Abbildung 16 C und D). Die Zellen, in denen der Reporter lacZ exprimiert wird, sind jedoch vorhanden. Zumindest legt dies die, im Vergleich zum Wildtyp, unverminderte Stärke der anti-REPO Färbung in Abbildung 16 E und F nahe. Wenn REPO keine außergewöhnlich lange Halbwertszeit besitzt, bedeutet dies, daß *repo* in den Gliazellen weiterhin exprimiert wird und diese somit auch physiologisch aktiv sind.

3.1.3.3 Eine mögliche Funktion des *Vam*-Genprodukts

Die Enhancer-Trap Linie *repo*⁴ mit dem Reportergen lacZ und *repo* selbst stehen unter der Kontrolle des gleichen Enhancers (Xiong et al. 1994). Da REPO ein zentraler Marker der untersuchten Gliazellen ist, kann man davon ausgehen, daß die ausdifferenzierten Zellen sicher vorhanden und wahrscheinlich auch physiologisch weitgehend funktionell aktiv sind. Auf jeden Fall bleibt die *repo* Expression, im Gegensatz zur lacZ Expression, während der Versuchsdauer von 5 Tagen unbeeinflusst (siehe Abbildung 16). Die *Vam*-Mutation scheint also weniger die Zellen an sich zu schädigen, was sekundär zu einer Beeinflussung der Färbung führen würde, sondern *Vam* beeinträchtigt direkt den Reporter des Enhancer-Trap Konstrukts. Wenn nun, wie oben gezeigt, die Menge an detektierbaren Reporter stark zurückgeht, so liegt die Vermutung nahe, daß in *Vam*-Fliegen spezifisch die Transkription des Reporterkonstrukts reprimiert wird. Vergleicht man die einzelnen hier vorgestellten Enhancer-Trap-Linien und sucht nach Gemeinsamkeiten, so fällt auf, daß sie alle den identischen Reporter, ein an das P-Protein des Transposons fusioniertes lacZ, besitzen. Der zugehörige P-Promoter ist nur sehr schwach und reicht autark nicht für einen nachweisbaren Expressionslevel aus. Entsprechend ergäben sich als mögliche Angriffspunkte des *Vam* Genprodukts entweder der P-Promoter selbst (z.B. GTFs siehe 1.3.1) oder die jeweiligen Enhancer (siehe auch 1.3.2.1) oder aber ein Bindeglied innerhalb der Aktivierungskette (siehe auch 1.3.2.2) um die Transkription zu reprimieren. Es ist jedoch aufgrund der Diversität der einzelnen Expressionsmuster anzunehmen, daß die Enhancer nur wenige Gemeinsamkeiten besitzen. Damit bleibt als wahrscheinlichster Wirkungsort für *Vam* der allen Linien gemeinsame P-Element Promotor.

Wie in der Einleitung kurz erläutert, ist die Regulation eines Promotors hochkomplex und im Detail noch unverstanden. Bislang wurden ca. 30 verschiedene Proteine identifiziert, die für die Transkriptionsinitiation unabdingbar sind. Die Zahl der für Promotoren spezifischen und nur dort fakultativ benötigten Genprodukte liegt weit höher. Viele davon sind noch unbekannt. Wenn die hier gezeigte transkriptionelle Reprimierung des P-Element Promotors bestätigt werden kann, könnte VAM ein Bestandteil der Transkriptionsmaschinerie sein.

Als physiologischer Wirkungsort in Fliegen kämen dann auch ein oder mehrere Gene in Frage, die einen dem P-Promoter ähnlichen Promoter besitzen. Obwohl *Vam* ubiquitär exprimiert zu sein scheint, würde so sein störender Effekt auf distinkte Zelltypen beschränkt werden. Wenn in diesen Zellen bestimmte Gene in einer zum lacZ-Reporter analogen Weise reprimiert werden, wäre es denkbar, daß die betroffenen Zellen, wie in 3.1.2.2 beschrieben, apoptotisch absterben und so die Grundlage für die Degenerationserscheinungen im optischen System gelegt wird.

Wenn man diesen repo-Befund auf die anderen Enhancer-Trap Experimente überträgt, so ergibt sich daraus folgende Vermutung: In einigen Enhancer-Trap-Experimenten spiegelt der Rückgang der X-Gal Färbung sicher auch den sich verschlechternden Zustand der Zellen in *Vam* Fliegen wieder. Dies deutet sich ebenfalls in diesem Versuch durch die Beobachtung an, daß obwohl die Färbung generell nachläßt einige Zellsubtypen etwas robuster zu sein scheinen (vgl. Interfacemedulla Glia in Abbildung 16 A – F). Andere Zellentypen werden wahrscheinlich, obwohl *Vam* dort offenbar auch exprimiert wird, nicht soweit beeinflußt, daß sie degenerieren oder ihre Funktionalität verlieren.

3.2 Molekulare Identifizierung des *Vam* Gens

3.2.1 Die Semidominanz des *Vam* Gens und Implikationen für dessen Identifizierung

Wie in 1.1.2 diskutiert, handelt es sich bei *Vam* um eine semidominante Mutation. Die wahrscheinlichste Ursache für den Phänotyp ist somit ein verändertes *Vam* Protein, das seine eigentlichen zellulären Aufgaben nicht mehr wahrnehmen kann, oder durch die Mutation neue störende Funktion ausübt. Der klassische Weg, einen mutanten Phänotyp durch eine wildtypische Kopie des betroffenen Gens, oder des fraglichen genomischen Bereichs zu retten, ist nur bei rezessiven Mutationen möglich. Bei dominanten oder, wie im Falle des *Vam* Allels, semidominanten Mutationen scheidet dieser Weg aus.

Der *Vam*-Phänotyp erweist sich auch als weitestgehend unbeeinflussbar von zusätzlichen wildtypischen Kopien. Über Duplikationen, die den *Vam*-Bereich beinhalten, wie z.B. $Dp(1:4)f^+long$, kann das Verhältnis von *Vam*- zu *wt*-Kopien maximal auf 1:3 erhöht werden (Weibchen: *Vam*/+; $Dp(1:4)f^+long / Dp(1:4)f^+long$). Wie in der Einleitung (siehe 1.1.2) beschrieben ergibt sich bereits ein Unterschied zwischen heterozygoten Weibchen auf der einen und homozygoten Fliegen und hemizygoten Männchen auf der anderen Seite. Dieser Effekt kann jedoch im Rahmen des experimentell Durchführbaren nicht verstärkt werden. Diese Einschränkung auf die experimentellen Rahmenbedingungen ist aus zweierlei Gründen notwendig. Zum einen kann die Kopienanzahl, solange das individuelle Gen noch unbekannt ist, durch Überexpression nicht beliebig gesteigert werden. Es wäre also durchaus möglich, daß bei einer genügend hohen Anzahl von wildtypischen *Vam*-Kopien der Phänotyp verschwindet. Zum anderen beruht diese Beurteilung rein auf der Bewertung der Löcher im optischem System. Und dieses Kriterium ist, wie in 3.1.1 dargelegt, nicht geeignet fundierte qualitative oder gar quantitative Aussagen zu treffen.

3.2.1.1 Induktion des Phänotyps in wildtypischen Fliegen

Im Falle der semidominanten Mutation *Vam* heißt dies, daß der Phänotyp nicht durch eine Transformation mit einer wildtypischen Kopie gerettet werden kann. Im Umkehrschluß bedeutet dies jedoch auch, daß als einzig wirklich beweiskräftige Strategie die Möglichkeit bleibt den dominanten Effekt des Gens bei einer Keimbahntransformation zu nutzen. Dabei würde der fragliche genomische Bereich aus den mutanten Fliegen isoliert, in ein P-Element kloniert und schließlich wildtypische Fliegen damit transformiert. Aufgrund der Dominanz sollte sich so in sonst genetisch wildtypischen Fliegen der Phänotyp der Mutation induzieren lassen. Dabei wird jedoch der genomische Bereich, der für die Transformation ausgewählt wurde, aus seinem natürlichen Kontext gerissen, wodurch cis-kontrollierende Bereiche, die für die Expression zwingend notwendig wären (z.B. Enhancer), verloren gehen können. Obwohl das mutante Gen im Konstrukt enthalten wäre bliebe der Phänotyp somit verborgen. Und selbst wenn der Phänotyp in den Transformanten auftritt, ist es möglich, daß er aufgrund von Positionseffekten, die sich aus dem P-Element Insertionsort ergeben, leicht modifiziert zu Tage tritt.

Als experimentelle Strategie wurde der für das *Vam*-Gen fragliche Bereich über PCR in Teilstücken kloniert und mit einem P-Element ohne eigene Kontrollbereiche in w^{1118} -Embryonen injiziert. Das P-Element ist so modifiziert, daß es autark nicht mehr mobilisierbar ist. Zur stabilen Integration bedarf es eines sog. *helper* Plasmids, das zwar selbst nicht integriert, aber die Transposase liefert und so den eigentlichen Transformationsvektor ins Fliegen-genom schleusen

kann. Von den jeweils ca. 1500 injizierten Embryonen werden die überlebenden Fliegen als Einzelstämme etabliert und auf eine Integration des P-Elementes mit der darin enthaltenen *Vam*-DNA selektioniert. Linien, die ein P-Element tragen in dem der tatsächlich für die *Vam*-Mutation verantwortliche Genlocus enthalten ist, sollten wegen der Semidominanz zumindest einen *Vam* ähnlichen Phänotyp zeigen.

3.2.1.2 Reversion des Phänotyps durch Ausschalten des defekten Gens

Eine weitere Möglichkeit dominante oder semidominante Mutationen molekular zu erfassen besteht darin, das mutante Gen durch eine erneute Mutation vollständig auszuschalten. Diese neu generierte Nullmutante könnte dann den dominanten Phänotyp nicht mehr induzieren. Diese Strategie wurde bei der Röntgenmutagenese, wie in 3.2.4.1 beschrieben, verfolgt. Dabei sollte durch eine Mutagenese im genetischen *Vam* Hintergrund eine Mutation erzeugt werden, die zum Verlust des histologischen Phänotyps führt. Der Nachteil dieses Ansatzes besteht darin, daß durch die Röntgenstrahlen meist Deletionen erzeugt werden, die mehr als ein Gen betreffen (siehe auch 3.2.4.1).

3.2.2 Keimbahntransformationen

Nachdem anderweitig die *Vam*-Mutation auf 18 kb eingegrenzt werden konnte wurden drei verschiedene P-Element Konstrukte kreiert, die die fraglichen Transkriptionseinheiten der *Vam*-Region abdecken (siehe Abbildung 17). Aufgrund eines innerhalb der Arbeit weiter eingegrenzten RFLPs (Schleip 1997; Cruz 1998; Glück 1996; siehe auch 1.1.2) muß die *Vam*-Mutation rechts der in Abbildung 17 rot eingezeichneten Linien liegen (siehe Abbildung 17 links der *SacI*

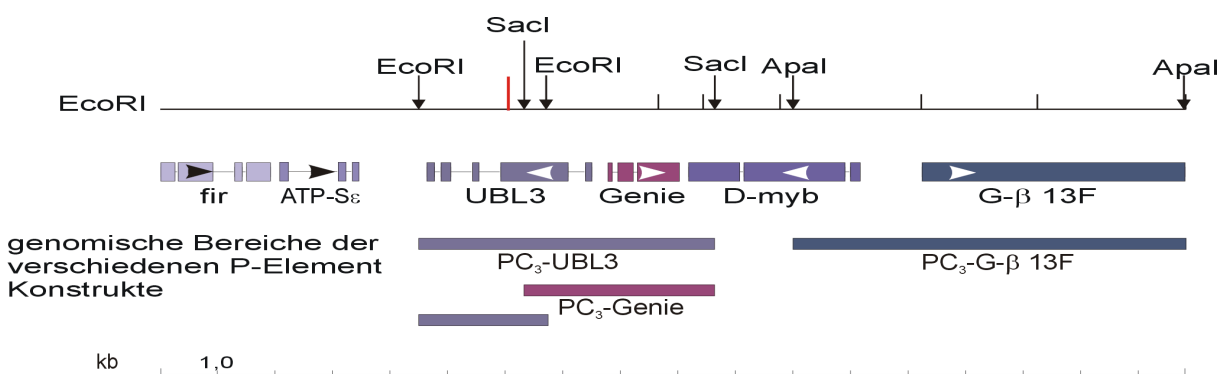


Abbildung 17: Die Transformationskonstrukte

Die drei PC₃-Balken repräsentieren die aus *Vam*-Fliegen stammenden genomischen Bereiche, mit denen w¹¹¹⁸ Embryonen transformiert wurden bzw. werden. Zur Orientierung sind oberhalb der in der *Vam*-Region bekannten Transkriptionseinheiten zusätzlich zur EcoRI-Restriktionskarte noch die jeweiligen Hauptklonierungsschnittstellen der einzelnen Konstrukte angegeben. *fir* = FBgn0030699; *ATP-Se* = FBgn0040875; *ubl3* = FBgn0026076; *Genie* = CG15914 = FBgn0030700; *D-myb* = FBgn0002914; *G-β 13f* = FBgn0001105.

Schnittstelle). Dadurch werden als mögliche Kandidaten für die *Vam*-Mutation sowohl *fir* als auch *ATP-e-S* ausgeschlossen. Zu Beginn der Arbeit waren innerhalb der Region nur die Transkripte *D-myb* und *G-β 13F* bekannt.

Nachfolgend werden die Ergebnisse für die Keimbahntransformationen mit den drei Konstrukten beschrieben.

3.2.2.1 PC₃-G-β13F

Das in (2.2.7) beschriebene Konstrukt PC₃-G-β-13F wurde in *w*¹¹⁸ Embryonen injiziert und aus den folgenden Generationen wurden zwei unabhängige Linien etabliert. Keine dieser vier Linien zeigte in unabhängigen Experimenten nach 21 Tagen auf Paraffinschnitten unter Autofluoreszenz einen *Vam* ähnlichen Phänotyp. Damit konnte gezeigt werden, daß die semi-dominante *Vam*-Mutation nicht innerhalb des durch das P-Element transformierten Bereichs inklusive des G-β 13F Genlocus liegt. Ebenso diente dieses Experiment als eine Art Nullkontrolle, bei der gezeigt wird, daß die Transformation mit dem P-Elementvektor pP{CoSpeR-3} alleine nicht zu degenerativen Erscheinungen führt.

3.2.2.2 PC₃-UBL3

Das in 2.2.7 beschriebene Konstrukt PC₃-UBL3 wurde in *w*¹¹⁸ Embryonen injiziert und aus den folgenden Generationen 20 Stämme (PC₃-UBL3^[#1-20]) mit mindestens zwei unabhängigen Linien etabliert. Die Stämme #9, #5, #4, #3 und #2 wiesen in zwei voneinander getrennten Experimenten einmal nach 25 und einmal nach 17 Tagen einen eindeutigen, *Vam*-ähnlichen Phänotyp auf (siehe Abbildung 18, nur Stamm #9 gezeigt).

a) Die Linie PC₃-UBL3^[9]

Der Stamm PC₃-UBL3^[9] zeigte den robustesten Phänotyp. Die Autofluoreszenzaufnahmen in Abbildung 18 zeigen deutlich, daß durch die Integration dieses genomischen *Vam*-Bereichs der *Vam*-Phänotyp induziert werden kann. In diesem Experiment wurden von je 4 Männchen und Weibchen Paraffinschnitte angefertigt. Alle zeigen in mehr oder weniger ausgeprägter Form den beschriebenen Phänotyp. Auf dem selben Kragen befinden sich neben den Kontrollfliegen weitere P-Element Linien, die keinen oder nur sehr schwache Phänotypen zeigen. Die einzelnen Vakuolen in Abb. 18 C und D können aufgrund ihrer Form und dem Auftreten in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Schnitten der Serie eindeutig von histologischen Artefakten unterschieden werden. Vor allem Löcher in der Lamina, wie in Abbildung 18 D gezeigt, sind außer in mutanten Fliegen nie beobachtet worden. In Abbildung 18 E liegt sozusagen der klas-

sische *Vam*-Phänotyp mit den namensgebenden Vakuolen in der Medulla vor. In allen Männchen der Linie #9 ist der Phänotyp deutlich stärker ausgeprägt und entspricht in seiner Stärke in etwa den Aufnahmen in Abbildung 18 E und F.

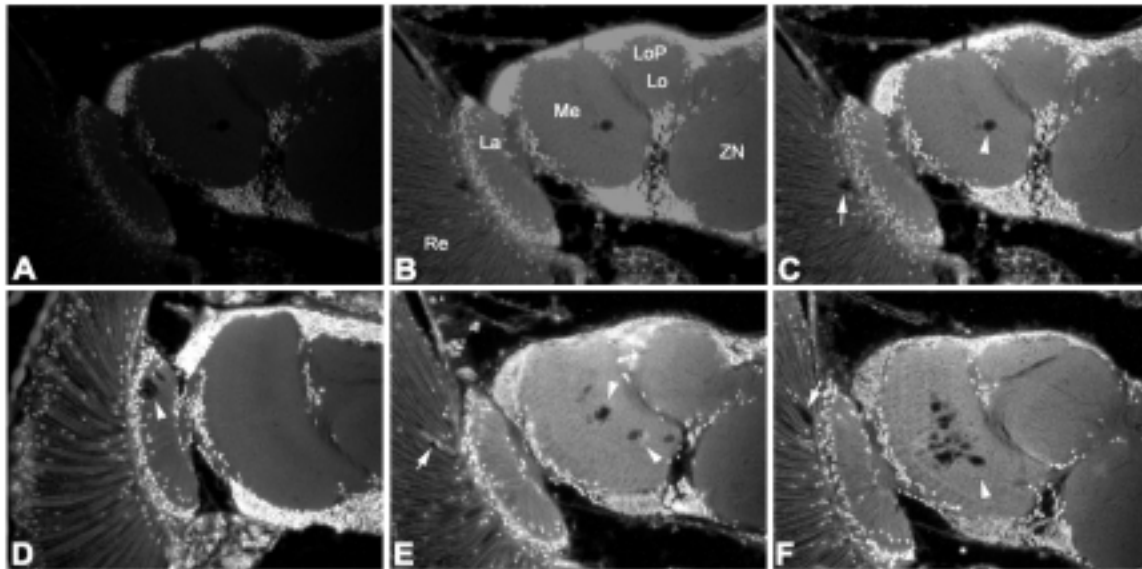


Abbildung 18: Autofluoreszenzaufnahmen von 25 Tage alten Fliegen der Linie PC₃-UBL3^[9]

Die Pfeilspitzen markieren jeweils Vakuolen im optischen Neuropil, die Pfeile Degenerationserscheinungen im Komplexauge. **A)** kurze Belichtungszeit; **B)** lange Belichtungszeit; Das Bild **C** entspricht einer in Graustufen überführten Überlagerung von A und B. Die Bilder D-F sind analog aus zwei Ausgangsbildern entstanden. **C)** PC₃-UBL3 ♀; **D)** PC₃-UBL3 ♀; **E)** PC₃-UBL3 ♂; **F)** PC₃-UBL3 ♂: (Zur näheren Beschreibung der einzelnen Aufnahmen siehe Text). **Re:** Retina; **La:** Lamina; **Me:** Medulla; **LoP:** LobulaPlatte; **Lo:** Lobula; **ZN:** Zentralhirn

Der genomische Bereich, der innerhalb des Transformationsvektors enthalten ist wurde aus *Vam*^{KST4} Fliegen isoliert (siehe auch 2.2). Der P-Elementvektor enthält außer für das Markergen *w*⁺ keine eigenen Promotorsequenzen (Perrimon 1991). Gene, die innerhalb des Inserts liegen, können entsprechend nur von eigenen Kontrollregionen gesteuert transkribiert werden. Daß mehrere unabhängige Linien durch eine Insertion innerhalb eines anderen Genlocus eine neue Mutation mit *Vam* ähnlichem Phänotyp generieren, ist sehr unwahrscheinlich. Aus diesen Überlegungen und den zugrunde liegenden Daten folgt, daß der im P-Element enthaltene Bereich die semidominante *Vam*-Mutation enthalten muß. Mit diesem Experiment kann jedoch noch keine Aussage über das betroffene Gen und die Art der Mutation getroffen werden.

3.2.2.3 PC₃-Genie

Das in 2.2.7 beschriebene Konstrukt PC₃-Genie liegt fertig vor. Aus den insgesamt ca. 5000 injizierten Embryonen konnten jedoch keine rotäugigen und somit P-Element tragenden Nachkommen isoliert werden (siehe auch 4.1).

3.2.2.4 Diskussion der P-Element Transformationsexperimente

1982 gelang es Rubin und Spradling (Rubin & Spradling 1982) erstmalig ein in freilebenden *Drosophiliden* vorkommendes transposables Element so zu modifizieren, daß es zur gezielten Keimbahntransformation der Fliegen eingesetzt werden konnte. Bereits in den ersten beiden parallel veröffentlichten Arbeiten (Rubin & Spradling 1982 und Spradling & Rubin 1982) wurden zwei wesentliche Anwendungen der P-Element gestützten Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster* beschrieben. In der ersten Arbeit konnte durch Einbringen einer Kopie des Gens *rosy*, einer Xanthin Dehydrogenase, die an der Ausbildung von Augenpigmenten beteiligt ist, die wildtypische Augenfarbe in rosa-äugigen *ry* Fliegen wiederhergestellt werden (Rubin & Spradling 1982). In der zweiten Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch die Insertion von P-Elementen Genloci inaktiviert werden können (Spradling & Rubin 1982) – Im ersten Fall also die Rettung einer vorhandenen Mutante durch Einbringung einer neuen wildtypischen Kopie des betroffenen Gens und im zweiten die Generierung neuer Mutanten. Eine dritte Hauptanwendung ist die von O'Kane und Gehring beschriebene Enhancer-Trap-Methode (O'Kane & Gehring 1987). Als namensgebende Voraussetzung dafür wurde ein lacZ tragendes P-Element in einem von einem spezifischen Enhancer kontrollierten Bereich inseriert. Dadurch können über einen Nachweis des nun unter Enhancer-Kontrolle befindlichen bakteriellen Enzyms Erkenntnisse über den Regulations- und Expressionsstatus einzelner Zellen oder Zellgruppen gewonnen werden (siehe auch 3.1.3). Diese Basisanwendungen wurden vielfach modifiziert und verfeinert (z.B. P-Element-Mutagenese: Cooley et al. 1988, zusammengefaßt in Spradling et al. 1995; Gal4-UAS System: Brand & Perrimon 1993, zusammengefaßt in Phelps & Brand 1998; RNA-Interference: Kennerdell 2000).

Wenn eine Mutante durch ein P-Element mit einer wildtypischen Kopie eines bestimmten Gens gerettet werden kann, so gilt dies allgemein als endgültiger Beweis dafür, daß das neu eingebrachte Gen auch für den mutanten Phänotyp verantwortlich ist.

Im Fall von *Vam* ist dieser Beweis aufgrund der Semidominanz, wie in 3.2.1 diskutiert, nicht möglich. Der experimentelle Ansatz, der sich dies zunutze macht, ist die Keimbahntransformation von w^{1118} -Fliegen mit definierten Bereichen aus *Vam*-Fliegen. Da zunächst nichts über die Art der Mutation in *Vam*-Fliegen bekannt war, ist es notwendig neben dem genomischen Abschnitt eines Gens auch die kontrollierenden Bereiche mit in die *wt*-Fliegen zu transformieren. Dadurch kann gewährleistet werden, daß jede Art Mutation Berücksichtigung findet: sowohl Defekte in Kontroll- oder Promotor-Bereichen, Irregularitäten des Spleißvorgangs, oder Modifikationen innerhalb der für Aminosäuren kodierenden Sequenzbereiche.

Das Konstrukt PC₃UBL3 induziert den *Vam*-Phänotyp. Die eigentliche *Vam*-Mutation muß also innerhalb dieses Bereichs liegen. Zum Zeitpunkt der Klonierung dieses Bereichs aus *Vam*-Fliegen war nur die Existenz des UBL3-Transkripts innerhalb des Konstruktes bekannt. Erst die Entdeckung des putativen Transkripts CG15914 und der Beweis, daß es auch tatsächlich exprimiert wird, erhöhten die Anzahl der möglichen Kandidaten wieder auf zwei.

Daß die Ausprägung des Phänotyps von der originären Form des *Vam* Phänotyps abweicht könnte an Positionseffekten oder fehlenden Kontrollbereichen liegen. Der für die Transformation benutzte Bereich ist vergleichsweise kurz (vgl. Abbildung 17) und entsprechend können kontrollierende Bereiche während der Klonierung „verloren“ gegangen sein. Deswegen spiegelt die P-Element transformierte Form von *Vam* nicht zwingend auch das natürliche Expressionsverhalten des Gens wieder.

Parallel zu den Transformationsexperimenten wurde die *Vam*-Region und die darin enthaltenen Transkripte molekular weiter untersucht.

3.2.3 Die Transkripte der *Vam*-Region

Innerhalb dieser Arbeit wurde aus *Vam*-Fliegen DNA isoliert und über PCR verschiedene die jeweiligen Transkriptionseinheiten abdeckende Bereiche kloniert (vgl. 2.2.4). Diese Bereiche wurden innerhalb dieser Arbeit und vor allem als Bestandteil zweier Diplomarbeiten (Cruz 1998; Maruhn 1999) mehrfach sequenziert. Zum Abgleich wurden aus den vorhandenen Cosmiden (vgl. Abbildung 19) unterschiedliche Bereiche genomischer Wildtyp-DNA subkloniert und ebenfalls sequenziert. Die zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen Datensätze aus dem *Drosophila*-Genomprojekt wurden ebenfalls zur Aufdeckung eventuell vorhandener Mutationen herangezogen. Zu Beginn dieser Arbeit waren innerhalb des *Vam*-Bereichs nur zwei Gene und die dazu

publizierten, teilweise sogar fehlerhaften Sequenzdaten (vgl. Cruz 1998) bekannt: Das *Drosophila*-Ortholog des Transkriptionsfaktors und Proto-Onkogens c-myb (Katzen 1995; Fbgn0002914) und die G-protein β -Untereinheit 13F (Yarfitz et al. 1988; FBgn0001105; siehe Abbildung 19).

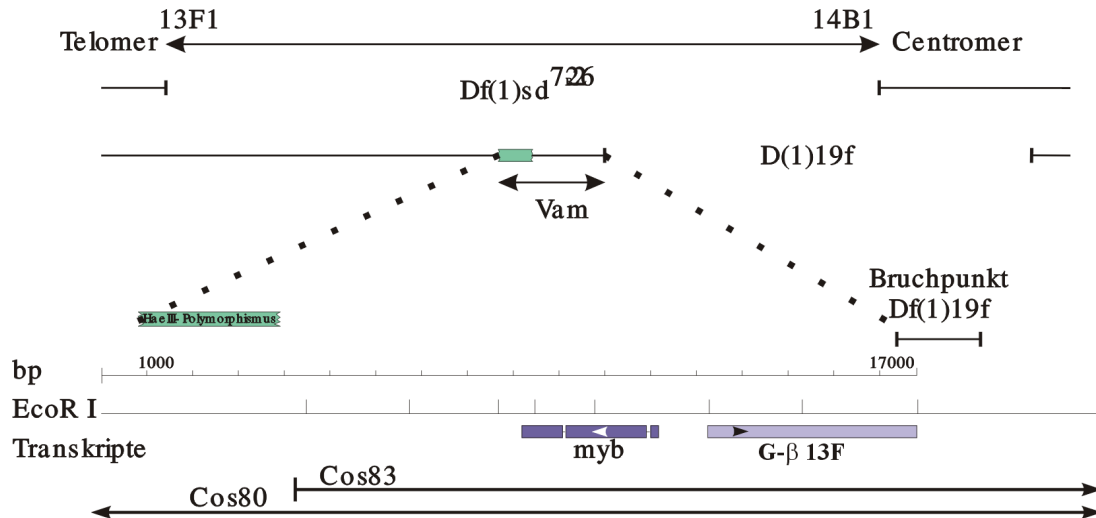


Abbildung 19: Stand der *Vam*-Kartierung zu Beginn der Arbeit

Über den Bereich von ca. 18kb bestand, abgesehen von den beiden veröffentlichten Transkripten, keinerlei Sequenzinformation. *Vam* wird von der Defizienz *Df(1)sd⁷²⁶* aufgedeckt, liegt aber nicht im Bereich von *Df(1)19f*. Dadurch ergibt sich eine proximale Grenze mit dem Bruchpunkt der *Df(1)19f*. Durch einen *HaeIII* RFLP konnte der Bereich distal auf die schematisch dargestellten ca. 18kb eingegrenzt werden. Der Bereich lag in zwei Cosmiden (*Cos80* und *Cos83*) kloniert vor. Die Transkripte *D-myb* und *G-β13F* wurden von anderen Arbeitsgruppen publiziert und die entsprechenden Sequenzdaten veröffentlicht.

3.2.3.1 *D-myb* und *G-β*

Wie zu erwarten finden sich innerhalb beider Gene verschiedene Abweichungen zu den Vergleichssequenzen (Cosmide: *wt^{OR}* und BDGP-Daten: *wt^{CS}*). Aber keine dieser Mutationen führt auf Translationsebene zu einem modifizierten Protein. Wie in Cruz (Cruz 1998) bereits diskutiert scheiden diese beiden Transkriptionseinheiten damit für den *Vam*-Phänotyp aus.

3.2.3.2 Das *Drosophila* UBL3

Als Bestandteil der Diplomarbeit von Alexandre Cruz (Cruz 1998) wurde über Homologien zu cDNAs ein neues Gen innerhalb der *Vam*-Region identifiziert. Dieses neue Gen, das den Arbeitsnamen *tres* erhielt, wurde kurz darauf von Chadwick (Chadwick et al. 1999) als *HCG1* oder *Drosophila*-Ortholog zu dem Ubiquitin ähnlichen Protein UBL3 (Fbgn0026076) publiziert. Ein erneuter Vergleich zwischen wildtypischer und *Vam*-spezifischer Sequenz ergab wiederum keine Veränderung innerhalb des bekannten codierenden Bereichs (siehe Cruz 1998). Allerdings konnten innerhalb des Introns 2 zwischen Exon 2 und Exon 3 zwei Insertionen innerhalb der *Vam*-DNA aufgedeckt werden, die in den zum Vergleich herangezogenen *wt*-Sequenzen fehlen (siehe Abbildung 20).

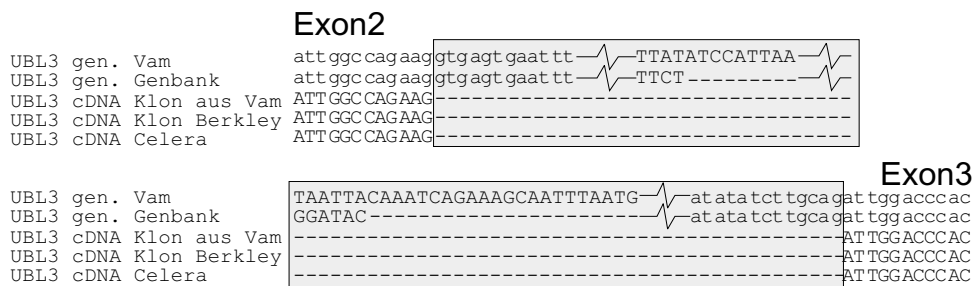


Abbildung 20: Insertion in Intron 2 des Vam-UBL3

Von oben nach unten sind hier folgende Sequenzausschnitte gegenüber gestellt: genomische *Vam*-Fliegen DNA, genomische DNA nach GenBank Eintrag AE003500.1, exemplarisch ein cDNA Klon aus *Vam*, *wt* cDNA Klon (Cruz 1998), und zuletzt die *in silicio* prognostizierte cDNA von CG9038. Der intronische Bereich ist grau hinterlegt. Innerhalb dieses Bereichs sind die Sequenzunterschiede zwischen *Vam* und *wt* in Großbuchstaben dargestellt. Trotz der Insertion im Intron wird die *Vam* UBL3-mRNA korrekt prozessiert.

Bevor ein Protein an den Ribosomen translatiert wird, durchläuft das primäre Transkript mehrere Modifikationen. In deren Verlauf wird die prä-mRNA u.a. polyadenyliert, die für Eukaryoten typische 5'-Cap angehängt und nicht zuletzt die Introns entfernt, bevor die fertig prozessierte mRNA den Kern verläßt (zusammengefaßt in Pederson 1998; Rio 1992). Das korrekte Splicing der RNA hängt neben verschiedenen Spleißfaktoren auch von konservierten Sequenzmotiven ab, welche von eben diesen Faktoren als Zielorte erkannt werden. So ist z.B. für die Formierung der sog. Lariat- oder Lassostruktur, einer Übergangsstufe beim entfernen eines Introns, der innerhalb des Introns gelegene „Branchpoint A“ von essentieller Bedeutung. Sollte durch die in *Vam* zusätzlich vorhandenen Basen eine dieser konservierten Sequenzabschnitte beeinträchtigt werden, so wäre es also möglich, daß hierdurch das Splicing der UBL3 mRNA in *Vam*-Fliegen gestört oder gar unterbunden wird. Alle bisherigen Untersuchungen gingen von genomischer DNA aus. Demzufolge sind diese Ansätze bei der Aufklärung der mRNA Struktur weitestgehend nutzlos. Um die *Vam*-UBL3 mRNA zu untersuchen wurde über RT-PCR aus *Vam*-Fliegen das UBL3 Transkript amplifiziert, kloniert und anschließend sequenziert (vgl. 2.2). Dadurch konnte gezeigt werden, daß zum einen die UBL3-mRNA in *Vam*-Fliegen vorhanden ist und zum anderen die Insertion im Intron 2 den Spleißmechanismus im Rahmen der versuchsbedingten Nachweisgrenzen nicht beeinflußt (siehe Abbildung 20).

Kurioserweise wurde in einem von 25 untersuchten cDNA-Klonen das Intron 3 nicht aus der mRNA entfernt. Und dies obwohl weder innerhalb des Introns 3 noch der angrenzenden Exone Abweichungen zur wildtypischen Sequenz vorhanden sind.

Diese falsche Prozessierung würde zu einem vorzeitigem Abbruch der Translation führen. (vgl. Abbildung 21). Ein so trunkiertes UBL3 Protein könnte für den semidominanten *Vam*-Phänotyp verantwortlich sein. Bereits bei einer Auftrennung der RT-PCR Produkte auf einem Agarosegel sollte sich diese Splicevariante durch ihre um 113 bp erhöhte Größe von den normalen ca. 1 kb großen Produkten deutlich unterscheiden. Weder bei EtBr Färbungen der Agarosegele (Nachweisgrenze bei ca. 5-10 ng DNA pro Bande) noch bei den anschließenden Southernblots der Gele (Nachweisgrenze bei. ca. 1 pg DNA pro Bande) konnte eine derartige Bande jedoch nachgewiesen werden. Setzt man vereinfachend voraus, daß während der RT-PCR alle Spleißvarianten gleich amplifiziert werden, folgt daraus, daß der sequenzierte Klon weniger



Abbildung 21: UBL3 cDNA Klon#5

In einem von 25 klonierten und untersuchten cDNA-Klonen aus einer RT-PCR ausgehend von *Vam*-Fliegen RNA wurde das Intron 3 während des Spleißvorgangs nicht entfernt. Gezeigt ist hier das 3' terminale Ende des daraus resultierenden UBL3. Rot hinterlegt sind die Aminosäuren, die sich durch die neue Splicevariante ergäben. Das „neue“ *Vam*-UBL3 wäre um 10 Aminosäuren verkürzt und würde bereits 21 AS vor dem Ende des *wt* UBL3 deutlich von diesem abweichen. Unter anderen würde die *Vam* spezifische Form einen Verlust des terminalen Prenylierungssignals CSIL bedeuten.

als $1/10^4$ (5-10 ng zu 1 pg) der nativen Population an UBL3 Transkript ausmacht. Dadurch wird eine ursächliche Beteiligung am *Vam*-Phänotyp ausgeschlossen.

Daß eine mRNA nicht korrekt prozessiert wird und ein oder mehrere Introne nicht entfernt werden, ist ein bekanntes Phänomen. So konnte z.B. für *double-time* bzw. *discs overgrown* gezeigt werden, daß das erste Intron häufig nicht entfernt wird (Zilian et al. 1999). Auch in dieser Arbeit wird jedoch keine Aussage bezüglich der physiologischen Relevanz, Funktion oder des zugrunde liegenden Mechanismus gemacht.

Abschließend bleibt, auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Diplomarbeit von A. Cruz (Cruz 1998), die Aussage, daß UBL3 nicht für den *Vam*-Phänotyp verantwortlich ist.

Bedenkt man, daß die für *Vam* verantwortliche Mutation jedoch innerhalb des von PC₃-UBL3 abgedeckten Bereichs liegt (vgl. 3.2.2.2), so folgt daraus, daß eine weitere Transkriptionseinheit auf diesem genomischen Abschnitt liegen muß. Außerdem liegt in diesem neuen Gen wahrscheinlich auch die Ursache des *Vam*-Phänotyps.

3.2.3.3 CG15914

Innerhalb der ca. 18 kb, die im Rahmen der verschiedenen Arbeiten untersucht wurden, befanden sich zu diesem Zeitpunkt vier bekannte Transkriptionseinheiten: *G-β13F*, *D-myb*, *UBL3* und ein zunächst als *fir* bezeichnetes Gen (Fbgn0030699), das allerdings bereits früh ausgeschlossen werden konnte (Cruz 1998). Betrachtet man die innerhalb der gesamten Region offenen Leseraster ergibt sich folgendes Bild (siehe Abbildung 22).

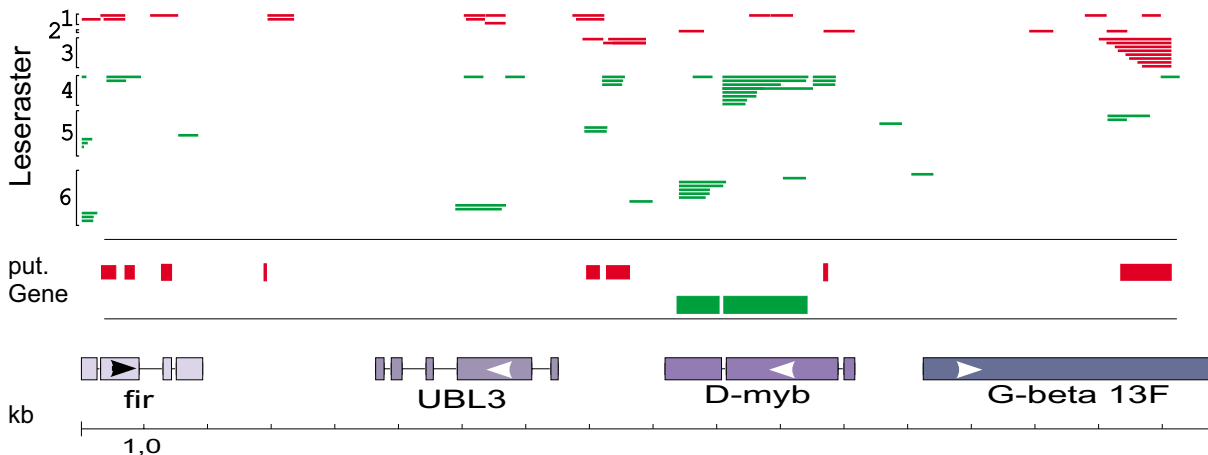


Abbildung 22: Offene Leseraster der *Vam*-Region

Aus den beiden Strängen der DNA und der Tripletcodierung der Aminosäuren ergeben sich 6 mögliche Leseraster für Transkripte. Im oberen Teil der Abbildung sind offene Leseraster mit mindestens 100 AS Länge ohne beginnendes Startcodon dargestellt. Darunter stehen die vier zum damaligen Zeitpunkt bekannten Gene. Die jeweiligen Transkriptionsrichtungen sind durch Pfeilspitzen angedeutet. Der auch für die Annotation des *Drosophila* Genoms angewandte Suchalgorithmus GENIE (Meyers et al. 2000; URL 8) prognostiziert die hier mit „putative Gene“ bezeichneten Sequenzabschnitte als Transkriptionseinheiten. Auffälliger Weise wird UBL3 nicht als Transkript identifiziert, im Gegenzug dazu wird aber zwischen UBL3 und D-myb noch ein potentielles Gen vorhergesagt. Insgesamt ist die Region mit ca. 18kb und darin verteilten vier Genen bereits eng gepackt und die Existenz eines weiteren Gens erschien sehr unwahrscheinlich. Da sich innerhalb der publizierten Sequenz für diesen Bereich noch Lücken befanden, diente als Ausgangsbasis für dieses Schema ein selbst erstellter Contig aus eigenen und publizierten Sequenzdaten.

Wie in 2.2.7 und 3.2.2.2 gezeigt, beinhaltet PC₃-UBL3 den genomischen Bereich zwischen dem 3' Ende von D-myb und dem 5' Ende von UBL3. Flankiert von diesen beiden Genen wurde im Rahmen des *Drosophila* Genom Projekts eine neue bis dato unbekannte Transkriptionseinheit vorhergesagt. Diese Prognose basiert, wie viele anderen auch, auf einem Annotationsprogramm, das versucht Transkriptionseinheiten aufgrund verschiedener Kriterien (z.B. Konsensussequenzen für Transkriptionsstart, Translationsstart, Exon/Intron Strukturen, offene Leseraster uvm.) von unkodierenden Bereichen zu unterscheiden. Für viele solcher putativer Gene ergibt sich bei einem Abgleich mit den bekannten Gensequenzen der verschiedenen Datenbanken eine definitive Bestätigung, daß es sich hierbei auch um ein reales Gen handelt. Das qualitativ höchste Kriterium ist die Existenz eines ansequenzierten cDNA-Klons oder ESTs. Für das kurze Transkript CG15914 lag, obwohl der genomische Bereich in zwei Arbeiten untersucht wurde (Katzen 1996; Chadwick et al. 1999), bis dato keine Information zum Expressionsstatus vor.

a) Bestätigung des Transkripts von CG15914

Um zu überprüfen, ob es sich bei der als Genie oder CG15914 bezeichneten Annotation um ein transkribiertes Gen handelt wurde eine RT-PCR mit RNA aus *sd Vam16* Männchen durchgeführt (vgl. 2.2.5). Als PCR-Produkte traten drei Banden auf, von denen zwei die jeweils erwarteten Größen der entsprechenden genomischen, bzw. mRNA Fragmente aufweisen. Nachfolgend wurden die PCR-Produktbanden aus einem Agarosegel extrahiert und mit Genie2up (siehe 2.2 und Abbildung 23) als Primer direkt sequenziert (siehe Abbildung 24).

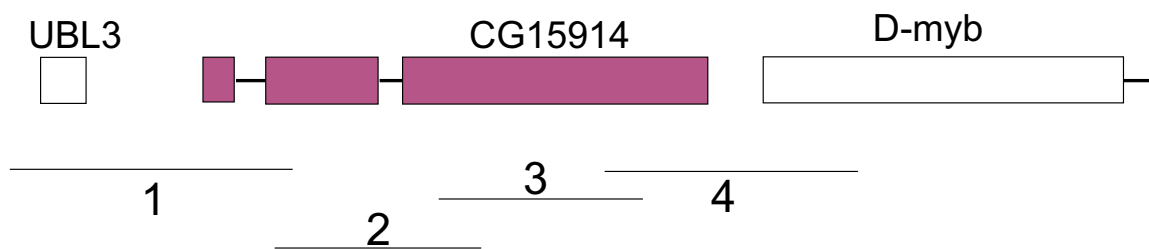


Abbildung 23: Genie RT-PCR

Die Bereiche 1-4 repräsentieren die PCR-Produkte bei Einsatz der jeweiligen Primerpaare Genie1-4. Das Primerpaar Nummer 2 (Genie2up/Genie2low) liegt flankierend zu einem Intron. Das so entstehende Produkt sollte sich somit eindeutig als genomisch oder mRNA spezifisch ansprechen lassen.

Die Sequenz einer der PCR-Banden entspricht dem genomischen Bereich zwischen den beiden PCR-Primern Genie2up und Genie2low (siehe Abbildung 24). Ob letztendlich in der RT-PCR tatsächlich eine Kontamination der cDNA durch genomische DNA vorlag, kann nicht bestimmt werden. Genauso könnte eine Spleißvariante, in der das Intron nicht entfernt wird, die aber exprimiert und evtl. auch translatiert wird, als Template für die PCR gedient haben. Es ist anzunehmen, daß eine DNA-Kontamination der RNA-Präparation im Vergleich zur RNA Menge nur einen geringen Bruchteil an für die PCR nutzbarem Template ausmacht. Durch eine Quantifizierung der PCR-Produkte könnte überprüft werden, ob es eine relevante Menge an mRNA mit nicht entferntem Intron gibt.

Anders als bei dem falsch gespleißten Intron bei UBL3 (vgl. Abbildung 20) handelt es sich hier jedoch nicht um ein PCR-Einzelergebnis. Bei UBL3 wurden die RT-PCR Produkte kloniert und dann Einzelklone sequenziert. Durch diese klonale Strategie kann es passieren, daß PCR-Produkte gewählt werden, die innerhalb des Pools an Produkten tatsächlich nur ein einziges Mal auftauchen. Dies ist auch ein Grund dafür, daß Sequenzen, die aus klonalen Quellen entstanden sind, immer mit anderen PCR-Klonen abgeglichen werden müssen. Um auf eine einzelne Sequenz zu vertrauen ist die Fehlerrate der thermostabilen Polymerasen zu hoch (Barnes 1994; Eckert und Kunkel 1991). Anders verhält es sich bei einer direkten Sequenzierung von PCR-Pro-

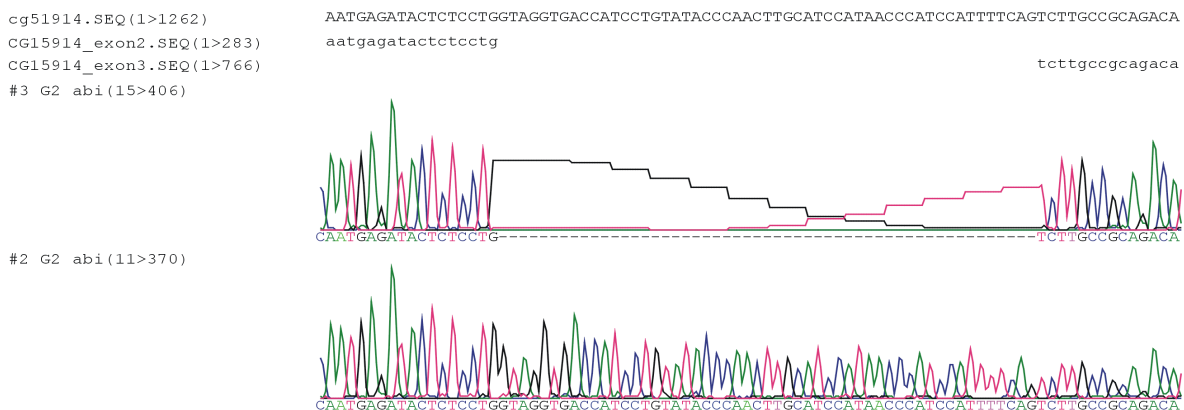


Abbildung 24: RT-PCR CG15914

Die im Text beschriebenen PCR Banden wurden sequenziert und die erhaltenen Sequenzen den genomischen und den prognostizierten Daten gegenübergestellt. Die erste Zeile entspricht der genomischen Sequenz des Bereichs von CG15914. Die zweite und dritte Zeile repräsentieren die prognostizierten Exone 2 und 3 der Annotation von CG15914. #3 Genie2 entspricht der erwarteten mRNA mit entferntem Intron #2 Genie2 entspricht analog dem genomischen Bereich.

dukten. Die generierte Sequenz wird immer der Majorität der im PCR-Produktpool enthaltenen Sequenzen entsprechen. Einzelne abnormale Produkte werden nur einen vernachlässigbar kleinen Bruchteil zur Intensitätsstärke der Sequenzersignale beitragen.

Daraus ergeben sich zwei wichtige Feststellungen:

a) Das zunächst rein hypothetische Transkript CG15914 wird in der vorhergesagten Weise prozessiert. Seine Annotation innerhalb des *Drosophila*-Genomprojekts wird dadurch erstmalig durch experimentelle Daten gestützt.

b) Da als Ausgangsmaterial RNA aus *sd Vam16*-Fliegen verwendet wurde liegt das Transkript auch in *Vam*-Fliegen prozessiert vor.

b) Die Annotation von CG15914

Die Annotationen im *Drosophila*-Genomprojekt wurden, wie in den meisten anderen Genomprojekten auch, zunächst automatisiert vorgenommen. Der für den bewertenden Algorithmus einfachste Fall liegt vor, wenn zu einem genomischen Bereich cDNA-Klone oder EST-Informationen vorliegen. Aus den cDNAs ergeben sich direkt die möglichen Exon/Intron-Strukturen und daraus wiederum das offene Leseraster. Der durchschnittliche Promotorbereich eines eukaryotischen Organismus ist in etwa 100 bp lang und besteht aus drei Grundstrukturen (Novina & Roy 1996; Smale et al. 1998; siehe auch 1.3.1) – der TATA-Box, Bindestellen für Transkriptionsregulatoren, und dem eigentlichen Transkriptionsstart. Die TATA-Box, ein AT-reicher Abschnitt, an dem TBP (TATA-Box Bindig Protein) bindet liegt meist 25-30 bp oberhalb des Transkriptionsstarts (Cormack et al. 1992) und muß nicht zwingend die Konsensussequenz

TATA besitzen (Hahn et al. 1999). Diese Beobachtung erschwert die Vorhersage von Promotoren innerhalb einer unbekannten DNA-Sequenz erheblich. Anders als bei Genen, für die cDNAs bekannt sind, gibt es bei den *in silicio* gefundenen Genen meist keine Prognose zu 5' oder 3' untranslatierten Regionen (UTR). Auch die annotierte Sequenz von CG15914 beginnt direkt mit dem Startmethionin.

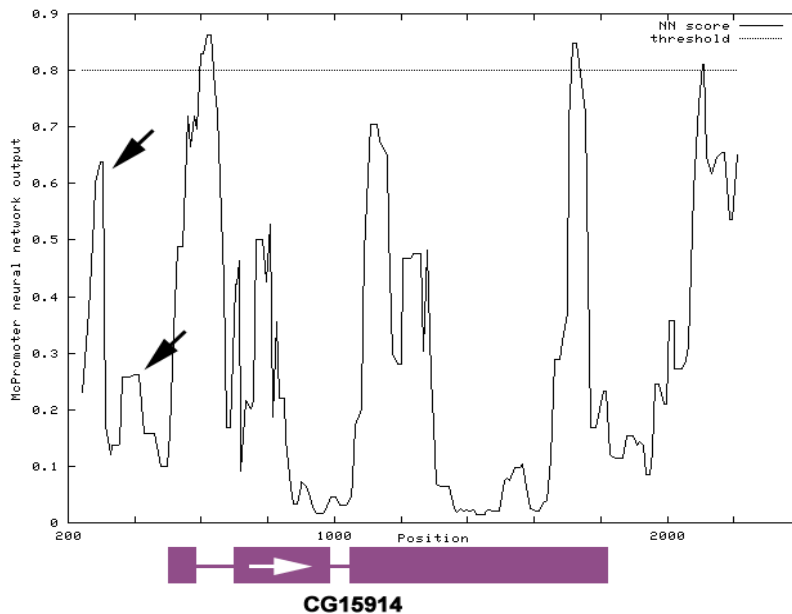


Abbildung 25: Promotoren Vorhersage

Gezeigt ist hier die überarbeitete Ausgabe eines Analyseprogramms, das versucht mögliche Promotor-Sequenzen in DNA-Bereichen zu finden. Als Input diente der genomische Bereich von CG15914 plus 500 bp links und 765 bp rechts. Die Skala am linken Rand gibt eine relative Güte der Transkriptionsinitiationsstelle an. Der Schwellenwert, ab dem eine Sequenz als Promotor definiert wird liegt hier bei 0,8 (Skala von 0-1; 1 entspricht dem Maximum). Die schwarze Kurve zeigt die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Promotors am + Strang an, von dem auch CG15914 abgelesen wird. Die für das Transkript möglichen und wahrscheinlich verwendeten Promotoren sind mit je einer Pfeilspitze markiert. Zur Orientierung sind die prognostizierten Exone unterhalb des Graphen angezeigt

Die Abbildung 25 zeigt die graphische Ausgabe des Programms McPromotor V3 (Ohler & Niemann 2001; Ohler et al. 2001; URL 2). Dieses Programm versucht anhand von Konsensussequenzen bereits bekannter Promotoren, innerhalb eines unbekannten DNA-Bereichs neue Transkriptionsstartpunkte zu finden. Der hier angewandte, auf einem neuronalen Netz basierende Algorithmus wird mit Daten bekannter Gene und deren Promotoren „trainiert“. Dadurch gewinnt die Vorhersage zusätzlich zu den Konsensuskriterien noch eine für den jeweiligen Organismus spezifische statistische Komponente. Der in Abbildung 25 gewählte Schwellenwert zur Klassifikation als Promotor liegt bei 0,85 und ist nur eine Richtlinie. Es gibt sowohl Promotoren, die deutlich schlechtere Werte besitzen, als auch Bereiche, die mit sehr hohen Wahrscheinlichkeiten versehen werden aber dennoch keinem nativen Promotor entsprechen. Bei einem Probelauf mit 92 sehr gut charakterisierten Genen der ADH-Region von *Drosophila melanogaster* erkennt das Programm ca. 50 % der tatsächlich vorhandenen Promotoren (Ohler 2000). Allerdings zeigt es dabei auch eine falschpositive Zuordnung pro circa 1500 bp an. Daraus folgt, daß neben dieser Prognose weitere Kriterien berücksichtigt werden müssen, um ein Gen sinnvoll zu annotieren.

Ergebnisse und Diskussion

Die einzigen gesicherten Daten für CG15914 sind, daß es eine mRNA gibt (diese Arbeit), und daß das zweite Intron zumindest in einem Teil der mRNAs wie vorhergesagt ausgespleißt wird (diese Arbeit; siehe Abbildung 24). Vor dem ersten prognostizierten Exon der CG15914-Annotation befindet sich nach der McPromoter-Prognose erstaunlicherweise kein guter Promotorbereich. Der markante „Peak“ bei ca. 600 bp überschreitet mit 0,86 die Schwelle zur Einordnung als Promotor hingegen deutlich (siehe Abbildung 25). Unter Berücksichtigung der möglichen und „guten“ Exon/Intron Übergänge wäre eine cDNA denkbar, die zwar im selben Leseraster wie die annotierte liegt, deren Produkt aber N-terminal um 127 AS verkürzt wäre. Eine Gegenüberstellung mit den Werten für die Güte der einzelnen Komponenten bietet Abbildung 26. Die Pro-

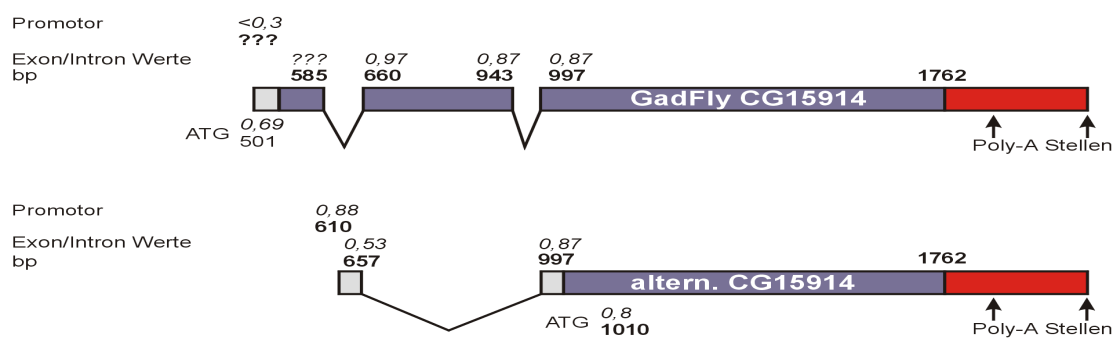


Abbildung 26: Alternative cDNA zu CG15914:

Hier sind die cDNA von GadFly (GadFly CG15914; URL11) und eine andere mögliche und theoretisch sogar wahrscheinlichere Annotation (altern. CG15914) gegenübergestellt. Gezeigt sind: Ausgehend vom Start-ATG der GadFly-Annotation als Position 501 bp, die Positionen der Sequenz in fester Schrift; die relativen Wahrscheinlichkeiten der jeweiligen Strukturen sind kursiv mit Werten von 0 bis max. 1 dargestellt; die resultierenden offenen Leseraster sind in lila, die 3'UTR in rot und die 5'UTR inklusive der putativen Promotoren in grau dargestellt.

gramme, die zur Bewertung herangezogen wurden waren:

Für die Promotor-Analyse	McPromoter v3 URL 2
Für das Startmethionin	ATGpr URL 2
Für die Exon/Intron Vorhersage	URL 5

Die als alternatives CG15914 angebotene cDNA übertrifft die GadFly-Annotation in allen Werten außer der Länge des offen Leserasters. Besonders negativ fällt bei der derzeitigen Annotation neben dem schwachen Promotor die anscheinend fehlende Donor-Stelle am ersten Exon/Intron Übergang bei Position 585 bp auf (siehe Abbildung 26). Die für einen korrekten Spleißvorgang wichtigere Akzeptorstelle bei Pos. 660 ist mit 0,97 von maximal 1 jedoch sehr stark. Für die GadFly-Annotation spricht eindeutig die in dieser Arbeit nachgewiesene Spleißform mit entferntem Intron2 (Pos.943-997 der GadFly-Annotation). Dennoch könnte es sich bei der als alternativ präsentierten cDNA um eine natürlich vorkommende Variante des

Gens CG15914 handeln. So sind z.B. verschiedene Gene bekannt, für die mRNAs mit alternativen Promotoren und Startmethioninen beschrieben wurden (vgl. Kozac 1999; Martinez-Salas 1999). Die hier präsentierte mRNA wäre bei der in dieser Arbeit beschriebenen RT-PCR sozusagen ausselektiert worden, da die Primer-Bindungsstelle von Genie2low (siehe Abbildung 23), die sich innerhalb des zweiten GadFly-Exons befindet, in der neuen Form nicht vorhanden wäre. Erst ein erneutes RT-PCR Experiment, das die alternative Spleißvariante berücksichtigt könnte klären ob es diese cDNA in *Drosophila* tatsächlich gibt.

c) Homologe zu CG15914

Um mögliche Homologe zu dem *Drosophila* Gen CG15914 zu finden wurden verschiedene BLAST-Suchen (**B**asic **L**ineup **A**lgorithhm **S**earch **T**ool) durchgeführt (Altschul et al. 1997; URL 3). Die Suchen ergaben mehrere signifikante Treffer bei verschiedenen Organismen.

<i>Organismus</i>	<i>Art der Sequenzen</i>	<i>Gewebe</i>	<i>Genbank Eintrag</i>
Mensch	5' cDNA; 3' cDNA	Adult Brustgewebe; Embryo 10 Tage Kopf; Leber; Blase; „Soares“ 19 Wochen Fötales Herz- Gewebe; Testis; B-Zellen; Nervensystem	R72577; NM_024659; BG567301; AV653067; BG286851; AU119344; AA279962; R72577; BF949961; AI140424; AI082171;
<i>Mus musculus</i>	5' cDNA; 3' cDNA	„Soares“ cDNA-Bank; Milchdrüsen; 2-Zell Embryo	W36797; BE689695; BE625829; AI593721; AI390976; AA619723; AI120240
<i>Bos taurus</i>	5' cDNA	Vereinte Gewebe: Lymphknoten; Ovarien; Hypothalamus; Fett	AW447493
<i>Xenopus laevis</i>	5' cDNA	Gastrula; unbefruchtetes Ei; Blackshear/Soares nor- malisierte Ei-cDNA	BG409604; BF426517; AW640665
<i>Ciona intestinalis</i>	cDNA Bibliothek	Gesamt	AV673781

Abbildung 27: Homologe zu CG15914

Übersicht über die bis dato vorhandenen, zu CG15914 homologen cDNAs aus verschiedenen Organismen und Gewebetypen.

Für *Saccharomyces cerevisiae* und *C. elegans* ergaben sich weder auf genomischer noch auf cDNA- oder EST-Ebene homologe Sequenzen.

In keinem der anderen Organismen ist bislang bekannt, ob zu den cDNAs ein entsprechendes Protein existiert. Um also die einzelnen putativen Produkte zu vergleichen, wurde wie folgt vorgegangen.

Ergebnisse und Diskussion

Bei den Organismen, für die mehrere cDNA Klone vorhanden sind, wurde nach Sequenz-überlappungen gesucht und falls vorhanden eine neue, längere, hypothetische cDNA aus der Konsensussequenz gebildet.

Im Falle der Maus-Sequenzen ergab sich so aus den Klonen BE625829, AI120240, W36797, AI390976 und BE689695 mit Längen von je ca. 500 bp eine neue hypothetische cDNA von 1247 bp (mus_con1; siehe 5.1.3). Die Sequenzen AI593721 und AA619723 sind 5' und 3'-Sequenzen des gleichen cDNA Klons (mus_con2; siehe 5.1.4).

Die Sequenzen AW640665, BF426517 und BG409604 des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) formieren ebenfalls eine neue cDNA mit 1234 bp Länge (xenopus_con; siehe 5.1.2).

Bei dem Vergleich der humanen cDNA-Klone mit der humanen genomischen Sequenz bietet sich ein erstaunliches Bild. Der cDNA-Klon BG286851 ergibt keine zuverlässigen Treffer bei einem Alignment mit der humanen genomischen Sequenz und wurde deshalb ausgeschlossen. Die restlichen cDNAs sind innerhalb des „*Homo sapiens chromosome 2 working draft sequence segment*“ mit dem Genbank-Code NT_005314.2 lokalisiert. Bei einem Alignment ergeben sie eine zusammenhängende Sequenz von 2747 bp Länge (human_con; siehe 5.1.1). Dabei gibt es einige Bereiche, die nicht mit der Konsensussequenz der restlichen Klone übereinstimmen. Da es zu diesen cDNA-Teilbereichen jedoch Sequenzdaten aus der genomischen humanen Sequenz gibt, spiegeln diese Bereiche wohl alternative Spleißprodukte oder nicht vollständig prozessierte mRNAs wieder. Um Fehler, die durch die Sequenzierung der einzelnen cDNA-Klone auftreten können abzufangen, wurde die Konsensussequenz human_con mit den genomischen Daten abgeglichen und bei Unstimmigkeiten die Sequenz von NM_005314.2 übernommen. Die so gewonnene putative cDNA human_con liegt auf dem II. Chromosom Abschnitt 2q22.

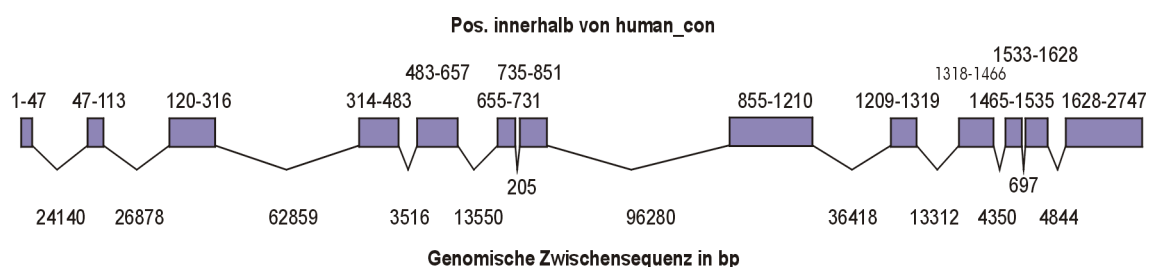


Abbildung 28: Schematische Übersicht über die Exon/Intron-Struktur des humanen Homologs zu CG15914

Die 2747 bp der Sequenz von human_con (siehe 5.2) erstrecken sich innerhalb des genomischen Bereichs von NM_005314.2 über ca. 266 kb. Gezeigt ist hier nur eine graphisch aufbereitete Version der Text-Ausgabe der BLAST Suche gegen das Humangenom (URL 7). Position 1-2747 der Sequenz von human_con erstreckt sich von Position 2193087 bis 2458672 innerhalb der genomischen Sequenz von NM_005314.2. Als genomische Zwischensequenzen oder auch putative Introns, sind nur die jeweiligen Abstände in der genomischen Sequenz bis zum nächsten ebenfalls putativen Exon/Intron Übergang angegeben.

Die durchschnittliche Größe eines humanen Gens beträgt ca. 25 kb (Venter et al. 2001). Wenn die Orientierung innerhalb des „*Drafts*“ NT005314.2 stimmt, dann deckt die Konsensussequenz der cDNAs (human_con; siehe Anhang) einen genomischen Bereich von 265590 bp ab. Die Abbildung 28 zeigt eine Übersicht des Alignments der Sequenz von human_con mit dem genomischen Bereich von NM_005314.2. Innerhalb der Sequenz von human_con gibt es kein am 5'-Ende beginnendes durchgehendes offenes Leseraster. Dies könnte an der mangelnden Qualität der zur Verfügung stehenden cDNA-Sequenzen liegen. Läßt man die Lese-Stops außer acht,

Score = 211 bits (537), Expect = 1e-53Identities = 102/169 (60%), Positives = 128/169 (75%), Gaps = 2/169 (1%)		
Drosi: 8	ILIIIEPFYGGSHKQLIGALIEGLNHGDSEIFSLPAKKWHWRARTSALHFAQLIPRDHA	FR 67
FR2 : 46	ILIIE FYGGSHKQL+ L E L GD +++LPAKKWHWRARTSAL+F+Q IP +R	103
Drosi: 68	VLFASSVLSLAELIGLRPDLAACRKIVYFHENQLIYPVREVKQRDCQYGFNEILSCLAAD	127
FR2: 104	LFASSVL+L EL LRPDL +KI+YFHENQLIYPV++ ++RD QYG+N+ILSCL AD	163
Drosi:128	MVLFNSQFNCNSFLDNVQPFLNMQPDFKIKHIREQIEKKCQVLYFPVNF 176	
FR2: 164	+V+FNS FN SFL ++ F+ + PD + K + I KCQV+YFP+ F	212
Score = 167 bits (423), Expect = 2e-40Identities = 70/150 (46%), Positives = 107/150 (70%), Gaps = 1/150 (0%)		
Drosi:193	DLDEKCIHLIWPHRWEHDKNPKLLVDTLCQLHERQVDFKVTICGESYQEIPPEFEHIQEK	252
FR2: 382	D ++ +H++WPHRWEHDK+P+ L L + ++F V++ GE++ ++P+ F ++	441
Drosi:253	LGSKLVNFGHL-EREYLYKTLTGTGDIVISTADHEFFGVAMLEAAFCGCYPIAPNKLVYPE	311
FR2: 442	LGS ++++G+L +++Y + L D+VISTA HEFFGVAMLEA +CGCYP+ P LVYPE	501
Drosi:312	IYPKENLYNTSNALTKKLYNFCRMPRVFRK 341	
Fr2: 502	I+P E LY+T L+K+L NFC+ P + RK	531
Abbildung 29: Alignment der putativen Proteine zu CG15914 aus <i>Drosophila</i> und dem Homologen dazu aus Mensch Gezeigt wird hier ein BLAST2 Alignment nach Tatusova & Malden (Tatusova & Malden 1999;URL 3) des putativen <i>Drosophila</i> Proteins zu CG15914 (Drosi) mit den Aminosäuren, die dem zweiten Leseraster der preliminären humanen cDNA human_con entsprechen (FR2). Innerhalb des ersten Blocks besteht eine 60%ige innerhalb des zweiten eine 46%ige Übereinstimmung.		

translatiert das zweite der drei möglichen Leseraster und vergleicht das entstehenden Protein mit dem putativen *Drosophila*-Protein von CG15914, so ergibt sich folgendes Bild (siehe Abbildung 29).

Aus diesen Bereichen mit sehr hoch konservierten Motiven ergeben sich mehrere Schlußfolgerungen. Zum einen stützt dieses Alignment die Annotation von GadFly. Die theoretisch günstigere, alternativ präsentierte cDNA (siehe Abbildung 25 & Abbildung 26) wird unwahrscheinlicher. Die präsumptive cDNA human_con scheint sowohl im 5' als auch im 3' Bereich kodierend zu sein. Anders wäre eine derartig hohe Konservierung auf Aminosäure-Ebene nicht zu erklären. Daraus folgt auch, daß die Sequenz human_con noch fehlerhaft sein muß und es höchstwahrscheinlich eine cDNA gibt, bei der ein durchgehendes offenes Leseraster vorliegt.

Diese hohe Maß an Konservierung gilt ebenso für die putativen Proteine, die sich aus den cDNAs der anderen Organismen ergeben. Interessant ist hier vor allem auch die Konsensus-cDNA aus *Xenopus laevis*, xenopus_con. Anders als bei human_con befindet sich in den 1,2 kb ein durchgehend offenes Leseraster, das mit dem ersten ATG beginnt und nicht terminiert wird. Das daraus resultierende Protein ist 398 AS lang und bekräftigt so die langen Produkte des *Drosophila* und des *humanen* Gegenstücks.

Erwartungsgemäß ist der Grad der Konservierung zwischen Maus und Mensch am höchsten. Aber auch zwischen den anderen Spezies sind Teilbereiche hoch konserviert. Eine Suche nach möglichen Proteinmotiven ergab für das *Drosophila* Protein zwei Treffer. Zum einen eine Homologie zu Glykosyltransferasen der Gruppe 1 (URL 6; InterPro IPR001296) und zum anderen ein „*Bipartite nuclear localization signal*“ (URL 6; InterPro IPR001472).

Das Kernlokalisierungssignal besteht aus zwei basischen Aminosäuren (K oder R) gefolgt von einem Trennstück aus 10 beliebigen Aminosäuren und mindestens 3 weiteren basischen Aminosäuren in den 5 Aminosäuren, die dem Trennstück folgen (für *drosi* in Abbildung 30 **KKLYNFCRMPRI/FRKQR**). Innerhalb des humanen Gegenparts, des Maus- und des Rinder-Proteins ist der Bereich zwar auch konserviert, aber nach dem 10 AS Zwischenstück fehlt die dritte basische Aminosäure. Demzufolge wird das Signal bei keinem anderen Protein angezeigt. Etwa 56 % der bekannten Kernproteine besitzen dieses Signal, ebenso 4,2 % der nicht kernassoziierten Proteine (Dingwall & Laskey 1991; Robbins et al. 1991). Demzufolge müßte eine tatsächliche Kernlokalisierung durch andere Daten verifiziert werden.

<i>CLUSTLW Alignment der putativen Proteine</i>	
human_con	-LYKGEIAPFSWAALHGKFRSLTTTEPREDL-----
bos	-LYKGEMATFS-----
mus_con2+1	ILYKGEVAPFSWAALHGKFRSLTTTEPREDL-----
xenopus_con	-----
ciona	-----
drosi	-RDQFFENFNDRFSKELVPKYLDIFNKHIADQSQS

Abbildung 30: CLUSTALW Alignment der putativen CG15914 Homologe:

Das hier gezeigte Alignment zeigt die putativen Proteine, die aus den im Text beschriebenen cDNA Klonen oder Konsensussequenzen resultieren. Für das humane Homolog wurde nicht der gesamte Klon human_con verwandt, sondern nur die zwei größten ununterbrochenen Leseraster daraus. (Erster Block von Base 137-691; zweiter Block von Base 860-1711 der human_con Sequenz; getrennt durch **XXXXX**). Bei den beiden Maussequenzen mus_con1 und mus_con2 wurde ebenfalls eine Fusion für das Alingment verwandt (mus_con2: 24-485+**XXXX**+mus_con1: 108-779). Die zu 100% konservierten Bereiche sind mit einem Stern (*) markiert. Das konservierte VISTA Motiv ist grau hinterlegt. Die potentiellen Mutationen innerhalb des *Vam*-Proteins innerhalb der Drosophilasequenz (drosi) sind fett gedruckt und unterstrichen.

d) Mutationen innerhalb von CG15914 in *Vam*-Fliegen

Das in PC₃-UBL3 enthaltene Gen CG15914 wurde sequenziert. Dabei konnten auf DNA-Ebene vier Mutationen nachgewiesen werden, die in Abbildung 31 gezeigt sind. Zwei Austausche führen dabei nicht zu einer modifizierten Aminosäuresequenz, eine Bewertung der möglichen Donor und Akzeptorstellen für das Spleißen der RNA ergibt ebenfalls keine Abweichungen zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Damit scheiden diese beiden Mutationen für die Erzeugung des *Vam*-Phänotyps aus. Die beiden verbleibenden Nukleotid-Austausche würden zu einer veränderten Aminosäuresequenz des CG15914 Genproduktes führen: Einmal zu einem Austausch von Glutamin zu Glycin (E28 zu G) und im anderen Fall zu einem Isoleucin zu Threonin (I279 zu T) Austausch.

Vergleicht man die Sequenzen der homologen Proteine, so zeigt sich, daß zwar die Position E28 im *humanen*, *xenopus* und *Drosophila* Protein erhalten ist, der umgebende Bereich aber minder konserviert erscheint (vgl. Abbildung 30). Der I279 zu T279 Austausch betrifft hingegen das Isoleucin des VISTA-Motivs, den am höchsten konservierten Abschnitt der Proteine. Wie im vorherigen Absatz erörtert, scheint ein derart konservierter Bereich eine hohe physiologische Bedeutung zu haben. Die Mutation im *Vam*-Fliegen Stamm zerstört diesen Kontext. Es wird postuliert, daß der Austausch I279 zu T279 innerhalb des VISTA-Motivs des Transkripts CG15914 die molekulare Ursache des *Vam*-Phänotyps ist.

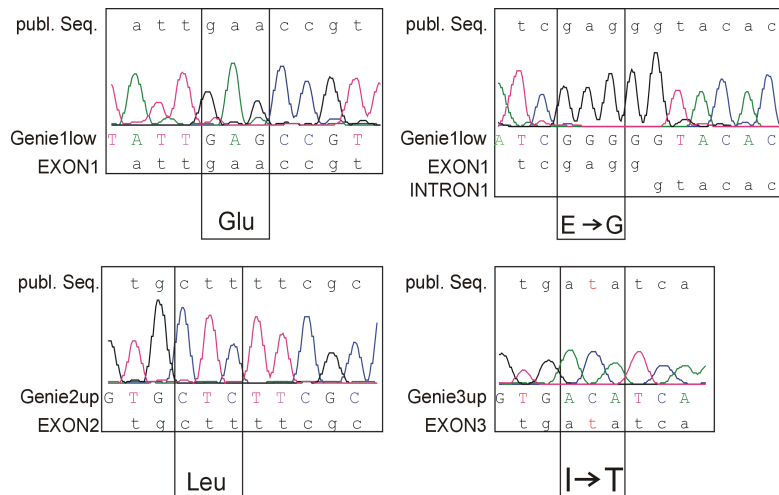


Abbildung 31: Mutationen in CG15914

Gezeigt sind vier Mutationen innerhalb der putativ codierenden Region des Transkripts von CG15914. Um die Signifikanz zu belegen, sind die Signale des Sequenziergerätes (ABI-Prism) mit abgebildet. In der jeweils obersten Zeile ist die publizierte Sequenz als Referenz angegeben. Darunter folgt jeweils die Sequenz aus dem Konstrukt PC₃-UBL3, darunter die Sequenz der putativen Exone und Introne der Transkriptionseinheit. In dem vorhergesagten Leseraster führen die Punktmutationen zu den angegebenen Modifikationen auf Aminosäureebene.

3.2.3.4 ATP ε Untereinheit

Die ATP ε Untereinheit liegt bereits außerhalb des für *Vam* relevanten Bereichs.

3.2.3.5 CG8578

Das in Cruz 1998 als für Bezeichnete Transkript CG8578 liegt ebenfalls bereits außerhalb des für *Vam* relevanten Bereichs und wird nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

3.2.4 Röntgeninduzierte Revertanten der *Vam*-Mutation

Neben der Keimbahntransformation schien eine erneute Mutagenese von *Vam*-Fliegen, um eine Reversion des Phänotyps zu erhalten, als probates Mittel die Region weiter einzugrenzen (siehe 1.1.2 und 3.2.1). Wegen der Semidominanz sollte eine Inaktivierung des betroffenen Gens in *Vam*-Fliegen zu einer Reversion des Phänotyps zum wildtypischen Zustand führen. Um diese Reversion zu erreichen, wurden *Vam*-Männchen mit Röntgenstrahlen mutagenisiert und die potentiell revertierten Nachkommen als Einzelstämme gehalten und weiter untersucht. Der Nachweis des *Vam*-Phänotyps bzw. einer Reversion des selbigen kann nur über die für *Vam* charakteristischen Löcher in der Medulla geführt werden. Dazu müssen jedoch alle Kandidaten nach einer Alterungsperiode von ca. 20 Tagen massenhistologisch untersucht werden. Eine der Hauptschwierigkeiten, an der sich Ansatz und Planung der Mutagenese ausrichten. Ein weiterer Punkt, an dem sich die eingesetzten Methoden orientieren müssen, sind die verschiedenen Mutationen, die zu einer Reversion führen können. Zum einen wäre es denkbar, daß eine Punktmutation oder eine Deletion direkt innerhalb des „*Vam*-Gens“ zu einer nicht mehr funktionellen Form des codierten Proteins führt. Aus Mutationen in anderen Genbereichen, die in irgendeiner Form mit *Vam* interagieren könnten ebenso eine Repression des semidominanten *Vam*-Phänotyps resultieren. Im folgenden sollen die Vorzüge, die eine Röntgenmutagenese für diese Aufga-

benstellung bietet, kurz diskutiert werden. Das Verständnis der Methode, ihrer Implikationen und Vorzüge ist nötig, um die Motivation zu verstehen, die hinter diesem sehr arbeitsintensiven experimentellen Abschnitt steht (detaillierte Abhandlung zu verschiedenen Mutagenese-Varianten in Ashburner 1989a).

3.2.4.1 Experimentelle Durchführung der Röntgenmutagenese

Pastink und Mitarbeiter (Pastink et al. 1987 & 1988) verglichen 31 röntgeninduzierte Mutationen innerhalb des *white*-locus auf molekularer Ebene. Neben 3 Translokationen führten auch 6 kleine Deletionen von nur je 6-29 Basen zur Inaktivierung des Pigmenttransporters *white*. Diese kleinen Deletionen sind jeweils von kurzen „direkt repeats“ (2-3bp) flankiert, was nach Pastink eine Beteiligung von Replikationsmechanismen an der Entstehung von kurzen, röntgeninduzierten Deletionen nahelegt. Mit 15 Stück zeigten nahezu die Hälfte der generierten *white*-Stämme weiterreichende Deletionen, die neben *white* auch noch mindestens ein benachbartes Gen betrafen. Dabei liegen die proximal und distal nächst benachbarten Gene etwa 7 kb bzw. 14 kb entfernt. Innerhalb der für *Vam* relevanten Region von ca. 18kb sind derzeit 6 Transkriptionseinheiten bekannt.

Auch wenn die Anzahl der untersuchten Linien bei Pastink keine hohe statistische Signifikanz aufweist, könnte man also bei einer Röntgenmutagenese im *Vam*-Hintergrund zumindest bei 50% der gewonnenen *Vam*-Revertanten davon ausgehen, daß neben *Vam* auch ein weiteres benachbartes Gen inaktiviert wurde. Über *Vam* selbst ist nicht bekannt, ob es für die Fliegen essentiell ist, mit *d-myb* steht jedoch zumindest ein, zu *Vam* eng benachbartes Gen zur Verfügung, dessen Funktionsverlust für die Fliegen letal ist.

Durch diese bei Pastink beschriebenen Eigenschaften der röntgeninduzierten Mutationen eröffnet sich die Möglichkeit zuerst alle nicht letalen Linien auszusondern und die aufwendige Massenhistologie auf Stämme mit letalen X-chromosomalen Treffern zu beschränken. Selbst für den Fall, daß *Vam* nicht letal mutagenisiert werden kann, verlöre man so nur einen geringen Teil der neu entstandenen Mutanten. Durch die Wahl der eingesetzten Stämme kann außerdem gewährleistet werden, daß die letalen Mutationen nur innerhalb des für *Vam* relevanten Bereichs weiter untersucht werden müssen (vgl. Abbildung 32). Das theoretisch effizientere Schema mit der Duplikation erwies sich in der praktischen Anwendung als sehr problematisch. Reproduzierbar legen die attX/Duplikations Jungfrauen ungewöhnlich große Mengen an unbefruchteten Eiern. Auch nach der Kreuzung mit den durch die Bestrahlung geschwächten Männchen bleibt die Eiablage subjektiv konstant hoch. Aus einer Massenkreuzung (50x150) schlüpfen etwa nur

Im oberen Teil der Abbildung soll schematisch nochmals die Lage der *Vam*-Region bezüglich der Defizienz *Df*(1)19 f und der Duplikation *Dp*(1:Y), die nahezu deckungsgleich mit *Dp*(1:4) long liegt aufgezeigt werden (vgl. auch Abbildung 4). Die Duplikation *Dp*(1:Y) deckt den *Vam*-Bereich deutlich ab. Im Mutageneseschema **A** könnte man sich dies zunutze machen indem man aus allen letalen Treffern (roter Asterix) in beliebigen Bereichen des *Vam F* X-Chromosoms (verschiedene Blautöne) nur die weiter kreuzt, die innerhalb der Duplikation liegen (Männchen mit umrahmtem Genotyp). In **B** würden alle Weibchen weiterverwertet. Da das zweite wildtypische X-Chromosom alle Mutationen kompensieren kann, müssen deutlich mehr Linien durchgesehen werden um Mutationen im *Vam* Bereich zu erhalten.

Die Dauer und Modalitäten der Bestrahlung wurden nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt. Nach Soebels (Soebels 1963 und Soebels 1970) entsteht die höchste Rate an X-chromosomal, rezessiv letalen Treffern bei der Bestrahlung von Spermatidien. Berücksichtigt man die Chronologie der Spermientwicklung von den Spermatogonien über Spermatocyten zu Spermatidien und letztendlich zum reifen Spermium, entspricht dies in etwa der Bestrahlung von 2 Tage alten Männchen. Die höchste Rate ergibt sich außerdem bei der ersten Befruchtung von Jungfrauen. Bei weiteren Kopulationen sinkt der Anteil an Nachkommen mit rezessiv letalen Treffern und steigt erst ab Tag 4 wieder an. Ab Tag 6-10 nimmt die Anzahl der lebensfähigen Nachkommen deutlich ab. Dies erklärt sich durch die Zerstörung der Spermatocyten und späten

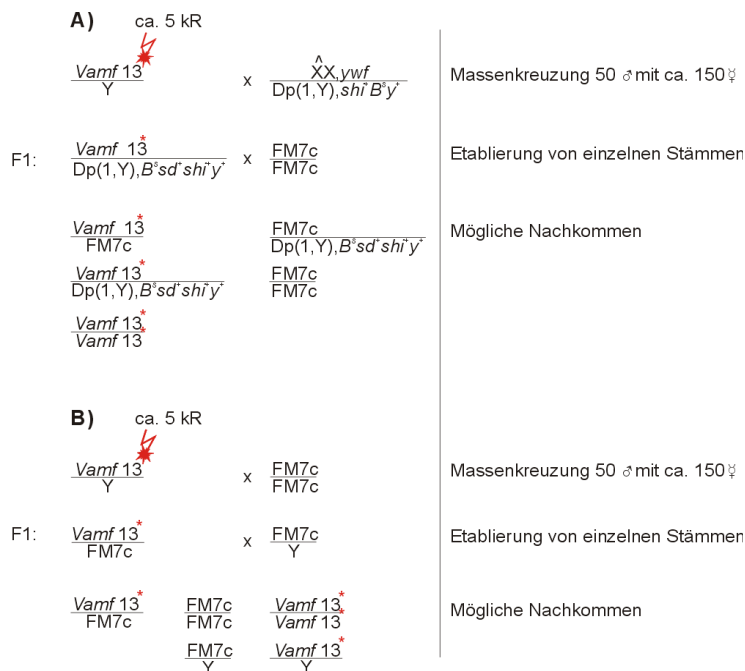


Abbildung 33: Schema der Mutagenese

Bei den ersten Mutageneserunden (**A**) wurden die bestrahlten Männchen mit attX Jungfrauen gekreuzt, die ein den *Vam*-Bereich abdeckendes Duplikations-Y in die Stämme einbringen. Alle *Vam* f 13 Männchen der folgenden Generation erhalten diese Duplikation. Etablierte Stämme, in denen keine homozygoten *Vam* f 13 Weibchen aber *Vam* f 13 Männchen mit Duplikation vorkommen tragen demnach zumindest einen letalen Treffer auf dem X-Chromosom innerhalb des von der Duplikation abgedeckten Bereichs und sind somit gute Kandidaten für eine Reversion des *Vam*-Phänotyps. In Schema **B** wird in den Einzelstämmen nur auf letale Treffer auf dem gesamten X-Chromosom selektioniert. Die möglichen Nachkommen der etablierten Einzelkreuzungen sind grau dargestellt.

Spermatogonien, insbesondere durch die erhöhte Anfälligkeit der Spermatocyten für Chromosomenverluste durch die Bestrahlung (Welshon & Russel 1957; Baker 1957). Die Dosisabhängigkeit wurde unter anderem von Edington 1956 als lineare Antwort über einen Bereich von 0,025 - 6 kRad beschrieben. Für die Bestrahlung von Spermatidien geben Soebel und Broese (Sobels & Broese 1970) einen Wert von ca. 2,2 % letale, geschlechtsgekoppelte, rezessive Treffer pro 1 kRad Dosis an. Als groben Richtwert gibt Ashburner (Ashburner 1989a) 1 Treffer pro 5000 Chromosomen pro spezifischem Genlocus bei 4 kRad Dosis an.

3.2.4.2 Neue Röntgeninduzierte X-Chromosomale Defizienzen

Nach Vereinzelung der Stämme wurden alle rezessiv letalen X-chromosomalen Linien auf Reversion des *Vam*-Phänotyps überprüft. Dazu wurden von allen Linien jeweils 20 Jungfrauen abgesammelt und nach einer Alterungsperiode von 21 Tagen vier Stück Carnoy-fixiert und Paraffin geschnitten (siehe 2.3). Alle in Abbildung 34 aufgeführten letztendlich positiven Stämme wurden diesem Prozedere je viermal unterzogen und zeigten bei keinem der Durchgänge *Vam* typische Löcher oder andere histologische Auffälligkeiten. Um zu überprüfen ob die Linien tatsächlich noch das ursprüngliche *forked* markierte *Vam*-Chromosom tragen, wurden alle Stämme mit *R13-Vamf* Männchen rückgekreuzt und die Nachkommen untersucht. Alle zeigten sowohl den rezessiven Marker *forked* als auch die durch *Vam* verursachten Vakuolen in der Medulla. Dieser Versuch wurde mit allen Linien doppelt durchgeführt. Damit konnte gezeigt werden, daß alle verbliebenen Linien den Genotyp *Vamf*^{*} (Bestrahltes *Vamf*-Chromosom) besitzen.

Zudem sind die letalen Treffer auf dem X-Chromosom lokalisiert und führen zum Verschwinden der histologischen Ausprägung des neurodegenerativen *Vam*-Phänotyps. Eine weitere mutante Kopie des *Vam*-Gens führt wieder zu Löchern im optischen System, die semidominante Form der Ausgangsmutation bleibt also gewahrt. Wäre eine Mutation außerhalb des eigentlichen *Vam*-Locus für die Reversion des Phänotyps verantwortlich, so müßte sie also auf dem X-Chromosom liegen und nur in cis-Richtung ihre repressive Wirkung auf *Vam* ausüben.

Zur genaueren Lokalisation wurde bei allen Linien untersucht, ob sie die Defizienz Df(1)9 komplementieren können bzw. von der Duplikation Dp(1;4)long gerettet werden können.

Linie #	<i>Vamf/Df19</i>	<i>Vamf/Df19 ; Dp(1,4)long</i>	<i>Vamf/Y</i>	<i>Vamf/Y ; Dp(1,4)long</i>	<i>Rest (Vamf / Fm7c & Df19 / Fm7c +/- Dp(1;4) long</i>	Bemerkungen
11	15	79	-	-	82	
20	7	78	-	-	84	
21	10	52	-	-	65	
24	5	53	-	4	96	sd Flügel
28	3	51	-	-	33	
35	6	63	-	-	52	sd Flügel
50	-	53	-	-	56	
98	-	27	-	-	33	sd Flügel
104	-	53	-	-	50	sd Flügel
127	-	22	-	3	36	sd Flügel
194	-	17	-	7	9	
197	13	67	-	-	63	
199	2	68	-	35	68	sd Flügel
206	-	32	-	38	91	
232	1	20	11	3	18	
249	-	59	-	-	50	
271	-	3	-	-	8	
385	1	32	1	-	23	

Abbildung 34: Nachkommen aus den Kreuzungen des Typs *Vam f^[#]/FM7c X Df(1)19 / Y ; Dp(1;4) long / IV.:*

[#] entspricht der jeweiligen Linie in der ersten Spalte. Die Männchen FM7c/Y wurden nicht ausgezählt und sind nicht aufgeführt. *Vam f^[#]* entspricht dem *Vam f* X-Chromosom mit letalem Treffer durch die Röntgenmutagenese. *sd (scalloped)* ist ein distal von *Vam* liegendes bekanntes Gen bei dem Mutationen zu Defekten bei der Flügelausbildung führen.

Nach der bisherigen Kartierung (siehe 1.1.2) liegt der *Vam*-locus nicht innerhalb des von der Df(1) 19 f betroffenen Bereichs, wohl aber im durch die Dp(1;4) long abgedeckten Bereich. Daraus ergibt sich, daß die Linien 24, 199 und 232 am besten für eine weitere Kartierung des *Vam* Genbereichs geeignet sind. Diese Stämme sind über Df(1) 19 lebensfähig und werden von Dp(1;4) long gerettet. Die neu generierten röntgeninduzierten letalen Mutationen liegen also sicher im Bereich des *Vam*-Gens und könnten somit für eine weitere Einengung der *Vam*-Mutation verwendet werden. Da die Stämme 24 und 199 wie auch einige andere Linien eine

Ergebnisse und Diskussion

leichten *sd*-Phänotyp zeigen, muß man davon ausgehen, daß nicht das *Vam* Gen alleine getroffen wurde, sondern in Übereinstimmung mit den Erwartungen Deletionen unterschiedlicher Größe erzeugt wurden (vgl. Abbildung 35).

Bei den Linien 232 und 385 gab es vereinzelt lebensfähige Männchen des Genotyps *Vam* $f^{#}$ /Y. Bei einer erneuten Überprüfung des *Vam*-Phänotyps zeigten diese Linien wieder die typischen Vakuolen in der Medulla und Lamina. In den vier Testrunden, bei denen zuvor überprüft wurde, ob die heterozygoten Weibchen *Vam* $f^{#}$ /FM7c einen *Vam*-Phänotyp zeigen, konnten diese Stämme nicht aussortiert werden. Wie an der geringen Zahl der Nachkommen zu sehen, haben beide Stämme offensichtlich eine sehr schwache Konstitution. Vermutlich konnten sie deshalb vorher nicht als falschpositive Linien ausgesondert werden.

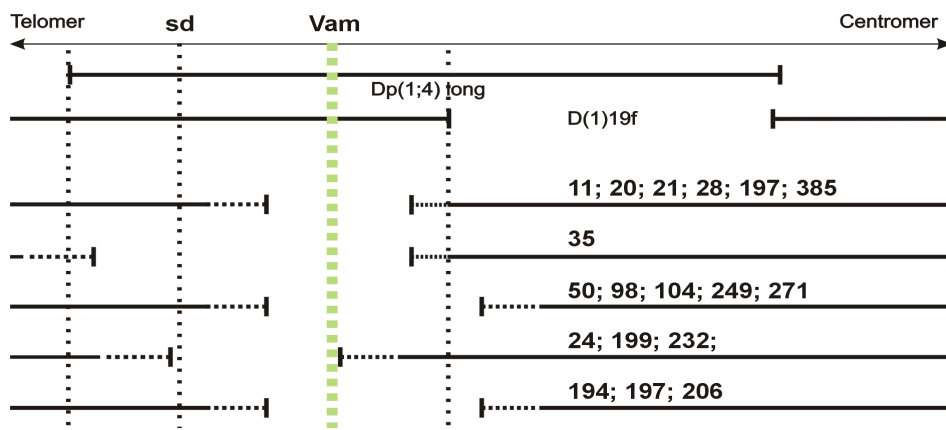


Abbildung 35: Schematische Übersicht über die Revertanten

Die neu erzeugten letalen Röntgenmutanten lassen sich in fünf Klassen einordnen. Diese Klassen sind in der obigen Grafik schematisch dargestellt. Die Bruchpunkte der neuen Deletionen sind nicht genau kartiert und entsprechend punktiert dargestellt. Die Einordnung ergibt sich jeweils aus dem Verhalten zu den bekannten Markern *Df* (1) 19 f, *Dp*(1:4) long *Vam* und *sd*. Die grün gestrichelte Linie gibt die Position des *Vam*-Gens an.

Abschließend läßt sich zu dieser sehr arbeitsintensiven Runde an Experimenten sagen, daß die *Vam*-Mutation sich dadurch klassisch genetisch noch weiter eingrenzen ließe. Wenn die Experimente der Keimbahntransformation mit PC₃-Genie erwartungsgemäß ausfallen, wäre die weitere Untersuchung der Linien jedoch obsolet.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit nochmals gesammelt und unter Berücksichtigung aller vorhandenen Daten eine mögliche Weiterführung der Arbeiten aufgezeigt werden.

4.1 CG15914 ist *Vam*

Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in wildtypischen Fliegen durch eine Keimbahntransformation mit einem P-Element, das den genomischen Bereich von UBL3 und CG15914 aus *Vam*-Fliegen enthält, ein *Vam* ähnlicher Phänotyp induziert werden kann (siehe 2.2.7 und 3.2.2.2). Dadurch konnte der Beweis erbracht werden, daß entweder Ubl3 oder das bis dahin nur hypothetische Transkript CG15914 für den *Vam*-Phänotyp verantwortlich ist (siehe 3.2.2.2). Das *Drosophila*-Ortholog zu UBL3 scheidet als möglicher Kandidat für die Mutation aus (siehe 3.2.3.2). Damit kann begründet postuliert werden, daß die Genregion von CG15914 die *Vam*-Mutation trägt. Das putative Gen CG15914 konnte als Transkript in *Vam*-Fliegen bestätigt werden (siehe 3.2.3.3 a). Die Sequenz der CG15914 cDNA aus *Vam*-Fliegen weist vier Mutationen im codierenden Bereich auf. Zwei davon führen zu nichtkonservativen Aminosäureaustauschen (siehe 3.2.3.3 d).

Es konnten *in silicio* mehrere cDNAs aus verschiedenen Organismen und Gewebetypen gefunden werden, die hohe Homologien zu dem putativen Genprodukt von CG15914 aufweisen (siehe 3.2.3.3 c). Eine der nachgewiesenen Mutationen liegt zentral in einem hochkonserviertem Bereich, dem neuen VISTA-Motiv (siehe 3.2.3.3 c & 3.2.3.3 d). Daher wird als Teilergebnis dieser Arbeit postuliert, daß die in *Vam* nachgewiesene Mutation innerhalb dieses VISTA-Motivs die molekulare Basis für die Ausprägung des *Vam*-Phänotyps ist.

Bisher handelt es sich um einen Indizienbeweis mit vielen Ausschlußargumenten. Die erfolgreiche Transformation des fertigen PC₃-Genie Konstrukts (vgl. 2.2.7 & 3.2.1.2) sollte einen weiteren Beweis liefern, daß die Transkriptionseinheit CG15914 für die *Vam*-Mutante verantwortlich zeichnet. Diese Transformanten müssen einen *Vam*-Phänotyp zeigen. Wenn dies der Fall ist, könnte die eigentliche Mutation im VISTA-Motiv in einer wildtypischen Kopie des Gens über *Site-Directed-Mutagenesis* PCR neu kreiert werden. Ein derartiges Konstrukt muß in w¹¹¹⁸-Fliegen transformiert ebenfalls den Phänotyp induzieren. Dies wäre der endgültige Beweis für die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese.

4.2 VISTA – Eine neue Genfamilie

Die homologen Proteine zu CG15914 werden als neue Genfamilie VISTA postuliert. Deren Expression reicht vom 2-Zell-Stadium eines Maus-Embryo über Tumorzellen bis hin zu Brust- und Nervengewebe beim Menschen (3.2.3.3 c). Die sehr hohe Konservierung (Abbildung 29 & 30) und der komplexe Genlocus im Menschen (Abbildung 28) deuten an, daß es sich bei diesen Proteinen um Bausteine mit hoher physiologischer Relevanz handelt. Vor allem ein Bereich am N-Terminus der Proteine ist hochkonserviert und enthält unter anderem die auffällige Aminosäuresequenz VISTA (Valin-Isoleucin-Serin-Threonin-Alanin).

4.2.1 Mögliche Funktionen der VISTA – Proteine

In keinem der anderen Organismen sind experimentelle Daten zur Funktion vorhanden. Das konservierte Glykosyltransferase-Proteinmotiv ist nur schwach und gibt keinen befriedigenden Aufschluß über mögliche Aufgaben der neuen Proteinfamilie. In 3.1.3 konnten Indizien für die Beteiligung des dVISTA-Proteins an der Regulation der Transkription des P-Element-Promotors angeführt werden. Auch wenn die Repression der Transkription die wahrscheinlichste Ursache für die in 3.1.3 beschriebenen Phänomene darstellt, so konnte dies nicht bewiesen werden. Um die Beweisführung weiter zu konsolidieren, wäre es nötig zu zeigen, daß nur die Transkription des P-Element Reporters lacZ, nicht aber die Proteinstabilität desselbigen in *Vam*-Fliegen vermindert wird. Dies könnte z.B. über die Wahl eines anderen Reporters geschehen, der, wenn nur die lacZ-Stabilität in *Vam* beeinflusst wäre, ein wildtypisches Expressionsverhalten zeigen sollte. Im anderen Fall, wenn sich also die Ergebnisse des lacZ-Reporters mit einem anderen Reporter reproduzieren ließen, so würde damit bewiesen, daß VAM tatsächlich einen Einfluß auf die Transkription ausübt. Zudem könnte über eine quantitative RT-PCR der Transkriptionsstatus des P-Element Promotors in *Vam*- und wt-Fliegen überwacht werden. Auch hier würde ich erwarten, daß in *Vam*-Fliegen die Transkriptionsrate und damit die Menge an Reporter-mRNA sinkt.

Um die weiteren Aufgaben des Proteins zu charakterisieren, können einige Standardmethoden verwendet werden. So z.B. ein *Yeast two hybrid Screen*, oder ein anderes auf Protein-Wechselwirkungen basierendes Nachweisverfahren, um mögliche Interaktionspartner zu finden. Mit der Erzeugung von Antikörpern gegen VAM oder sogar nur gegen den konservierten Bereich des VISTA-Motivs könnten die Lokalisation des Proteins in den Zellen und den verschiedenen Geweben verfolgt werden.

Zusammenfassung und Ausblick

Der neuronale Phänotyp der Mutante spiegelt wahrscheinlich weniger eine neuronale Selektivität dieses Proteins als vielmehr die erhöhte Anfälligkeit des Nervensystems generell und der Lamina von *Drosophila m.* im speziellen wieder. Ungeachtet dessen stünde mit *Vam* eine Mutante einer neuen, in Vertebraten anscheinend ubiquitären Proteinfamilie zur Verfügung, die evtl. an der Transkriptionsregulation beteiligt ist.

Sofern die noch ausstehenden Kontrollexperimente mit PC₃-Genie und der angesprochenen quantitativen RT-PCR positiv verlaufen, ist eine Fortführung der Arbeit in jedem Falle lohnens- und wünschenswert.

ANHANG

5 Anhang

5.1 Sequenzen

5.1.1 human_con

Konsensus Sequenz der <i>humanen</i> cDNAs: 2747 bp	
1	CCAGATTGGA CATATGTAAA GGGACATCAG TATATCTGGA TCATCAGATT GTGCTTCAAG AAGACCATAG GGAAGAACGC ATTTTCATCT TGCTGCAAAA
101	GTTCGAATAG AAGATCTGAA AGGTTTGAAT GGGCCA ATG AGTATCCTCAT CATTGAAGCA TTCTATGGAG GCTCCCATAA ACAGCTGGTG GATCTTCTTC
201	AAGAAGAGTT AGGAGACTGT GTCGTTTATA CCCTTCCTGC AAAGAAATGG CATTGGAGAG CCCGGACATC TGCTTTATAT TTCTCTCAGA CCATTCCCAT
301	CAGTGAGCAT TACAGGACCC TCTTTGCAAG TTCAGTGTCT AACCTGACCG AACTGGCTGC CCTTCGGCCT GACCTTGGGA AACTGAAAAA GATTCTGTAT
401	TTTCACGAGA ACCAGTTGAT ATATCCTGTC AAGAAATGTC AGGAGAGGGA TTTCGAATAT GGATACAACC AAATTCCTTC ATGCCTGGTG GCTGATGTGG
501	TTGTATTCAA CTCAGTTTTT AATATGGAAT CATTCTCTAC TTCATGGGA AAATTATGA AGCTGATTCC TGATCACAGA CCCAAGGATC TGGAAAGCAT
601	CATCAGACCC AAGTGCCAAG TTATTACTTT TCCCATCAGG TTTCTGTATG TGAGCAGTAA ACACTGGGCT ACTCATATAA AACTTATTTG AAGAGTGAGG
701	AATAAGAGTT TCCAGCATTT GAAACTCAGA ATCTGGTGGC TGTAGCAACA CTCTGTCTCT GCCTCTTCTC GTGGCTATCA GGTGAATCCT TCTTTTATC
801	CCTGAGTCTT GTTGGGATAG CTGGGTGACG TCATGAGGCG TGGGCTGATG TACTGATTCA ATG CCCCAAGCA CAAAACAACC CATTTAAAAA AGATGCTCGG
901	CCTTAAAGGA AATGGCGGTG CGGTTCTGTC CATGGCCCTT CCTTTTCAGC CAGAGCAGAG AGATTTCAGAG GATTTATTGA AGAATTTTAA TTCAGAGTGT
1001	GATACACACT GTGGCCTTGA TACTGCACGA CAAGAATATT TGGGTAACCT ATTAAGACAG GAATCAGACT TGAaaaaaatC CACCTCGTCA GATAATTCAA
1101	GCTCTCATCA TGGTGAaaaAT AAACAAAATC TGACTGTGTA TCCCTGTGAC ATTTTGGGTG GAGTTGATAA TCAGCAAAGA CTGCTACACA TTGTCTGGCC
1201	TCACAGTGGG GAGCATGATA AAGATCCAGA AAGCTTTTTT AAGGTATTAA TGATCTTAA AGACTTAGGA CTCAAATTCC ACGTGTCTGT ACTTGGAGAA
1301	ACCTTCACAG ATGTCCCAGA TATTTTTTCA GAGGCCAAAA AGGCATTGGG ATCTTCTGTC TTACACTGGG GCTACTTACC CAGCAAAGAT GACTATTTC
1401	AAGTACTGTG CATGGCTGAT GTTGTCTCTT CAACAGCTAA GCATGAATTC TTTGAGTGG CAATGTTGGA AGCTGTGTAC TGTGGGTGTT ACCCACTTTG
1501	TCCTAAAGAT TTGTTTATC CCGAAATATT TCCAGCTGAA TATCTGTATT CTACACCTGA ACAGCTTTCA AAAAGGCTCC AGAATTTCTG CAAGAGACCA
1601	GATATTATAA GAAAACATCT CTATAAGGGT GAAATCGCTC CGTTTTCTTG GGCAGCCCTA CATGGTAAAT TCAGGTCTCT GCTTACAACA GAACCTAGGG
1701	AAGATTTGTG ACAGATGGGG CTAAGTCACA AACTTGCAGC CTAAGGCAGA ATCTGAAGAA CTTTCCAGAG TGTGCCCATA TTACCTGAT CAGAGAGAAA
1801	AGAAAATCTG CAGAGGAAGC TGAGCCTGGC TGCTTGTCAT AGCTGACACA GAGCCATCTG CCACAAACCT GTGGCGGCTT CAGATCTCCA ATCCCTGCCA
1901	CCACCCCAAC TCAAAATAAA TACAGATTCC TAGAGACGTT ATGATGGTTA CACATGTCCT CGGCATCACA TGTAGGAGAC TGTTCAAAAA AAATATGTGG
2001	CCTGTTGTAT AACCGCACTC ATGTATCCCA TATGTGTGTC CACATTGAAT TTCCGGTTGA ATCCGTTTTT ATCCTTTGTA CTGGATGACA TGGTGCCTGA
2101	ATTCTTTCTT TTCGCCGACA CGATGGCAGC CAAACTGCAG CTTCAAACGC TCACACTTGG CTGGGTTTCT ACCTAGGTG CCAGGTTATC ATCGGAGCCT
2201	TCTTGTGTCC TCAAAAGGCG ACGAGGCCTG AAAGGAGGAT CAGAATGCTT TGGGATTAAT TGGGCAGCCA TCGCAGAATT GTTTGTGGGC AAAGGGCTGC
2301	TTTAGCACTT TTCTTTTAGC AAATTAATGA CTCTCAGGCA CAGGGGGTTT TAAGTGAAGG TATTAATAAG AGGTCTGGCA GGTATTCCCA TGATTACAG
2401	AGTTACATTT GCATTTAATT AATCTTAAAG TTGCAAGATA AACAGCTGTA ATTCGGACAA ACATGACAAA CACAGTGAAG CCAACTATCC CATAAAATGA
2501	ACACTGACAT ACTTGTTTTA ATTTTTTTCC CAGCGTAAAA ATAGAAAAAT CAAAATACTC CTAACAAAAC CAGTGATTTT GATAGAAATA TTTCTCCAAT
2601	ATACTTGATC CCACCTACAA ATATAACCTT TTCAAGATAA ATCGCTTATG ATTTCAATAG TCAAACTGCT GTGTTTGTG ATGTAAGATG GTTTTGAATG
2701	GCTAGATGGT AAAATAAATT CTTAATAAAG TACCCACTGC AATTTTT

Abbildung 36: Konsensus cDNA human_con:

Sequenz der Konsensus cDNA wie in 3.2.3.3 c beschrieben. Der Beginn der für das CLUSTALW-Alignment verwanten ORFs sind jeweils durch ein **ATG** markiert.

5.1.2 xeno_con

Konsensus Sequenz der Maus <i>Xenopus laevis</i> cDNAs: 1234 bp	
1	AATTCGGCAC GAGGAGGACA AGTACAGAAG ACGTTGGCTG GAGAGAAA ATG AGCACCCCTGC TGCTAGTCGA AGCCTTCTAT GGAGGGTCCC ACAAGCAGCT
101	GATGGACCTA ATTAAGAAG AGGTAGAAGG CTGTATTTTG TATACACTCC CGCGGAAGAA ATGGCACTGG CGAGCACGGA CGGCCGCACT GTATTTTCATG
201	CAAGCGATTT TACCCAGTGA TACCTACAGG GTTCTATTTA CAAGTTCAGT TTTGAACCTG GCAGAACTTG TGGCGCTTCG ACCAGACCTG GGCAAATTAA
301	AAAAGATCCT CTACTTCCAC GAGAACCAGT TGATCTATCC TGTTCAAAAG AGTCAAGAGA GAGACTTTCA GTATGGCTAT AACCAAAATC TTTTCATGTTT
401	AGTTGCAGAT ACTGTGGTGT TCAATTCTGC CTTCAACATG GAATCTTTTC TAACCTCTAT AAAAACTTTT CTGAAGAAGA TACCGGACCA TCGTCCCAAG
501	AATCTGGAAG AAATTATCAG ACCAAAAATGC TGGGTCCTTT ATTTTCCCAT TAATTTTCCA GACMTCASGC AGTMYSTGCC AGAGCATAAA TGCATACCCC
601	ATAACCTAGT GGATAAATCA TCTAGTGATA TCAGTTATTG CCAAAAAACA TCAATTCAGA CAGGRCGTAT GTCTGTGGAA TTCAGTGATC ATCAAAATSCA
701	GTGCTCTAWT GATGAGTCAT CTGCTGAACA AGAGAAAAACA RCWGTCTCTG AAAAAACAA TTGTGAAGKT GGYGATCATG TGATTKTACA TTCACAAAGT
801	ACCTTGCGTG GSGATATTCA TCAGGAAAAG CCCTTGCAATA TTGTGTGGCC TCATAGATGG GAACATGATA AAGACCCAGA AACGTCTTTT AAAGTATTGC
901	TGAAACTTAA AGAAAAGGAG CTGACTTTTC ATCTATCAGT CCTTGAGAAA ACCTTTACCG ATGTACCAGA TATATTTTCT GAAGCCAGAA TAACCTTGGG
1001	ATCGTCTGTC TTGCACTGGG GCTATTTAGC CAGCAAAGAT GACTATTTCG AAGCTCTCTG CATGGCTGAT GTTGTCTGTT CAACAGCTAA ACATGAATTC

5.2.3 p{CoSpeR-3}

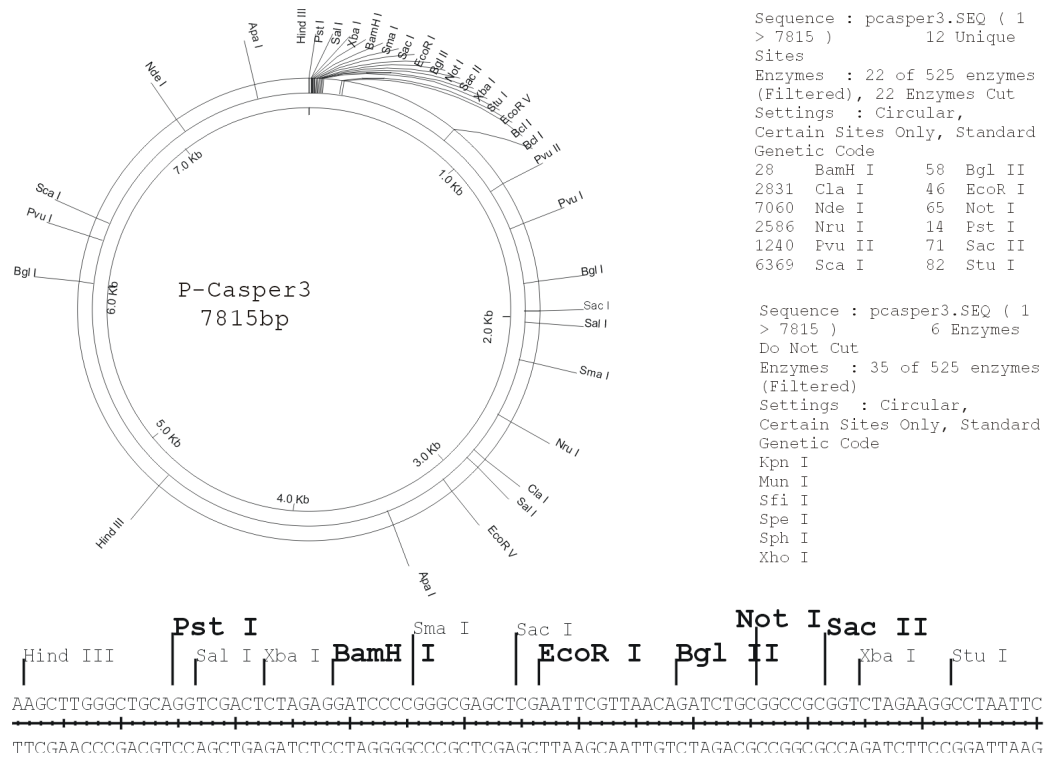


Abbildung 43: Der Transformationsvektor p{CoSpeR-3}

Schematische Vektor Karte des Transformationsvektors p{CoSpeR-3}, der für die genomischen Keimbahntransformationen verwendet wurde.

QUELLENANGABEN

6 Quellenangaben

- Adams** Mark D. , Susan E. Celniker, Robert A. Holt, Cheryl A. Evans, Jeannine D. Gocayne, Peter G. Amanatides, Steven E. Scherer, Peter W. Li, Roger A. Hoskins, Richard F. Galle, Reed A. George, Suzanna E. Lewis, Stephen Richards, Michael Ashburner, Scott N. Henderson, Granger G. Sutton, Jennifer R. Wortman, Mark D. Yandell, Qing Zhang, Lin X. Chen, Rhonda C. Brandon, Yu-Hui C. Rogers, Robert G. Blazej, Mark Champe, Barret D. Pfeiffer, Kenneth H. Wan, Clare Doyle, Evan G. Baxter, Gregg Helt, Catherine R. Nelson, George L. Gabor Miklos, Josep F. Abril, Anna Agbayani, Hui-Jin An, Cynthia Andrews-Pfannkoch, Danita Baldwin, Richard M. Ballew, Anand Basu, James Baxendale, Leyla Bayraktaroglu, Ellen M. Beasley, Karen Y. Beeson, P. V. Benos, Benjamin P. Berman, Deepali Bhandari, Slava Bolshakov, Dana Borkova, Michael R. Botchan, John Bouck, Peter Brokstein, Phillipe Brottier, Kenneth C. Burtis, Dana A. Busam, Heather Butler, Edouard Cadieu, Angela Center, Ishwar Chandra, J. Michael Cherry, Simon Cawley, Carl Dahlke, Lionel B. Davenport, Peter Davies, Beatriz de Pablos, Arthur Delcher, Zuoming Deng, Anne Deslattes Mays, Ian Dew, Suzanne M. Dietz, Kristina Dodson, Lisa E. Doup, Michael Downes, Shannon Dugan-Rocha, Boris C. Dunkov, Patrick Dunn, Kenneth J. Durbin, Carlos C. Evangelista, Concepcion Ferraz, Steven Ferriera, Wolfgang Fleischmann, Carl Fosler, Andrei E. Gabrielian, Neha S. Garg, William M. Gelbart, Ken Glasser, Anna Glodek, Fangcheng Gong, J. Harley Gorrell, Zhiping Gu, Ping Guan, Michael Harris, Nomi L. Harris, Damon Harvey, Thomas J. Heiman, Judith R. Hernandez, Jarrett Houck, Damon Hostin, Kathryn A. Houston, Timothy J. Howland, Ming-Hui Wei, Chinyere Ibegwam, Mena Jalali, Francis Kalush, Gary H. Karpen, Zhaoxi Ke, James A. Kennison, Karen A. Ketchum, Bruce E. Kimmel, Chinnappa D. Kodira, Cheryl Kraft, Saul Kravitz, David Kulp, Zhongwu Lai, Paul Lasko, Yiding Lei, Alexander A. Levitsky, Jiayin Li, Zhenya Li, Yong Liang, Xiaoying Lin, Xiangjun Liu, Bettina Mattei, Tina C. McIntosh, Michael P. McLeod, Duncan McPherson, Gennady Merkulov, Natalia V. Milshina, Clark Mobarry, Joe Morris, Ali Moshrefi, Stephen M. Mount, Mee Moy, Brian Murphy, Lee Murphy, Donna M. Muzny, David L. Nelson, David R. Nelson, Keith A. Nelson, Katherine Nixon, Deborah R. Nusskern, Joanne M. Pacleb, Michael Palazzolo, Gjang S. Pittman, Sue Pan, John Pollard, Vinita Puri, Martin G. Reese, Knut Reinert, Karin Remington, Robert D. C. Saunders, Frederick Scheeler, Hua Shen, Bixiang Christopher Shue, Inga Sidén-Kiamos, Michael Simpson, Marian P. Skupski, Tom Smith, Eugene Spier, Allan C. Spradling, Mark Stapleton, Renee Strong, Eric Sun, Robert Svirskas, Cyndee Tector, Russell Turner, Eli Venter, Aihui H. Wang, Xin Wang, Zhen-Yuan Wang, David A. Wassarman, George M. Weinstock, Jean Weissenbach, Sherita M. Williams, Trevor Woodage, Kim C. Worley, David Wu, Song Yang, Q. Alison Yao, Jane Ye, Ru-Fang Yeh, Jayshree S. Zaveri, Ming Zhan, Guangren Zhang, Qi Zhao, Liansheng Zheng, Xiangqun H. Zheng, Fei N. Zhong, Wenyan Zhong, Xiaojun Zhou, Shiaoping Zhu, Xiaohong Zhu, Hamilton O. Smith, Richard A. Gibbs, Eugene W. Myers, Gerald M. Rubin, J. Craig Venter. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **2000** Mar 24;287(5461):2185-95.
- Altschul**, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* **1997** 25:3389-3402
- Ansari** B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol* **1993** 170:1–8.
- Ashburner** M, *Drosophila-Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. **1989a**
- Ashburner** M, *Drosophila-Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. **1989b**
- Ausubel-FM**, Brent-R, Kingston-RE, Moore-DD, Seidman-JG, Smith-JA, Struhl-K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons **1996**
- Baker**, W.K. Induced loss of a ring and a telomeric chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **1957** 42:735-748
- Barnes** WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1994** Mar 15;91(6):2216-20.
- Basler**, K. and Hafen, E. Dynamics of *Drosophila* eye development and temporal requirements of sevenless expression. *Development* **1989** 107: 723-31
- Bates** M. Arias A.M. *The Development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press **1993**
- Bellen**, H.J., O'Kane, C.J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R.K., and Gehring, W.J. P-element-mediated enhancer detection: A versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **1989** 3:1288-1300

- Bellen** HJ, Wilson C, Gibson G, Grossniklaus U, Pearson RK, O'Kane C, Gehring WJ. P-element-mediated enhancer detection allows rapid identification of developmentally regulated genes and cell specific markers in *Drosophila*. *J Physiol (Paris)*. **1990**;84(1):33-41.
- Bergenheim**, N.C.H., Venta, P.J., Hopkins, P.J., Kim, H.J. and Tashian, R.E. Mutation creates an open reading frame within the 5' UTR of macaque CA I mRNA that suppresses CA I expression and supports the scanning model for translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992** USA 89, pp. 8798–8802.
- Berghella** L, Dimitri P. The heterochromatic rolled gene of *Drosophila melanogaster* is extensively polytenized and transcriptionally active in the salivary gland chromocenter. *Genetics*. **1996** Sep;144(1):117-25.
- Bjorklund** S, Almouzni G, Davidson I, Nightingale KP, Weiss K. Global transcription regulators of eukaryotes. *Cell*. **1999** Mar 19;96(6):759-67.
- Blackwood** EM, Kadonaga JT. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*. **1998** Jul 3;281(5373):61-3.
- Bortner** CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*. **1995** 5:21–26.
- Brand** AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. **1993** Jun;118(2):401-15.
- Buck**, M., M. Miller, M. Drummond, and R. Dixon. Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* **1986** 320: 374-378.
- Callahan**, C.A., and Thomas, J.B. Tau- β -galactosidase, an axon-targeted fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994** USA 91:5972-5976
- Casares**, F., Bender, W., Merriam, J., and Sanchez-Herrero, E. Interactions of *Drosophila* Ultrabithorax regulatory regions with native and foreign promoters. *Genetics* **1997** 145:123-137
- Cooley** L, Kelley R, Spradling. A Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science*. **1988** Mar 4;239(4844):1121-8.
- Coombe**-PE & Heisenberg-M: The structural mutant Vacuolar medulla of *Drosophila melanogaster* with specific behavioral defects and cell degeneration in the adult. *J-Neurogen*. **1986** May; 3(3):135-58
- Cormack** BP, Struhl K. The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell* **1992** 69:685–96
- Coulson** RM, Enright AJ, Ouzounis CA. Transcription-associated protein families are primarily taxon-specific. *Bioinformatics*. **2001** Jan;17(1):95-7.
- Cruz** Bettencourt da A. Molekulare und genetische Analyse der *Vam*-Mutation in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät III Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg **1998**
- Dickson** D. Gene estimate rises as US and UK discuss freedom of access. *Nature* **1999** Sep 23;401(6751):311
- Dingwall** C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*. **1991** Dec;16(12):478-81.
- Dong** Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death: involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol* **1997** 151:1205–1213.
- Eckert** KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR Methods Appl*. **1991** Aug;1(1):17-24.
- Eichbaum** QG, Iyer R, Raveh DP, Mathieu C, Ezekowitz RA. Restriction of interferon gamma responsiveness and basal expression of the myeloid human Fc gamma R1b gene is mediated by a functional PU.1 site and a transcription initiator consensus. *J. Exp. Med*. **1994** 179:1985-96
- Enari** M, Sakahira H, Yokoyama K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **1998**; 391: 43–50.
- Feany** MB, Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*. **2000** Mar 23;404(6776):394-8.
- Fernandez**-Funez P, Nino-Rosales ML, de Gouyon B, She WC, Luchak JM, Martinez P, Turiegano E, Benito J, Capovilla M, Skinner PJ, McCall A, Canal I, Orr HT, Zoghbi HY, Botas J. Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*. **2000** Nov 2;408(6808):101-6.
- Fischbach** KF, Dittrich APM. The optic lobe of *Drosophila melanogaster*. I. A Golgi analysis of wildtype structure. *Cell Tiss. Res*. **1989** 258: 441-475.
- Flaherty** KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC. Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1991** Jun 1;88(11):5041-5.

Quellenangaben

- Gavrieli Y**, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* **1992** Nov;119(3):493-501.
- Gdula DA**, Gerasimova TI, Corces VG. Genetic and molecular analysis of the gypsy chromatin insulator of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996** Sep 3;93(18):9378-83.
- Geyer PK**. The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* **1997** Apr;7(2):242-8.
- Giniger, E.**, Wells, W., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. Tracing neurons with a kinesin- β -galactosidase fusion protein. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **1993** 202:112-122.
- Grummt I**. Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **1999**; 62:109-54.
- Guillemin, K.**, Groppe, J., Ducker, K., Triesman, R., Hafen, E., Affolter, M. and Krasnow, M. A. The pruned gene encodes the *Drosophila* serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system. *Development* **1996** 122, 1353-1362. *American Scientist* 75, 354-365.
- Hahn S**, Buratowski S, Sharp PA, Guarente L. Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1989** USA 86:5718–22
- Halter, D.A.**, Uban, J., Rickert, C., Ner, S.S., Ito, K., Travers, A.A. and Technau, G.M. The homeobox gene repo is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **1995** 121: 317-332
- Hartenstein, V.**, and Jan, Y.N. Studying *Drosophila* embryogenesis with P-lacZ enhancer trap lines. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **1992** 201:194-220.
- Hartl DL**, Ajioka JW, Cai H, Lohe AR, Lozovskaya ER, Smoller DA, Duncan IW. Towards a *Drosophila* genome map. *Trends Genet* **1992** Feb;8(2):70-5
- Heisenberg M**. in *Development and Neurobiology of Drosophila*. ed. Siddiqi O, Babu P, Hall L M, Hall J C. Plenum, New York **1980** pp. 373-390
- Heisenberg M** and Böhl K. Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila melanogaster* by histological means. *Z. Naturforsch.*, 34 **1978** 143-147
- Hengartner, M**. Apoptosis. Death by crowd control. *Science* **1998** 281, 1298–1299
- Hochschild A**, Dove SL. Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. *Cell.* **1998** Mar 6;92(5):597-600
- Jack J**, DeLotto Y. Structure and regulation of a complex locus: the cut gene of *Drosophila*. *Genetics.* **1995** Apr;139(4):1689-700.
- Jacobson, M. D.**, Weil, M. & Raff, M. C. Programmed cell death in animal development. *Cell* **1997** 88, 347–354
- James L**. Weber and Eugene W. Myers. Human Whole-Genome Shotgun Sequencing. *Genome Research* Vol. 7 **1997** May, No. 5, pp. 401-409
- Karpen GH**, Spradling AC. Analysis of subtelomeric heterochromatin in the *Drosophila* minichromosome Dp1187 by single P element insertional mutagenesis. *Genetics.* **1992** Nov;132(3):737-53
- Katzen AL**, Bishop JM. myb provides an essential function during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996** Nov 26;93(24):13955-60.
- Kelleher RJ 3rd**, Flanagan PM, Kornberg RD. A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell.* **1990** Jun 29;61(7):1209-15.
- Kennerdell JR**, Carthew RW. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol.* **2000** Aug;18(8):896-8.
- Kerr JF**, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **1972** Aug;26(4):239-57
- Khoury G**, Gruss P. Enhancer elements. *Cell.* **1983** Jun;33(2):313-4.
- Kim YJ**, Bjorklund S, Li Y, Sayre MH, Kornberg RD. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell.* **1994** May 20;77(4):599-608.
- Kozak M**. An analysis of 5'- noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs *Nucleic Acids Res.* **1987a**. V. 15. P. 8125-8148.
- Kozak M**. At least 6 nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells *J. Mol. Biol.* **1987b**. V. 196. P. 947-950.
- Kozak M**. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* **1999** Jul 8;234(2):187-208.

- Lee** TI, Young RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet.* **2000**;34:77-137.
- Lewis** E.B., Bacher F Methods of feeding ethyl methan sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Inf. Service* **1968**;43:193
- Lindsley** DL, Sandler L, Baker BS, Carpenter AT, Denell RE, Hall JC, Jacobs PA, Miklos GL, Davis BK, Gethmann RC, Hardy RW, Steven AH, Miller M, Nozawa H, Parry DM, Gould-Somero M, Gould-Somero M. Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the *Drosophila* genome. *Genetics.* **1972** May;71(1):157-84
- Liu** X, Zou H, Slaughter C, Wang X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* **1997** Apr 18;89(2):175-84.
- Li** X. and Noll M. Compatibility between enhancers and promoters determines the transcriptional specificity of gooseberry and gooseberry neuro in the *Drosophila* embryo *EMBO J.* **1994** 13: 400-06.
- Lu** BY, Emtage PC, Duyf BJ, Hilliker AJ, Eissenberg JC. Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics.* **2000** Jun;155(2):699-708.
- Martinez-Salas** E. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Curr Opin Biotechnol.* **1999** Oct;10(5):458-64
- McCall**, K., O'Connor, M.B., and Bender, W. Enhancer traps in the *Drosophila* bithorax complex mark parasegmental domains. *Genetics* **1994**; 138:387-399
- Meier** D, Untersuchungen zu Genetik und Molekularbiologie der Entwicklung des visuellen Systems in *Drosophila melanogaster*. Dissertation an der Universität Regensburg **2000**
- Meinertzhagen** IA, O'Neil SD. Synaptic organization of columnar elements in the lamina of the wild type in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol.* **1991** Mar 8;305(2):232-63.
- Merli** C., DE Bergstrom, JA Cygan, and RK Blackman. Promoter specificity mediates the independent regulation of neighboring genes *Genes Dev.* **1996** 10: 1260-1270
- Mount** SM, Burks C, Hertz G, Stormo GD, White O, Fields C. Splicing signals in *Drosophila*: intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **1992** Aug 25;20(16):4255-62.
- Muller** Hermann Joseph, *Science* **1927**; 66, 84
- Mullis** KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **1987**;155:335-50
- Myers** Eugene W. , Granger G. Sutton, Art L. Delcher, Ian M. Dew, Dan P. Fasulo, Michael J. Flanigan, Saul A. Kravitz, Clark M. Mobarry, Knut H. J. Reinert, Karin A. Remington, Eric L. Anson, Randall A. Bolanos, Hui-Hsien Chou, Catherine M. Jordan, Aaron L. Halpern, Stefano Lonardi, Ellen M. Beasley, Rhonda C. Brandon, Lin Chen, Patrick J. Dunn, Zhongwu Lai, Yong Liang, Deborah R. Nusskern, Ming Zhan, Qing Zhang, Xiangqun Zheng, Gerald M. Rubin, Mark D. Adams, J. Craig Venter. A Whole-Genome Assembly of *Drosophila*. *Science* **2000**; 287, 2196
- Myers** LC, Gustafsson CM, Bushnell DA, Lui M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kornberg RD. The Med proteins of yeast and their function through the RNA polymerase II carboxyterminal domain. *Genes Dev.* **1998** Jan 1;12(1):45-54.
- Novina** CD, Roy AL. Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet* 1996;12:351-5
- Nusslein-Volhard** C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* **1980** Oct 30;287(5785):795-801.
- Oberhammer** F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* **1993**;12:3679-3684.
- Ohler** ,U. and H. Niemann. Identification and analysis of eukaryotic promoters: recent computational approaches *Trends Genet.* **2001**;17:56-60,
- Ohler**,U. H. Niemann, G. Liao and G. M. Rubin. Joint modeling of DNA sequence and physical properties to improve eukaryotic promoter recognition *Bioinformatics*, to appear in **2001**.
- Ohler** U Promoter prediction on a genomic scale - the Adh experience *Genome Res* **2000**;10(4):539-542
- O'Kane** CJ, Gehring WJ. Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1987** Dec;84(24):9123-7.
- Park** JM, Gim BS, Kim JM, Yoon JH, Kim HS, Kang JG, Kim YJ. *Drosophila* Mediator complex is broadly utilized by diverse gene-specific transcription factors at different types of core promoters. *Mol Cell Biol.* **2001** Apr;21(7):2312-23.

Quellenangaben

- Pastink A**, Schalet AP, Vreeken C, Paradi E, Eeken JC. The nature of radiation-induced mutations at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* **1987** Mar;177(1):101-15.
- Pastink A**, Vreeken C, Schalet AP, Eeken JC. DNA sequence analysis of X-ray-induced deletions at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* **1988** Jan;207(1):23-8.
- Pederson T**. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* **1998** Sep 1;26(17):3871-6.
- Perrimon, N.**, Noll, E., McCall, K., and Brand, A. Generating lineage-specific markers to study *Drosophila* development. *Dev. Genet.* **1991**;12:238-252
- Phelps CB**, Brand AH. Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods.* **1998** Apr;14(4):367-79.
- Pirrotta V**. Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. *Biotechnology.* **1988**;10:437-56.
- Reitzer, L.J.** and B. Magasanik. Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* **1986**;45: 785-792
- Rio DC**. RNA processing. *Curr Opin Cell Biol.* **1992** Jun;4(3):444-52.
- Robbins J**, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell.* **1991** Feb 8;64(3):615-23.
- Robertson, H.M.**, Preston, C.R., Phillis, R.W., Johnson-Schlitz, D.M., Benz, W.K., and Engels, W.R. A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **1988**;118:461-470
- Romais B**, Mikroskopische Technik. Oldenbourg Verlag München. **1948**
- Rubin GM**, Spradling AC. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science.* **1982** Oct 22;218(4570):348-53.
- Rychlic-W.** Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular Biology* **1993**;Vol.15
- Saint Marie RL**, Carlson SD. The fine structure of neuroglia in the lamina ganglionaris of the housefly, *Musca domestica*. *J. Neurocytol.* **1983**;12: 213-241
- Samakovlis C**, Hacohen N, Manning G, Sutherland DC, Guillemin K, Krasnow MA. Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development.* **1996** May;122(5):1395-407.
- Schwyter DH**, Huang JD, Dubnicoff T, Courey AJ. The decapentaplegic core promoter region plays an integral role in the spatial control of transcription. *Mol. Cell. Biol.* **1995**;15:3960-68
- Shen WC**, Green MR. Yeast TAF(II)145 functions as a core promoter selectivity factor, not a general coactivator. *Cell.* **1997** Aug 22;90(4):615-24.
- Simon, M. A.**, Bowtell, D. D. and Rubin, G. M. Structure and activity of the sevenless protein: a protein tyrosine kinase receptor required for photoreceptor development in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci* **1989**;86: 8333-7
- Smale ST**, Baltimore D. The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 1989;57:103-13522.
- Smale ST**, Jain A, Kaufmann J, Emami KH, Lo K, Garraway IP. The initiator element: a paradigm for core promoter heterogeneity within metazoan protein-coding genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1998**;63:21 31
- Snow ET**, Foote RS, Mitra S. Basepairing properties of O⁶-methylguanine in template DNA during in vitro DNA replication. *J. Biol. Chem.* **1987** 259:8095-8100
- Soebels, F.H.** And J.J. Broese. RBE-values of 15 MeV neutrons of recessive lethals and translocations in mature spermatozoa and late spermatids of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **1970** 9:395-406
- Soebels, F.H.** Repair and differential radiosensitivity in developing germ cells of *drosophila* males. In *Repair from genetic radiation damage and differential radiosensitivity in germ cells* (ed. F.H. Soebels), **1963**; pp. 179-197. Pergamon Press , Oxford
- Spradling AC**, Rubin GM. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science.* **1982** Oct 22;218(4570):341-7.
- Spradling AC**, Stern DM, Kiss I, Roote J, Lavery T, Rubin GM. Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1995** Nov 21;92(24):10824-30.
- Stadelmann C**, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res.* **2000** Jul;301(1):19-31.
- Steller H**, Fischbach KF, Rubin GM. Disconnected: a locus required for neuronal pathway formation in the visual system of *Drosophila*. *Cell.* **1987** Sep 25;50(7):1139-53.
- Straußfeld NJ**, Atlas of an Insect Brain Springer Verlag Berlin Heidelberg New York **1976**

- Tatusova** Tatiana A. , Madden Thomas L. Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett.* **1999**;174:247-250.
- Venter**, JC;Adams, MD;Sutton, GG;Kerlavage, AR;Smith, HO;Hunkapiller, M. Shotgun sequencing of the human genome *Science* **1998** JUN 5;280: (5369) 1540-1542
- Venter** JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Rombiad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science.* **2001** Feb 16;291(5507):1304-51.
- Wedel**, A., D.S. Weiss, D. Popham, P. Droge, and S. Kustu. A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. *Science* **1990**;248: 486-490
- Welshons**, W.J. And Russell W.L. The effect of X-rays on the *Drosophila* testis and a method for obtaining spermatogonium mutation rates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1957**;43:608-613
- Wieland** T, Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC Crit Rev Biochem.* **1978** Dec;5(3):185-260.
- Wilson**, C., Pearson, R.K., Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Grossniklaus, U., and Gehring, W.J. P-element-mediated enhancer detection: An efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes Dev.* **1989**;3:1301-1313
- Wyllie** AH, Kerr JF, Currie AR. Cellular events in the adrenal cortex following ACTH deprivation. *J Pathol.* **1972** Jan;106(1):
- Wyllie** AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251–306.
- Wyllie** AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **1980**;284:555–556.
- Xiong**, W.C., Okano, H., Patel, N.H., Blendy, J.A. and Montell, C. repo encodes a glial-specific homeodomain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes & Dev.* 1994;8: 981-994
- Xiong**, W.C. and Montell, C. Defective glia induce neuroal apoptosis in the repo visual system of *Drosophila*. *Neuron* **1995**;14: 581-90
- Yamamoto**, D. Signaling mechanisms in induction of the R7 photoreceptor in the developing *Drosophila* retina. *BioEssays* **1994**;16: 237-244
- Yarfitz** S, Provost NM, Hurley JB. Cloning of a *Drosophila melanogaster* guanine nucleotide regulatory protein β -subunit gene and characterization of its expression during development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1988** Oct;85(19):7134-8.

Quellenangaben

Zilian O, Frei E, Burke R, Brentrup D, Gutjahr T, Bryant PJ, Noll M. double-time is identical to discs overgrown, which is required for cell survival, proliferation and growth arrest in *Drosophila* imaginal discs. *Development*. 1999 Dec;126(23):5409-20.

URLs:	
1 Information zum Hefegenom	http://www.mips.embl.org/proj/yeast/info/
2 Promotor Vorhersage McPromotor V3	http://promoter.informatik.uni-erlangen.de
3 BLAST Suche am NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
4 Start-AUG Vorhersage	http://www.hri.co.jp/atgpr
5 Exon/Intron Vorhersage	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
6 InterPro Proteinmotive	http://www.ebi.ac.uk/interpro/
7 BLAST Suche gegen das Humangenom	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/HsBlast.html
8 GENIE Algorithmus zur Gen Vorhersage	http://www.fruitfly.org/seq_tools/genie.html
9 Flybase	http://www.fruitfly.org
10. cDNA Vektor poT2	http://www.fruitfly.org/about/methods/pOT2vector.html
11. GadFly	http://www.fruitfly.org/annot/index.html

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Omatidiums	4
Abbildung 2: Neuronale Zelltypen der Lamina und Medulla	6
Abbildung 3: Der Vam-Phänotyp	8
Abbildung 4: Kartierung der Vam-Mutation	10
Abbildung 5: Einträge in GenBank 1982-2000	11
Abbildung 6: Die Transkriptionsinitiation	15
Abbildung 7: Modell zur Enhancer Spezifität	18
Abbildung 8: DNA-Schleifen zur Enhancer Promotor Findung	19
Abbildung 9: P-Element Konstrukte	26
Abbildung 10: Bestrahlungsschema	27
Abbildung 11: Dunkelfeldaufnahmen von Paraffinschnitten von Männchen	31
Abbildung 12: Toluidinblau gefärbte Plastik-Semidünnschnitte von w Vam f Männchen	33
Abbildung 13: TUNEL Färbung an horizontalen Kryostatschnitten durch Köpfe von w Vam f#7 Männchen	35
Abbildung 14: Ultrastruktur - EM-Aufnahmen von w Vam f Männchen	36
Abbildung 15: LacZ Enhancer Trap Linien	38
Abbildung 16: Horizontale Kryostatschnitte der glialen Enhancer-Trap Linie repo4	40
Abbildung 17: Die Transformationskonstrukte	44
Abbildung 18: Autofluoreszenzaufnahmen von 25 Tage alten Fliegen der Linie PC3-UBL3[9]	46
Abbildung 19: Stand der Vam-Kartierung zu Beginn der Arbeit	49
Abbildung 20: Insertion in Intron 2 des Vam-UBL3	50
Abbildung 21: UBL3 cDNA Klon#5	51
Abbildung 22: Offene Leseraster der Vam-Region	52
Abbildung 23: Genie RT-PCR	53
Abbildung 24: RT-PCR CG15914	54
Abbildung 25: Promotoren Vorhersage	55
Abbildung 26: Alternative cDNA zu CG15914:	56
Abbildung 27: Homologe zu CG15914	57
Abbildung 28: Schematische Übersicht über die Exon/Intron-Struktur des humanen Homologs zu CG15914	58
Abbildung 29: Alignment der putativen Proteine zu CG15914 aus Drosophila und dem Homologen dazu aus Mensch	59
Abbildung 30: CLUSTALW Alignment der putativen CG15914 Homologe:	62
Abbildung 31: Mutationen in CG15914	63
Abbildung 32: Schema der Strategien zur Mutagenese	65
Abbildung 33: Schema der Mutagenese	66
Abbildung 34: Nachkommen aus den Kreuzungen des Typs Vam f [#]/FM7c X Df(1)19 / Y ; Dp(1;4) long / IV.:	67
Abbildung 35: Schematische Übersicht über die Revertanten	68
Abbildung 36: Konsensus cDNA human_con:	74
Abbildung 37: Konsensus cDNA xeno_con	75
Abbildung 38: Konsensus cDNA mus1_con	75
Abbildung 39: Konsensus cDNA mus2_con	75
Abbildung 40: Ergänzung zu AE003500:	75
Abbildung 41: Restriktionskarte der Vam-Region	76
Abbildung 42: Der Klonierungsvektor PSNE	76
Abbildung 43: Der Transformationsvektor p{CoSpeR-3}	77

8 Dank

Mein erster Dank gebührt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, Ihrem Verständnis, Ihrer Förderung und Unterstützung während meiner langen Ausbildung.

Ein besonderer Dank gilt natürlich meinem Doktorvater Stephan Schneuwly. Nicht nur wegen der vielen guten und interessanten Diskussionen und Ratschläge, wie sie in jeder Danksagung aufgeführt sind, sondern vor allem für die überaus angenehme offene und freundschaftliche Atmosphäre mit der er sie zu vermitteln verstand.

Ein Dank diesbezüglich auch an den ganzen Lehrstuhl, bei dem die offenen Türen nicht nur für Bequemlichkeit, sondern auch familiäre Umgebung und nicht zuletzt eine gehörige Portion gute Laune bei der Arbeit stehen.

Vor Katharina und Christine, die beide als technische Unterstützung vor allem mit den vielen tausend Fliegenstämmen eine unschätzbare Hilfe waren, eine ebenso dankbare Verbeugung wie vor Doris Krretztzschmr, die als direkte und tägliche Betreuung mein Freud und Leid während der Arbeit hautnah mit erleben mußte und mit Rat und Tat zur Seite stand. Jakob meinem Laborgenossen und Max der zusätzlich noch zum Leidensgenossen während der heißen Phase der Promotion wurde – Danke.

Einen weiteren K'o-t'ou in Richtung des immer offenen Alois, des immer kritischen Burkhardt und des immer diskussionsbegierigen José. Und zuletzt das obligate aber aus tiefstem Herzen kommende Danke an alle die ich vergessen haben sollte (z.B. Sinje und Alex).

Danke Margit!