

**Vollständige Charakterisierung  
des geschlechtsbestimmenden Lokus  
der Honigbiene *Apis mellifera***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tanja Gempe  
aus Esslingen am Neckar

Dezember 2006

Aus dem Institut für Genetik  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. Martin Beye
Koreferent:	Prof. Dr. Rüdiger Simon
Tag der mündlichen Prüfung:	12.04.2007

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1	<i>Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsdifferenzierung</i> .....	6
1.2	<i>Haplodiploide und komplementäre Geschlechtsbestimmung</i> .....	6
1.3	<i>Der Geschlechtsbestimmungslokus von A. mellifera</i> .....	8
1.4	<i>Das Gen complementary sex determiner</i> .....	9
1.5	<i>Der Mechanismus der Geschlechtsbestimmung von A. mellifera</i> .....	10
1.6	<i>Molekulare Mechanismen und Elemente der Geschlechtsbestimmungskaskaden der Diptera</i> .....	12
1.6.1	Das initiale Signal und Elemente der somatischen Geschlechtsbestimmungskaskade von <i>D. melanogaster</i> .....	13
1.6.2	Das initiale Signal und Elemente der Geschlechtsbestimmungskaskade der Keimbahn von <i>D. melanogaster</i> .....	15
1.6.3	Das initiale Signal und Elemente der Geschlechtsbestimmungskaskade von <i>C. capitata</i> und <i>M. domestica</i> .....	16
1.7	<i>Regulatorische Prinzipien geschlechtsbestimmender Kaskaden</i> .....	17
1.8	<i>Fragstellungen und Ziele der Arbeit</i> .....	18
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1	<i>Chemikalien und sonstige Materialien</i> .....	20
2.1.1	Bakterienstämme .....	21
2.1.2	Vektoren .....	21
2.1.3	Zellkultur .....	21
2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	22
2.2.1	DNA-Extraktion (nach Hunt & Page 1995) .....	22
2.2.2	RNA-Extraktion (nach Marois 2000).....	23
2.2.3	Isolierung der Genomsequenz des SDL .....	23
2.2.4	Transkriptionsanalysen.....	24
2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i> .....	27
2.3.1	Herstellung embryonaler und larvaler Proteinlysate .....	27
2.3.2	Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern .....	27
2.3.3	Herstellung und Detektion von Fusionsproteinen .....	28
2.3.4	Isolierung von Fusionsproteinen vom SR-Typ.....	29
2.4	<i>Bienenzucht und histologische Methoden</i> .....	31
2.4.1	Jungfräuliche und einzelbesamte Königinnen.....	31
2.4.2	Künstliche Aufzucht von Honigbienen .....	31
2.4.3	Morphologische und histologische Präparationen.....	32
2.5	<i>Mikromanipulation von A. mellifera</i> .....	34
2.5.1	RNA-Interferenz (RNAi) .....	34
2.5.2	Mikroinjektion.....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1	<i>Isolierung der Genomsequenz des Geschlechtsbestimmungslokus (SDL)</i> .....	38
3.1.1	<i>csd</i> und <i>tra-like</i> sind paraloge Gene .....	38
3.1.2	Der SDL von <i>A. mellifera</i> enthält fünf Gene.....	40
3.2	<i>Repression der SDL-Gene durch RNA-Interferenz (RNAi)</i> .....	44
3.2.1	<i>tra-like</i> und <i>csd</i> sind für die weibliche Differenzierung der Gonaden essentiell.....	46
3.2.2	<i>tra-like</i> und <i>csd</i> sind für die weibliche Differenzierung von Soma und Keimzellen essentiell.....	54
3.3	<i>Kodierung der geschlechtsspezifischen Information von tra-like und csd auf der Ebene von Transkription und Translation</i> .....	64
3.3.1	<i>tra-like</i> weist geschlechtsspezifische Spleißvarianten auf.....	64
3.3.2	<i>csd</i> weist allelische Varianten in einer Kreuzung auf.....	66
3.3.3	TRA-LIKE und CSD gehören dem SR-Typ an.....	70
3.3.4	CSD ist während der gesamten Embryonalphase aktiv.....	72
3.3.5	TRA-LIKE <sup>F</sup> :EGFP erscheint mit der nuklearen Matrix assoziiert.....	73

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1	<i>Die geschlechtsbestimmenden Gene des SDL tragen Signaturen von Duplikation .....</i>	75
4.2	<i>Das Gen transformer-like ist struktur- und funktionsortholog mit dem transformer-Gen, in seiner Sequenz jedoch nicht konserviert .....</i>	78
4.2.1	<i>tra-like ist ein Schaltergen der Geschlechtsbestimmung.....</i>	78
4.2.2	<i>Die weibliche Spleißvariante tra-like<sup>F</sup> wird posttranskriptionell reguliert.....</i>	79
4.2.3	<i>Das TRA-LIKE<sup>F</sup>-Protein ist ein potentieller Spleißregulator.....</i>	80
4.3	<i>Das Gen complementary sex determiner aktiviert den allelischen Mechanismus posttranslational und reguliert seine Zielgene posttranskriptionell.....</i>	82
4.3.1	<i>csd ist das Haupt-Schaltergen der Geschlechtsbestimmung.....</i>	82
4.3.2	<i>csd weist in einer Kreuzung unterschiedliche Allele auf, die die Voraussetzung für einen aktiven Genzustand darstellen.....</i>	82
4.3.3	<i>Das CSD-Protein ist ein potentieller Spleißregulator mit an den Aktivitätszustand gekoppelten Proteinbindungs-Eigenschaften .....</i>	83
4.4	<i>Modell der Geschlechtsbestimmungskaskade von A. mellifera .....</i>	85
4.4.1	<i>Das Schlüsselgen csd erzeugt das initiale Signal der weiblichen Regulationskaskade und reguliert ein wichtiges Schaltergen .....</i>	85
4.4.2	<i>Das Schaltergen tra-like wird posttranskriptionell reguliert und ist selbst ein Spleißregulator ....</i>	86
4.4.3	<i>Aufrechterhaltung des Signals?.....</i>	87
4.5	<i>Die Modelle der Geschlechtsbestimmung der Insekten konvergieren auf der Stufe der transformer-orthologen Gene.....</i>	89
4.6	<i>Die transformer-orthologen Gene weisen eine hohe Evolutionsrate und ein bedeutendes plastisches Potential auf.....</i>	90
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>102</b>

[...] ABER DIE NATUR VERSTEHT GAR KEINEN SPASS,  
SIE IST IMMER WAHR, IMMER ERNST, IMMER STRENGE;  
SIE HAT IMMER RECHT,  
UND DIE FEHLER UND IRRTÜMER SIND IMMER DES MENSCHEN.

J. W. v. GOETHE

aus J. P. Eckermann, Gespräche mit Goethe, Gesprächsbericht vom 13. Februar 1829

## **1 Einleitung**

### **1.1 Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsdifferenzierung**

Unterschiede zwischen den Geschlechtern drücken sich vielfältig aus. Neben den oft augenfälligen morphologischen Unterschieden unterscheiden sich weibliche und männliche Individuen auch in Physiologie und Verhalten. Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsdifferenzierung stellen daher fundamentale Prozesse in der Ontogenese eines Organismus dar. Die zugrundeliegenden molekularen Bestandteile und Mechanismen sind bisher allerdings erst in wenigen Modellorganismen ergründet worden.

Die Modellvorstellung besagt, dass ein initiales Signal der Geschlechtsbestimmung eine molekulare Signaltransduktionskette in Keim- und Somazellen reguliert, die mit fortschreitender Entwicklung des Embryos zur Differenzierung des Geschlechts führt. Das initiale Signal kann in einem Umweltfaktor bestehen, der mit einem darauf ausgerichteten molekularen Exekutivapparat korrespondiert, beispielsweise infolge einer temperatursensitiven Mutation eines an der Geschlechtsbestimmung beteiligten Gens. In vielen Organismen wird das initiale Signal der Geschlechtsbestimmung jedoch zellautonom generiert und ist auf einem Heterosom oder einem Autosom genetisch fixiert.

### **1.2 Haplodiploide und komplementäre Geschlechtsbestimmung**

In etwa 20% aller Tierarten ist die haplodiploide Geschlechtsbestimmung verwirklicht, bei der ein Geschlecht, in der Regel das männliche, aus der unbefruchteten Eizelle hervorgeht und einen haploiden Chromosomensatz besitzt (Arrhenotokie). Eine Variante der Haplodiploidie ist die komplementäre Geschlechtsbestimmung, bei der die befruchtete, diploide Zygote beide Geschlechter hervorbringen kann. In diesem Fall entscheidet nicht der einfache oder doppelte Chromosomensatz über das Geschlecht, sondern der allelische Zustand am geschlechtsbestimmenden Locus (Whiting 1943). Heterozygotie an diesem Locus erzeugt Weibchen, während der homo- und hemizygote Allelzustand männliche Tiere hervorbringt (Abb. 1.1). Das Auftreten diploider Männchen in haplodiploiden Organismen kann folglich als Indikator für komplementäre Geschlechtsbestimmung angesehen werden. In der über 200000 Arten umfassenden und ausnahmslos haplodiploiden Ordnung Hymenoptera (Hautflügler) wurden diploide Männchen in bisher 4 von 18 Überfamilien nachgewiesen, den Tenthredinoidea, Apoidea,

Abbildung 1.1. Komplementäre Geschlechtsbestimmung, schematische Darstellung. Der allelische Zustand am Geschlechtsbestimmungslokus entscheidet über das Geschlecht. Haploide Individuen mit nur einem Allel (A oder B oder C; hemizygoter Zustand) sind männlich. Diploide Individuen mit zwei identischen Allelen (A/A oder B/B oder C/C; homozygoter Zustand) sind ebenfalls männlich, während diploide Individuen mit zwei verschiedenen Allelen (A/B oder A/C oder B/C; heterozygoter Zustand) weiblich sind. In den abgebildeten Kreuzungsschemata segregieren zwei bzw. drei Allele in der F1-Generation. Teilt der Vater ein Allel mit der Mutter, erzeugt die Kreuzung zu 50% diploide Männchen (a). Besitzt der Vater ein anderes Allel als die Mutter, bringt die Kreuzung zu 100% weibliche Tiere hervor (b).

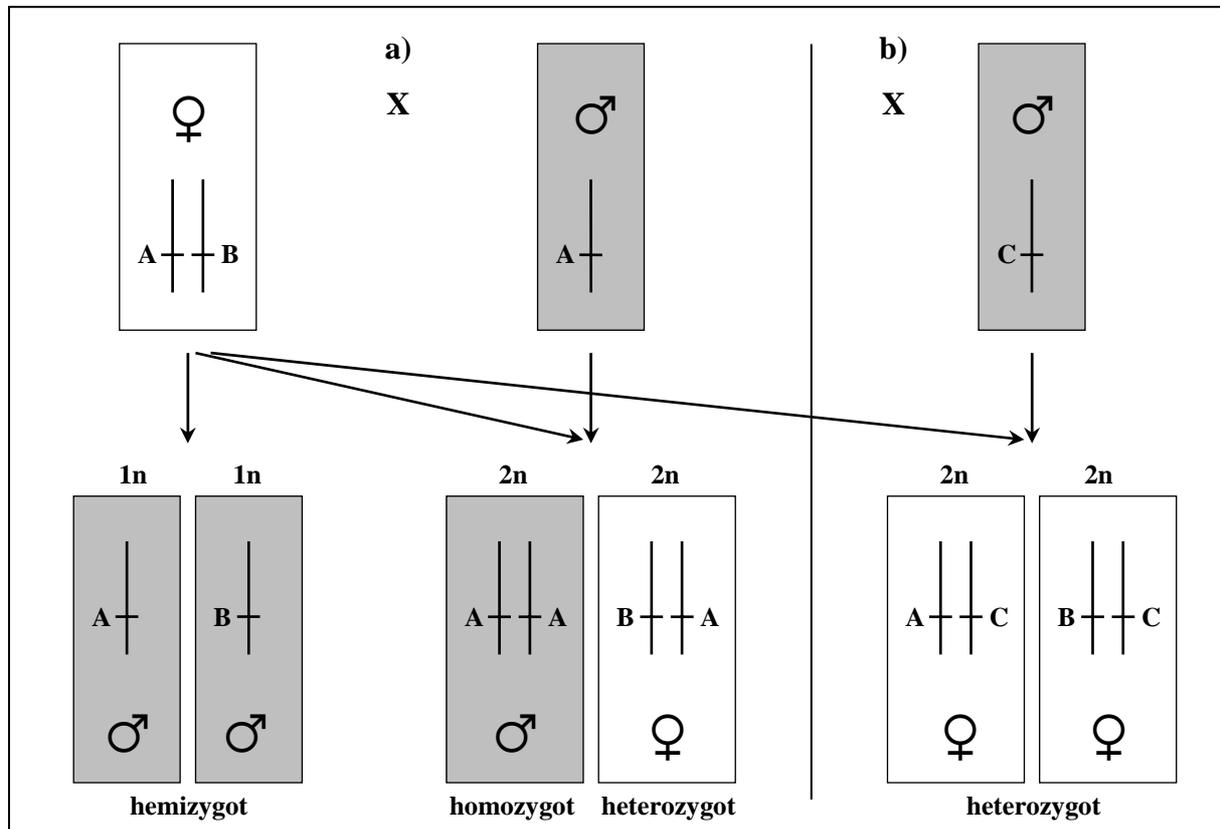
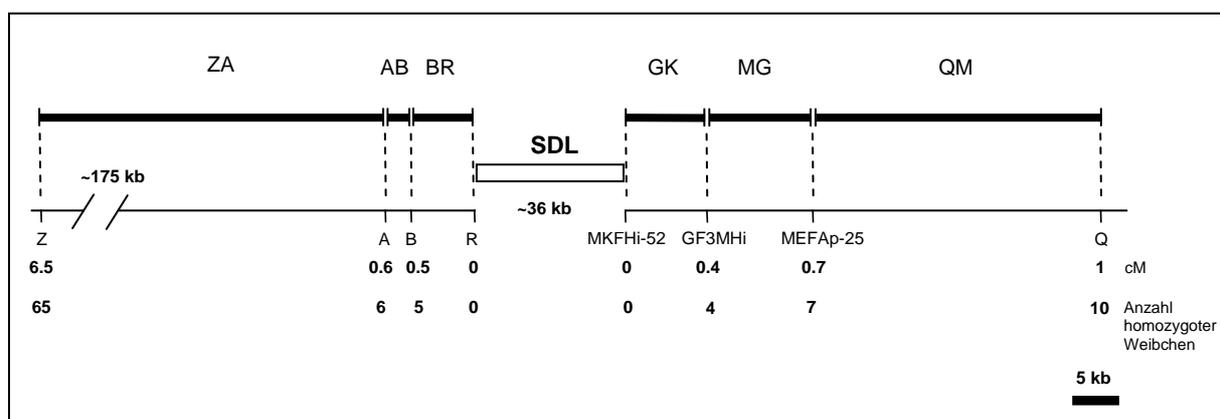


Abbildung 1.2. Physikalische und genetische Karte des Geschlechtsbestimmungslokus (SDL) und angrenzender Regionen von *A. mellifera*. Weibliche Tiere sind heterozygot am SDL. Aus der Anzahl der Rekombinationen zwischen SDL und genetischen Markern in 1000 Meiosen kann die genetische Distanz der Marker zum SDL abgeleitet werden. Abbildung entnommen aus Hasselmann & Beye 2006.



Vespoidea und Ichneumonoidea (Cook 1993). Die Fitness diploider Drohnen ist dramatisch reduziert, da sie diploide Spermien und triploide, infertile Nachkommen erzeugen. Im Falle der Honigbiene *Apis mellifera* werden homozygote Individuen kurz nach dem Schlupf von den Arbeiterinnen erkannt und aufgefressen. In natürlichen Populationen der Honigbiene segregieren bis zu 19 Sexlokus-Allele (Adams *et al.* 1977), was die Wahrscheinlichkeit der Heterozygotie pro Zygote erhöht und die Produktion diploider Drohnen reduziert. Die selektiven Mechanismen zur Rekrutierung neuer Allele und Aufrechterhaltung der allelischen Vielfalt am Geschlechtsbestimmungslokus der Honigbiene sind erst in Ansätzen verstanden. Es gibt Hinweise, dass in einer Population neue Allelvarianten durch zufällige Mutationen entstehen und selektiv begünstigt werden (Hasselmann & Beye 2004). Die rekrutierten Allele stehen unter starker balanzierender Selektion, die der genetischen Drift entgegenwirkt und neue Allele in der Population aufrechterhält (Hasselmann & Beye 2006).

### 1.3 Der Geschlechtsbestimmungslokus von *A. mellifera*

Der Geschlechtsbestimmungslokus (Sex Determination Locus, SDL) in Taxa mit komplementärer Geschlechtsbestimmung ist dadurch definiert, dass weibliche Tiere an diesem Locus heterozygot sind (Whiting 1943). Der SDL der Honigbiene ist ein singulärer Locus und auf dem dritten Chromosom lokalisiert (Beye *et al.* 1996).

Ein erste grobe Abgrenzung der SDL-Region stellen die mit dem SDL ko-segregierenden genetischen Marker Z (Beye *et al.* 1994) und Q (Hunt & Page 1994) dar, die eine genomische Region von etwa 360 kb umfassen und den SDL mit einer genetischen Distanz von 6.5 bzw.  $1 \text{ cM} \pm 0.85 \text{ cM}$  (95% Konfidenzintervall) flankieren (Beye *et al.* 1999) (Abb.1.2). Die genetische Distanz ist durch die Anzahl der Rekombinationen zwischen dem SDL und dem Marker in einer Kartierungspopulation von 1000 Weibchen definiert. Die zwischen Z und Q ermittelte Rekombinationsrate von 44 kb/cM (Beye *et al.* 1999) ist über zehnmal höher als die durchschnittliche Rekombinationsrate in *D. melanogaster* (Merriam *et al.* 1991).

Neben Z und Q grenzen mehrere CAPS-Marker ('cleaved amplified polymorphic sequence') den SDL weiter ein (Hasselmann *et al.* 2001; Hasselmann & Beye 2006) (Abb. 1.2). Die Marker MEFap-25 (33 kb aufwärts von Q) und GF3FMHi (46 kb aufwärts von Q) sind in 7 bzw. 4 von 1000 Weibchen der Kartierungspopulation homozygot, was einer genetischen Distanz von 0.7 bzw. 0.4 cM zum SDL entspricht. Die Marker MKFHi-52 (54 kb aufwärts von Q) und R (90 kb aufwärts von Q) sind in allen Weibchen der Kartierungspopulation heterozygot; die dazwischenliegende Region umfasst etwa 36 kb und ist vollständig im SDL lokalisiert.

siert. Die Marker B (94 kb aufwärts von Q) und A (97 kb aufwärts von Q) sind in 5 bzw. 6 von 1000 Weibchen homozygot, was einer genetischen Distanz von 0.5 bzw. 0.6 cM zum SDL entspricht. Die jüngsten Studien zeigen, dass die Rekombinationsrate zwischen den den SDL flankierenden Markern etwa viermal höher als im genomweiten Durchschnitt der Honigbiene ist, während die Rekombinationsrate innerhalb des SDL reduziert ist (Hasselmann & Beye 2006).

Die genomische Sequenz des SDL der Honigbiene ist noch nicht vollständig isoliert. Von den insgesamt 48 kb der um die potentiellen SDL-Bereiche zwischen B und R sowie MKFHi-52 und GF3FMHi erweiterten SDL-Region sind bis jetzt nur 13 kb isoliert. Die bereits isolierten Sequenzen enthalten die Gene *complementary sex determiner* (*csd*) und *Ex4.8-5.8* (Beye *et al.* 2003). Die aufwärts von *csd* verstärkt auftretenden repetitiven Sequenzen verhinderten bislang die Isolierung weiterer Bereiche zur Charakterisierung des SDL.

#### 1.4 Das Gen *complementary sex determiner*

Die Transkripte von *csd* treten in beiden Geschlechtern vom frühen Blastodermstadium (12 h nach Befruchtung) bis zum mittleren Puppenstadium auf und weisen keine geschlechtsspezifischen Spleiß- oder Sequenzvarianten auf (Beye *et al.* 2003). Das Transkript besteht aus neun Exons, deren putativer ORF (durchgehendes Leseraster) für ein Protein kodiert, das eine Arginin-Serin-reiche Domäne (RS-Domäne) und eine C-terminale prolinreiche Region (PRR) aufweist, die durch eine hypervariable Region (HVR) getrennt sind. Die HVR enthält im wesentlichen eine je nach Allel unterschiedliche Anzahl repetitiver NY-Motive, die jeweils aus 1-4 Asparagin- und einem Tyrosinmolekül bestehen (Beye *et al.* 2003; Hasselmann & Beye 2004).

RS-Domäne und prolinreiche Region rücken das CSD-Protein in die Verwandtschaft der SR-Typ-Proteine. SR-Proteine ('SR proteins') und SR-Typ-Proteine ('SR-related proteins') weisen eine oder mehrere RS-Domänen auf und sind hauptsächlich Spleißregulatoren, die die Nutzung alternativer Spleißstellen kontrollieren, indem die RS-Domänen Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, die die Bildung von spleißosomalen und regulatorischen Spleißkomplexen ermöglichen (Wu & Maniatis 1993; Amrein *et al.* 1994). SR-Proteine besitzen ein RNA-Bindungsmotiv ('RNA-recognition motif', RRM) (Zahler *et al.* 1992; Graveley 2000; Hastings & Krainer 2001), SR-Typ-Proteine dagegen nicht (Blencowe *et al.* 1999). Einige SR-Typ-Proteine weisen prolinreiche Regionen auf (Blencowe *et al.* 1998).

Auch das TRA-Protein von *Drosophila melanogaster* weist eine RS-Domäne und prolinreiche Region auf (Butler *et al.* 1986; Boggs *et al.* 1987). Im paarweisen Alignment ähneln sich die Sequenzen der RS-Domäne und prolinreichen Region von CSD und TRA mit einer Aminosäureidentität von 33.3%; über den gesamten ORF beträgt die Aminosäureidentität von CSD und TRA allerdings nur 16% (Beye *et al.* 2003). RS-Domänen treten in nicht-orthologen Genen, die sich funktionell unterscheiden, mit ähnlichen Aminosäureidentitäten auf. Es ist möglich, dass es sich im Fall von CSD und TRA trotz der gemeinsamen Domänen nicht um orthologe Gene, sondern lediglich um verschiedene Mitglieder einer Proteinfamilie vom SR-Typ handelt.

### 1.5 Der Mechanismus der Geschlechtsbestimmung von *A. mellifera*

Die allelische Kombination im SDL ist das primäre Signal der Geschlechtsbestimmung in der Honigbiene. Die Repression von *csd* in heterozygoten weiblichen Genotypen führt zu der Entwicklung männlicher Gonaden, während die Repression in hemizygoten männlichen Genotypen keinen phänotypischen Effekt verursacht (Beye *et al.* 2003). Diese Befunde zeigen, dass eine heterozygote Allelkombination den aktiven Zustand von *csd* darstellt, während eine homozygote Allelkombination bzw. der hemizygoten Allelzustand *csd* inaktivieren. In natürlichen Populationen segregieren bis zu 19 Allele (Adams *et al.* 1977), was bis zu 171 heterozygote Allelkombinationen erlaubt, die *csd* aktivieren; diesen gegenüber stehen bis zu 19 homozygote Kombinationen, die *csd* inaktivieren (Beye 2004).

Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus konnte bisher nicht geklärt werden, plausibel erscheint jedoch eine über RS- und prolinreiche Domäne vermittelte Interaktion der CSD-Polypeptide. Neben den Modellvorstellungen, dass ausschließlich von ungleichen (Heteromer-Modell) oder ausschließlich von gleichen (Homomer-Modell) Allelen stammende CSD-Moleküle interagieren können, wäre es auch denkbar, dass eine Bindung unabhängig davon stattfindet, ob die involvierten Proteine von Allelen gleicher oder ungleicher Identität abgeleitet sind. Verschiedene komplementäre Gruppen in unterschiedlichen Allelen könnten sich funktionell ergänzen, woraufhin aktives CSD entsteht (Komplementierungs-Modell) (Beye 2004).

Die Aminosäuresequenz, die die Identität eines Allels kodiert, ist nicht bekannt, dürfte jedoch in der variablen Abfolge singulärer Nukleotidaustausche, Insertionen und Deletionen begründet liegen. Insbesondere nicht-synonyme Nukleotidsubstitutionen, die zur Kodierung alternativer Aminosäuren führen, könnten unterschiedliche Allele spezifizieren. In den bis jetzt iso-

lierten *csd*-Allelen finden sich die meisten Aminosäureunterschiede im Bereich der RS- und prolinreichen Domänen und betreffen überwiegend Aminosäuren zwischen den Abfolgen von Arginin/Serin bzw. Prolin. Mögliche Kandidaten für variable komplementäre Gruppen wären die RS-Domäne, die prolinreiche Region und die hypervariable Region (HVR). Die HVR erzeugt eine Längendifferenz in unterschiedlichen Allelen und könnte dadurch die Wirkungsweise ihrer benachbarten Domänen beeinflussen. RS-Domänen werden durch multiple Kinasen phosphoryliert (Wang *et al.* 1998; Yeakley *et al.* 1999). Denkbar wäre daher, dass Unterschiede in der Phosphorylierung des CSD-Proteins, die für unterschiedliche Allele vorhergesagt werden, aktive komplementäre Gruppen erzeugen können (Beye *et al.* 2003).

## 1.6 Molekulare Mechanismen und Elemente der Geschlechtsbestimmungskaskaden der Diptera

Die Modellvorstellung der Geschlechtsbestimmung besagt, dass ein initiales Signal eine molekulare Signaltransduktionskette in Keim- und Somazellen reguliert, die mit fortschreitender Entwicklung des Embryos zur Differenzierung des sexuellen Phänotyps führt (Marin & Baker 1998). Die molekularen Mechanismen und Elemente der Geschlechtsbestimmungskaskade sind bislang nur in wenigen Modellorganismen untersucht worden, neben dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* vor allem in der Taufliege *Drosophila melanogaster*. Diese Arten besitzen ein initiales Signal, das auf dem Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen basiert; die molekularen Bestandteile des Signals unterscheiden sich jedoch grundlegend zwischen *C. elegans* und *D. melanogaster* (Cline & Meyer 1996). Der Vergleich mit weiteren Organismen zeigt, dass das initiale Signal der Geschlechtsbestimmung in einer Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen auftritt und sich bereits zwischen nahe verwandten Arten fundamental unterscheiden kann. Die Taufliege *Drosophila melanogaster*, die Stubenfliege *Musca domestica* und die Mittelmeerfruchtfliege *Ceratitis capitata* gehören der Ordnung Diptera (Zweiflügler) an und zeigen unterschiedliche Mechanismen der Geschlechtsbestimmung. Im Fall von *D. melanogaster* besteht das primäre Signal in dem bereits erwähnten Mengenverhältnis von X-chromosomalen zu autosomalen Genen (X:A-Signal), während es im Fall von *M. domestica* und *C. capitata* aus einem dominanten M-Faktor besteht (M = 'Masculinizer'), der je nach Kreuzung auf dem Y-Chromosom oder einem Autosom lokalisiert ist und dessen Bestandteile noch nicht charakterisiert sind. Auch in Säugetieren tritt in Form von *Sry* ein dominanter M-Faktor auf dem Y-Chromosom auf (Goodfellow & Lovell-Badge 1993). In der Honigbiene *Apis mellifera* und anderen Vertretern der Hymenoptera mit komplementärer Geschlechtsbestimmung hat sich mit dem allelischen Zustand am Geschlechtsbestimmungslokus eine weitere Art von initialem Signal etabliert.

## 1.6.1 Das initiale Signal und Elemente der somatischen Geschlechtsbestimmungskade von *D. melanogaster*

### 1.6.1.1 Das X:A-Signal kontrolliert die geschlechtsspezifische Expression von SXL

Das initiale Signal der somatischen Geschlechtsbestimmung in *D. melanogaster* setzt sich aus mindestens neun Genen zusammen, die ausnahmslos Transkriptionsfaktoren darstellen und gemeinsam das geschlechtsspezifische Spleißen des Schlüsselgens *Sex-lethal* (*Sxl*) kontrollieren (Parkhurst & Ish-Horowicz 1992). Auf dem X-Chromosom befinden sich die Numeratorgene *sisterless* (*sisA*, *sisB*, *sisC*) und *runt* (*run*), die *Sxl* positiv regulieren (Cline 1988; Duffy & Gergen 1991; Erickson & Cline 1993; Deshpande *et al.* 1995; Kramer *et al.* 1999). Auf dem Autosom liegt das Denominatorgen *deadpan* (*dpn*), das *Sxl* negativ reguliert (Younger-Shepherd *et al.* 1992; Barbash & Cline 1995; Hoshijima *et al.* 1995). Verschiedene maternal vererbte Gene agieren als Ko-Faktoren, wobei *daughterless* (*da*) und *hermaphrodite* (*her*) den positiven Effekt der Numeratorgene verstärken (Cronmiller *et al.* 1988; Pultz & Baker 1995), *extramacrochaetae* (*emc*) und *groucho* (*gro*) den positiven Effekt dagegen schwächen (Van Doren M. *et al.* 1991; Paroush *et al.* 1994). Maternales DA- und zygotisches SISB-Protein bilden Heterodimere (Cabrera & Alonso 1991). Eine Modellvorstellung ist, dass in XX-Genotypen ( $X:A = 1.0$ ) die Numeratorproteine SISA, SISB, SISC und RUN nicht vollständig von DPN gebunden werden können. Daraufhin bilden die nichtgebundenen Numeratorproteine mit DA heteromere Proteinkomplexe, die den ‘Establishment’-Promoter  $Sxl_{pe}$  aktivieren (Parkhurst *et al.* 1990; Parkhurst & Ish-Horowicz 1992). Zusätzlich konkurrieren die verschiedenen positiven und negativen Transkriptionsfaktoren des primären Signals direkt um multiple Bindungsstellen auf *Sxl* (Estes *et al.* 1995). Die transiente Aktivierung von  $Sxl_{pe}$  durch das X:A-Signal in XX-Genotypen erzeugt das weibliche Transkript exklusive Exon 2 und 3 und ein aktives SXL-Protein (Keyes *et al.* 1992). Im Gegensatz zu  $Sxl_{pe}$  produziert der in beiden Geschlechtern aktive ‘Maintenance’-Promoter  $Sxl_{pm}$  eine prä-mRNA inklusive Exon 2 und 3. In XY-Genotypen mit einem X:A-Signal von 0.5 wird  $Sxl_{pe}$  nicht aktiviert und die unter  $Sxl_{pm}$  gespleißte mRNA lässt infolge eines Stop-Kodons in Exon 3 die Translation von SXL vorzeitig enden (Bell *et al.* 1988), was zum männlichen Entwicklungsweg führt. In XX-Genotypen bewirkt der durch  $Sxl_{pe}$  erzeugte Vorrat an SXL-Protein, dass nach der Inaktivierung von  $Sxl_{pe}$  auch unter  $Sxl_{pm}$  ein aktives Transkript ohne Exon 2 und 3 erzeugt und der weibliche Entwicklungsweg eingeschlagen wird (Bell *et al.* 1991). In der Modellvorstellung interagiert SXL mit dem Protein des Spleißfaktors *sans fille* (*snf*) (Albrecht & Salz 1993). Der

Komplex aus SXL und SNF maskiert die 5'- und 3'-Spleißstellen von Exon 3, was zu dessen Herausspleißen und dem weiblichen Transkript unter  $Sxl_{Pm}$  führt (Deshpande *et al.* 1996). Die kurzfristige Erzeugung von SXL unter  $Sxl_{Pe}$  in weiblichen Genotypen führt somit über eine autoregulatorische Schleife zu der dauerhaften Produktion von SXL unter  $Sxl_{Pm}$ . Neben SXL und SNF sind auch die Gene *female-lethal(2)d* (*fl(2)d*) und *virilizer* (*vir*) zur Bildung von  $Sxl^F$  unter  $Sxl_{Pm}$  notwendig (Granadino *et al.* 1992; Hilfiker *et al.* 1995).

### 1.6.1.2 SXL kontrolliert die geschlechtsspezifische Expression von MSL-2 und TRA

Das SXL-Protein besitzt zwei RRM-Elemente und reguliert nicht nur sich selbst, sondern auch die geschlechtsspezifische Expression der Gene *male-specific lethal-2* (*msl-2*) und *transformer* (*tra*). MSL-2 ist an der Dosiskompensation beteiligt und aktiviert zusammen mit 4 weiteren Genen die Hypertranskription der unterrepräsentierten X-chromosomalen Gene in männlichen Genotypen (Lucchesi 1996). In weiblichen Genotypen wird durch die Bindung von SXL an insgesamt 6 SXL-Bindungsstellen in der 5'- und 3'-UTR der mRNA die Translation von *msl-2* unterbunden (Kelley *et al.* 1995; Bashaw & Baker 1997).

*tra* ist nach *Sxl* das nächste Glied in der somatischen Geschlechtsbestimmungskaskade. Die prä-mRNA enthält in beiden Geschlechtern drei Exons; die Spleißvariante  $tra^F$  mit durchgehendem Leseraster wird jedoch nur in Gegenwart von SXL erzeugt. SXL agiert in diesem Fall als Spleißrepressor, der mit höherer Affinität mit dem Spleißfaktor U2AF um die Bindung an die voreingestellte ('default') Spleißstelle vor Exon 2 konkurriert (Valcarcel *et al.* 1993). Das hat die Verwendung einer schwächeren Spleißstelle in 3'-Richtung zur Folge. In XY-Genotypen ohne SXL-Konkurrenz führt der Spleißprozeß an der voreingestellten Spleißstelle zu einem Transkript mit Stop-Kodon am 5'-Ende von Exon 2 (Boggs *et al.* 1987; Sosnowski *et al.* 1989).

### 1.6.1.3 TRA und TRA-2 kontrollieren die geschlechtsspezifische Expression von DSX

Das TRA-Protein enthält eine umfangreiche RS-Domäne und eine C-terminale prolinreiche Region (Boggs *et al.* 1987). Das Gen *transformer2* (*tra2*) zeigt keine geschlechtsspezifischen Spleißvarianten und ist ein Ko-Faktor von *tra*. Das TRA2-Protein enthält zwei RS-Domänen, die durch ein RRM getrennt sind (Amrein *et al.* 1988). Das SR-Typ-Protein TRA und das SR-Protein TRA2 sind Spleißregulatoren des bifunktionalen Schaltergens *doublesex* (*dsx*). Das weibchenspezifische Exon 4 der prä-mRNA von *dsx* enthält TRA/TRA2-Bindungsstellen, die

aus sechs ESE-Kopien ('exonic splicing enhancer') und einem purinreichen Element (PRE) bestehen. TRA und TRA2 assoziieren mit anderen SR-Proteinen zu einem Spleißregulationskomplex, der über das RRM von TRA2 an die ESE- und PRE-Sequenzen der prä-mRNA von *dsx* bindet und damit den Spleißapparat an die 3'-Spleißstelle vor Exon 4 dirigiert, was die weibliche Spleißvariante *dsx<sup>F</sup>* begünstigt (Tian & Maniatis 1993; Lynch & Maniatis 1996). In Abwesenheit des TRA/TRA2-Komplexes wird die männliche Spleißvariante *dsx<sup>M</sup>* ohne Exon 4 erstellt.

Sowohl DSX<sup>F</sup> als auch DSX<sup>M</sup> sind Transkriptionsfaktoren, die die Aktivität der finalen, phänotypprägenden Gene der somatischen Geschlechtsbestimmungskaskade kontrollieren (Burtis & Baker 1989). Das DSX-Protein enthält die Oligomerisierungsdomänen OD1 und OD2, die als Schnittstellen für Protein- und DNA-Interaktionen dienen (An *et al.* 1996; Cho & Wensink 1997). OD1 besteht aus einer atypischen Zinkfinger-Domäne (DM-Domäne), die direkt an die DNA-Zielsequenz bindet. Während die Exons 1-3 sowohl in der weiblichen als auch der männlichen Spleißvariante vorhanden sind und DSX<sup>F/M</sup> über die N-terminale OD1 an das Zielgen bindet (Erdman *et al.* 1996), ist OD2 am geschlechtsspezifisch exprimierten C-Terminus für den alternativen Effekt auf das jeweilige Zielgen verantwortlich. Bekannte Zielgene von DSX sind an der Neuroblastendifferenzierung und der Yolk-Protein-Synthese beteiligt (Burtis *et al.* 1991).

### **1.6.2 Das initiale Signal und Elemente der Geschlechtsbestimmungskaskade der Keimbahn von *D. melanogaster***

Die Geschlechtsbestimmung in der Keimbahn stimmt nicht in allen Organismen mit der somatischen Geschlechtsbestimmung überein. Während in *M. domestica* einzig das Geschlecht des Gonadengewebes das Geschlecht der Keimzellen prägt, bestimmt in *D. melanogaster* eine Kombination von keimzellautonomen Signalen und induktiven Signalen der benachbarten Somazellen das Geschlecht der Keimzellen (Steinmann-Zwicky *et al.* 1989). Die Regulationskaskade der Keimzellen in *D. melanogaster* unterscheidet sich von derjenigen der Somazellen sowohl in einzelnen Elementen als auch in der Funktion gemeinsamer Bestandteile. So führt die Nullmutation von *Sxl* in weiblichen Keimzellen nicht zu dem erwarteten männlichen Phänotyp, sondern lediglich zu tumorartiger Zellproliferation ohne erkennbare Bildung von Spermatozyten (Schüpbach 1985). Die Gene *tra* und *dsx* spielen in dem keimzellautonomen Anteil der Geschlechtsbestimmung ebenfalls keine Rolle, werden jedoch zur Regulation des

induktiven Signals der somatischen Zellen benötigt (Steinmann-Zwicky 1994a; Steinmann-Zwicky 1994b; Hinson & Nagoshi 1999; Evans & Cline 2006).

### 1.6.3 Das initiale Signal und Elemente der Geschlechtsbestimmungskaskade von *C. capitata* und *M. domestica*

Das initiale Signal der Geschlechtsbestimmung in *C. capitata* und *M. domestica* ist der sogenannte ‘Masculinizer’-Faktor (M-Faktor), der paternal vererbt wird. Der M-Faktor inaktiviert über einen noch unbekanntem Mechanismus das maternal vererbte weibliche Transkript des Schlüsseligens *Cctransformer* (*Cctra*) bzw. *Feminizer* (*F*), woraufhin der männliche Entwicklungsweg eingeschlagen wird (Dübendorfer & Hediger 1998; Dübendorfer *et al.* 2002; Pane *et al.* 2002). Im Gegensatz zu *Cctra* wurde das *Feminizer*-Gen von *M. domestica* noch nicht vollständig isoliert.

In Abwesenheit des initialen Signals M-Faktor werden die maternal vererbten weiblichen Transkripte von *Cctra* und *F* in der Zygote aktiviert und der weibliche Entwicklungsweg eingeleitet. In *C. capitata* erzeugt das maternal vererbte weibliche Transkript von *Cctra*, bestehend aus den Exons 1, 4 und 5, aktives CcTRA-Protein, das die weibliche Spleißvariante von zygotischem *Cctra* begünstigt (Pane *et al.* 2002). Das Modell basiert auf einer autoregulatorischen Schleife, in der CcTRA an konservierte TRA/TRA2-Bindungsstellen in Intron 1 der prä-mRNA von zygotischem *Cctra* bindet. In der Folge führt eine Kombination von ‘exon skipping’ und alternativer Nutzung von 5’- und 3’-Spleißstellen zum Herausspleißen der Exons 2 und 3, die Stop-Kodons enthalten. Die mögliche Beteiligung eines *tra2*-Orthologons in *C. capitata*, *Cctra2*, an der Autoregulation von *Cctra* wurde bisher nicht untersucht. In *M. domestica* wird zur Aktivierung der maternalen mRNA von *F* zusätzlich maternales *Mdtra2* benötigt (Burghardt *et al.* 2005). Die Modellvorstellung ist, dass analog zu der TRA/TRA2-Assoziation in *D. melanogaster* maternales *F* mit maternalem MdTRA2 einen aktiven Komplex bildet, der zygotisches *F* aktiviert, welches sich in der Folge über eine autoregulatorische Schleife und *Mdtra2* als Ko-Aktivator selbst reguliert.

Die prä-mRNA der *dsx*-orthologen Gene *Ccdsx* und *Mddsx* wird analog zu *dsx* alternativ gespleißt (Saccone *et al.* 2000; Hediger *et al.* 2004). In Anwesenheit von aktivem CcTRA bzw. *F* wird die weibliche Spleißvariante erzeugt, während in Männchen ohne Aktivität von CcTRA- bzw. *F* die prä-mRNA männlich gespleißt wird. In *M. domestica* ist dazu neben *F* wiederum *Mdtra2* als Ko-Faktor notwendig (Burghardt *et al.* 2005), was in der Modellvorstellung in Analogie zu *D. melanogaster* die Bildung eines Spleißregulationskomplexes durch

Assoziation von F und MdTRA2 und die Bindung des Spleißregulationskomplexes an konservierte TRA/TRA2-Bindungsstellen von *Mdlsx* nahelegt.

## 1.7 Regulatorische Prinzipien geschlechtsbestimmender Kaskaden

Aus der Vielzahl experimenteller Daten, die an *D. melanogaster* und anderen Vertretern der Diptera gewonnen wurden, abstrahierten Schütt & Nöthiger (2000) einige generelle Merkmale von Geschlechtsbestimmungskaskaden. Das initiale Signal, das sich zwischen männlichem und weiblichem Genotyp unterscheidet und den molekularen Mechanismus der Geschlechtsbestimmung charakterisiert, führt zu der differentiellen Expression eines Schlüsselgens ('key gene'). Der Aktivitätszustand dieses Schlüsselgens wird über eine kurze Kaskade untergeordneter Kontrollgene ('control genes') weitergeleitet, an deren Ende die geschlechtsdifferenzierenden Gene ('differentiation genes') stehen, die das molekulare Signal in den männlichen oder weiblichen Phänotyp umsetzen. Schlüssel- und Kontrollgene dieses Modells liegen geschlechtsspezifisch in aktiven oder inaktiven Zuständen vor und werden darum auch als Schaltergene ('switch genes') bezeichnet.

Die Analyse der Regulation geschlechtsbestimmender Kaskaden in den Diptera lässt zwei wichtige Prinzipien erkennen: a) das Auftreten geschlechtsspezifischer Transkripte und b) die Erhaltung der aktiven Transkripte durch Autoregulation. Die Umsetzung des initialen Signals in geschlechtsspezifische Transkripte bewirkt in Verbindung mit der Autoregulation der aktiven Varianten, dass ein transientes Element der Kaskade einen festgelegten Zustand kodiert und auf nachfolgende Elemente der Kaskade überträgt.

In der somatischen Geschlechtsbestimmungskaskade von *D. melanogaster* kodieren die Gene des initialen Signals und das Doppel-Schaltergen *dsx* für Transkriptionsfaktoren, während die Produkte der Schaltergene *Sxl*, *tra* und *tra2* als Spleißregulatoren auf der posttranskriptionellen Ebene agieren. Im Fall von *Sxl* erzeugen alternativ aktive Promotoren geschlechtsspezifische Transkripte, während die primären Transkripte (prä-mRNA) von *tra* und *dsx* in beiden Geschlechtern identisch sind und erst ein sich anschließender alternativer Spleißprozeß geschlechtsspezifische Transkripte zur Folge hat. Geschlechtsspezifische Transkripte können wie im Fall von *Sxl* und *tra* für eine funktionelle (aktive) und eine rudimentäre (inaktive) Proteinvariante kodieren oder wie im Fall von *dsx* für zwei alternative, aktive Proteinvarianten. Die Autoregulation des aktiven Transkripts erfolgt in *D. melanogaster* auf der Stufe von *Sxl*, in *M. domestica* und *C. capitata* auf der Stufe von *F* bzw. *Cetra*.

Das Beispiel der Diptera zeigt, dass sich bereits zwischen nahe verwandten Arten der für die Geschlechtsbestimmung verantwortliche molekulare Mechanismus und die oberen Bestandteile der Geschlechtsbestimmungskaskade grundlegend unterscheiden können. Dieser Befund weist zum einen auf eine gewisse Plastizität in der Steuerung geschlechtsbestimmender Regulationskaskaden hin, zum anderen zeigt er, dass diese Kaskaden vergleichsweise schnell evolvieren können.

## 1.8 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Die Honigbiene ist der bekannteste Vertreter mit komplementärer Geschlechtsbestimmung, die unabhängig von Geschlechtschromosomen erfolgt. Das initiale Signal der Geschlechtsbestimmung ist in dem heterozygoten Allelzustand am Geschlechtsbestimmungslokus (SDL) kodiert. Die genomische Sequenz des SDL ist noch nicht vollständig isoliert und die im SDL kodierten Gene erst teilweise identifiziert. Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die vollständige Isolierung der Genomsequenz des SDL und die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der in diesem Locus kodierten Gene. Diese Daten schaffen die Basis für künftige Studien zur molekularen Funktionsweise der komplementären Geschlechtsbestimmung.

Die geschlechtsbestimmende Funktion der identifizierten SDL-Gene wird durch embryonale RNA-Interferenz (RNAi) getestet. Der sexuelle Phänotyp der manipulierten Individuen wird durch Gonadenpräparation im Larven- und Puppenstadium bestimmt. Zur Klärung der Frage, ob diese Gene sowohl in den Soma- als auch in den Keimzellen eine geschlechtsbestimmende Funktion ausüben, werden zusätzlich die äußeren somatischen Geschlechtsmerkmale und die Keimzellen von manipulierten Individuen im Puppenstadium überprüft.

Das Modell der allelischen Komplementierung am SDL durch unterschiedliche funktionelle Allele wurde aufgestellt, ohne bislang unterschiedliche Transkripte in einer Kreuzung zu isolieren. Zur Unterstützung dieses Modells werden die in einer Kreuzung segregierenden Allele des SDL isoliert und deren Aminosäureidentität bestimmt.

Die Transkripte des Gens *complementary sex determiner* (*csd*) sind in beiden Geschlechtern der Honigbiene vorhanden und zeigen keine geschlechtsspezifischen Spleißvarianten. Da *csd* für ein Protein vom SR-Typ kodiert, könnte das oder die von *csd* kontrollierte(n) Gen(e) alternativ gespleißt werden. Um Einblicke in Regulation und Funktion der geschlechtsbestimmenden SDL-Gene zu gewinnen werden deren Transkriptions- und Expressionsmuster analysiert und mögliche Homologien zu anderen Genen der Insekten untersucht.

Aus den Erkenntnissen der Funktions-, Transkriptions- und Exoressionsanalysen wird ein weiterführendes Modell der geschlechtsbestimmenden Regulationskaskade von *Apis mellifera* erstellt. Die identifizierten Elemente werden mit den Geschlechtsbestimmungskaskaden anderer Insekten, insbesondere der gut untersuchten Kaskade von *Drosophila melanogaster*, verglichen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Stufe der molekularen Entscheidungsfindung und die Regulation und Funktion der *transformer*-orthologen Gene gelegt, die in allen bekannten Geschlechtsbestimmungskaskaden der Insekten auftreten. Abschließend wird die Evolutionsrate und das plastische Potential der *tra*-orthologen Gene diskutiert und zu einem Modell der Evolution geschlechtsbestimmender Kaskaden in Beziehung gesetzt.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Chemikalien und sonstige Materialien

Verbrauchskemikalien wurden in der Qualität ‘pro analysis’ hauptsächlich von folgenden Firmen bezogen: Becton Dickinson, Heidelberg; GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Sigma-Aldrich, Steinheim. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden hauptsächlich von folgenden Firmen bezogen: MBI Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Frankfurt/Main; Peqlab, Erlangen; Promega, Mannheim. Sämtliche Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit bidestilliertem H<sub>2</sub>O angesetzt und im Bedarfsfall autoklaviert oder sterilfiltriert.

#### Kitsysteme:

- Dynabeads<sup>TM</sup> mRNA Purification Kit, Dynal Biotech ASA, Oslo (Norwegen)
- RevertAid<sup>TM</sup> Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, MBI Fermentas, St. Leon-Rot
- FirstChoice<sup>TM</sup> RLM-RACE Kit, Ambion, Austin (USA)
- Qiagen Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden
- pGEM<sup>TM</sup>-T Vektor System, Promega, Mannheim
- GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich, Steinheim
- InsectSelect<sup>TM</sup> Expression System, Invitrogen, Karlsruhe
- Bac-to-Bac<sup>TM</sup> Baculovirus Expression System, Invitrogen, Karlsruhe
- ProBond<sup>TM</sup> Purification System, Invitrogen, Karlsruhe
- HiTrap NHS-activated HP, Amersham Biosciences, Freiburg
- ECL Western Blotting Analysis System, Amersham Biosciences, Freiburg

#### Fotoarbeiten und Bildverarbeitung:

- Fotolichtmikroskop: Zeiss Axiophot 2, Zeiss, Oberkochen
- Fotostereomikroskop: Zeiss Stemi 2000, Zeiss, Oberkochen  
Leica S8 APO, Leica, Bensheim
- Bildverarbeitung: Adobe Photoshop, Adobe Systems, San Jose, USA

### 2.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.1. Verwendete Bakterienstämme. Für detaillierte Angaben zu den Genotypen der verwendeten Bakterienstämme sei auf die Hersteller verwiesen, z.B. Invitrogen, Karlsruhe; Stratagene, Heidelberg.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Anmerkung
<i>E. coli</i> JM109	Standardwirt für diverse Plasmide	<i>recA</i> , <i>endA</i>
<i>E. coli</i> TOP10 <sup>TM</sup>	Standardwirt für diverse Plasmide	<i>recA</i> , <i>endA</i>
<i>E. coli</i> DH10Bac <sup>TM</sup>	Standardwirt für pFastBac <sup>TM</sup>	enthält Baculovirus Shuttle Vector (Bacmid) mit Kanamycin-Resistenz, <i>lacZ</i> und mini- <i>attTn7</i> ; und Helferplasmid mit Tetrazyklin-Resistenz

### 2.1.2 Vektoren

- pGEM<sup>TM</sup>-T: Vektor mit Ampicillin-Resistenz, SP6/T7 RNA Polymerase Promotoren, *lacZ*-Element und MCS mit 3'T-Überhang für Transformation von PCR-Produkten (Promega, Mannheim)
- pIZ/V5-His: Vektor mit Zeocin<sup>TM</sup>-Resistenz, OpIE2-Promoter, MCS, 6xHis-Epitop und V5-Epitop für Transformation von PCR-Produkten und anschließende Proteinexpression in Schmetterlingszellen (Invitrogen, Karlsruhe)
- pFastBac<sup>TM</sup>HT: Vektor mit Ampicillin- und Gentamycin-Resistenz, Polyhedrin-Promoter, MCS, 6xHis-Epitop und Tn7-Elementen für Transformation von PCR-Produkten in DH10Bac<sup>TM</sup>-Zellen und anschließende baculovirusinduzierte Proteinexpression in Schmetterlingszellen (Invitrogen, Karlsruhe)

### 2.1.3 Zellkultur

Im Labor wurden Zelllinien von Sf21-Zellen und High Five<sup>TM</sup>-Zellen der Firma Invitrogen, Karlsruhe, kultiviert. In beiden Fällen handelt es sich um aus pupalem Ovariengewebe des Eulenfalters *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) abgeleitete Zelllinien, die sich insbesondere zur Transfektion von Expressionsvektoren mit Baculovirus-Promoter eignen. Die Zellen wurden als adhärenente Kultur in serumfreiem Medium mit Gentamycin bei 27.5°C nach dem Standardprotokoll kultiviert.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen, PCR ('polymerase chain reaction'), Gelelektrophorese, DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung der 5'-Enden linearer DNA-Moleküle mit alkalischer Phosphatase (CIP), Ligation mit T4-DNA-Ligase sowie Herstellung und Transformation von elektro- und chemokompetenten Zellen sind in (Sambrook *et al.* 1989) beschrieben und werden hier nicht aufgeführt. Die Verwendung der angeführten Kitsysteme erfolgte unter Beachtung der Herstellerangaben. Mit Ausnahme der Oligonukleotide in den Kitsystemen erfolgten Synthese und HPLC-Aufreinigung aller in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide sowie sämtliche DNA-Sequenzierungen durch die Firma MWG-Biotech, Ebersberg.

### 2.2.1 DNA-Extraktion (nach Hunt & Page 1995)

- ethanolkonservierte Individuen 1-2 h wässern
- adulte ♂ in 200 (adulte ♀ in 150) µl CTAB-Lysispuffer + 2 µl Proteinase K lösen
- mit Pistill zermörsern (Lösung wird viskos) und 2-3 h bei 60°C inkubieren
- 250 (200) µl Phenol/Chloroform zugeben, 10x invertieren und 10 min zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- 250 (150) µl Chloroform zugeben, 10x invertieren und 2 min zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- Fällung der DNA: 1/10 Volumeneinheit (ca. 20 µl) 3 M Natriumacetat, pH 5.2, und 2 Volumeneinheiten (ca. 450 µl) eiskalten 100% Ethanol zugeben, 4-6x invertieren und 2-4 h bei -20°C inkubieren
- 25 min zentrifugieren, Überstand verwerfen und DNA-Pellet mit 70% Ethanol waschen
- 2 min zentrifugieren, Pellet trocknen und in 30-50 µl H<sub>2</sub>O resuspendieren

#### Lösungen:

CTAB-Lysispuffer	1% CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)
	50 mM Tris-HCl, pH 8.0
	10 mM EDTA
	750 mM NaCl

Proteinase K	1 mg/ml
Phenol/Chloroform	50:50, frisch gemischt oder bei -20°C gelagert Phenol muss pH > 7.5 aufweisen!

### 2.2.2 RNA-Extraktion (nach Marois 2000)

- schockgefrorene Individuen auf flüssigem Stickstoff mit Pistill zermörsern
- pro Embryo oder L3-Larve 50 µl Trizol zugeben, 1 min vortexen, 5 min bei RT inkubieren, 1 min vortexen
- pro Embryo/L3 10 µl Chloroform zugeben, 30 s sanft vortexen, 5 min bei RT inkubieren und 15 min zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen und in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- diesselbe Menge (ca. 20 µl je Embryo/L3) Isopropanol zugeben, 4-6x invertieren und 10 min bei RT inkubieren
- 10 min bei 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen und RNA-Pellet mit 70% Ethanol waschen
- 10 min bei 4°C zentrifugieren, Pellet trocknen und in 10 µl H<sub>2</sub>O oder DNase-Mastermix resuspendieren

#### Lösungen:

Trizol-Extraktionspuffer	0.8 M Guanidin-Thiocyanat 0.4 M Ammonium-Thiocyanat 0.1 M Natriumacetat, pH 5.0 5% Glycerin 38% Phenol
--------------------------	--

### 2.2.3 Isolierung der Genomsequenz des SDL

Bei der vollständigen genomischen Isolierung des Geschlechtsbestimmungslokus (SDL) wurden verschiedene Allele des Gens *complementary sex determiner (csd)* einer BLAST-Analyse (Altschul *et al.* 1990) gegen die WGS-Sequenzen ('whole genome shotgun') der Honigbiene ([www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee](http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee)) unterzogen und korrespondierende Sequenzen erneut geblastet. Die korrespondierenden Sequenzen wurden anhand überlappender Sequenz-

bereiche unter Verwendung der Software Staden Package (Staden *et al.* 2000) sukzessive zusammengesetzt. Putative Gene der SDL-Region wurden unter Verwendung einer Genprognose-Software ([www.hgmp.mrc.ac.uk](http://www.hgmp.mrc.ac.uk)) ermittelt, signifikante Sequenzen durch RT-PCR ('reverse transcriptase') aus RNA von mehreren weiblichen und männlichen Embryonen verifiziert und die Enden der Transkripte durch RACE ('rapid elongation of cDNA ends') in 5'- und 3'-Richtung unter Verwendung des angegebenen Kitsystems ergänzt. Basierend auf den Sequenzdaten von WGS-Montage, RT-PCR und 5'/3'-RACE wurde die genomische Sequenz der SDL-Region vollständig isoliert.

Mit Ausnahme von *csd* und seinem Schwestergen *transformer-like* (*tra-like*) werden die isolierten Gene auf dem SDL mit den ID-Nummern (Official\_Gene\_Set\_1) der TAMU-Datenbank (Texas A&M University, Houston) bezeichnet. Das von Beye *et al.* (2003) als *Ex4.8-5.8* bezeichnete Gen wird zu *GB30480*. Orthologe Gene bzw. Genabschnitte wurden anhand von TBLASTN-Analysen des putativen Proteins und TBLASTX-Analysen der Nukleotidsequenz gegen die nr-Datenbank unter Übernahme der Voreinstellungen und der Option 'all organisms' ermittelt ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). TBLASTN ('protein query versus translated database') und TBLASTX ('translated query versus translated database') vergleichen mit translatierten Nukleotid-Datenbanken, die alle putativen Leseraster umfassen (Altschul *et al.* 1997).

#### 2.2.4 Transkriptionsanalysen

In einigen Experimenten wurden Kreuzungen verwendet, die zu je 50% homo- und heterozygote Genotypen hervorbringen und in denen nur zwei Allele von *csd* segregieren. Zur Bestimmung des Genotyps der einzelnen Individuen wurde aus jedem Individuum die genomische DNA isoliert, die Exons 6-9 inklusive Introns unter Verwendung einer DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität ('proofreading') amplifiziert und das Fragment mit den Restriktionsendonukleasen ApoI und MboI getrennt restringiert. Homozygote Genotypen mit nur einem *csd*-Allel zeigen ein anderes Restriktionsmuster als heterozygote Genotypen mit zwei *csd*-Allelen. Zur Isolierung der Allele wurden mehrere heterozygote Kontrollen aus jeder Kreuzung gepoolt, die genomische DNA isoliert, die amplifizierten Exon 6-9-Fragmente in den Standardvektor pGEM<sup>TM</sup>-T ligiert und in *E. coli* JM109 transformiert. Die Fragmente in positiv transformierten Klonen wurden erneut amplifiziert und das jeweilige Allelfragment durch Restriktionsanalyse identifiziert. Im Anschluss wurde pro Allel aus mindestens drei

Klonen das Plasmid unter Verwendung des angegebenen Kitsystems isoliert und das Allelfragment doppelsträngig sequenziert.

Zur Isolierung des ORF (open reading frame, durchgehendes Leseraster) aller in einer Kreuzung segregierenden *tra-like*- und *csd*-Allele wurden 10 weibliche L3-Larven gepoolt und die RNA extrahiert; die Isolierung der mRNA und Umschreibung in cDNA erfolgte unter Verwendung der angegebenen Kitsysteme. Die cDNA wurde unter Verwendung einer DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität amplifiziert und die Fragmente in den Standardvektor pGEM<sup>TM</sup>-T kloniert. Die Fragmente in positiv transformierten Klonen wurden erneut amplifiziert und das jeweilige Allelfragment mit den Restriktionsendonukleasen ApoI, MboI und SspI getrennt restringiert, wobei Sequenzunterschiede zwischen verschiedenen Allelen durch unterschiedliche Restriktionsmuster abgebildet wurden. Plasmide mit unterschiedlichen Allelfragmenten wurden isoliert und das Allelfragment doppelsträngig sequenziert. Im Bedarfsfall wurde der ORF der isolierten Allelfragmente durch 5'/3'RACE vervollständigt und ebenfalls kloniert. Jedes Allel wurde aus den isolierten Allelfragmenten von mindestens sechs doppelsträngig sequenzierten cDNA-Klonen unter Verwendung der Software STADEN Package 1.6 assembliert.

Die Alignierung der isolierten *tra-like*- und *csd*-Sequenzen erfolgte unter Verwendung der Software ClustalX (Thompson *et al.* 1997) und wurde manuell unter Verwendung der Software BioEdit (Hall 1999) nachbearbeitet. Die Berechnung von Nukleotid- bzw. Aminosäureidentitäten erfolgte durch paarweise Distanzkalkulation anhand der Software MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2001) unter Verwendung der Kalkulationsmodi 'complete deletion of gaps' und 'No. of differences'. Die prozentuale Nukleotid- bzw. Aminosäureidentität wurde manuell unter Verwendung der Gesamtzahl an Positionen im Alignment berechnet, exklusive der Lückenpositionen ('gaps'). In einigen Fällen war die Berechnung von lückenintegrierten Nukleotid- bzw. Aminosäureidentitäten sinnvoll. Die Berechnung erfolgte manuell, wobei die Lücken im Alignment wie Aminosäurepositionen behandelt wurden. Die prozentuale lückenintegrierte Nukleotid- bzw. Aminosäureidentität wurde manuell unter Verwendung der Gesamtzahl an Positionen im Alignment berechnet, inklusive der Lückenpositionen.

Die physikalischen Eigenschaften, Domänen und Motive der vom putativen ORF abgeleiteten Proteine wurden unter Verwendung der Software PROSITE ([www.expasy.org/prosite](http://www.expasy.org/prosite)) prognostiziert.

### 2.2.4.1 Oligonukleotide

Tabelle 2.2. Oligonukleotide zur Transkriptionsanalyse von *tra-like* und *csd*.

Gen	5'-Oligonukleotid	3'-Oligonukleotid
<i>tra-like</i>	cons3CSD_fw TCATAAAAATGAAACGGAATACAAC	consCSD_rv RTCATCTCATWTTTCATTATTCAAT
	GenoRNAi_II CCAATTGCACAATGTAGAAGAAAAGCA	GenoRNAi_rv ATACTGTGACAGATTTTACATTTCTAT
<i>tra-like</i> <sup>F</sup> <i>tra-like</i> <sup>M</sup>	Race_typeII_fw1 (Exon 2) CGGAATACAACAAATCATTCCGC	Race_typeII_rv1 GGTGGAAAATTTCCCATAGTAAACA
	TypeII-W2 (Exon 3) CAACATCTGATGAACTTAAACGG	Race_typeII_rv2 CTATTTCTGTCTTCATGTCTTGAA
<i>csd</i>	consCSD_fw GGTGATTTATACATTTGCAGGT	consCSD_rv RTCATCTCATWTTTCATTATTCAAT
	cons2CSD_fw TCATAAAAATGAAACGAAATATATC	
	Int_csd_fw AAGAACGGGAGAAGGATCTAAG	Int_csd_rv CTCTAYTTCTATCTCTACTGCAAC
	GenoRNAi_Ib CAGACAATATGAAAAATTACACAATGA	GenoRNAi_rv ATACTGTGACAGATTTTACATTTCTAT
	spezIa_fw ACATCACGATGAGAAATTTAAAC	spezIa_rv TACGACGTATTCGTGAAATAGAA
	spezIb_fw GACGTATTCGTGAAATAGAAAA	spezIb_rv TAAATAAAAATGAAGAACATGATAC
	spezIc_fw CTCATGGTTTTCAACATACATCG	spezIc_rv AAGACCAATGGGACCTTGGA
	TypI_57A_fw AAATGAAGATAGCGAAATTGATTTG	
	TypI_57B_fw GAATGAAGATAACAAAATTGATCTC	
	TypI_84_fw TTCAAGAACAAAAGAAGAACGAT	
	TypI_98_fw AAGAACGATTACAACATAGACG	TypI_1342_rv AAATTCACACAATAAATAGGAAC
	TypI_105A_fw ATTACAACATAGACGTGAAGCA	TypI_1203_rv ATAATTATTATAATTATTATTATAAATTGTAA
	TypI_105B_fw ATTACAACATAGACGCGAAGCG	TypI_1089_rv CTCGATATTTTCGATAAGAATTC
	TypI_437_fw CAACTGTGGAAGTTAAACGAG	TypI_1068_rv TTCTTTTCATTTTTATATGACTTTTGT
	TypI_544_fw GTATTAACAAAATAAATAAATTGAAG	TypI_1050_rv CTTTTGTCTCGTTCTCTTGAACGG
	TypI_814_fw GAAAAATTACACAATGAAAAAGAAAAAC	TypI_814_rv GTTTTTCTTTTCATTGTGTAATTTTTC
	TypI_823_fw CACAAATGAAAAAGAAAACTTTTAG	TypI_823_rv TCTAAAAGTTTTCTTTTTCATTGTG
	SIQ30_82_fw AGAACGAGAGCAAAAAGTATG	SIQ30_495_rv TTGGTGGAAAATTCTAATAATG

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung embryonaler und larvaler Proteinlysate

Altersstandardisierte haploide und diploide Embryonen wurden in Pools zu je 50 Stück in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Altersstandardisierte haploide und diploide Larven wurden im Brutschrank bis zum L3-Stadium aufgezogen und einzeln schockgefroren. Je 50 Embryonen bzw. je eine L3-Larve wurden in 50 µl 2% SDS in 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 unter Verwendung eines Pistills vollständig gelöst. Dieses Primärlysat wurde vor der Auftrennung durch SDS-PAGE nochmals im Verhältnis 1:1 mit dem Lysispuffer gemischt, je 7.5 µl dieses Sekundärlysat mit 2.5 µl 4x SDS-PAGE-Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 40% Glycerin, 8% Mercaptoethanol, 8% SDS, Bromphenolblau) versetzt und auf 95°C erhitzt. Pro Geltasche wurden 10 µl dieser Mischung appliziert, was etwa 2 Embryonen entspricht.

Für SDS-PAGE und Western-Blotting wurde ein kombiniertes Gelelektrophorese-/Nassblotgerät der Firma GibcoBRL, Karlsruhe, gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Die Proteinlysate wurden in einem denaturierenden 10% Polyacrylamid-Gel mit 0.01% SDS aufgetrennt, auf Hybond<sup>TM</sup> ECL-Nitrozellulosemembran (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen und der Transfer durch eine Ponceau S-Färbung überprüft. Die Proteindetektion erfolgte mit der ECL-Methode ('enhanced chemiluminescence') auf BioMax<sup>TM</sup> Light Film (Eastman Kodak, Genf) unter Verwendung des angegebenen Kitsystems und der in Tabelle 2.3 aufgeführten Antikörper.

Tabelle 2.3. Verwendete Antikörper zur Proteindetektion in Honigbienen.

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Referenz
aTra-like (236-251)	polyklonaler Kaninchenantikörper	1:10000	Seqlab, Göttingen
aCsd (67-80)	polyklonaler Kaninchenantikörper	1:10000	Seqlab, Göttingen
aActin (20-33)	monoklonaler Kaninchenantikörper	1:10000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ziege-a-Kaninchen-HRP	polyklonaler Ziegenantikörper	1:10000	Merck-Calbiochem, Darmstadt

### 2.3.2 Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern

Gegen TRA-LIKE und CSD wurde je ein spezifischer Antikörper entworfen, dessen Antigen eine Oligopeptidsequenz von 16 bzw. 14 Aminosäuren ist. Zur Vermeidung unerwünschter

Kreuzreaktionen wurden Epitope ausgewählt, deren Aminosäuresequenzen eine möglichst hohe Divergenz zwischen TRA-LIKE und CSD aufweisen (Tab. 2.4). Im Falle von *tra-like* ist die Epitopsequenz in Exon 8 lokalisiert, wodurch nur die weibliche Spleißvariante des TRA-LIKE-Proteins detektiert werden kann; im Falle von *csd* liegt die Epitopsequenz in Exon 2, das in allen bekannten Spleißvarianten vorhanden ist.

Tabelle 2.4. Aminosäuredivergenz zwischen *tra-like*- und *csd*-Allelen im Bereich der Antikörper-Epitope. Zugrundegelegt ist das Alignment von Abbildung 3.15. Aminosäuren in rot geben die Epitopsequenz der Antikörper an. Grüne/gelbe/grau Boxen indizieren identische Aminosäuren in 4/3/2 von 4 Allelen. Werte in Klammern geben die Divergenz in Prozent an. Das Allel CSD<sup>Z</sup> weist eine Deletion in der Epitopsequenz auf.

Antikörper	Aminosäurealignment	Aminosäuredivergenz
aTra-like (236-251)	Position 236 251	
	SIQ88 TRA-LIKE YEDSRHEDRNSYRNDG	
	SIQ88 CSD X -----	16/16 (100)
	SIQ88 CSD Y -----	
	SIQ88 CSD Z -----	
aCsd (67-80)	Position 67 80	
	SIQ88 TRA-LIKE RRAREK-KL-SKRS	
	SIQ88 CSD X RRIRIEKLGERS	5/14 (35.7)
	SIQ88 CSD Y RRIRIEKLGERS	5/14 (35.7)
	SIQ88 CSD Z RRIRI--KLGERS	1/5 (20.0)
	Alignment ohne Lücken:	
	SIQ88 TRA-LIKE RRAREKKLSKRKSKS	
	SIQ88 CSD X RRIRIEKLGERS	9/14 (64.3)
	SIQ88 CSD Y RRIRIEKLGERS	9/14 (64.3)
	SIQ88 CSD Z RRIRIKLGERSKTK	1/5 (20.0)

Synthese der Oligopeptide (Antigene), Immunisierung von je zwei Kaninchen pro Antigen und Abnahme des mit den polyklonalen Antikörpern angereicherten Serums erfolgte durch die Firma SeqLab, Göttingen. Vor ihrer Anwendung im Western-Blotting wurden die Antikörper durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Zu diesem Zweck wurde das Antigen nach dem Standardprotokoll des Herstellers an eine NHS-aktivierte Sepharose<sup>TM</sup>-Matrix (Amersham Biosciences, Freiburg) gekoppelt und nach Durchfluss des Serums die kovalent an die Antigene gebundenen Antikörper in 2 M Glycin-HCl, pH 2.0, eluiert. Zur Feststellung möglicher Kreuzreaktionen wurde die Spezifität der Antikörper an rekombinant exprimierten TRA-LIKE und CSD-Fusionsproteinen im Western-Blotting überprüft.

### 2.3.3 Herstellung und Detektion von Fusionsproteinen

Zur Herstellung rekombinanter Fusionsproteine mit 6xHis-Epitop wurde cDNA des vollständigen ORFs verschiedener Allele von *tra-like* und *csd* unter Verwendung einer DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität amplifiziert, die Fragmente unter Berücksichtigung der Kozak-Sequenz und des Leserasters in die MCS ('multiple cloning site') der Expressionsvek-

toren pIZ/V5-His und pFastBac<sup>TM</sup>HT ligiert und zunächst in *E. coli* JM109 transformiert. In die MCS von pIZV5-His wurde zusätzlich der 720 bp umfassende ORF von EGFP (‘enhanced green fluorescent protein’) (Cormack *et al.* 1996) entweder allein oder an das 3’-Ende von *tra-like* bzw. *csd* ligiert. In die MCS von pFastBac<sup>TM</sup>HT wurde zusätzlich ein 33 bp umfassendes Fragment des HSV (Herpes simplex virus) an das 3’-Ende von *tra-like* bzw. *csd* ligiert. Die korrekte Orientierung des transformierten Fragments wurde durch unterschiedliche Restriktionsstellen an 5’- und 3’-Terminus sichergestellt oder, falls das nicht möglich war, nach der Transformation durch PCR überprüft. Bei korrekter Orientierung wurde das Plasmid isoliert und das transformierte Fragment durch doppelsträngige Sequenzierung überprüft.

Das isolierte pIZV5-His mit rekombinantem Fragment wurde nach dem Standardprotokoll des InsectSelect<sup>TM</sup> Expression Systems unter Verwendung eines liposomenbasierten Transfektionsreagens in High Five<sup>TM</sup>-Zellen transfiziert. Die Selektion von polyklonalen Zelllinien erfolgte durch Zugabe von 500 µg/ml Zeocin<sup>TM</sup> in das Nährmedium. Die Fluoreszenzdetektion rekombinanter EGFP-Fusionsproteine erfolgte an lebenden Zellen unter dem Lichtmikroskop unter Verwendung eines Ex485/Em515-Filtersets. Zur Herstellung eines einfachen Proteinlysats wurden die Zellen in der Expressionsphase pelletiert und in 2% SDS in 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 lysiert. Die Expression der rekombinanten Fusionsproteine mit V5-Epitop wurde durch SDS-PAGE, Western-Blotting und aV5-Antikörper nachgewiesen.

Das isolierte pFastBac<sup>TM</sup>HT mit rekombinantem Fragment wurde nach dem Standardprotokoll des Bac-to-Bac<sup>TM</sup> Baculovirus Expression System in *E. coli* DH10Bac<sup>TM</sup> transformiert und das Fragment in einen Baculovirus Shuttle Vektor (Bacmid) transponiert. Das isolierte Bacmid mit rekombinantem Fragment wurde unter Verwendung eines liposomenbasierten Transfektionsreagens in Sf21-Zellen transfiziert. Infizierte Zellen gaben die virale DNA nach etwa 3 Tagen in das Nährmedium ab. Der Titer der viralen DNA wurde durch die wiederholte Infektion von frischen Zellen amplifiziert. Zur Herstellung eines einfachen Proteinlysats wurden die Zellen etwa drei Tage nach der Infektion pelletiert und in 2% SDS in 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 lysiert. Die Expression der rekombinanten Fusionsproteine mit HSV-Epitop wurde durch SDS-PAGE, Western-Blotting und aHSV-Antikörper nachgewiesen.

#### **2.3.4 Isolierung von Fusionsproteinen vom SR-Typ**

Zur Isolierung von rekombinant exprimierten TRA-LIKE- und CSD-Fusionsproteinen mit 6xHis-Epitop aus Sf21- oder High Five<sup>TM</sup>-Zellen wurde das Protokoll des angegebenen ProBond<sup>TM</sup> Purification System (Invitrogen, Karlsruhe) in folgender Weise modifiziert:

- vor Zugabe der Harnstoffpuffer stets auf Eis oder im Klimaraum (4°C) arbeiten
- $4 \times 10^6$  transfizierte Zellen in der Expressionsphase aus Adhäsionskultur in Kulturmedium suspendieren und 15 min zentrifugieren (500 g)
- Zellpellet in 3 ml eiskalten Lysispuffer lösen, 5x 15 s sonifizieren (konstanter Modus) und 15 min ruhen lassen
- 30 min zentrifugieren, Überstand verwerfen und Pellet in 2 ml 10 M Harnstoffpuffer, pH 7.8, lösen (falls nötig, vortexen; resultierendes Probevolumen ~2.5 ml)
- 1 h bei RT auf rotierendem Rad inkubieren
- durch Zugabe von 500 µl 500 mM NaCl das gelöste Pellet in 8 M Harnstoffpuffer, pH 7.8, überführen (resultierendes Probevolumen ~3 ml)
- 500 µl ProBond<sup>TM</sup> Resin 2x mit je 1.5 ml frischen 8 M Harnstoffpuffer, pH 7.8, waschen und Probe zugeben (resultierendes Probevolumen ~3.5 ml)
- 2 h bei RT auf rotierendem Rad inkubieren
- je 2x waschen mit je 1.5 ml 8 M Harnstoffpuffer pH 7.8 bzw. pH 6.0 bzw. pH 5.3
- 800 µl Elutionspuffer, pH 4.0, zugeben, 15 min bei RT auf rotierendem Rad inkubieren und zentrifugieren
- 800 µl Überstand (1. Eluat) mit 40 µl Glycerin versetzen und bei -20°C lagern
- bei Bedarf die letzten beiden Schritte wiederholen und 2. Eluat ernten

Lösungen:

1. Lysispuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 1% Tween 20 1 mM PMSF
2. Lysispuffer	10 M Harnstoff 20 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 7.8 500 mM NaCl
Bindungs-/Waschpuffer	8 M Harnstoff 20 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 7.8 bzw. pH 6.0 bzw. pH 5.3 500 mM NaCl
Elutionspuffer	8 M Harnstoff 20 mM NaPO <sub>4</sub> , pH 4.0 500 mM NaCl

## 2.4 Bienenzucht und histologische Methoden

### 2.4.1 Jungfräuliche und einzelbesamte Königinnen

Jungfräuliche Königinnen ('virgin queens', VQ) legen ausschließlich unbefruchtete, haploide Eier, die hemizygot-männliche Genotypen darstellen. Mit Spermien eines nicht-verwandten Drohns artifiziell einzelbesamte Königinnen ('single-inseminated queens', SIQ) legen nahezu ausschließlich befruchtete, diploide Eier, die heterozygot-weibliche Genotypen darstellen. In Einzelfällen wurden einzelbesamte Königinnen eingesetzt, die ein Allel mit dem Samenspende teilen und zu je 50% heterozygot-weibliche und homozygot-männliche Genotypen hervorbringen. In diesem Fall erfolgte die Genotypisierung der verwendeten Embryonen a posteriori durch Restriktionsanalyse der *csd*-Allele. Heterozygote Genotypen mit zwei Allelen zeigen ein anderes Restriktionsmuster als homozygote Genotypen mit einem Allel.

Jungfräuliche und einzelbesamte Königinnen, die durch mehrfache CO<sub>2</sub>-Begasung zur Eiablage stimuliert worden sind, wurden von den Bieneninstituten Hohen-Neuendorf, Deutschland, und Dol, Tschechien, bezogen und einzeln in geeignete Bienenstöcke mit vorzugsweise jungen Arbeiterinnen integriert. Die Bienenstöcke wiesen ein von Karl Jenter (Nürtingen) patentiertes und von Omholt *et al.* modifiziertes Wabensystem auf, das die gleichzeitige und berührungsfreie Entnahme von bis zu 112 Eiern pro Wabe ermöglicht, wobei sich jedes Ei auf einer einzeln handhabbaren Einsteckzelle befindet (Omholt *et al.* 1995).

### 2.4.2 Künstliche Aufzucht von Honigbienen

Die postembryonale Ontogenese der Honigbiene ist in fünf Larvenstadien (L1-L5), Puppe und Imago unterteilt, die jeweils durch eine Häutung getrennt sind. Larven bis zur vierten Häutung (L4) werden Rundmaden genannt. Zwischen der vierten und der fünften Häutung streckt sich die Larve (Streckmade) und entwickelt sich zur Vorpuppe (L5). Die fünfte Häutung leitet zur Puppe (P) über, die nach der sechsten und letzten Häutung die Imago bildet.

Nach Entnahme der Eier aus dem Bienenstock erfolgte die Entwicklung der Embryonen, Larven und Puppen im Brutschrank bei 34.5°C. Zur Vermeidung von Schimmelpilzen wurden die Embryonen unter schwefelhaltiger Atmosphäre gehalten, die durch ca. 5 ml Schwefelsäure auf dem Boden der Zuchtgefäße erzeugt wurde. Im Falle der diploiden Embryonen wurde 16% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, im Falle der haploiden Embryonen 8% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verwendet. Diploide

und haploide Larven und Puppen wurden je nach Grad der vorhandenen Pilzsporenkontamination unter schwach schwefelhaltiger Atmosphäre (4% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) oder unter normaler Wasserdampf-atmosphäre gehalten. Die Zuchtgefäße wurden einmal täglich heiß ausgespült, getrocknet und frische Säure bzw. frisches Wasser hinzugefügt. Beim Manipulieren der Embryonen, Larven und Puppen außerhalb des Brutschranks wurde eine Infrarotlampe eingesetzt bzw. im Klimaraum (30°C) gearbeitet, um Temperaturschwankungen zu reduzieren und ein Auskühlen der Tiere zu vermeiden. Die Embryonen verblieben während der gesamten Embryogenese auf den Einsteckzellen und wurden erst kurz nach dem Schlupf der Larven auf vorgewärmten Futterbrei umgesetzt. Einmal täglich erfolgte die Umsetzung der Larven auf frischen, vorgewärmten Futterbrei. Kurz nach der Verpuppung wurden die Tiere auf Zellstoff gelegt, der nach Bedarf ausgetauscht wurde. Der Futterbrei enthält Glucose (3.6%), Fructose (3.6%), Hefeextrakt (1%) und flüssiges Gelee Royale (52%). Zur Herstellung werden die festen Bestandteile zermörsert, in Leitungswasser gelöst und das Gelee Royale hinzugefügt. Der aliquotierte Futterbrei wird bei -20°C, angebrochene Aliquots bei +4°C gelagert.

### **2.4.3 Morphologische und histologische Präparationen**

Die Präparation der Individuen zur Analyse der geschlechtlichen Differenzierung der Gonaden erfolgte in den meisten Fällen im L5-Stadium, in Einzelfällen auch im L4-Stadium. Die Individuen wurden entweder unmittelbar nach dem Abtöten präpariert oder bis zur Präparation in 70% Ethanol konserviert. Präparation und Fotodokumentation der Gonaden erfolgten unter dem Stereomikroskop. Die Präparation wurde in einer Wachsschale unter PBS durchgeführt, wobei das Tier mit einem dorsomedianen Schnitt eröffnet und die dorsolateral gelegenen Gonaden samt anhängiger Gonodukte freigelegt wurden. Zur besseren Unterscheidung der rein weißen Strukturen wurde der Situs mit 1% Orcein (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 45% (v/v) Essigsäure angefärbt.

Die Präparation der Individuen zur Analyse der geschlechtlichen Differenzierung des Somas und der Keimzellen erfolgte überwiegend nach der fünften Häutung (Puppe), vereinzelt auch nach der sechsten Häutung (Imago). Bei der Puppe wurden drei Stadien unterschieden: P1 (weiße Augen, weiße Kutikula), P2 (rote Augen, weiße Kutikula) und P3 (dunkle Augen, gebräunte Kutikula). Die Individuen wurden unmittelbar nach dem Abtöten präpariert; Präparation und Fotodokumentation der äußeren Morphologie und des Gonadenapparats erfolgten unter dem Stereomikroskop. Die isolierten Gonaden wurden in 3% Glutaraldehyd in 0.1 M

Natriumcacodylat, pH 7.2, fixiert. Einbettung, Schneiden und Fotodokumentation der fixierten Gonaden erfolgte durch Gerd Hause, Halle.

Die phänotypischen Analysen der Gonaden, somatischen Geschlechtsmerkmale und Keimzellen orientierten sich an Zander (1922), Snodgrass (1956) und Beye et al. (1994). Zur sicheren Definition weiblicher und männlicher Gonaden im L5-Stadium wurden einige Kriterien entwickelt, die in Tabelle 2.5 zusammengefasst sind.

Tabelle 2.5. Phänotypische Merkmale weiblicher und männlicher Gonaden im L5-Stadium. L5, Larve vor der 5. Häutung.

<b>Merkmal</b>	<b>Ovarien</b>	<b>Testes</b>
Größe der Gonade (maximale Ausdehnung)	< 1.5 mm	> 3 mm
Hüllmembran um Gonade	mit wenigen Tracheen	mit zahlreichen Tracheen
Bindegewebe zwischen rechter und linker Gonade	obligatorisch ab später L5 nur anterior	fakultativ ab später L5 nicht mehr vorhanden
Ovarioli/Testioli	Länge < 0.5 mm	Länge > 1.5 mm
	apikal nicht gebogen	apikal gebogen
	posterior konvergierend	median konvergierend
Ovidukt/Vas deferens	posterior inserierend	submedian inserierend
Ausführlbulbi der larvalen Gonodukte	separiert	median verschmolzen
	schlank	kräftig

## 2.5 Mikromanipulation von *A. mellifera*

### 2.5.1 RNA-Interferenz (RNAi)

Die Repression der SDL-Gene erfolgte über die RNA-Interferenz-Technik ('RNA interference', RNAi), für deren Anwendung in der Honigbiene bereits einige Daten vorliegen (Beye *et al.* 2002; Beye *et al.* 2003). RNAi ermöglicht es, ein Gen durch die Injektion der entsprechenden doppelsträngigen RNA (dsRNA aus Plus- und Minus-Strang) gezielt auszuschalten (Fire *et al.* 1998; Hannon 2002). Gegen jedes SDL-Gen wurde eine spezifische RNAi-Sonde aus dsRNA bzw. siRNA ('small interfering RNA') entwickelt (Tab. 2.6) und in weibliche und männliche Embryonen injiziert.

Tabelle 2.6. RNAi-Sonden gegen SDL-Gene und RNAi-Kontrollen. Im Fall der dsRNA-Sonden und dsRNA-Kontrolle sind die Oligonukleotide zur Generierung des dsRNA-Fragments angegeben, wobei die Sequenz des an die Oligonukleotide fusionierten T7-Promoters nicht ausgeführt ist. Im Fall der siRNA-Sonden und siRNA-Kontrollen (\*siRNA) ist die vollständige siRNA-Sequenz angegeben. dsRNA, doppelsträngige RNA. siRNA, small interfering RNA.

Gen	RNAi-Sonde	RNAi-Kontrolle
<i>GB11211</i>	GB11211_dsRNA ( T7 ) TTGAAATTGGAACGAATCGAG ( T7 ) TTGCTAAGACCTGTTGCTTC	Q-Marker_dsRNA ( T7 ) AGTGCAGCCAGCTACTGAGAG ( T7 ) AGTGCAGCCACGTGCCTGAAT
<i>GB13727</i>	GB13727_dsRNA ( T7 ) GCTGGCTTTGATGAAACACTT ( T7 ) GCAGTCATTAATGAACGAGATAC	Q-Marker_dsRNA ( T7 ) AGTGCAGCCAGCTACTGAGAG ( T7 ) AGTGCAGCCACGTGCCTGAAT
<i>tra-like</i>	tra-like_siRNA_1 GAUUCAAGACAUGAAGACA	tra-like_*siRNA UACAUAGAAGAGAGAUAC
	tra-like_siRNA_2 AUGGUUAGACCUUGGGUUC	–
<i>csd</i>	csd_siRNA_1 CGUAUUCGUGAAAUAGAAA	–
	csd_siRNA_2 CAAUGGGACCUUGGAUUUC	csd_*siRNA GUCAUCCGAGGUGUAUUC
<i>GB30480</i>	GB30480_dsRNA ( T7 ) GTTTGGTGA CTATGGAGAATAGT ( T7 ) CAAATACAAGAATAATACACGTTG	Q-Marker_dsRNA ( T7 ) AGTGCAGCCAGCTACTGAGAG ( T7 ) AGTGCAGCCACGTGCCTGAAT

Die dsRNA-Sonden und die dsRNA-Kontrolle wurden von Martin Hasselmann, Düsseldorf, hergestellt und umfassen 824 bp (*GB11211*), 335 bp (*GB13727*), 552 bp (*GB30480*) und ~650 bp (Q-Marker). Infolge der Notwendigkeit, *tra-like* und *csd* trotz zahlreicher konservierter Sequenzbereiche unabhängig voneinander zu reprimieren und gleichzeitig der Alleldiversität von *csd* Rechnung zu tragen, wurden im Falle dieser Gene siRNA-Sonden entwickelt. Die siRNA-Sonden und -Kontrollen umfassen jeweils 19 Nukleotide. Pro Gen wurden zwei siRNA-Sonden entwickelt, die jeweils im Verhältnis 1:1 gemischt und zusammen injiziert wur-

den. Pro Gen wurde außerdem unter Anwendung der Software ‘siRNA Sequence Scrambler’ ([www.genscript.com/tools.html](http://www.genscript.com/tools.html)) eine von einer siRNA-Sonde abgeleitete siRNA-Kontrolle (\*siRNA) entwickelt, beide siRNA-Kontrollen im Verhältnis 1:1 gemischt und zusammen injiziert. Synthese, HPLC-Aufreinigung und Annealing von sense- und antisense-Strang der siRNA-Sonden und siRNA-Kontrollen wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg, durchgeführt.

Da es nicht sinnvoll war, die Genotypen aller potentiell zum Einsatz kommenden Königinnen im Vorfeld zu bestimmen, wurden anhand eines Sequenzalignments, das alle bis dahin bekannten *csd*- und *tra-like*-Allele enthielt, vier Sequenzabschnitte, worin sich *tra-like* und *csd* durch Nukleotidaustausche und/oder Deletionen und/oder Insertionen unterscheiden und gleichzeitig die *csd*-Allele konserviert sind, als Zielsequenz für die siRNA-Sonden ausgewählt. Die Nukleotiddivergenz der Zielsequenzen von *tra-like* und *csd* ist in Tabelle 2.7 am Beispiel der Allele dargestellt, die in der F1-Generation der einzelbesamten Königin SIQ88 segregieren.

Tabelle 2.7. Nukleotiddivergenz zwischen *tra-like*- und *csd*-Allelen im Bereich der Zielsequenzen der siRNA-Sonden. Zugrundegelegt ist das Alignment von Abbildung 3.14. Nukleotide in rot geben die Zielsequenz der Sonde an. Grüne/gelbe/grau Boxen indizieren identische Nukleotide in 4/3/2 von 4 Allelen. Werte in Klammern geben die Divergenz in Prozent an. Das Allel *csd*<sup>Z</sup> weist eine Deletion in der Zielsequenz der Sonde *csd\_siRNA\_1* auf.

siRNA-Sonde	Nukleotidalignment	Nukleotiddivergenz
tra-like_siRNA_1	Position 727 745	
	SIQ88 <i>tra-like</i> GATTCAAGACATGAAGACA	19/19 (100)
	SIQ88 <i>csd</i> X -----	
	SIQ88 <i>csd</i> Y -----	
	SIQ88 <i>csd</i> Z -----	
tra-like_siRNA_2	Position 1204 1222	
	SIQ88 <i>tra-like</i> ATGTTAGACCTTGGTTTC	7/19 (36.8)
	SIQ88 <i>csd</i> X ATGGGA---CCTTGGATTTC	
	SIQ88 <i>csd</i> Y ATGGGA---CCTTGGATTTC	
	SIQ88 <i>csd</i> Z ATGGGA---CCTTGGATTTC	
	Alignment ohne Lücken:	
	SIQ88 <i>tra-like</i> ATGTTAGACCTTGGTTTC	15/19 (78.9)
	SIQ88 <i>csd</i> X ATGGGACCTTGGATTTC	
	SIQ88 <i>csd</i> Y ATGGGACCTTGGATTTC	
	SIQ88 <i>csd</i> Z ATGGGACCTTGGATTTC	
	Alignment ohne Lücken, revers-komplementär:	
	SIQ88 <i>tra-like</i> GAACTCAAGGTTTAAACCAT	8/19 (42.1)
SIQ88 <i>csd</i> Z AAATCCAAGGTCCATTGG		
SIQ88 <i>csd</i> Y AAATCCAAGGTCCATTGG		
SIQ88 <i>csd</i> Z AAATCCAAGGTCCATTGG		
csd_siRNA_1	Position 202 220	
	SIQ88 <i>tra-like</i> CGTGCTCGTGAGAAA---A	7/19 (36.8)
	SIQ88 <i>csd</i> X CGTATTCGTGAAATAGAAA	7/19 (36.8)
	SIQ88 <i>csd</i> Y CGTATTCGTGAAATAGAAA	3/13 (23.1)
	SIQ88 <i>csd</i> Z CGTATTCGTGAA-----	
	Alignment ohne Lücken:	
	SIQ88 <i>tra-like</i> CGTGCTCGTGAGAAAAT	6/19 (31.6)
	SIQ88 <i>csd</i> X CGTATTCGTGAAATAGAAA	6/19 (31.6)
	SIQ88 <i>csd</i> Y CGTATTCGTGAAATAGAAA	3/13 (23.1)
	SIQ88 <i>csd</i> Z CGTATTCGTGAAATATAG	
	Alignment ohne Lücken, revers-komplementär:	
	SIQ88 <i>tra-like</i> TTTTCTCACGAGCCGTCG	12/19 (63.2)
SIQ88 <i>csd</i> X TTTCTATTTTCACGATACG	12/19 (63.2)	
SIQ88 <i>csd</i> Y TTTCTATTTTCACGATACG	9/13 (69.2)	
SIQ88 <i>csd</i> Z CLAATTTTTCACGATACG		
csd_siRNA_2	Position 1199 1223	
	SIQ88 <i>tra-like</i> CAATAATGGTTAGACCTTGGTTCC	10/25 (40.0)
	SIQ88 <i>csd</i> X CA---ATGGGA---CCTTGGATTTC	10/25 (40.0)
	SIQ88 <i>csd</i> Y CA---ATGGGA---CCTTGGATTTC	10/25 (40.0)
	SIQ88 <i>csd</i> Z CA---ATGGGA---CCTTGGATTTC	
	Alignment ohne Lücken:	
	SIQ88 <i>tra-like</i> CAATAATGGTTAGACCTTG	11/19 (57.9)
	SIQ88 <i>csd</i> X CAATGGGACCTTGGATTTC	11/19 (57.9)
	SIQ88 <i>csd</i> Y CAATGGGACCTTGGATTTC	11/19 (57.9)
	SIQ88 <i>csd</i> Z CAATGGGACCTTGGATTTC	
	Alignment ohne Lücken, revers-komplementär:	
	SIQ88 <i>tra-like</i> GGAACCCAAGGTCTAAACCA	7/19 (36.8)
SIQ88 <i>csd</i> X GAAATCCAAGGTCCATTGG	7/19 (36.8)	
SIQ88 <i>csd</i> Y GAAATCCAAGGTCCATTGG	7/19 (36.8)	
SIQ88 <i>csd</i> Z GAAATCCAAGGTCCATTGG		

## 2.5.2 Mikroinjektion

Die RNAi-Sonden und RNAi-Kontrollen wurden in weibliche und männliche Embryonen im Alter von 0-3 h injiziert; in diesem Zeitfenster liegt der Embryo als Prä-Blastula vor, deren syncytiale Struktur die Dispersion der injizierten dsRNA/siRNA begünstigt. Die Injektion der Embryonen erfolgte in feuchtwarmer Atmosphäre (Infrarotlampe bzw. 30°C-Klimaraum) unter dem Stereomikroskop. Die Glaskanüle war an einen Druckluftinjektionsapparat (Femto-Jet, Eppendorf, Hamburg) angeschlossen und wurde mittels eines Mikromanipulators (Singer Instruments, UK) manipuliert. Bei einem Innendurchmesser der Kanülenspitze von 0.5  $\mu\text{m}$ , einer Injektionszeit von 0.1 s und einem Injektionsdruck von 400 hPa betrug das Injektionsvolumen in allen Fällen 400 pl.

Die Stamm- und Injektionskonzentration der dsRNA-Sonden und dsRNA-Kontrolle betrug 3-5 pg/pl. In diploide Embryonen (weiblicher bzw. homozygot-männlicher Genotyp) wurden durchschnittlich 1600 pg je Embryo injiziert, in haploide Embryonen (hemizygot-männlicher Genotyp) durchschnittlich 1200 pg je Embryo. Die Stammkonzentration der siRNA-Sonden und siRNA-Kontrolle betrug 4 pg/pl. Die bei konstantem Injektionsvolumen effektive Injektionskonzentration der siRNA-Kombinationen wurde für weibliche und männliche Embryonen experimentell bestimmt (Tab. 2.8).

Tabelle 2.8. Übersicht über Molarität, Konzentration und Menge der siRNA-Sonden (weiß) und siRNA-Kontrolle (grau), die in embryonale weibliche und männliche Genotypen injiziert wurden. E, Embryo.

siRNA-Sonde/ siRNA-Kontrolle	Molarität	Konzentration		Menge		Genotyp	
	$\mu\text{M}$	fmol/pl	pg/pl	fmol/E	pg/E	weiblich	männlich
tra-like siRNA_1	9.375	0.009375	0.125	3.75	50	+	+
tra-like siRNA_2	18.75	0.01875	0.25	7.5	100	+	+
	37.5	0.0375	0.5	15	200	+	-
	75	0.075	1	30	400	+	-
	150	0.15	2	60	800	+	-
csd siRNA_1	9.375	0.009375	0.125	3.75	50	-	-
csd siRNA_2	18.75	0.01875	0.25	7.5	100	+	+
	37.5	0.0375	0.5	15	200	+	+
	75	0.075	1	30	400	+	-
	150	0.15	2	60	800	+	-
tra-like *siRNA	9.375	0.009375	0.125	3.75	50	-	-
csd *siRNA	18.75	0.01875	0.25	7.5	100	-	+
	37.5	0.0375	0.5	15	200	-	-
	75	0.075	1	30	400	+	+
	150	0.15	2	60	800	+	-

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung der Genomsequenz des Geschlechtsbestimmungslokus (SDL)

Weibliche Tiere sind heterozygot am SDL. Die Isolierung der genomischen Sequenz des SDL erfolgte im Zusammenhang mit der Kartierung des SDL anhand von Markern, die den SDL flankieren (Hasselmann & Beye 2006). Die Marker R und MKFHi-52 sind in 1000 Weibchen einer Kartierungspopulation heterozygot und liegen damit im SDL. Der Bereich zwischen diesen Markern umfasst inklusive Markerfragmente 36263 bp und wird im folgenden als Geschlechtsbestimmungslokus *sensu strictu* (SDL *s.s.*) bezeichnet (Abb. 3.1). Die Marker B und GF3FMHi sind in 5 bzw. 4 von 1000 Weibchen homozygot und damit nicht im SDL lokalisiert. Der Bereich zwischen B und R umfasst 4586 bp und ist potentieller SDL-Bereich; dasselbe gilt für den 7013 bp umfassenden Bereich zwischen MKFHi-52 und GF3FMHi. Der um die potentiellen SDL-Bereiche erweiterte SDL umfasst 47862 bp und wird im folgenden als Geschlechtsbestimmungslokus *sensu lato* (SDL *s.l.*) bezeichnet (Abb. 3.1).

##### 3.1.1 *csd* und *tra-like* sind paraloge Gene

Verschiedene bekannte Allele des Gens *complementary sex determiner* (*csd*) wurden einer BLAST-Analyse gegen die WGS-Sequenz ('whole genome shotgun') der Honigbiene unterworfen und die korrespondierenden Sequenzen anhand überlappender Bereiche zusammengesetzt (assembliert). Die assemblierte Sequenz wurde erneut gegen die WGS-Sequenz geblastet und die korrespondierenden Sequenzen in wiederholten Abfolgen von Montage und BLAST-Analyse sukzessive zusammengesetzt. Dabei wurde ein bisher als Allel von *csd* bewertetes Transkript knapp 12 kb distal von *csd* assembliert und damit als eigenständiges Gen identifiziert (Abb. 3.1). Infolge der hohen Ähnlichkeit zu *csd* (vgl. Abschnitt 3.3) stellt dieses Gen vermutlich ein Schwestergen von *csd* dar und wird im folgenden als *transformer-like* (*tra-like*) bezeichnet.



### 3.1.2 Der SDL von *A. mellifera* enthält fünf Gene

Die *tra-like*-Sequenz wurde einer BLAST-Analyse gegen die WGS-Sequenz unterworfen und die korrespondierenden Sequenzen in wiederholten Abfolgen von Montage und erneuter BLAST-Analyse sukzessive zusammengesetzt. Putative Gene der SDL-Region wurden unter Verwendung einer Genprognose-Software ermittelt, signifikante Sequenzen durch RT-PCR in weiblichen und männlichen Embryonen verifiziert und die Enden der Transkripte durch 5'/3'-RACE ergänzt. Basierend auf den Sequenzdaten von WGS-Montage, RT-PCR und 5'/3'-RACE wurde die genomische Sequenz der SDL-Region vollständig isoliert (Abb. 6.1).

Der SDL *s.s.* enthält neben *csd* und *tra-like* das Gen *GB13727*, das sich 1616 bp distal von *tra-like* auf dem Minus-Strang befindet (Abb. 3.1). Der SDL *s.l.* enthält neben *csd*, *tra-like* und *GB13727* zusätzlich die Gene *GB11211* am 5'-Ende und *GB30480* am 3'-Ende. Das Gen *GB13727* ist als einziges der fünf SDL-Gene auf dem Minus-Strang lokalisiert. Die Sequenz des vollständig isolierten SDL *s.l.* ist im Anhang aufgeführt.

#### 3.1.2.1 *GB11211*

Das 5'-Ende des Gens *GB11211* (Abb 3.2/A) wurde nicht vollständig isoliert. Die bekannte Sequenz umfasst auf genomischer Ebene 5121 bp und enthält vier Exons, die insgesamt 3345 bp aufweisen und einen Anteil von 65.3% an der genomischen Sequenz von *GB11211* haben. Die 3'UTR umfasst 566 bp. Der putative ORF ('open reading frame', durchgehendes Leseraster) von *GB11211* besteht aus 2778 bp bzw. 926 Aminosäuren und weist im vorderen Drittel eine 38 Aminosäuren umfassende asparaginreiche Region auf. In der TBLASTN-Analyse des putativen Proteins von *GB11211* zeigten die terminalen Bereiche signifikante Ähnlichkeit zu einem vorhergesagten Protein von *Tribolium castaneum* (N-Terminus:  $E=1.2^{-15}$ , C-Terminus  $E=5.1^{-19}$ ) und in schwächerer Ausprägung zu einem Protein von *Anopheles gambiae* (N-Terminus:  $E=2.9^{-6}$ ). Die TBLASTX-Analyse der Nukleotidsequenz von *GB11211* ergab keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen Proteinen als in der TBLASTN-Analyse. Die Funktion der Proteine mit signifikant ähnlichen Abschnitten zu *GB11211* ist nicht bekannt.

### 3.1.2.2 *GB13727*

Zwischen dem 3'-Ende von *GB11211* auf dem Plus-Strang und dem 3'-Ende von *GB13727* auf dem Minus-Strang liegen 357 bp. Das Gen *GB13727* (Abb. 3.2/B) umfasst auf genomischer Ebene 3559 bp und enthält neun Exons mit insgesamt 1288 bp. Der Exon-Anteil an der genomischen Sequenz von *GB13727* entspricht 36.2%. Die 5'UTR umfasst 295 bp, die 3'UTR wurde nicht isoliert. Der putative ORF von *GB13727* besteht aus 993 bp bzw. 331 Aminosäuren und weist keine Domänen auf. Die TBLASTN-Analyse des putativen Proteins von *GB13727* ergab eine signifikante Ähnlichkeit zu einem Protein von *D. melanogaster* ( $E=2.3^{-50}$ ), einem Protein von *A. gambiae* ( $E=2^{-40}$ ) und einem vorhergesagten Protein von *T. castaneum* ( $E=1.9^{-36}$ ). Die TBLASTX-Analyse der Nukleotidsequenz von *GB3727* ergab keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen Proteinen als in der TBLASTN-Analyse. Die Funktion der Proteine mit signifikant ähnlichen Abschnitten zu *GB13727* ist nicht bekannt.

### 3.1.2.3 *transformer-like (tra-like)*

Zwischen dem 5'-Ende von *GB13727* auf dem Minus-Strang und dem 5'-Ende von *tra-like* auf dem Plus-Strang liegen 1616 bp. Das Gen *transformer-like* (Abb. 3.2 C) umfasst auf genomischer Ebene 7543 bp. Die Analyse der Transkripte in weiblichen und männlichen Embryonen ergab geschlechtsspezifische Unterschiede (vgl. Abschnitt 3.3). Das männliche Transkript enthält zwölf Exons, die insgesamt 2836 bp aufweisen und einen Anteil von 37.6% an der genomischen Sequenz von *tra-like* haben. Die 5'UTR umfasst 133 bp, die 3'UTR 2190 bp. Der putative ORF von *tra-like*<sup>M</sup> besteht infolge eines Stop-Kodons in Exon 3 aus 510 bp bzw. 170 Aminosäuren, die eine N-terminale RS-Domäne aufweisen. Das weibliche Transkript enthält zehn Exons, die insgesamt 1533 bp aufweisen und einen Anteil von 20.3% an der genomischen Sequenz von *tra-like* haben. Die 5'UTR umfasst 133 bp, die 3'UTR 194 bp. Der putative ORF von *tra-like*<sup>F</sup> besteht aus 1203 bp bzw. 401 Aminosäuren, die zwei RS-Domänen und eine C-terminale prolinreiche Region aufweisen. Im Fall von *tra-like* ergaben weder die TBLASTN-Analyse des putativen Proteins noch die TBLASTX-Analyse der Nukleotidsequenz eine signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen anderer Organismen.

### 3.1.2.4 *complementary sex determiner (csd)*

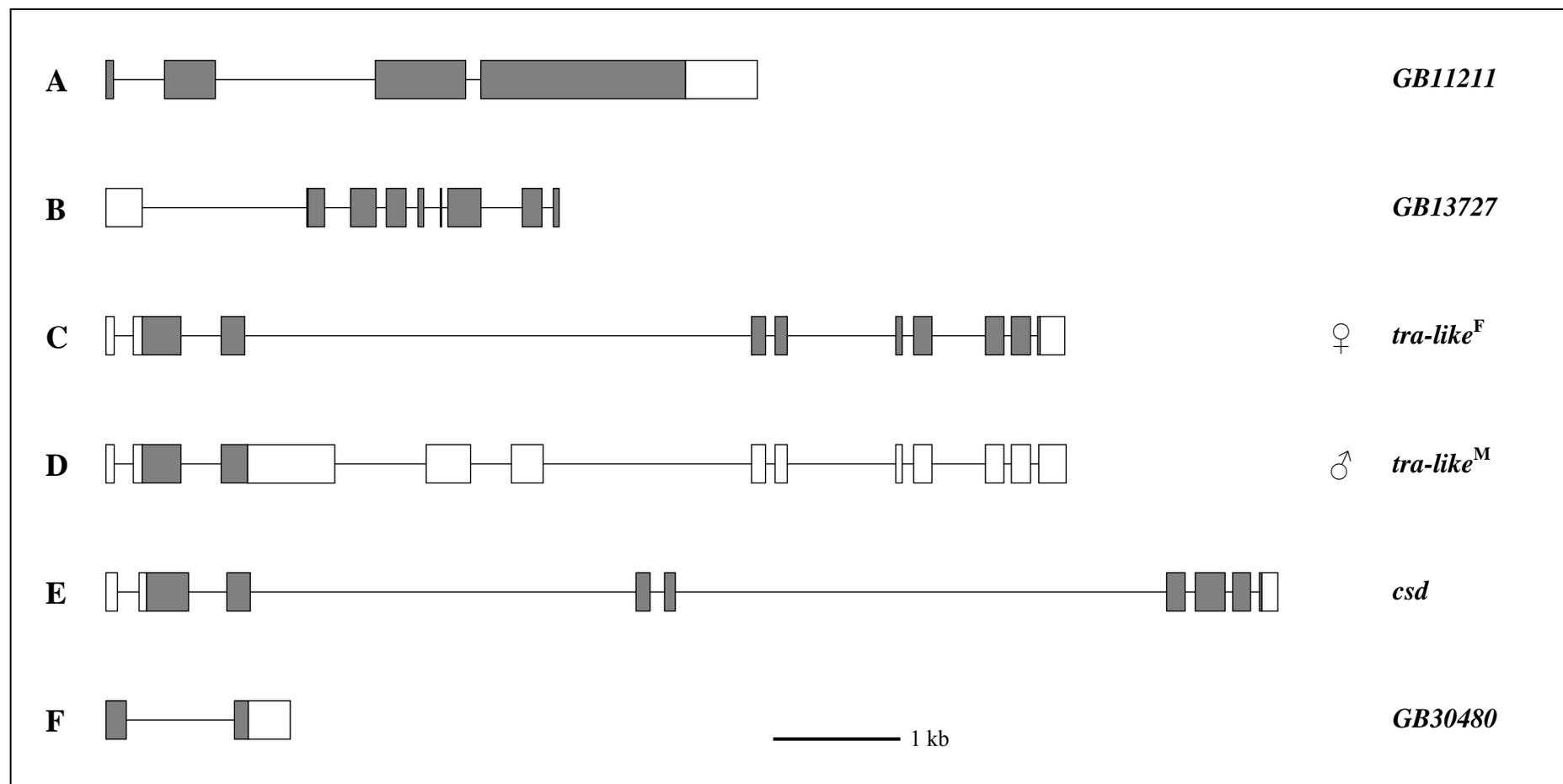
Zwischen dem 3'-Ende von *tra-like* und dem 5'-Ende von *csd* liegen 11929 bp, die zahlreiche repetitive Sequenzen aufweisen. Das Gen *complementary sex determiner* (Abb. 3.2/D) umfasst auf genomischer Ebene 9232 bp und enthält neun Exons mit insgesamt 1533 bp, was einem Anteil von 16.6% an der genomischen Sequenz von *csd* entspricht. Die Analyse der Transkripte in weiblichen und männlichen Embryonen ergab keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (vgl. Abschnitt 3.3). Die 5'UTR umfasst 150 bp, die 3'UTR 126 bp. Der putative ORF von *csd* besteht aus 1257 bp bzw. 419 Aminosäuren und ist damit um etwa 20 Aminosäuren länger als der putative ORF von *tra-like*<sup>F</sup>, was hauptsächlich auf die hypervariable Region (HVR) zurückzuführen ist. Neben der HVR, die in der Hauptsache aus einem repetitiven NY-Motiv besteht, weist das putative Protein von *csd* zwei RS-Domänen und eine C-terminale prolinreiche Region auf. Auch im Fall von *csd* ergaben weder die TBLASTN-Analyse des putativen Proteins noch die TBLASTX-Analyse der Nukleotidsequenz eine signifikante Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Organismen.

### 3.1.2.5 *GB30480*

Zwischen dem 3'-Ende von *csd* und dem 5'-Ende von *GB30480* liegen 4229 bp. Das 5'-Ende des Gens *GB30480* (Abb 3.2/E) ist möglicherweise nicht vollständig isoliert. Die bekannte Sequenz umfasst auf genomischer Ebene 1447 bp und enthält 2 Exons, die insgesamt 599 bp umfassen und einen Anteil von 41.4% an der genomischen Sequenz von *GB30480* haben. Die 5'UTR wurde nicht isoliert, die 3'UTR umfasst 330 bp. Der putative ORF besteht aus 269 bp bzw. 89 Aminosäuren und weist keine Domänen auf. Im Fall von *GB30480* ergaben weder die TBLASTN-Analyse des putativen Proteins noch die TBLASTX-Analyse der Nukleotidsequenz eine signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen anderer Organismen.

Abbildung 3.2. Genomische Organisation der SDL-Gene, schematische Darstellung. Die vollständigen Transkripte wurden durch eine Kombination aus RT-PCR und 5'/3'-RACE isoliert. Der 5'-Terminus befindet sich in allen Darstellungen auf der linken Seite. Exone sind durch Boxen, Introne durch Linien dargestellt. Gefüllte Boxen repräsentieren kodierende Sequenzen, leere Boxen nicht-translatierte Regionen (UTR).

**A.** Das Gen *GB11211* besteht aus 4 Exonen und umfasst einen ORF von 2778 bp. Das 5'-Ende wurde nicht vollständig isoliert. **B.** Das Gen *GB13727* besteht aus 9 Exonen und umfasst einen ORF von 993 bp. Die 3'UTR wurde nicht isoliert. **C.** Die weibliche Spleißvariante des Gens *transformer-like (tra-like)* besteht aus 10 Exonen und umfasst einen ORF von 1206 bp. **D.** Die männliche Spleißvariante von *tra-like* tritt als mutmaßliche default-Spleißvariante auch in weiblichen Genotypen auf und besteht aus 12 Exonen. Der ORF umfasst infolge eines Stop-Kodons in Exon 3 nur 510 bp. **E.** Das Gen *complementary sex determiner (csd)* besteht aus 9 Exonen und umfasst einen ORF von 1257 bp. **F.** Das Gen *GB30480* besteht aus 2 Exonen und umfasst einen ORF von 269 bp. Das 5'-Ende wurde nicht vollständig isoliert. ORF, open reading frame (durchgehendes Leseraster).



### 3.2 Repression der SDL-Gene durch RNA-Interferenz (RNAi)

Die potentiell geschlechtsbestimmende Funktion der SDL-Gene wurde durch die embryonale Repression ihrer Transkripte durch RNA-Interferenz (RNAi) überprüft. Gegen jedes Gen in der SDL-Region wurde eine spezifische dsRNA- bzw. siRNA-Sonde entwickelt und in weibliche und männliche Embryonen injiziert. Effekte infolge der künstlichen Aufzucht der Embryonen wurden anhand nicht-injizierter weiblicher und männlicher Embryonen kontrolliert. Effekte der dsRNA-Sonden wurden durch die Injektion einer dsRNA-Kontrolle gegen den Q-Marker, der keine Exonsequenz darstellt, überprüft. Effekte der siRNA-Sonden wurden durch die Injektion von siRNA-Kontrollen getestet, deren Sequenzen gegenüber den siRNA-Sonden zufällig vertauscht wurden und nicht funktionell sind. Zur Abschätzung der Effekte von künstlicher Aufzucht und Injektion wurden Schlupf- und Überlebensraten nicht-injizierter und injizierter weiblicher und männlicher Genotypen bestimmt.

Als Schlupfrate wurde der prozentuale Anteil der Embryonen, die das L1-Stadium (Larve vor der ersten Häutung) erreichen, definiert. Überlebensrate A bezeichnet den prozentualen Anteil der Embryonen, die das L2-Stadium (Larve vor der zweiten Häutung) erreichen. Überlebensrate B bestimmt den prozentualen Anteil der Embryonen, die mindestens das L5-Stadium (Larve vor der fünften Häutung, Vorpuppe) erreichen. Die Schlupfrate der injizierten weiblichen Embryonen war mit 45.7% gegenüber den nicht-injizierten Embryonen mit 82.5% um etwa die Hälfte reduziert. Die Schlupfrate der injizierten hemizygot-männlichen Embryonen war mit 26% gegenüber den nicht-injizierten Embryonen mit 52.3% ebenfalls um etwa die Hälfte reduziert (Tab. 3.1 und Abb. 6.2, Schlupfrate). Diese Tendenz setzt sich in den Überlebensraten fort. Die Überlebensrate A (B) der injizierten weiblichen Embryonen war mit 34% (27.5%) gegenüber den nicht-injizierten Embryonen mit 79.6% (47.4%) um gut (knapp) die Hälfte reduziert. Die Überlebensrate A (B) der injizierten hemizygot-männlichen Embryonen war mit 18.8% (6.6%) gegenüber den nicht-injizierten Embryonen mit 38.6% (15.9%) ebenfalls um gut die Hälfte reduziert (Tab. 3.1 und Abb. 6.2, Überlebensrate A und B).

Im Falle der siRNA wurden 50 bis 800 pg/Embryo injiziert. Generell verringerte sich mit zunehmender Menge injizierter siRNA in beiden Geschlechtern sowohl die Schlupf- als auch die Überlebensrate (Tab. 3.1 und Abb. 6.3). Die Injektion von mehr als 50 pg/Embryo der *tra-like* siRNA-Sonden verursachte im Vergleich zu anderen siRNA-Sonden und siRNA-Kontrollen in beiden Geschlechtern eine deutlich reduzierte Schlupf- und Überlebensrate. Die Ursache dieser vergleichsweise starken und nicht geschlechtsspezifischen Effekte der *tra-like* siRNA-Sonden wurde nicht ermittelt. Denkbar wäre ein spezifischer Effekt auf *tra-like*, der

lethal ist. In diesem Fall hätte *tra-like* eine vitale Funktion in der Ontogenese des Embryos. Alternativ könnte es sich um einen unspezifischen Effekt handeln, der neben *tra-like* andere Gene beeinflusst und möglicherweise ein Apoptose-Programm initiiert.

Tabelle 3.1. Absolute Anzahl und Schlupf-/Überlebensraten weiblicher und hemizygot-männlicher Embryonen nach Injektion von RNAi-Sonden (weiß) bzw. RNAi-Kontrollen (grau), und von nicht-injizierten weiblichen und hemizygot-männlichen Embryonen (grau). Werte in Klammern geben die Schlupf- bzw. Überlebensraten in Prozent an. RNAi, RNA-Interferenz. E, Embryo. L1/L2/L5, Larve vor der 1./2./5. Häutung. P, Puppe.

Genotyp	RNAi-Sonde/ RNAi-Kontrolle/ Kontrolle	pg/E	E	L1 (Schlupfrate)	L2 (Überlebens- rate A)	L5-P (Überlebens- rate B)
weiblich	GB11211_dsRNA	1600	135	74 (54.8)	68 (50.4)	52 (38.5)
	GB13727_dsRNA	1600	226	61 (27.0)	46 (20.4)	38 (16.8)
	tra-like_siRNA_1	50	336	201 (59.8)	172 (51.2)	150 (44.6)
	tra-like_siRNA_2	100	209	107 (51.2)	52 (24.9)	37 (17.7)
		200	40	27 (67.5)	2 (5.0)	1 (2.5)
		400	76	36 (47.4)	4 (5.3)	4 (5.3)
		800	110	17 (15.5)	5 (4.5)	5 (4.5)
	csd_siRNA_1	100	116	76 (65.5)	65 (56.0)	52 (44.8)
	csd_siRNA_2	200	91	44 (48.4)	37 (40.7)	23 (25.3)
		400	118	74 (62.7)	64 (54.2)	59 (50.0)
		800	195	82 (42.1)	75 (38.5)	53 (27.2)
	GB30480_dsRNA	1600	206	44 (21.4)	36 (17.5)	31 (15.0)
	Q-Marker_dsRNA	1600	87	25 (28.7)	23 (26.4)	17 (19.5)
	tra-like_*siRNA	400	133	80 (60.2)	64 (48.1)	56 (42.1)
	csd_*siRNA	800	60	28 (46.7)	13 (21.7)	11 (18.3)
keine Injektion	–	675	557 (82.5)	537 (79.6)	320 (47.4)	
hemizygot- männlich	GB11211_dsRNA	1200	137	49 (35.8)	32 (23.4)	10 (7.3)
	GB13727_dsRNA	1200	126	25 (19.8)	24 (19.0)	9 (7.1)
	tra-like_siRNA_1	50	487	151 (31.0)	107 (22.0)	42 (8.6)
	tra-like_siRNA_2	100	413	67 (16.2)	31 (7.5)	6 (1.5)
	csd_siRNA_1	100	480	118 (24.6)	99 (20.6)	41 (8.5)
	csd_siRNA_2	200	62	6 (9.7)	6 (9.7)	0 (0)
	GB30480_dsRNA	1200	121	39 (32.2)	33 (27.3)	12 (9.9)
	tra-like_*siRNA	100	148	52 (35.1)	35 (23.6)	11 (7.4)
	csd_*siRNA	400	361	99 (27.4)	73 (20.2)	22 (6.1)
	keine Injektion	–	44	23 (52.3)	17 (38.6)	7 (15.9)

### 3.2.1 *tra-like* und *csd* sind für die weibliche Differenzierung der Gonaden essentiell

Der Effekt der Repression der SDL-Gene durch RNA-Interferenz auf die geschlechtliche Differenzierung der weiblichen und männlichen Embryonen wurde zunächst anhand des sexuellen Phänotyps der Gonaden im L5-Stadium analysiert. Als Kontrolle für den weiblichen Phänotyp der Gonaden dienten nicht-injizierte weibliche L5-Larven, als Kontrolle für den männlichen Phänotyp der Gonaden dienten nicht-injizierte hemizygot-männliche und nicht-injizierte homozygot-männliche L5-Larven.

#### 3.2.1.1 Repression von *GB11211*

Die Repression von *GB11211* durch Injektion einer dsRNA-Sonde hatte in 52 weiblichen und 10 hemizygot-männlichen Embryonen keinen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden (Tab. 3.2). Die *GB11211*-reprimierten weiblichen Embryonen entwickelten Ovarien (Abb. 3.3/A), vergleichbar den nicht-injizierten weiblichen Embryonen (Abb. 3.6/C). Die *GB11211*-reprimierten hemizygot-männlichen Embryonen entwickelten Testes (Abb. 3.3/D), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Embryonen (Abb. 3.6/E).

#### 3.2.1.2 Repression von *GB13727*

Die Repression von *GB13727* durch Injektion einer dsRNA-Sonde hatte in 35 weiblichen und 9 hemizygot-männlichen Embryonen keinen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden (Tab. 3.2). Die *GB13727*-reprimierten weiblichen Embryonen entwickelten Ovarien (Abb. 3.3/B), vergleichbar den nicht-injizierten weiblichen Embryonen (Abb. 3.6/C). Die *GB13727*-reprimierten hemizygot-männlichen Embryonen entwickelten Testes (Abb. 3.3/E), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Embryonen (Abb. 3.6/E).

#### 3.2.1.3 Repression von *tra-like*

Die Repression von *tra-like* durch Injektion von zwei siRNA-Sonden hatte in 75.6% der weiblichen Embryonen eine eindeutig männliche Differenzierung der Gonaden zur Folge (Tab. 3.2). Die Gonaden der *tra-like*-reprimierten weiblichen L5-Larven wiesen alle in Tabelle 2.5 aufgelisteten phänotypischen Merkmale von Testes auf: Testioli und submedian inserie-

rende Vasa deferentia, die in kräftige, median verschmolzene Ausführbulbi münden (Abb. 3.4/A). Die Testioli füllten die Hüllmembran der Testes allerdings nicht vollständig aus und erschienen im Vergleich zu den nicht-injizierten homozygot-männlichen L5-Larven (Abb. 3.6/F) sowohl in der Anzahl reduziert als auch in der Länge verkürzt (Abb. 3.4/A'). In 24.4% der injizierten weiblichen Embryonen entwickelten sich Ovarien (Abb. 3.4/B-B'). Dieser relativ hohe Wert könnte sich auf die bereits erwähnten unspezifischen bzw. lethalen Effekte der *tra-like* siRNA-Sonden zurückführen lassen, in deren Folge bei Injektionen von 200-800 pg/Embryo bevorzugt diejenigen Individuen überleben, bei denen Injektion oder RNAi fehlgeschlagen ist. Die Injektion von nur 50 pg/Embryo könnte dagegen bereits eine verringerte Penetranz besitzen und dadurch gleichfalls ein überdurchschnittliches Fehlschlagen der RNAi erzeugen. Berücksichtigt man nur diejenigen weiblichen Embryonen, in die 100 pg/Embryo siRNA injiziert wurden, entwickelten sich in 96.3% der Embryonen Testes und in 3.7% der Embryonen Ovarien.

In 48 hemizygot-männlichen Embryonen hatte die Repression von *tra-like* durch Injektion von zwei siRNA-Sonden keinen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden (Tab. 3.2). Die *tra-like*-reprimierten hemizygot-männlichen Embryonen entwickelten Testes (Abb. 3.4/C), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Embryonen (Abb. 3.6/E).

#### **3.2.1.4 Repression von *csd***

Die Repression von *csd* durch Injektion von zwei siRNA-Sonden hatte in 99.4% der weiblichen Embryonen eine eindeutig männliche Differenzierung der Gonaden zur Folge (Tab. 3.2). Die Gonaden der *csd*-reprimierten weiblichen L5-Larven wiesen alle in Tabelle 2.5 aufgelisteten phänotypischen Merkmale von Testes auf: Testioli und submedian inserierenden Vasa deferentia, die in kräftige, median verschmolzene Ausführbulbi münden (Abb. 3.5/A-B). Die Testioli füllten die Hüllmembran der Testes nahezu vollständig aus und erschienen weder in der Anzahl reduziert noch in der Länge verkürzt (Abb. 3.5/A'-B'), vergleichbar den nicht-injizierten homozygot-männlichen L5-Larven (Abb. 3.6/F). In 0.6% der injizierten weiblichen Embryonen entwickelten sich Ovarien, was auf ein Fehlschlagen der Injektion oder der RNAi zurückzuführen sein dürfte.

In 41 hemizygot-männlichen Embryonen hatte die Repression von *csd* durch Injektion von zwei siRNA-Sonden keinen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden (Tab. 3.2). Die *csd*-reprimierten hemizygot-männlichen Embryonen entwickelten Testes

(Abb. 3.5/C), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Embryonen (Abb. 3.6/E).

### 3.2.1.5 Repression von *GB30480*

Die Repression von *GB30480* durch Injektion einer dsRNA-Sonde hatte in 26 weiblichen und 12 hemizygot-männlichen Embryonen keinen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden (Tab. 3.2). Die *GB30480*-reprimierten weiblichen Embryonen entwickelten Ovarien (Abb. 3.3/C), vergleichbar den nicht-injizierten weiblichen Embryonen (Abb. 3.6/C). Die *GB30480*-reprimierten hemizygot-männlichen Embryonen entwickelten Testes (Abb. 3.3/F), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Embryonen (Abb. 3.6/E).

### 3.2.1.6 Kontrollexperimente

Die Injektion einer dsRNA-Kontrolle hatte in 17 weiblichen Embryonen keinen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden (Tab. 3.2). Die mit einer dsRNA-Kontrolle injizierten weiblichen Embryonen entwickelten Ovarien (Abb. 3.6/A), vergleichbar den nicht-injizierten weiblichen Embryonen (Abb. 3.6/C). Auf die Injektion einer dsRNA-Kontrolle in hemizygot-männliche Embryonen wurde verzichtet.

Die Injektion von zwei siRNA-Kontrollen hatte in 63 weiblichen und 33 hemizygot-männlichen Embryonen keinen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden (Tab. 3.2). Die mit zwei siRNA-Kontrollen injizierten weiblichen Embryonen entwickelten Ovarien (Abb. 3.6/B), vergleichbar den nicht-injizierten weiblichen Embryonen (Abb. 3.6/C). Die mit zwei siRNA-Kontrollen injizierten hemizygot-männlichen Embryonen entwickelten Testes (Abb. 3.6/D), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Embryonen (Abb. 3.6/E).

Als nicht-injizierte Kontrolltiere dienten 52 weibliche, 25 homozygot-männliche und 7 hemizygot-männliche L5-Larven (Tab. 3.2). Die nicht-injizierten weiblichen Embryonen entwickelten Ovarien (Abb. 3.6/C), die nicht-injizierten männlichen Embryonen entwickelten Testes (Abb. 3.6/E-F). Die Testes der nicht-injizierten hemizygot-männlichen Larven (Abb. 3.6/E) erschienen mit ihren in mehreren Lagen gefalteten Testioli deutlich kräftiger als die Testes der nicht-injizierten homozygot-männlichen Larven (Abb. 3.6/F). Auch die mit RNAi-Sonden und RNAi-Kontrollen injizierten hemizygot-männlichen Embryonen entwickelten kompakte Testes mit mehrfach geschichteten Testioli (Abb. 3.3/D-F, 3.4/C, 3.5/C, 3.6/D).

Tabelle 3.2. Gonadenentwicklung in weiblichen und hemizygot-männlichen Embryonen nach Repression einzelner SDL-Gene durch RNA-Interferenz (RNAi). Die entsprechenden Kontrollen (nicht-injizierte Embryonen und Embryonen, in die dsRNA/siRNA-Kontrollen injiziert wurden) sind in grau unterlegten Zellen aufgeführt. Werte in Klammern geben den prozentualen Anteil der Individuen mit den jeweiligen Gonaden an. E, Embryo. L5, Larve vor der 5. Häutung.

Genotyp	Gen	RNAi-Sonde/ RNAi-Kontrolle/ Kontrolle	pg/E	L5	Ovarien	Testes
weiblich	<i>GB11211</i>	GB11211 dsRNA	1600	52	52 (100)	0 (0)
	<i>GB13727</i>	GB13727 dsRNA	1600	35	35 (100)	0 (0)
	<i>tra-like</i>	tra-like_siRNA_1 tra-like_siRNA_2	50	120	32 (26.7)	88 (73.3)
			100	27	1 (3.7)	26 (96.3)
			200	1	0 (0)	1 (100)
			400	4	2 (50.0)	2 (50.0)
			800	4	3 (75.0)	1 (25.0)
	<i>csd</i>	csd_siRNA_1 csd_siRNA_2	100	42	1 (2.4)	41 (97.6)
			200	12	0 (0)	12 (100)
			400	59	0 (0)	59 (100)
			800	52	0 (0)	52 (100)
	<i>GB30480</i>	GB30480 dsRNA	1600	26	26 (100)	0 (0)
	Kontrolle	Q-Marker dsRNA	1600	17	17 (100)	0 (0)
	Kontrolle	tra-like_*siRNA csd_*siRNA	400	52	52 (100)	0 (0)
800			11	11 (100)	0 (0)	
Kontrolle	keine Injektion	–	52	52 (100)	0 (0)	
homozygot-männlich	Kontrolle	keine Injektion	–	25	0 (0)	25 (100)
hemizygot-männlich	<i>GB11211</i>	GB11211 dsRNA	1200	10	0 (0)	10 (100)
	<i>GB13727</i>	GB13727 dsRNA	1200	9	0 (0)	9 (100)
	<i>tra-like</i>	tra-like_siRNA_1 tra-like_siRNA_2	50	42	0 (0)	42 (100)
			100	6	0 (0)	6 (100)
	<i>csd</i>	csd_siRNA_1 csd_siRNA_2	100	41	0 (0)	41 (100)
	<i>GB30480</i>	GB30480 dsRNA	1200	12	0 (0)	12 (100)
	Kontrolle	Q-Marker dsRNA	1200	0	0 (0)	0 (0)
	Kontrolle	tra-like_*siRNA csd_*siRNA	100	11	0 (0)	11 (100)
			400	22	0 (0)	22 (100)
Kontrolle	keine Injektion	–	7	0 (0)	7 (100)	

Die in der Gonadenanalyse erzielten Ergebnisse zeigen, dass die embryonale Repression der Transkripte von *tra-like* und *csd* die weibliche Differenzierung der Gonaden unterbindet. Die Transkripte von *tra-like* und *csd* sind für die weibliche Differenzierung der Gonaden essentiell und in der Embryogenese weiblicher Genotypen aktiv. Umgekehrt werden die embryonalen Transkripte von *tra-like* und *csd* für die männliche Differenzierung der Gonaden nicht benötigt. Die übrigen Gene des SDL scheinen im Embryonalstadium weder für die weibliche noch für die männliche Differenzierung der Gonaden von Bedeutung zu sein.

Abbildung 3.3. Effekt der embryonalen Repression von *GB11211*, *GB13727* und *GB30480* auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden. Pro Embryo wurden 1600/1200 (A-C/D-F) pg dsRNA injiziert. Die Gonaden wurden aus L5-Larven präpariert und mit Orcein angefärbt. Index des Individuums unten rechts. Balken = 1 mm. **A-C.** Ovarien von L5-Larven mit weiblichem Genotyp nach embryonaler Repression von *GB11211* (A), *GB13727* (B) und *GB30480* (C). Die Ovarien zeigen fadenförmige Ovarioli (vgl. Linienverlauf) und posterior inserierende Ovidukte (Pfeilköpfe), die in separierte, schlanke Ausführbulbi münden. **D-F.** Testes von L5-Larven mit hemizygot-männlichem Genotyp nach embryonaler Repression von *GB11211* (D), *GB13727* (E) und *GB30480* (F). Die Testes weisen fadenförmige Testioli (vgl. Linienverlauf) und submedian inserierende Vasa deferentia (Pfeilköpfe) auf, die in median verschmolzene, kräftige Ausführbulbi münden (nicht dargestellt).

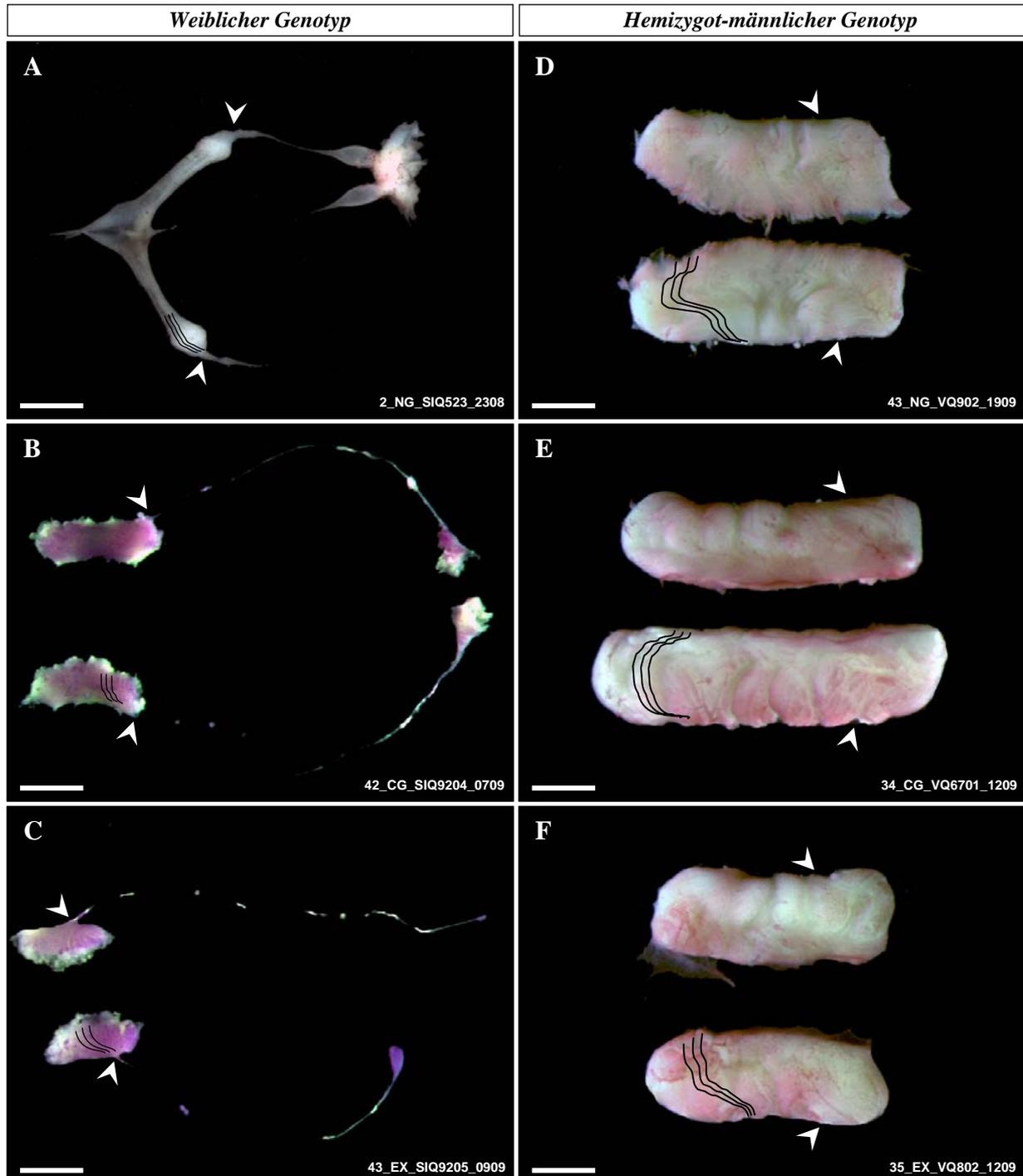


Abbildung 3.4. Effekt der embryonalen Repression von *tra-like* auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden. Pro Embryo wurden 100/400/50 (A/B/C) pg siRNA injiziert. Die Gonaden wurden aus L5-Larven präpariert und mit Orcein angefärbt. A'/B' zeigen die Gonaden von A/B mit entfernter Hüllmembran. Index des Individuums unten rechts. Balken = 1 mm.

**A.** Testes einer L5-Larve mit weiblichem Genotyp. Die Testes weisen fadenförmige Testioli (vgl. Linienverlauf) und submedian inserierende Vasa deferentia (Pfeilköpfe), die in median verschmolzene, kräftige Ausführbulbi münden. **B.** Ovarien einer L5-Larve mit weiblichem Genotyp. Die Ovarien zeigen fadenförmige Ovarioli (vgl. Linienverlauf) und posterior inserierende Ovidukte (Pfeilköpfe), die in separierte, schlanke Ausführbulbi münden. **C.** Testes einer L5-Larve mit hemizygot-männlichem Genotyp. Beschreibung vgl. A. Die Ausführbulbi der Vasa deferentia sind nicht dargestellt.

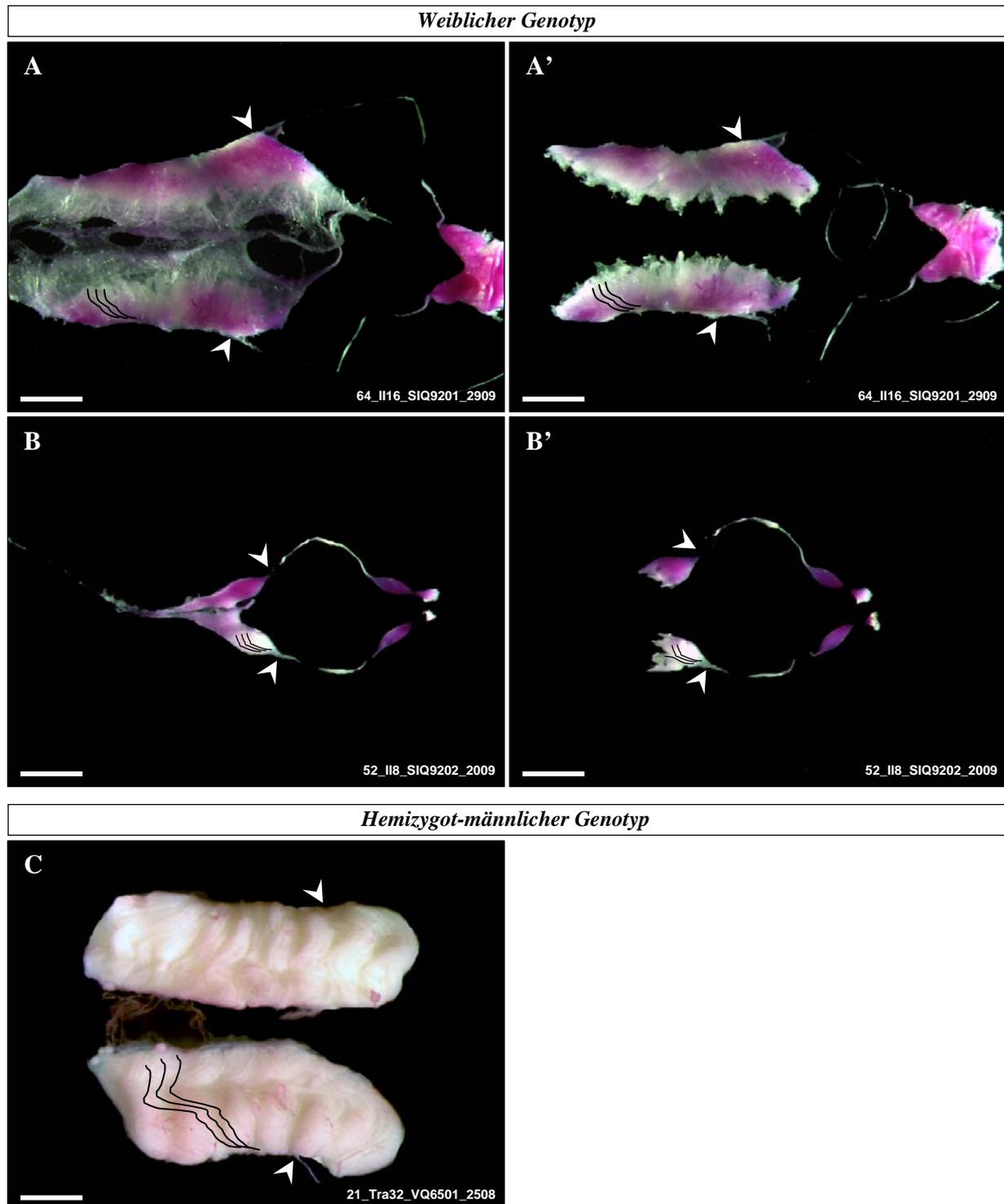


Abbildung 3.5. Effekt der embryonalen Repression von *csd* auf die geschlechtliche Differenzierung der Gonaden. Pro Embryo wurden 800/100 (A/B-C) pg siRNA injiziert. Die Gonaden wurden aus L5-Larven präpariert und mit Orcein angefärbt. A'/B' zeigen die Gonaden von A/B mit entfernter Hüllmembran. Index des Individuums unten rechts. Balken = 1 mm.

**A.** Testes einer L5-Larve mit weiblichem Genotyp. Die Testes weisen fadenförmige Testioli (vgl. Linienverlauf) und submedian inserierende Vasa deferentia (Pfeilköpfe), die in median verschmolzene, kräftige Ausführbulbi münden (nur in A' dargestellt). **B.** Testes einer L5-Larve mit weiblichem Genotyp. Beschreibung vgl. A. Die Ausführbulbi der Vasa deferentia sind nicht dargestellt. **C.** Testes einer L5-Larve mit hemizygot-männlichem Genotyp. Beschreibung vgl. A. Die Ausführbulbi der Vasa deferentia sind nicht dargestellt.

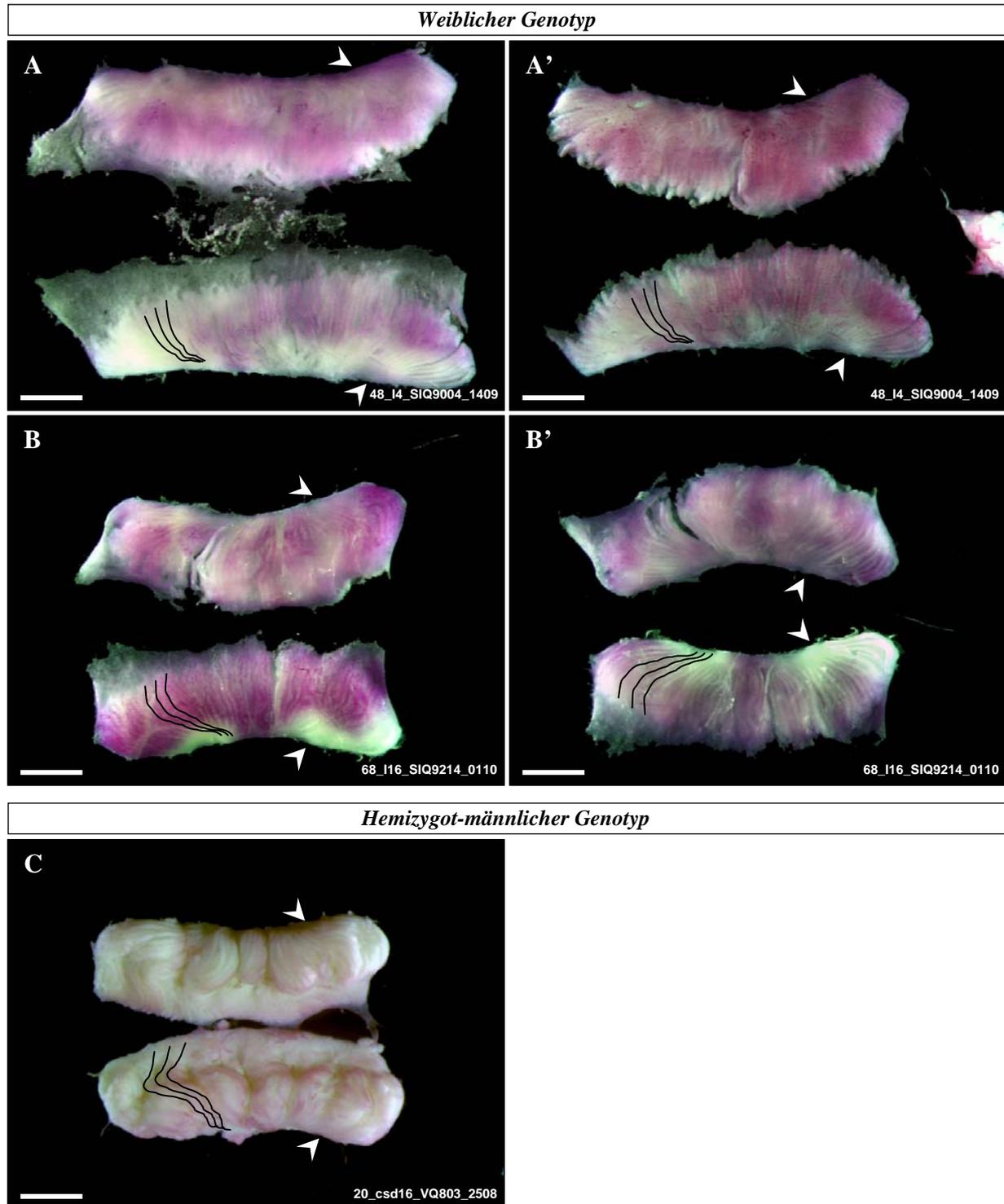
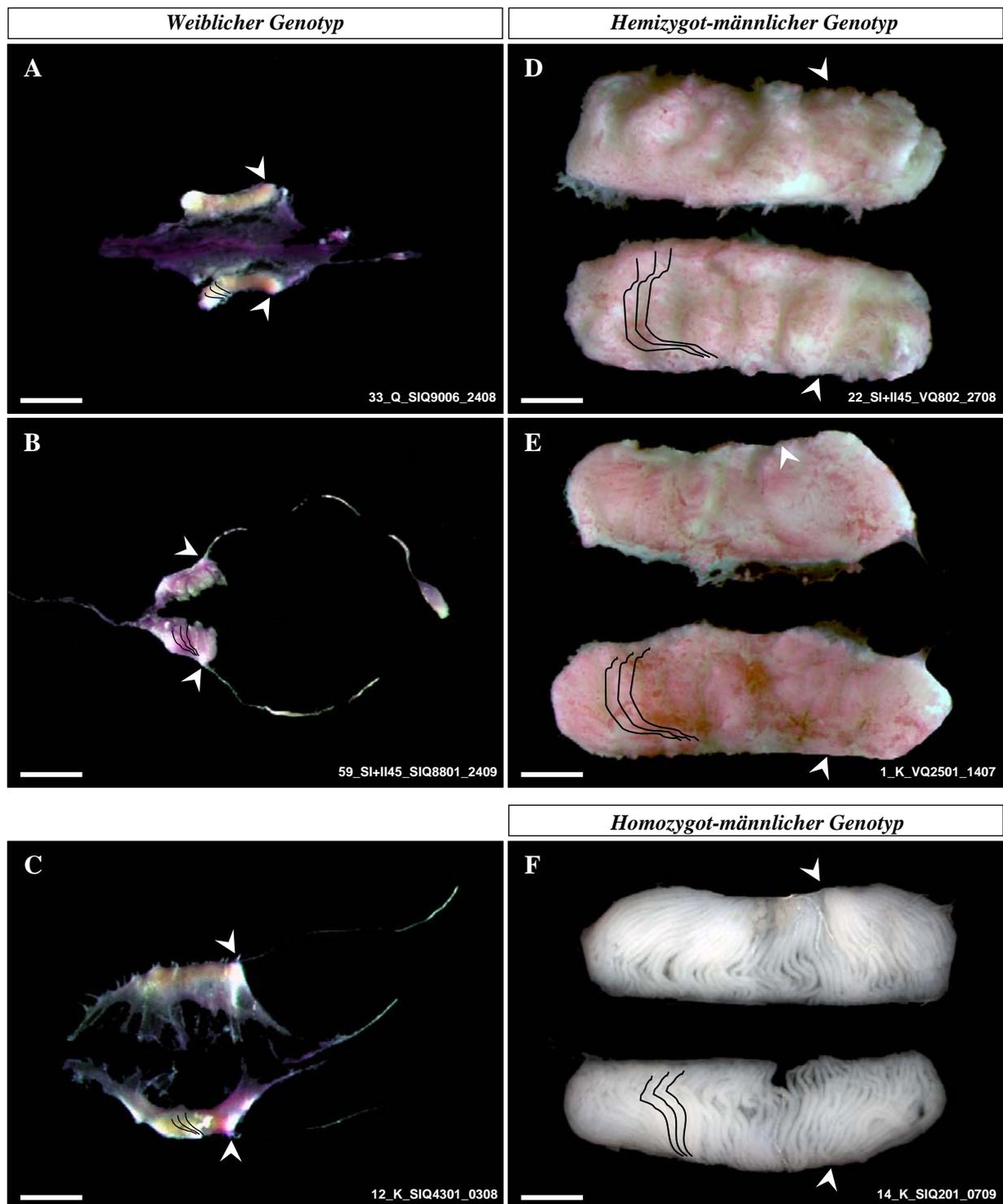


Abbildung 3.6. Geschlechtliche Differenzierung der Gonaden nach embryonaler Injektion von RNAi-Kontrollen und von nicht-injizierten Embryonen. Im Falle der RNAi-Kontrollen wurden pro Embryo 1600 pg dsRNA bzw. 400 pg siRNA injiziert. Die Gonaden wurden aus L5-Larven präpariert und mit Orcein angefärbt. Index des Individuums unten rechts. Balken = 1 mm.

**A-B.** Ovarien von L5-Larven mit weiblichem Genotyp nach embryonaler Injektion einer dsRNA-Kontrolle (A) und siRNA-Kontrolle (B). Die Ovarien zeigen fadenförmige Ovarioli (vgl. Linienverlauf) und posterior inserierende Ovidukte (Pfeilköpfe), die in separierte, schlanke Ausführbulbi münden (in A nicht dargestellt). **C.** Ovarien einer nicht-injizierten L5-Larve mit weiblichem Genotyp. Beschreibung vgl. A-B. Die Ausführbulbi der Ovidukte sind nicht dargestellt. **D.** Testes einer L5-Larve mit hemizygot-männlichem Genotyp nach embryonaler Injektion einer siRNA-Kontrolle. Die Testes weisen fadenförmige, mehrfach gewundene Testioli (vgl. Linienverlauf) und submedian inserierende Vasa deferentia (Pfeilköpfe) auf, die in median verschmolzene, kräftige Ausführbulbi münden (nicht dargestellt). **E-F.** Testes nicht-injizierter L5-Larven mit hemizygot-männlichem (E) und homozygot-männlichem (F) Genotyp. Beschreibung vgl. D.



### 3.2.2 *tra-like* und *csd* sind für die weibliche Differenzierung von Soma und Keimzellen essentiell

Das Gonadengewebe besteht aus Zellen der somatischen Zelllinie und der Keimbahn, deren Abkömmlinge die Keimzellen sind. Die vorhergehende Analyse belegt die Bedeutung von *tra-like* und *csd* für die weibliche Differenzierung der Gonaden, unterscheidet jedoch nicht zwischen den Zellen der somatischen Zelllinie und der Keimbahn. Die folgende Analyse nimmt diese Unterscheidung vor und soll klären, ob *tra-like* und *csd* die weibliche Differenzierung von Soma und Keimzellen verursachen. Zu diesem Zweck wurden die Transkripte von *tra-like* und *csd* durch RNA-Interferenz reprimiert und die geschlechtliche Differenzierung der weiblichen und männlichen Embryonen anhand des sexuellen Phänotyps von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen im Puppenstadium analysiert. Als Kontrolle für den weiblichen Phänotyp von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen dienten nicht-injizierte weibliche Puppen, als Kontrolle für den männlichen Phänotyp von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen dienten nicht-injizierte hemizygot-männliche und nicht-injizierte homozygot-männliche Puppen.

#### 3.2.2.1 Repression von *tra-like*

Die Repression von *tra-like* durch Injektion von zwei siRNA-Sonden bewirkte in 17 weiblichen Embryonen eine eindeutig männliche Differenzierung von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen (Tab. 3.3). Die *tra-like*-reprimierten weiblichen Puppen wiesen einen Kopf mit rundem Umriss, median angenäherten Komplexaugen und 13 Antennengliedern sowie eine 3. Extremität ohne Vorrichtungen für das Pollensammeln auf (Abb. 3.7/A-C), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.8/D-F). Der Gonadenapparat der *tra-like*-reprimierten weiblichen Puppen umfasste paarige Testes mit spiraligen Vasa deferentia, keulenförmige Glandulae mucosae (Schleimdrüsen) und einen unpaaren Ductus ejaculatorius (Spritzkanal) mit blasig erweitertem Begattungsbulbus (Abb. 3.9/A), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.10/D). Allerdings wiesen die Testes der *tra-like*-reprimierten weiblichen Puppen deutlich weniger und kürzere Testioli auf als die Testes der nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen. Die Testioli der *tra-like*-reprimierten weiblichen Puppen enthielten Spermatocyten, die in charakteristischen Spermatocysten organisiert waren und je nach Alter und Anzahl der erfolgten Mitosen eine kegelförmige, kugel-

förmige oder langgestreckte Gestalt zeigten (Abb. 3.9/B-C), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.10/E-F).

In 9 homozygot-männlichen Embryonen hatte die Repression von *tra-like* durch Injektion von zwei siRNA-Sonden keinen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen (Tab. 3.3). Die *tra-like*-reprimierten homozygot-männlichen Puppen wiesen einen Kopf mit rundem Umriss, median angenäherten Komplexaugen und 13 Antennengliedern sowie eine 3. Extremität ohne Vorrichtungen für das Pollensammeln auf (Abb. 3.7/D-F), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.8/D-F). Der Gonadenapparat der *tra-like*-reprimierten homozygot-männlichen Puppen umfasste paarige Testes mit spiraligen Vasa deferentii, keulenförmige Glandulae mucosae und einen unpaaren Ductus ejaculatorius mit blasig erweitertem Begattungsbulbus (Abb. 3.9/D), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.10/D). Die Testes der *tra-like*-reprimierten homozygot-männlichen Puppen erschienen einerseits kleiner als die Testes der nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen, andererseits aber deutlich größer als die Testes der *tra-like*-reprimierten weiblichen Puppen (Abb. 3.9/A). Die Testioli der *tra-like*-reprimierten homozygot-männlichen Puppen enthielten Spermatozyten, die in Spermatozysten organisiert waren und nach mehreren Mitosen eine langgestreckte Gestalt zeigten (Abb. 3.9/E-F), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.10/E-F).

### 3.2.2.2 Repression von *csd*

Die Repression von *csd* durch Injektion von zwei siRNA-Sonden bewirkte in 7 weiblichen Embryonen eine eindeutig männliche Differenzierung von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen (Tab. 3.3). Die *csd*-reprimierten weiblichen Puppen wiesen einen Kopf mit rundem Umriss, median angenäherten Komplexaugen und 13 Antennengliedern sowie eine 3. Extremität ohne Vorrichtungen für das Pollensammeln auf (Abb. 3.11/A-C), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.8/D-F). Der Gonadenapparat der *csd*-reprimierten weiblichen Puppen umfasste paarige Testes mit spiraligen Vasa deferentii, keulenförmige Glandulae mucosae und einen unpaaren Ductus ejaculatorius mit blasig erweitertem Begattungsbulbus (Abb. 3.12/A), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.10/D). Die Testes der *csd*-reprimierten weiblichen Puppen erschienen einerseits kleiner als die Testes der nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen, andererseits aber größer als die Testes der *tra-like*-reprimierten weiblichen Puppen (Abb. 3.9/A). Die Testioli der *csd*-reprimierten weiblichen Puppen zeigten in Spermatozysten gruppierte Sper-

matocyten, die je nach Alter und Anzahl der erfolgten Mitosen eine kugelförmige oder langgestreckte Gestalt zeigten (Abb. 3.12/B-D), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.10/E-F).

In 2 homozygot-männlichen Embryonen hatte die Repression von *csd* durch Injektion von zwei siRNA-Sonden keinen Einfluss auf die geschlechtliche Differenzierung von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen (Tab. 3.3). Die *csd*-reprimierten homozygot-männlichen Puppen wiesen einen Kopf mit rundem Umriss, median angenäherten Komplexaugen und 13 Antennengliedern sowie eine 3. Extremität ohne Vorrichtungen für das Pollensammeln auf (Abb. 3.11/D-F), vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.8/D-F). Der Gonadenapparat der *csd*-reprimierten homozygot-männlichen Puppen umfasste paarige Testes mit spiraligen Vasa deferentii, keulenförmige Glandulae mucosae und einen unpaaren Ductus ejaculatorius mit blasig erweitertem Begattungsbulbus, vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.10/D). Die Testioli der *csd*-reprimierten homozygot-männlichen Puppen enthielten Spermatoocyten, die in Spermatoocysten organisiert waren und nach einigen Mitosen eine langgestreckte Gestalt zeigten, vergleichbar den nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen (Abb. 3.10/E-F).

### 3.2.2.3 Kontrollexperimente

8 nicht-injizierte weibliche Embryonen entwickelten ein weibliches Soma, einen weiblichen Gonadenapparat und weibliche Keimzellen (Tab. 3.3). Die nicht-injizierten weiblichen Puppen besaßen einen Kopf mit dreieckigem Umriss, median isolierten Komplexaugen und 12 Antennengliedern sowie eine an das Pollensammeln adaptierte 3. Extremität mit Pollenkamm, Depstum (Pollenkneiter) und Corbiculum (Körbchen) an Tibia und 1. Tarsus (Abb. 3.8/A-C). Der Gonadenapparat der nicht-injizierten weiblichen Puppen umfasste paarige Ovarien mit je 3-4 Ovarioli, basalen Ovarialbecken, zylinderförmige Ovidukte und eine unpaare Vagina (Abb. 3.10/A). Die Ovarioli der nicht-injizierten weiblichen Puppen enthielten kugelige Keimzellen, die nicht in der Art von Spermatoocysten gruppiert und zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht in Ei- und Nährzellen differenziert waren (Abb. 3.10/B-C).

12 nicht-injizierte homozygot-männliche und 6 nicht-injizierte hemizygot-männliche Embryonen entwickelten ein männliches Soma, einen männlichen Gonadenapparat und männliche Keimzellen (Tab. 3.3). Die nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen besaßen einen Kopf mit rundem Umriss, median angenäherten Komplexaugen und 13 Antennengliedern sowie eine 3. Extremität ohne Vorrichtungen für das Pollensammeln (Abb. 3.8/D-F). Der Go-

nadenapparat der nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen umfasste paarige Testes mit spiraligen Vasa deferentii, keulenförmige Glandulae mucosae und einen unpaaren Ductus ejaculatorius mit blasig erweitertem Begattungsbulbus (Abb. 3.10/D). Die Testioli der nicht-injizierten hemizygot-männlichen Puppen enthielten Spermatocyten, die in Spermatocysten organisiert waren und nach vielfachen Mitosen eine langgestreckte Gestalt zeigten (Abb. 3.10/E-F).

Tabelle 3.3. Sexuelle Ausprägung ausgewählter somatischer Merkmale in weiblichen und männlichen Puppen nach embryonaler Repression von *tra-like* und *csd* durch RNA-Interferenz und in nicht-injizierten weiblichen und männlichen Puppen (grau). E, Embryo. P3, Puppe im 3. Puppenstadium.

Genotyp	Gen	RNAi-Sonde/ Kontrolle	pg/E	P3	Komplex- augen		Antennen- glieder		3. Extremität	
					♀	♂	♀	♂	♀	♂
weiblich	<i>tra-like</i>	tra-like_siRNA_1 tra-like_siRNA_2	50	17	0	17	0	17	0	17
	<i>csd</i>	csd_siRNA_1 csd_siRNA_2	100	7	0	7	0	7	0	7
	Kontrolle	keine Injektion	–	8	8	0	8	0	6	0
homozygot- männlich	<i>tra-like</i>	tra-like_siRNA_1 tra-like_siRNA_2	50	9	0	9	0	8	0	9
	<i>csd</i>	csd_siRNA_1 csd_siRNA_2	100	2	0	2	0	2	0	2
	Kontrolle	keine Injektion	–	12	0	12	0	12	0	12
hemizygot- männlich	Kontrolle	keine Injektion	–	6	0	6	0	6	0	6

Die in der Gonadenanalyse erzielten Ergebnisse zeigen, dass die embryonale Repression der Transkripte von *tra-like* und *csd* die weibliche Differenzierung von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen unterbindet. Die Transkripte von *tra-like* und *csd* sind für die weibliche Differenzierung von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen essentiell und in der Embryogenese weiblicher Genotypen aktiv. Umgekehrt werden die Transkripte von *tra-like* und *csd* im Embryonalstadium für die männliche Differenzierung von Soma, Gonadenapparat und Keimzellen nicht benötigt.

Abbildung 3.7. Effekt der embryonalen Repression von *tra-like* auf die geschlechtliche Differenzierung des Somas. Pro Embryo wurden 50 pg siRNA gegen *tra-like* injiziert. Die Merkmalsanalyse erfolgte im dritten Puppenstadium (P3). Index des Individuums unten rechts. Balken = 1 mm.

**A.** Männlich differenzierter Kopf einer Puppe mit weiblichem Genotyp. Der Kopf besitzt einen runden Umriss, median angenäherte Komplexaugen und Antennen aus 13 Segmenten (vgl. Linienverlauf). **B-C.** Männlich differenzierte 3. Extremität desselben Tieres, Ansicht von dorsal (B) und ventral (C). Tibia und 1. Tarsus weisen keine Vorrichtungen für das Pollensammeln auf. **D.** Männlich differenzierter Kopf einer Puppe mit homozygot-männlichem Genotyp. Beschreibung vgl. A. **E-F.** Männlich differenzierte 3. Extremität desselben Tieres, Ansicht von dorsal (E) und ventral (F). Beschreibung vgl. B-C.

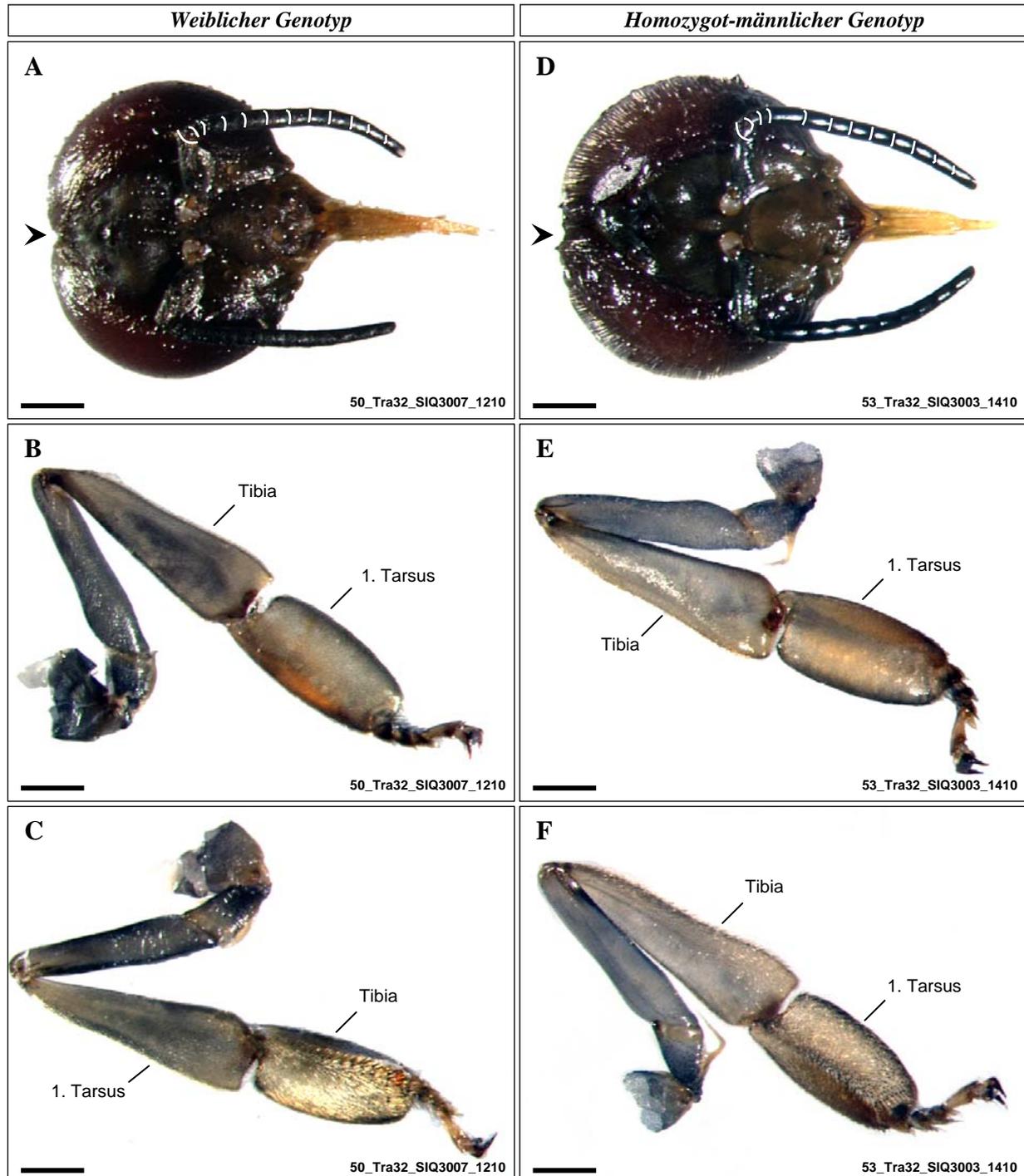


Abbildung 3.8. Geschlechtliche Differenzierung des Somas von nicht-injizierten Embryonen. Die Merkmalsanalyse erfolgte im dritten Puppenstadium (P3). Index des Individuums unten rechts. Balken = 1 mm.

**A.** Weiblich differenzierter Kopf einer Puppe mit weiblichem Genotyp. Der Kopf besitzt einen dreieckigen Umriss, median isolierte Komplexaugen (Pfeilspitzen) und Antennen aus 12 Segmenten (vgl. Linienverlauf). **B-C.** Weiblich differenzierte 3. Extremität desselben Tieres, Ansicht von dorsal (B) und ventral (C). Tibia und 1. Tarsus weisen Vorrichtungen für das Pollensammeln auf: Pollenkamm, Depstum und Corbiculum. **D.** Männlich differenzierter Kopf einer Puppe mit hemizygot-männlichem Genotyp. Der Kopf besitzt einen runden Umriss, median angenäherte Komplexaugen (Pfeilspitze) und Antennen aus 13 Segmenten (vgl. Linienverlauf). **E-F.** Männlich differenzierte 3. Extremität desselben Tieres, Ansicht von dorsal (E) und ventral (F). Tibia und 1. Tarsus weisen keine Vorrichtungen für das Pollensammeln auf.

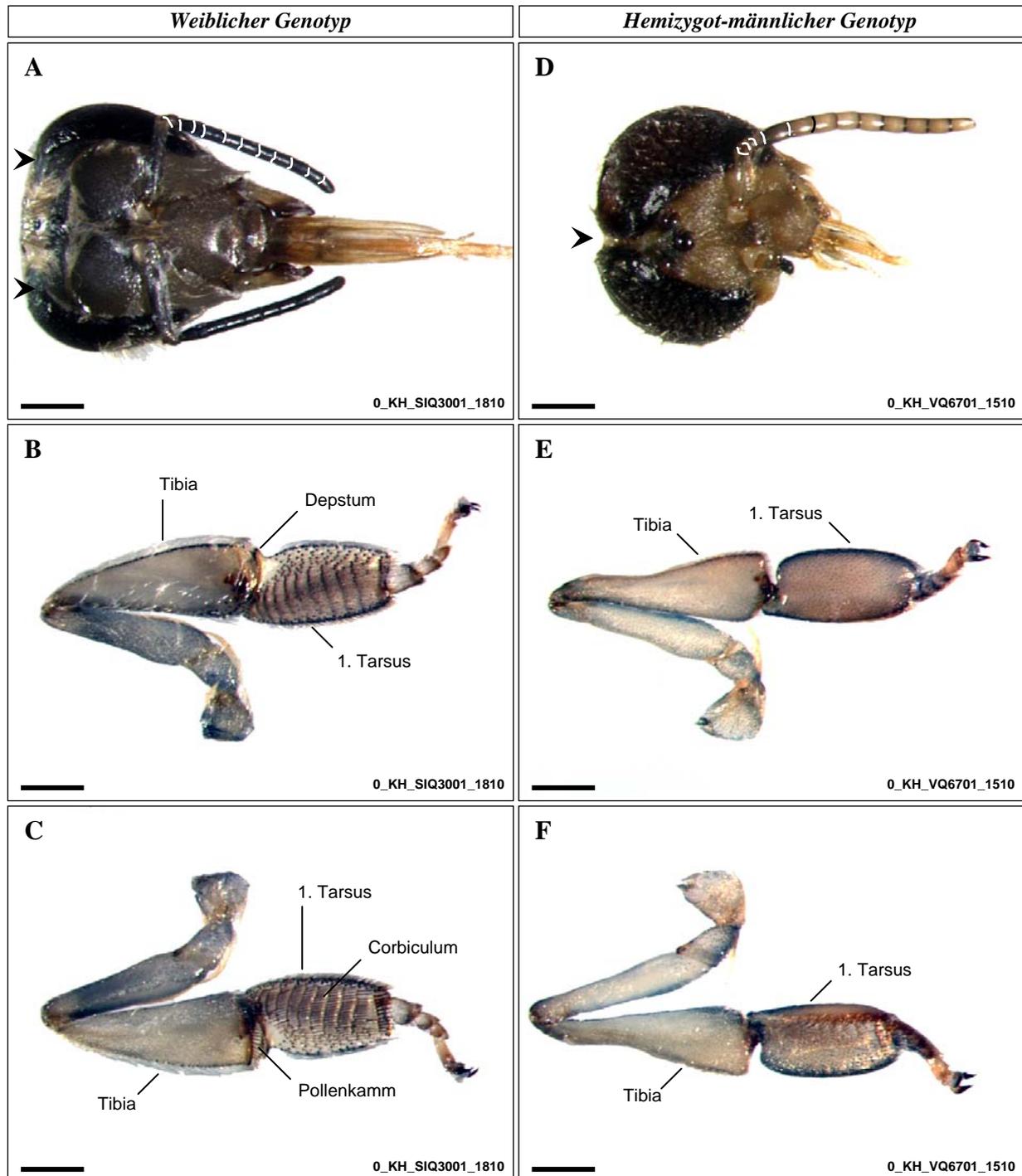


Abbildung 3.9. Effekt der embryonalen Repression von *tra-like* auf die geschlechtliche Differenzierung des Gonadenapparats und der Keimzellen. Pro Embryo wurden 50 pg siRNA gegen *tra-like* injiziert. Die Merkmalsanalyse erfolgte im dritten Puppenstadium (P3). Index des Individuums unten rechts. Weiße Balken = 1 mm. Schwarze Balken = 10  $\mu$ m.

**A.** Männlich differenzierter Gonadenapparat einer Puppe mit weiblichem Genotyp. Der Gonadenapparat weist paarige Testes mit fadenförmigen Testioli (vgl. Linienerlauf), spiralförmig gewundene Vasa deferentia, keulenförmige Glandulae mucosae und einen unpaaren Ductus ejaculatorius mit stark erweitertem Begattungsbulbus auf. **B-C.** Männlich differenzierte Keimzellen von Puppen mit weiblichem Genotyp. Ausgewählte Testioli sind schwarz, ausgewählte Spermatocysten punktiert umrandet. **B.** Querschnitt durch Testioli. Junge Spermatocyten (rot) besitzen eine kegelförmige Gestalt und sind rosettenartig um das Zentrum der Spermatocyste angeordnet. Ältere Spermatocyten kugeln sich ab (grün), bleiben jedoch im Verband der Spermatocyste. **C.** Querschnitt durch Testioli. Die in den Spermatocysten enthaltenen kugelförmigen Spermatocyten (grün) vervielfachen ihre Anzahl durch mitotische Teilungen. **D.** Männlich differenzierter Gonadenapparat einer Puppe mit homozygot-männlichem Genotyp. Beschreibung vgl. A. **E-F.** Männlich differenzierte Keimzellen von Puppen mit homozygot-männlichem Genotyp. Querschnitt durch Testioli. Beschreibung vgl. B-C.

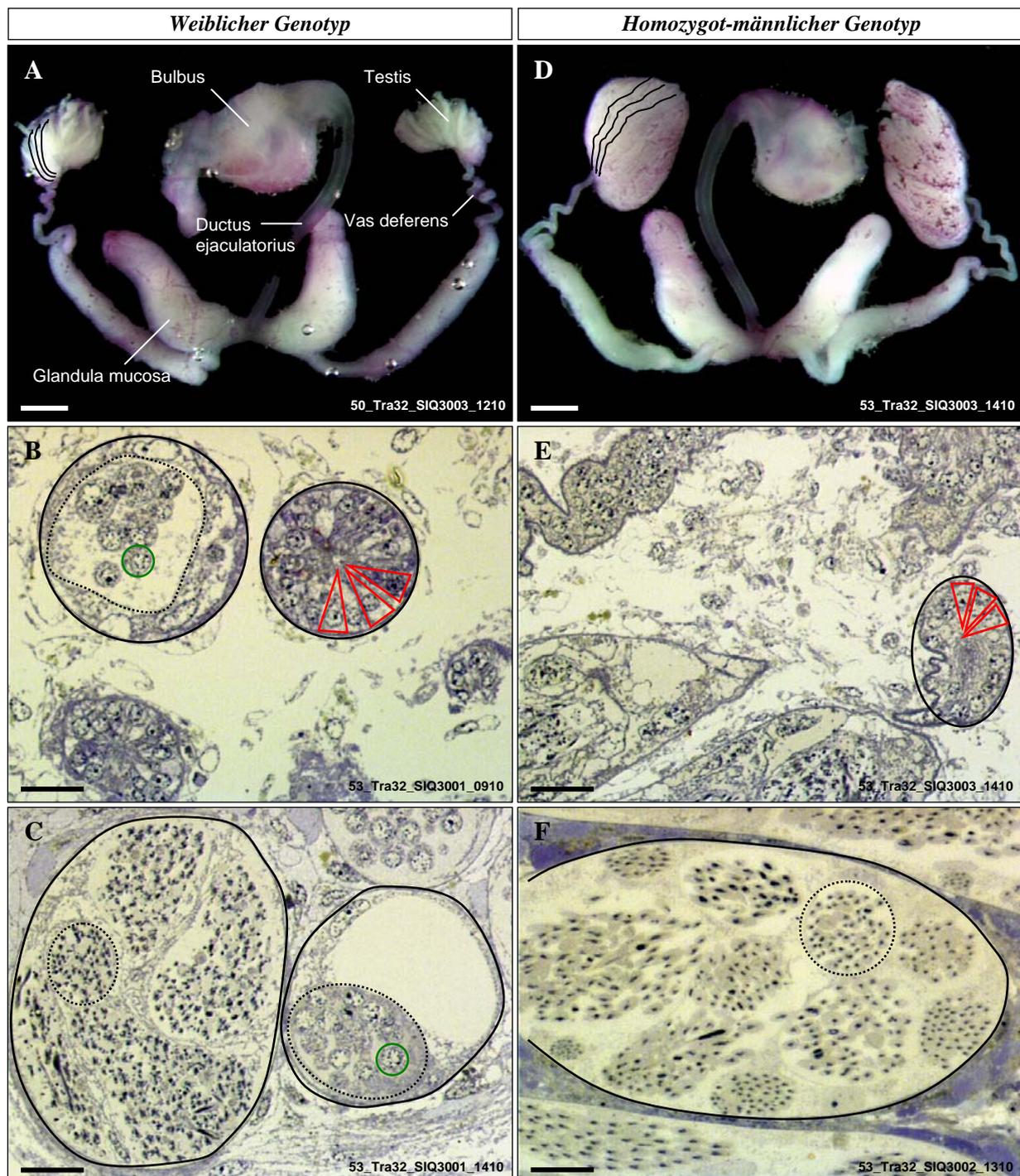


Abbildung 3.10. Geschlechtliche Differenzierung des Gonadenapparats und der Keimzellen von nicht-injizierten Embryonen. Die Merkmalsanalyse erfolgte im dritten Puppenstadium (P3). Index des Individuums unten rechts. Weiße Balken = 1 mm. Schwarze Balken = 10  $\mu$ m.

**A.** Weiblich differenzierter Gonadenapparat einer Puppe mit weiblichem Genotyp. Der Gonadenapparat weist paarige Ovarien mit je 3-4 Ovarioli (Pfeile) auf, die in das Ovarialbecken münden; das Ovarialbecken ist von dem angrenzenden Ovidukt durch eine Scheidewand getrennt (Pfeilspitze). Die Ovidukte vereinigen sich basal in die Vagina. **B-C.** Weiblich differenzierte Keimzellen von Puppen mit weiblichem Genotyp. Ausgewählte Ovarioli sind schwarz umrandet. **B.** Längsschnitt durch Ovarioli. Junge weibliche Keimzellen (rot) sind quer zur Längsrichtung des Eischlauchs angeordnet und liegen dachziegelartig übereinander. **C.** Querschnitt durch Ovarioli. Ältere Keimzellen (grün) kugeln sich ab, sind jedoch noch nicht in Ei- und Nährzellen differenziert. **D.** Männlich differenzierter Gonadenapparat einer Puppe mit hemizygot-männlichem Genotyp. Der Gonadenapparat weist paarige Testes mit fadenförmigen Testioli (vgl. Linienverlauf), spiralig gewundene Vasa deferentia, keulenförmige Glandulae mucosae und einen unpaaren Ductus ejaculatorius mit stark erweitertem Begattungsbulbus auf. **E-F.** Männlich differenzierte Keimzellen von Puppen mit hemizygot-männlichem Genotyp. Testioli sind schwarz, ausgewählte Spermatozysten punktiert umrandet. Querschnitt durch Testioli. Die in den Spermatozysten enthaltenen Spermatozyten vervielfachen ihre Anzahl durch mitotische Teilungen.

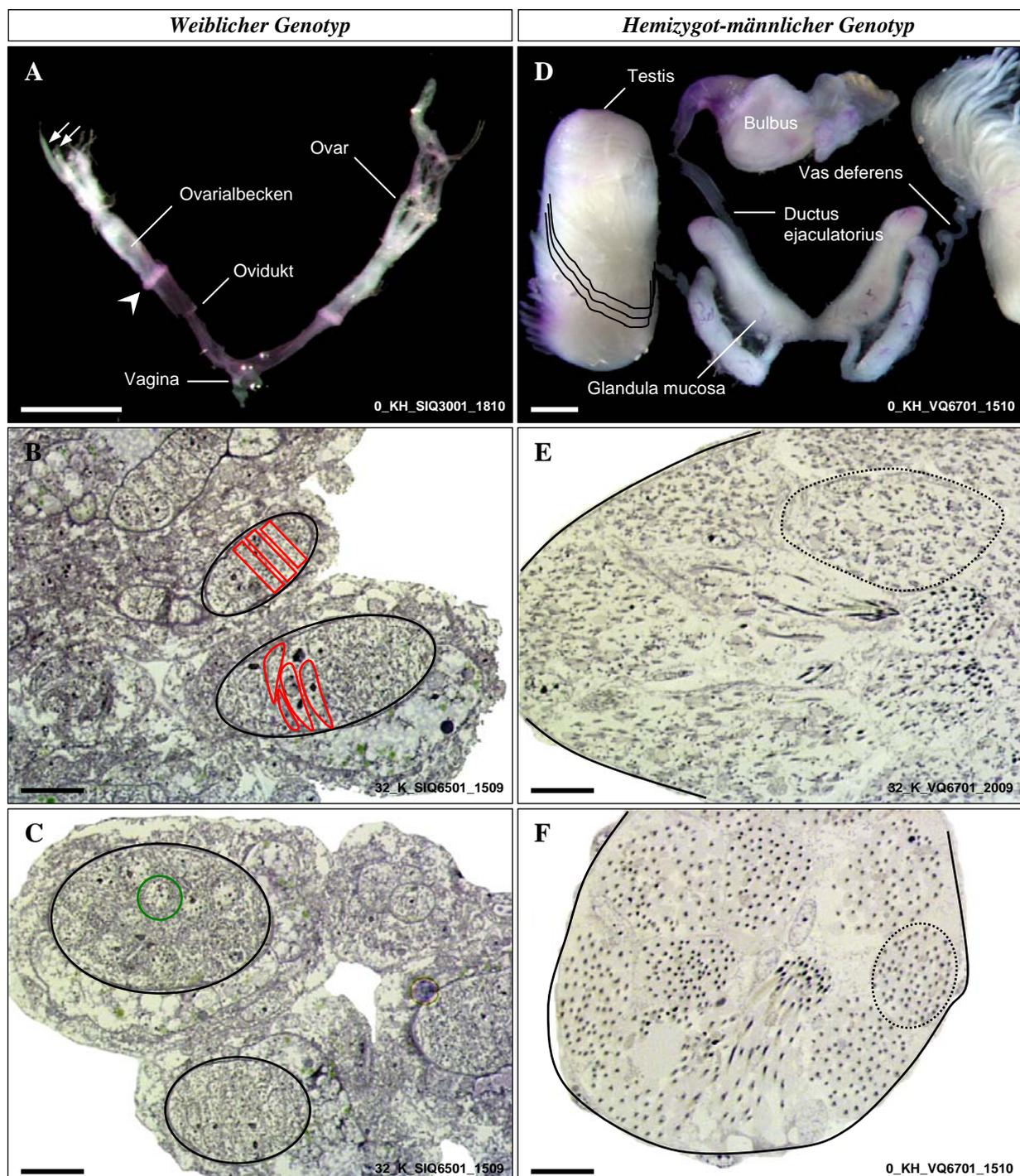


Abbildung 3.11. Effekt der embryonalen Repression von *csd* auf die geschlechtliche Differenzierung des Somas. Pro Embryo wurden 100 pg siRNA gegen *csd* injiziert. Die Merkmalsanalyse erfolgte im dritten Puppenstadium (P3). Index des Individuums unten rechts. Balken = 1 mm.

**A.** Männlich differenzierter Kopf einer Puppe mit weiblichem Genotyp. Der Kopf besitzt einen runden Umriss, median angenäherte Komplexaugen (Pfeilspitze) und Antennen aus 13 Segmenten (vgl. Linienverlauf). **B-C.** Männlich differenzierte 3. Extremität desselben Tieres, Ansicht von dorsal (B) und ventral (C). Tibia und 1. Tarsus weisen keine Vorrichtungen für das Pollensammeln auf. **D.** Männlich differenzierter Kopf einer Puppe mit homozygot-männlichem Genotyp. Beschreibung vgl. A. **E-F.** Männlich differenzierte 3. Extremität desselben Tieres, Ansicht von dorsal (E) und ventral (F). Beschreibung vgl. B-C.

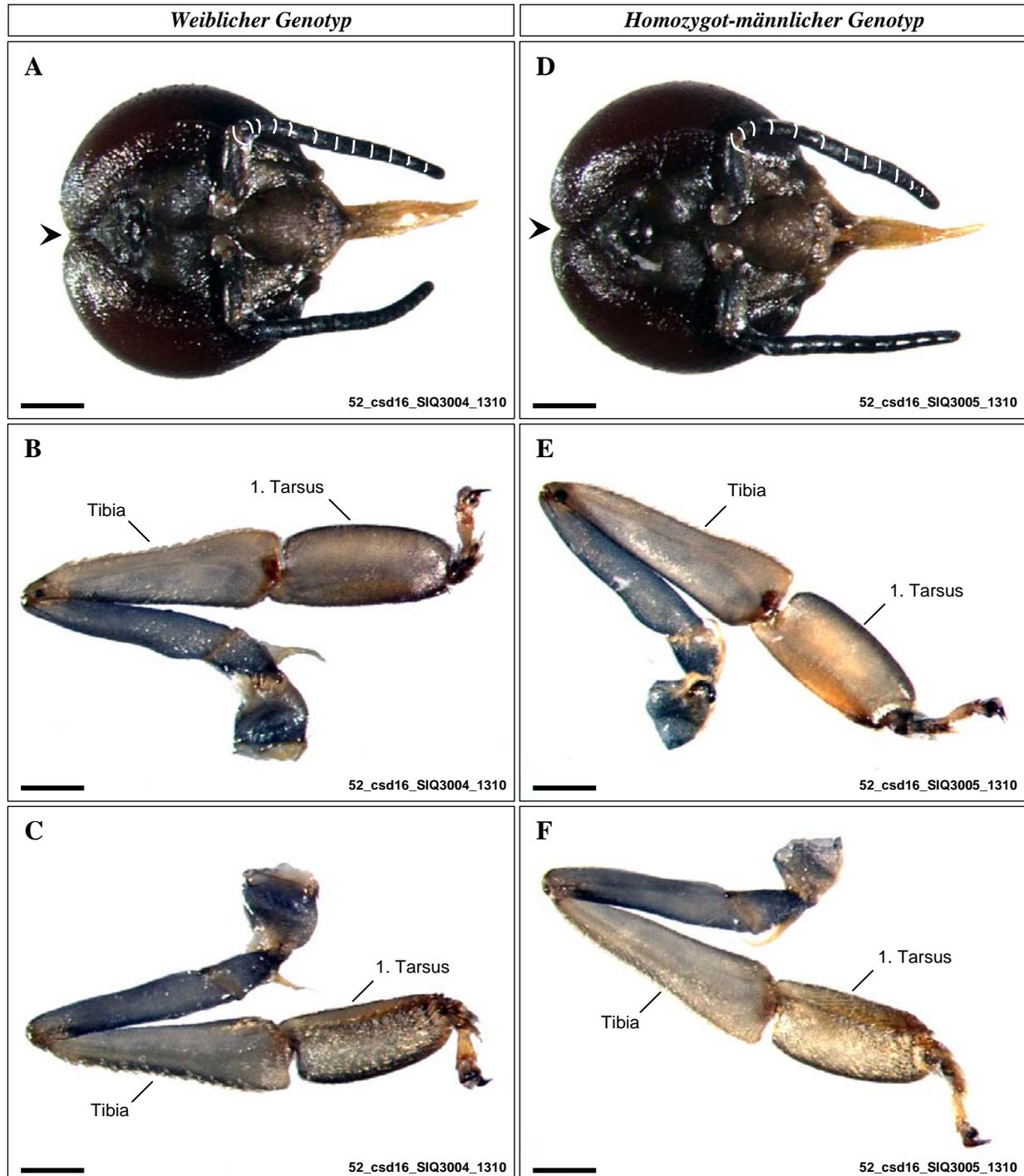
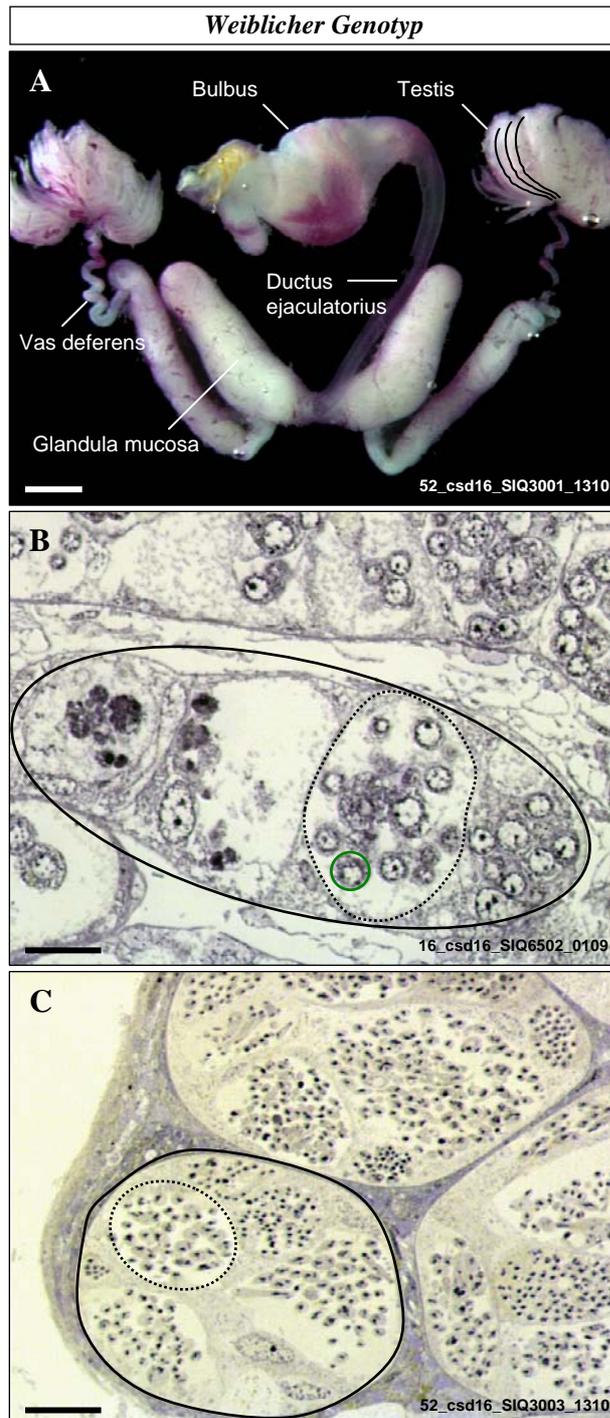


Abbildung 3.12. Effekt der embryonalen Repression von *csd* auf die geschlechtliche Differenzierung des Gonadenapparats und der Keimzellen. Pro Embryo wurden 100 pg siRNA gegen *csd* injiziert. Die Merkmalsanalyse erfolgte im dritten Puppenstadium (P3). Index des Individuums unten rechts. Weiße Balken = 1 mm. Schwarze Balken = 10  $\mu$ m.

**A.** Männlich differenzierter Gonadenapparat einer Puppe mit weiblichem Genotyp. Der Gonadenapparat weist paarige Testes mit fadenförmigen Testioli (vgl. Linienvorlauf), spiralig gewundene Vasa deferentia, keulenförmige Glandulae mucosae und einen unpaaren Ductus ejaculatorius mit stark erweitertem Begattungsbulbus auf. **B-C.** Männlich differenzierte Keimzellen von Puppen mit weiblichem Genotyp. Ausgewählte Testioli sind schwarz, ausgewählte Spermatocysten punktiert umrandet. **B.** Längsschnitt durch Testioli. Die Spermatocysten enthalten kugelförmige Spermatocyten (grün). **C.** Querschnitt durch Testioli. Die in den Spermatocysten enthaltenen Spermatocyten vervielfachen ihre Anzahl durch mitotische Teilungen.



### 3.3 Kodierung der geschlechtsspezifischen Information von *tra-like* und *csd* auf der Ebene von Transkription und Translation

Die in den funktionellen Analysen nachgewiesene aktive Funktion der Gene *tra-like* und *csd* in der weiblichen Regulationskaskade der Honigbiene warf die Frage auf, auf welche Weise die geschlechtsspezifische Information in diesen Genen kodiert ist. Im Zuge der Isolierung der genomischen Sequenz des SDL wurden zunächst verschiedene Transkripte von *tra-like* und *csd* in einer Kombination von RT-PCR und 5'/3'-RACE in nicht-verwandten weiblichen und männlichen Embryonen isoliert (vgl. Abschnitt 3.1). Da das Modell der allelischen Komplementierung unterschiedliche funktionelle Allele in weiblichen Individuen prognostiziert, wurden in einem zweiten Ansatz alle in den weiblichen Individuen einer Kreuzung segregierenden Transkripte von *tra-like* und *csd* über den gesamten ORF isoliert. In diesem Ansatz erfolgte die Isolierung in einer Kombination von cDNA-PCR mit multiplen Oligonukleotiden, Restriktionsanalyse und 5'/3'-RACE.

#### 3.3.1 *tra-like* weist geschlechtsspezifische Spleißvarianten auf

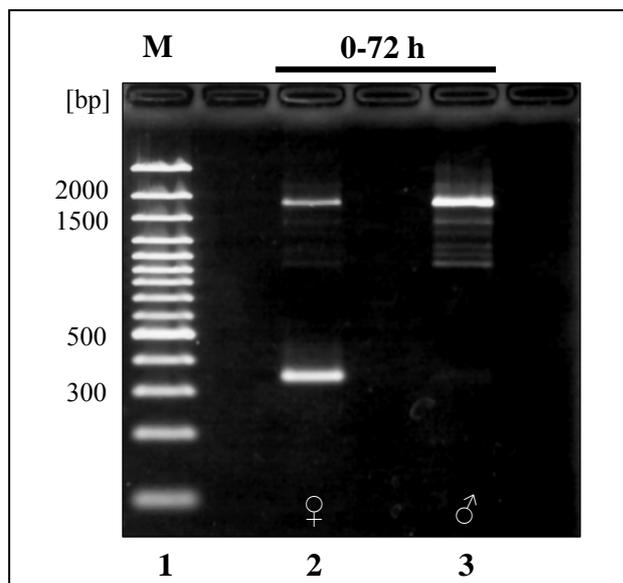
Aus cDNA von weiblichen Embryonen amplifizierten die für die 5'/3'-RACE-Analysen entwickelten Oligonukleotide 'Race\_typeII\_fw1' und 'Race\_typeII\_rv1' ein Fragment, das etwa 1000 bp umfasst und den größten Teil des putativen ORFs von *tra-like* darstellt. Aus cDNA von männlichen Embryonen konnte unter Verwendung derselben Oligonukleotide ein 1000 bp-Fragment und zusätzlich Fragmente zwischen 1700 und 2000 bp amplifiziert werden, die alternativ gespleißte Transkripte darstellen und neben einem verlängerten Exon 3 zusätzlich die männlichen Exons 4 und 5 umfassen (vgl. Abb. 3.2/C-D). Das 1000 bp-Fragment der weiblichen cDNA entstand durch Annealen des 5'-Oligonukleotids an Exon 2 und entspricht nicht dem 1000 bp-Fragment der männlichen cDNA, das durch Annealen des 5'-Oligonukleotids an Exon 4 entstand. Die Sequenzen von Exon 2 und Exon 4 sind sich mit einer Nukleotididentität von 93.1% sehr ähnlich, dasselbe gilt mit einer Nukleotididentität von 94.8% für die Sequenzen von Exon 3 und Exon 5. Dieser Befund könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Exonpaare durch Duplikation entstanden sind.

Die weibliche Spleißvariante ohne die männlichen Exons 4 und 5 wurde unter Verwendung eines 5'-Oligonukleotids, das unter bestimmten Voraussetzungen nur an Exon 3 und nicht an Exon 5 bindet, nachgewiesen. Die Oligonukleotide 'TypeII-W2' und 'Race\_typeII\_rv2' amplifizierten aus cDNA von männlichen Embryonen ein 1600 bp-Fragment und aus cDNA von

weiblichen Embryonen ein 1600 bp-Fragment und zusätzlich ein 300 bp-Fragment (Abb. 3.13). Das Auftreten des 1600 bp-Fragments in beiden Geschlechtern deutet darauf hin, dass das männliche Transkript die voreingestellte Spleißvariante darstellt, während das Spleißen im weiblichen Modus einen zusätzlichen Faktor erfordert.

Ein isoliertes männliches Transkript von *tra-like* umfasst 2836 bp und ist infolge des verlängerten Exons 3 und der zusätzlichen Exons 4 und 5 um 1303 bp länger als ein isoliertes weibliches Transkript mit 1533 bp. Infolge eines Stop-Kodons in Exon 3 umfasst der putative ORF des männlichen Transkripts jedoch nur 510 bp, während der putative ORF des weiblichen Transkripts mit 1203 bp mehr als doppelt so lang ist. Der putative ORF des männlichen Transkripts kodiert für ein Protein, das 170 Aminosäuren umfasst und ein prognostiziertes Molekulargewicht von 20265 Dalton aufweist.

Abbildung 3.13. Geschlechtsspezifische Spleißvarianten von *tra-like*. Aus cDNA von weiblichen Embryonen wurde ein 300 bp- und ein 1600 bp-Fragment amplifiziert (2), während aus cDNA von männlichen Embryonen unter Verwendung desselben Oligonukleotidpaars lediglich das 1600 bp-Fragment amplifiziert werden konnte (3). Das 300 bp-Fragment ist ein Teil des weiblichen Transkripts und nur in weiblichen Embryonen nachweisbar. Das 1600 bp-Fragment ist ein Teil des männlichen Transkripts und in beiden Geschlechtern nachweisbar. M, Größenstandard in Basenpaaren (1).



### 3.3.2 *csd* weist allelische Varianten in einer Kreuzung auf

In weiblichen L3-Larven einer Kreuzung der Königin SIQ88 mit einem nicht-verwandten Drohn wurden die vollständigen Transkripte von einem *tra-like*-Allel und drei *csd*-Allelen (*csd<sup>X</sup>*, *csd<sup>Y</sup>*, *csd<sup>Z</sup>*) isoliert (Abb. 3.14 und 3.15). Der putative ORF des *tra-like*-Transkripts umfasst 1209 bp und kodiert für ein Protein, das 403 Aminosäuren umfasst und ein prognostiziertes Molekulargewicht von 48690 Dalton besitzt. Der putative ORF des *csd*-Transkripts umfasst je nach Allel 1257, 1221 und 1269 bp und kodiert für ein Protein, das je nach Allel 419, 407 und 423 Aminosäuren umfasst und ein prognostiziertes Molekulargewicht von je nach Allel 50511, 48969 und 51113 Dalton besitzt.

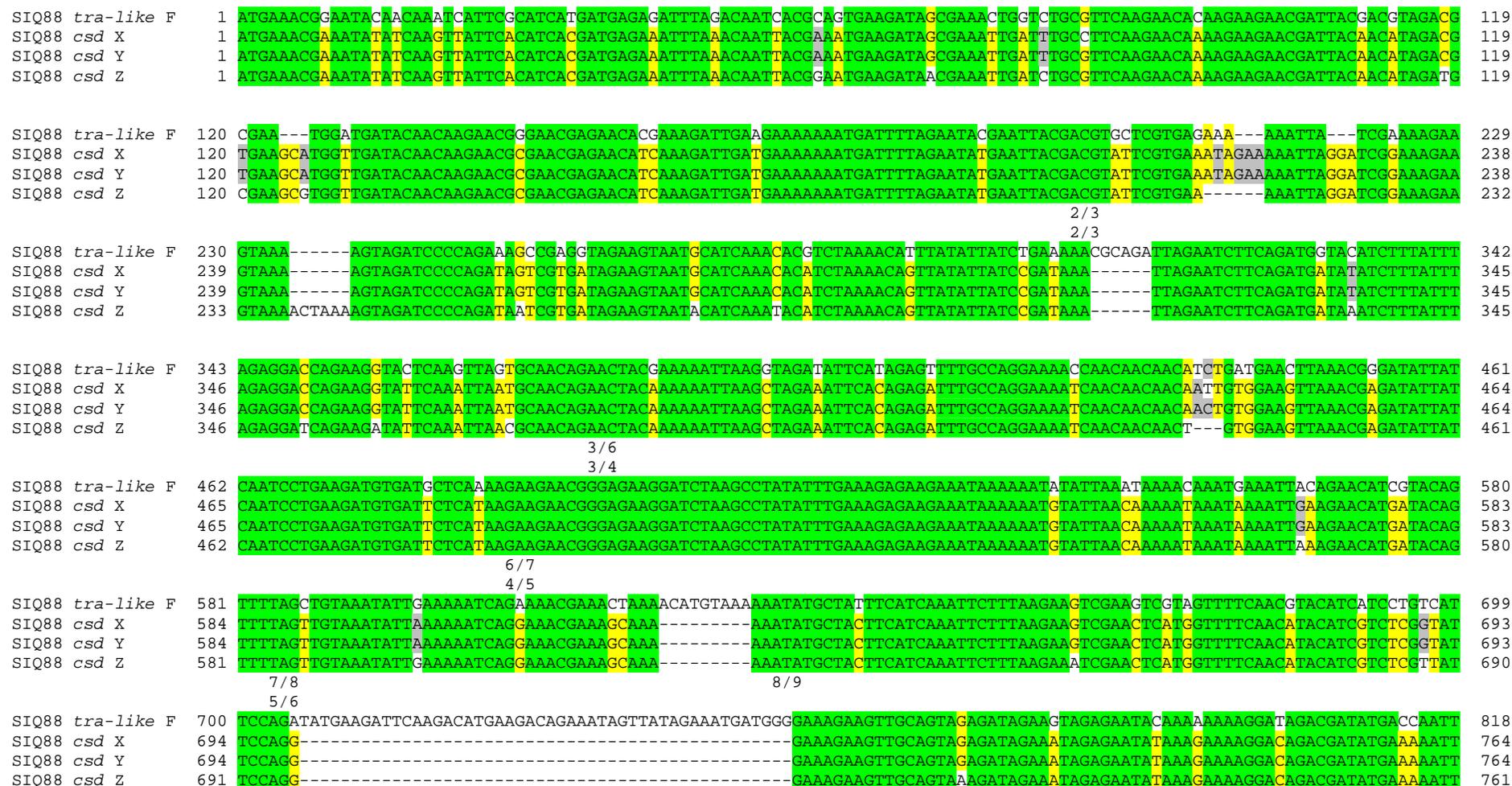
Das *tra-like*-Allel wies bei paarweiser Distanzkalkulation unter vollständiger Deletion der Lücken im Alignment eine Aminosäureidentität von durchschnittlich 75.4% mit den *csd*-Allelen auf (Tab. 3.4). Unter Berücksichtigung der Lücken im Alignment wies das *tra-like*-Allel eine lückenintegrierte Aminosäureidentität von durchschnittlich 65.5% mit den *csd*-Allelen auf (Tab. 3.4). Diese hohe Ähnlichkeit zwischen den Transkripten von *tra-like* und *csd* weist darauf hin, dass diese Gene durch Duplikation entstanden sein könnten.

Die *csd*-Allele wiesen bei paarweiser Distanzkalkulation unter vollständiger Deletion der Lücken im Alignment eine Aminosäureidentität von durchschnittlich 96.6% auf (Tab. 3.4). Unter Berücksichtigung der Lücken im Alignment wiesen die *csd*-Allele eine lückenintegrierte Aminosäureidentität von durchschnittlich 92.6% (Tab. 3.4). Im Bereich der hypervariablen Region (HVR) ist die lückenintegrierte Aminosäureidentität der *csd*-Allele auf durchschnittlich 64.9% reduziert (Tab. 3.4). Umgekehrt entspricht dieser Wert einer Divergenz von durchschnittlich 35.1% zwischen den in einer Kreuzung segregierenden *csd*-Allelen.

Tabelle 3.4. Prozentuale Aminosäureidentität des vollständigen ORF und der hypervariablen Region (HVR) von *tra-like*- und *csd*-Allelen, die in einer Kreuzung segregieren. Der ORF von *tra-like* bezieht sich auf das weibliche Transkript. Die paarweise Distanzkalkulation basiert auf dem Aminosäurealignment von Abbildung 3.14. Weiße Zellen geben die Aminosäureidentität für den vollständigen ORF, graue Zellen die Aminosäureidentität für die hypervariable Region (HVR) an. Werte in Klammern geben die lückenintegrierte Aminosäureidentität an. ORF, durchgehendes Leseraster.

Prozentuale Aminosäureidentität	SIQ88 TRA-LIKE <sup>F</sup>		SIQ88 CSD <sup>X</sup>		SIQ88 CSD <sup>Y</sup>	
	ORF	HVR	ORF	HVR	ORF	HVR
SIQ88 TRA-LIKE <sup>F</sup>						
SIQ88 CSD <sup>X</sup>	76.1 (65.6)	–				
SIQ88 CSD <sup>Y</sup>	76.1 (68.2)	–	99.0 (94.6)	100 (51.4)		
SIQ88 CSD <sup>Z</sup>	74.0 (62.7)	–	95.3 (92.5)	100 (83.8)	95.5 (90.6)	100 (59.5)

Abbildung 3.14. Transkripte von *tra-like* und *csd*. Nukleotidalignment der putativen ORF-Region von einem *tra-like*- und drei *csd*-Allelen (*csd<sup>X</sup>*, *csd<sup>Y</sup>*, *csd<sup>Z</sup>*), die in weiblichen L3-Larven einer Kreuzung segregieren. Die Allele wurden in einem kombinierten Ansatz aus cDNA-PCR mit multiplen Oligonukleotiden, Restriktionsanalyse und 5'/3'-RACE isoliert und jedes Allel aus den Sequenzen von mindestens sechs cDNA-Klonen assembliert. Das Alignment zeigt das weibliche Transkript von *tra-like* mit 10 Exonen. Zahlen über dem Alignment geben die Exon-Exon-Grenzen an, wobei sich der obere Wert auf *tra-like* und der untere Wert auf *csd* bezieht. Bindestriche markieren Lücken, die zur Maximierung der Allelhomologie eingefügt wurden. Grüne/gelbe/grau Boxen indizieren identische Nukleotide in 4/3/2 von 4 Allelen.







### 3.3.3 TRA-LIKE und CSD gehören dem SR-Typ an

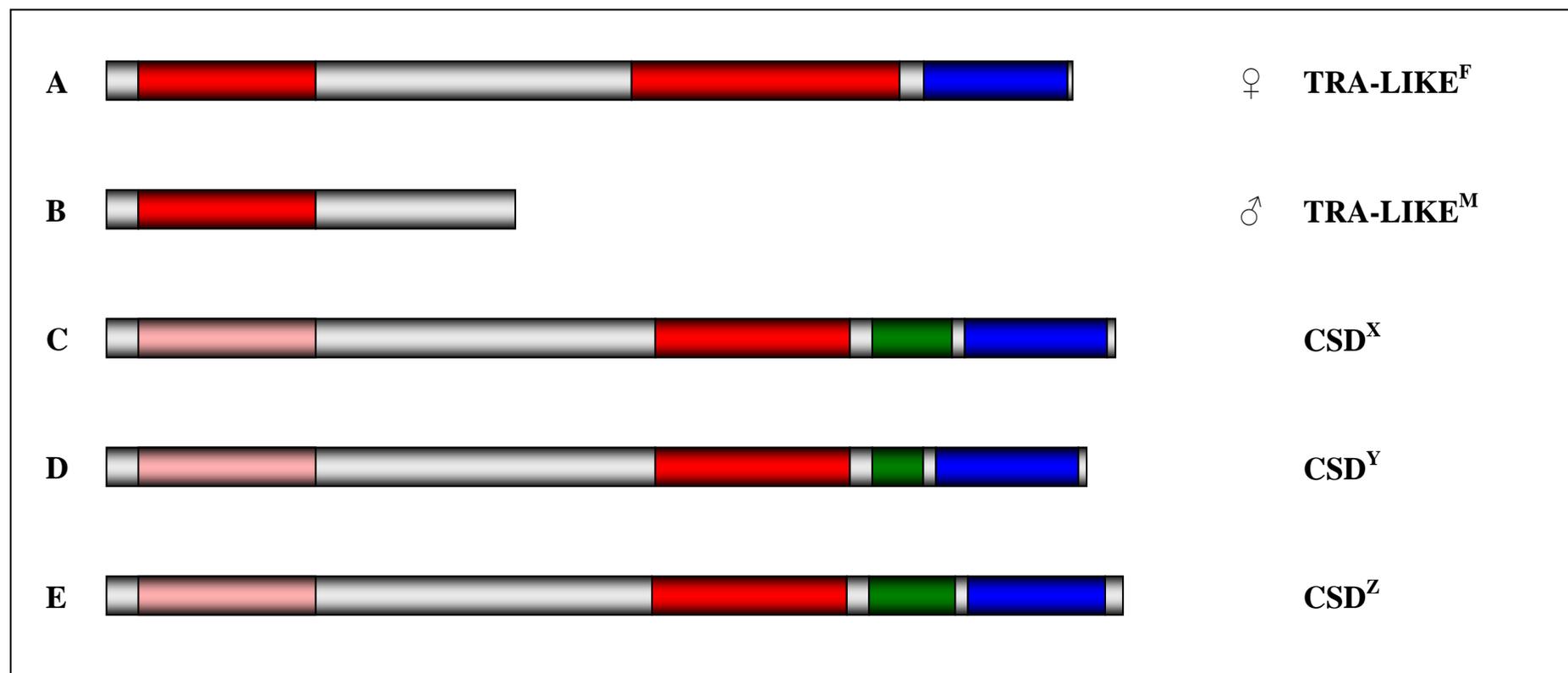
Die Proteinstruktur von TRA-LIKE<sup>F</sup> (Abb. 3.16/A) weist an N- und C-Terminus je eine RS-Domäne und eine prolinreiche Region am C-Terminus auf. Die Proteinstruktur von TRA-LIKE<sup>M</sup> teilt lediglich die N-terminale RS-Domäne mit der weiblichen Spleißvariante (Abb. 3.16/B). Die Proteinstruktur von CSD (Abb. 3.16/C-E) ähnelt derjenigen von TRA-LIKE<sup>F</sup>. Unterschiede bestehen in der im CSD-Protein nur schwach ausgeprägten N-terminalen RS-Domäne und der in TRA-LIKE nicht vorhandenen hypervariablen Region (HVR), die im CSD-Protein zwischen der C-terminalen RS-Domäne und der prolinreichen Region lokalisiert ist. Die HVR der in einer Kreuzung segregierenden CSD-Proteine umfasst je nach Allel 33, 22 und 37 Aminosäuren und ist maßgeblich für die Längendifferenz der Proteine verantwortlich (Tab. 3.5). Die RS-Domänen und die C-terminale prolinreiche Region stellen das TRA-LIKE<sup>F</sup>- und das CSD-Protein in die Verwandtschaft der SR-Typ-Proteine.

Tabelle 3.5. Eigenschaften von putativen TRA-LIKE- und CSD-Proteinen, die in einer Kreuzung segregieren. Werte in Klammern geben den prozentualen Anteil der betreffenden Domänen am ORF an. ORF, durchgehendes Leseraster. HVR, hypervariable Region. PRR, prolinreiche Region. aa, Aminosäuren.

	Molekulargewicht [Dalton]	ORF [aa]	RS-Domäne N-terminal [aa]	RS-Domäne C-terminal [aa]	HVR [aa]	PRR [aa]
<b>SIQ88 TRA-LIKE<sup>F</sup></b>	48689.6	403	75 (18.6)	109 (27.0)	–	60 (14.9)
<b>SIQ88 CSD<sup>X</sup></b>	50510.7	419	63 (15.0)	93 (22.2)	33 (7.9)	59 (14.1)
<b>SIQ88 CSD<sup>Y</sup></b>	48969.0	407	63 (15.5)	93 (22.9)	22 (5.4)	59 (14.5)
<b>SIQ88 CSD<sup>Z</sup></b>	51113.4	423	63 (14.9)	93 (22.0)	37 (8.7)	61 (14.4)

Abbildung 3.16. Putative Proteinstrukturen von einem *tra-like*- und drei *csd*-Allelen (*csd<sup>X</sup>*, *csd<sup>Y</sup>*, *csd<sup>Z</sup>*), die in weiblichen L3-Larven einer Kreuzung segregieren. Schematische Darstellung. Der N-Terminus befindet sich in allen Darstellungen auf der linken Seite. Domänen wurden auf Basis der vom putativen ORF abgeleiteten Aminosäuresequenz prognostiziert. Rote Boxen repräsentieren Arginin-Serin-reiche Domänen (RS-Domänen), blaue Boxen prolinreiche Regionen (PRR) und grüne Boxen hypervariable Regionen (HVR), die im wesentlichen aus repetitiven Asparagin-Tyrosin-Motiven (NY-Motiven) bestehen. Hellgraue Boxen stellen die übrigen Proteinbereiche dar.

**A-B.** *tra-like* weist geschlechtsspezifische Spleißvarianten auf. **A.** Die weibliche Spleißvariante von *tra-like* umfasst einen putativen ORF von 1209 bp bzw. 403 Aminosäuren. Das Protein besitzt zwei RS-Domänen und eine PRR am C-Terminus. **B.** Die männliche Spleißvariante von *tra-like* tritt im Embryonalstadium in beiden Geschlechtern auf und umfasst einen putativen ORF von nur 510 bp bzw. 170 Aminosäuren. Das Protein ist stark verkürzt und teilt lediglich die N-terminale RS-Domäne mit der weiblichen Spleißvariante. **C-E.** *csd* besitzt keine geschlechtsspezifischen Spleißvarianten, tritt in einer Kreuzung jedoch in unterschiedlichen Allelen (C-E) auf. Der putative ORF von *csd<sup>X</sup>*/*csd<sup>Y</sup>*/*csd<sup>Z</sup>* umfasst 1257/1221/1269 bp bzw. 419/407/423 Aminosäuren. Die Proteine enthalten eine schwach ausgeprägte RS-Domäne am N-Terminus sowie eine RS-Domäne und eine PRR am C-Terminus, die durch die HVR getrennt sind. Die HVR ist je nach Allel unterschiedlich lang und maßgeblich für die Längendifferenz der CSD-Proteine verantwortlich. ORF, open reading frame (durchgehendes Leseraster).



Sowohl das TRA-LIKE<sup>F</sup>- als auch das CSD-Protein weisen zahlreiche putative Erkennungsmotive für verschiedene Kinasen auf, die häufig im Bereich der RS-Domänen lokalisiert sind (Tab. 3.6). Diese Motive sind Ansatzstellen für Phosphorylierungen, Glykosylierungen und Myristoylierungen, die wichtige posttranslationale Kontrollmechanismen darstellen und die Aktivität des Proteins regulieren. Die in einer Kreuzung segregierenden CSD-Proteine unterscheiden sich in Anzahl und Position dieser Erkennungsmotive, so dass allelspezifische Muster an Phosphorylierungen, Glykosylierungen und Myristoylierungen zu erwarten sind. Sowohl TRA-LIKE<sup>F</sup> als auch CSD weisen mindestens eine bipartielle nukleare Zielsequenz (NLS, 'nuclear localisation signal') auf, was ein Indiz dafür ist, dass die Proteine in den Kern transportiert werden.

Tabelle 3.6. Anzahl der Erkennungsmotive für Phosphorylierungen (CK2, PKC, TYR, CAMP), Glykosylierungen (ASN) und Myristoylierungen (MYR) und Anzahl der bipartiellen nuklearen Zielsequenzen (NLS) von TRA-LIKE<sup>F</sup>- und CSD-Proteinen, die in einer Kreuzung segregieren. Werte in Klammern geben die Anzahl der Motive an, die im Bereich der prognostizierten RS-Domänen liegen. CK2, Kaseinkinase II. PKC, Proteinkinase C. TYR, Tyrosinkinase. CAMP, cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase.

	CK2	PKC	TYR	CAMP	ASN	MYR	NLS
SIQ88 TRA-LIKE <sup>F</sup>	10 (5)	10 (6)	4 (4)	4 (2)	6 (0)	2 (0)	2 (1)
SIQ88 CSD <sup>X</sup>	9 (3)	12 (8)	4 (3)	1 (1)	6 (0)	2 (1)	1 (1)
SIQ88 CSD <sup>Y</sup>	9 (4)	12 (9)	3 (2)	1 (1)	5 (0)	2 (1)	1 (1)
SIQ88 CSD <sup>Z</sup>	7 (2)	11 (7)	4 (3)	1 (1)	7 (1)	1 (1)	2 (2)

### 3.3.4 CSD ist während der gesamten Embryonalphase aktiv

Unter Verwendung eines polyklonalen aCsd-Antikörpers konnte das CSD-Protein in weiblichen und hemizygot-männlichen Genotypen durch Western-Blotting nachgewiesen werden. Der Nachweis der Expression erfolgte in embryonalen Stadien von 24±6 h, 48±6 h und 72±6 h und in L3-Larven (Abb. 3.17/2-9). In den Proteinlysaten von allen Stadien wurden 2-3 Proteinbanden detektiert, die nicht geschlechtsspezifisch sind. Die Banden weisen ein Molekulargewicht von 60 bis 70 kDalton auf und liegen damit deutlich über dem prognostizierten Molekulargewicht putativer CSD-Proteine von etwa 50 kDalton (vgl. Abschnitt 3.3.2). Ein durch Baculoviren in Sf21-Zellen rekombinant exprimiertes CSD:HSV-Fusionsprotein mit einem prognostizierten Molekulargewicht von 55296 Dalton zeigt auf demselben Blot ein Molekulargewicht von annähernd 60 kDalton (Abb. 3.17/10). Die Größendifferenz der geblotteten CSD-Proteine zum prognostizierten Molekulargewicht und zur Kontrolle könnten auf unterschiedliche Zustände der Proteinmodifikation, insbesondere der Phosphorylierung, zurückzuführen sein. Es könnte sich auch um Produkte verschiedener *csd*-Allele handeln, die infolge variierender Kinase-Erkennungsmotive unterschiedlich phosphoryliert sind. Die alternative

Nutzung eines anderen Startkodons kann dagegen ausgeschlossen werden, da ein in 3'-Richtung gelegenes ATG das Protein verkleinern würde und in allen bisher isolierten *csd*-Transkripten kein weiteres ATG in 5'-Richtung isoliert wurde.

### 3.3.5 TRA-LIKE<sup>F</sup>:EGFP erscheint mit der nuklearen Matrix assoziiert

Das TRA-LIKE<sup>F</sup>- und das CSD-Protein gehören dem SR-Typ an. Da SR-Typ-Proteine wie auch SR-Proteine häufig Spleißregulatoren und im Zellkern lokalisiert sind, wurde im folgenden Ansatz geprüft, ob TRA-LIKE<sup>F</sup> und CSD im Nukleus nachweisbar sind. Zu diesem Zweck wurde der ORF von *tra-like*<sup>F</sup> bzw. *csd* und von EGFP ('enhanced green fluorescent protein') in den Expressionsvektor pIZ/V5-His transformiert und anschließend in High Five<sup>TM</sup>-Zellen transfiziert. Bei der Fluoreszenzdetektion an lebenden Zellen unter dem Lichtmikroskop war rekombinant exprimiertes TRA-LIKE<sup>F</sup>:EGFP-Fusionsprotein auf den Zellkern beschränkt und erschien mit der nuklearen Matrix assoziiert (Abb. 3.18/A). Im Kontrollexperiment war rekombinant exprimiertes EGFP gleichmäßig in der Zelle verteilt und nicht auf den Nukleus beschränkt (Abb. 3.18/B). Rekombinant exprimiertes CSD:EGFP-Fusionsprotein konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise lag das Expressionsniveau von CSD:EGFP unter der Nachweisgrenze des verwendeten Lichtmikroskops.

Die Beschränkung der TRA-LIKE<sup>F</sup>:EGFP-Expression auf den Zellkern ist neben der putativen SR-Typ-Eigenschaft ein weiteres Indiz für die Hypothese, dass TRA-LIKE<sup>F</sup> ein Spleißregulator ist.

Abbildung 3.17. Expression von CSD in weiblichen und männlichen Genotypen. Dargestellt ist die Expression in embryonalen Entwicklungsstadien von  $24\pm 6$  h (2-3),  $48\pm 6$  h (4-5) und  $72\pm 6$  h (6-7) sowie in einem L3-Stadium (8-9). Pro Genotyp und Stadium treten 2-3 Proteinbanden auf, die nicht geschlechtsspezifisch sind und deren Molekulargewicht zwischen 60 und 70 kDa liegt, während rekombinant exprimiertes CSD:HSV-Fusionsprotein (10) ein Molekulargewicht von knapp 60 kDa aufweist. M, Größenstandard in kDalton (1). L3, Larve vor der dritten Häutung. K, Kontrolle in Form eines Proteinlysats von Sf21-Zellen mit rekombinant exprimiertem CSD: HSV-Fusionsprotein (pFastBac<sup>TM</sup>HT/CSD:HSV).

Proteinauftrennung und Western-Blotting der Proteinlysate erfolgte über SDS-PAGE und Nassblot auf Nitrozellulosemembran. Die Detektion des CSD-Proteins erfolgte über einen polyklonalen aCsd-Antikörper und einen polyklonalen Ziege-a-Kaninchen-HRP-Antikörper mit anschließender ECL-Reaktion. Als semiquantitative Kontrolle wurde die Blotmembran unterhalb der punktierten Linie statt mit dem aCsd-Anti-körper mit einem monoklonalen aActin-Antikörper inkubiert.

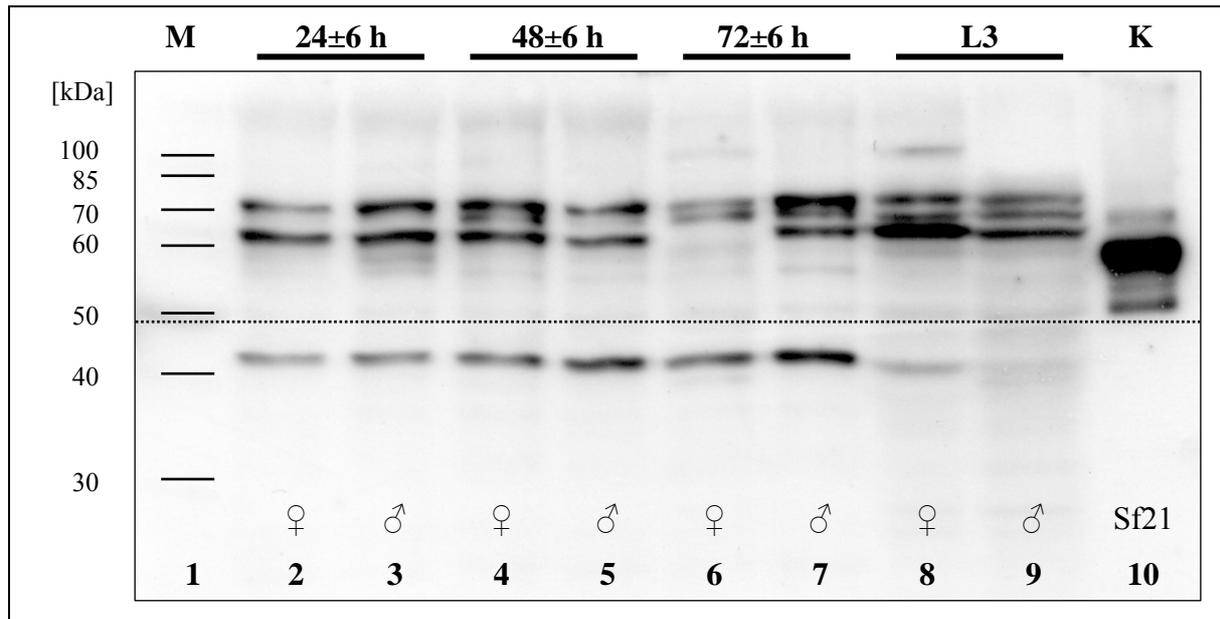
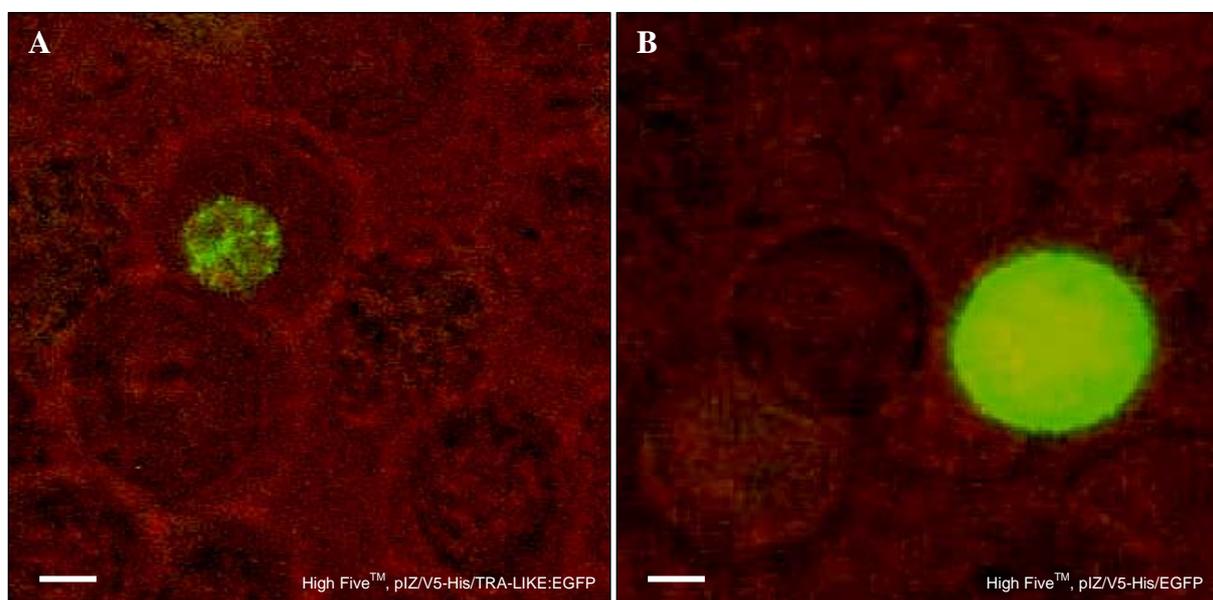


Abbildung 3.18. Rekombinante Expression von TRA-LIKE<sup>F</sup>:EGFP-Fusionsprotein (A) und EGFP (B) in High Five<sup>TM</sup>-Zellen. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte an lebenden Zellen unter dem Lichtmikroskop unter Verwendung eines Ex485/Em515-Filtersets. Index der transfizierten Zelllinie unten rechts. Balken = 10  $\mu$ m.

**A.** Rekombinant exprimiertes TRA-LIKE<sup>F</sup>:EGFP-Fusionsprotein ist im Nukleus lokalisiert. Das „gesprenkelte“ Verteilungsmuster weist auf eine Assoziation mit der nuklearen Matrix hin. **B.** Rekombinant exprimiertes EGFP im Kontrollversuch ist gleichmäßig in der Zelle verteilt und nicht auf den Nukleus beschränkt.



## 4 Diskussion

### 4.1 Die geschlechtsbestimmenden Gene des SDL tragen Signaturen von Duplikation

Die Isolierung des geschlechtsbestimmenden Locus (Sex Determination Locus, SDL) der Honigbiene wurde mit der vorliegenden Arbeit abgeschlossen. Der genomische Bereich, der in weiblichen Tieren stets heterozygot ist und dadurch per Definition den Geschlechtsbestimmungslokus darstellt, wurde von beiden Seiten eingegrenzt und die darin enthaltenen kodierenden Sequenzen isoliert. Der SDL *sensu strictu* (*s.s.*) umfasst über 36 kb und ist von Markern begrenzt, die in 1000 von 1000 weiblichen Tieren einer Kartierungspopulation heterozygot sind. An beide Seiten des SDL *s.s.* schließen sich Übergangsbereiche von jeweils ca. 6 kb an, über deren Heterozygotie in der Kartierungspopulation, i.e. über deren Zugehörigkeit zum SDL, infolge fehlender Marker keine Aussage getroffen werden kann. Der um diese Übergangsbereiche erweiterte SDL umfasst knapp 48 kb und wurde als SDL *sensu lato* (*s.l.*) bezeichnet. Der SDL *s.l.* enthält fünf Gene. Drei dieser Gene, *GB13727*, *transformer-like* (*tra-like*) und *complementary sex determiner* (*csd*), sind vollständig im Bereich des SDL *s.s.* lokalisiert, während die Gene *GB11211* und *GB30480* außerhalb des SDL *s.s.* im potentiell heterozygoten Übergangsbereich liegen. Der Geschlechtsbestimmungslokus der Honigbiene enthält somit maximal fünf Gene, deren Transkripte in der vorliegenden Arbeit vollständig isoliert und funktionell analysiert wurden.

Von fünf Genen auf dem SDL besitzen nur *tra-like* und *csd* eine durch embryonale RNA-Interferenz nachweisbare geschlechtsbestimmende Funktion. Hinsichtlich der fundamentalen Bedeutung der Geschlechtsbestimmung in der Ontogenese eines Organismus ist es überraschend, dass diese Gene keine signifikanten Sequenzhomologien zu Genen anderer Taxa der Insekten aufweisen. Allerdings wird dieser Befund durch die geringe Anzahl sequenzierter Modellorganismen relativiert: innerhalb der Klasse Hexapoda ist das Genom von nur 17 Arten aus lediglich vier Ordnungen sequenziert, wobei 14 sequenzierten Arten der Ordnung Diptera je eine sequenzierte Art der Ordnung Lepidoptera (*Bombyx mori*), der Coleoptera (*Tribolium castaneum*) und der Hymenoptera (*Apis mellifera*) gegenüberstehen (Sequencing Consortium 2006). In jedem Fall jedoch weist die fehlende Sequenzhomologie der in der Honigbiene geschlechtsbestimmenden Gene *tra-like* und *csd* zu Genen anderer Insekten darauf hin, dass *tra-like* und *csd* innerhalb der Insekten eine hohe Evolutionsrate aufweisen.

Von den übrigen Genen auf dem SDL weisen *GB11211* und *GB13727* in einigen Sequenzabschnitten signifikante Homologien zu Genen von Vertretern der Coleoptera und Diptera auf.

*GB30480* weist wie *tra-like* und *csd* keine signifikanten Homologien zu Genen anderer Taxa auf. Die Funktionen der zu *GB11211* und *GB13727* orthologen Gene sind nicht bekannt und können daher keine Hinweise auf potentielle Funktionen von *GB11211* und *GB13727* geben. Ein solcher Hinweis wäre allerdings nicht zwingend, da die Sequenzhomologie von orthologen Genen nicht notwendig mit der Funktion übereinstimmt und sequenzorthologe Gene verschiedener Taxa häufig unterschiedliche Funktionen ausüben.

Der genomische Umfang der Gene *tra-like* und *csd* ist mit 7.5 bzw. 9.2 kb deutlich größer als der 1.5-5 kb messende Umfang der übrigen SDL-Gene. Zugleich befindet sich das innerhalb des SDL umfangreichste nicht-kodierende Intervall mit knapp 12 kb zwischen *tra-like* und *csd* und weist zahlreiche repetitive Sequenzen auf. Die Allele von *tra-like* und *csd* in einer Kreuzung weisen eine durchschnittliche Aminosäureidentität von 75.4% auf. Sowohl die benachbarte Lage als auch die hohe Sequenzähnlichkeit von *tra-like* und *csd* bilden Argumente für die Hypothese, dass hier ein Duplikationsereignis stattgefunden hat und *tra-like* und *csd* paraloge Gene darstellen. Die Duplikation einzelner Genabschnitte und ganzer Gene stellt einen wichtigen Prozess in der Evolution dar, der durch verschiedene Mechanismen herbeigeführt werden kann und eine Grundlage zur Rekrutierung neuer Gene bildet (Ohno 1970; Holland 1999; Otto & Yong 2002). Einer der Mechanismen, die zur Duplikation eines Gens oder Genabschnitts führen, ist die replikative Transposition, wobei mobile Elemente wie Transposons, Retrotransposons oder Retroviren, die für Proteine kodieren, die ihre Replikation und Insertion in das Wirtsgenom ermöglichen, benachbarte Wirtsgene transponieren (Baldo & McClure 1999). In *D. melanogaster* ereignen sich pro Transposon und Generation etwa  $10^{-4}$  replikative Transpositionen, was die Punktmutationsrate des Transposons um mehrere Größenordnungen übersteigt (Charlesworth & Langley 1989). Weitere Ursachen einer Duplikation können die Paarung nicht-homologer Sequenzen durch zufälligen Bruch beim Crossover (Maeda & Smithies 1986) und die ungleiche homologe Rekombination zwischen repetitiven Elementen (einschließlich Transposons) sein, die entweder zu Verlust oder Duplikation der dazwischenliegenden Sequenzen führt und an einer Kopie des repetitiven Elements zwischen Gen und Duplikat zu erkennen ist. Unter diesem Aspekt ist es besonders interessant, dass das nicht-kodierende Intervall zwischen *tra-like* und *csd* zahlreiche repetitive Sequenzen aufweist, darunter auch eine *mariner*-Sequenz, die die Signatur eines früheren Duplikationsereignisses darstellen könnten.

Denkbar ist, dass im Falle von *tra-like* zwei Duplikationsereignisse stattgefunden haben. Zum einen könnte *tra-like* als vollständiges Gen dupliziert worden sein und damit das ursprüngliche *csd* erzeugt haben. Zum anderen könnten die einander sehr ähnlichen Exonpaare 2/4 und

3/5 des männlichen Transkripts von *tra-like* durch die Duplikation einzelner Genabschnitte entstanden sein. Im Falle des *transformer*-Gens von *D. melanogaster* sind dagegen keine Signaturen von Duplikation vorhanden.

In der Modellvorstellung kann ein dupliziertes Gen stillgelegt werden (Pseudogenisierung), diesselbe Funktion wie sein Schwestergen erfüllen (Redundanz), Teile der Funktion des Schwestergens übernehmen (Subfunktionalisierung) oder eine neue Funktion erhalten (Neofunktionalisierung) (Rastogi & Liberles 2005). Eine Neofunktionalisierung kann spontan oder über mehrere Stadien der Subfunktionalisierung erfolgen. Der Fall von *tra-like* und *csd* könnte ein Beispiel dafür sein, wie nach der Duplikation eines Gens (*tra-like*) das Duplikat (*csd*) neofunktionalisiert und ein neues initiales Signal der Geschlechtsbestimmung rekrutiert wurde.

## 4.2 Das Gen *transformer-like* ist struktur- und funktionsortholog mit dem *transformer*-Gen, in seiner Sequenz jedoch nicht konserviert

### 4.2.1 *tra-like* ist ein Schaltergen der Geschlechtsbestimmung

Die embryonale Repression des Gens *transformer-like* (*tra-like*) durch RNA-Interferenz verursachte in weiblichen Genotypen eine vollständig männliche Ausprägung des Somas und die Produktion männlicher Keimzellen. Eine frühembryonale Inaktivierung von *tra-like* ist hinreichend, die vom Genotyp implementierte weibliche Regulationskaskade dauerhaft zu unterdrücken bzw. durch die männliche Regulationskaskade zu ersetzen. Diese Schalterfunktion übt *tra-like* in der weiblichen Regulationskaskade der Somazellen als auch der Keimzellen aus. In dieser dualen Regulationskontrolle unterscheidet sich *tra-like* von seinem Namensgeber, dem Gen *transformer* (*tra*) in *D. melanogaster*, das in der weiblichen Regulationskaskade der Somazellen aktiv ist und für den somatischen Anteil an der Induktion weiblicher Keimzellen benötigt wird, in den Keimzellen selbst jedoch nicht aktiv ist (Steinmann-Zwicky 1994a; Steinmann-Zwicky 1994b; Hinson & Nagoshi 1999; Evans & Cline 2006).

*tra-like* ist in der weiblichen Regulationskaskade der Soma- und Keimzellen aktiv. In männlichen Genotypen verursachte die embryonale Repression von *tra-like* weder in den Soma- noch in den Keimzellen einen geschlechtsspezifischen Effekt, was zeigt, dass *tra-like* in der frühen männlichen Regulationskaskade keine Schalterfunktion ausübt und nicht aktiv ist. Dieser Befund entspricht dem Aktivitätsmuster von *tra*, das in der männlichen Regulationskaskade von *D. melanogaster* ebenfalls inaktiv ist (Baker 1989; Steinmann-Zwicky *et al.* 1990).

Im Vergleich zu den Testes der nicht-injizierten männlichen L5-Larven und der *csd*-reprimierten weiblichen L5-Larven erschienen die Testioli der *tra-like*-reprimierten weiblichen L5-Larven in der Anzahl reduziert und in der Länge verkürzt, so dass sie die Hüllmembran der Testes nicht vollständig ausfüllten. Auch die Testes der *tra-like*-reprimierten weiblichen Puppen besaßen deutlich weniger und kürzere Testioli als die Testes der nicht-injizierten männlichen Puppen und der *csd*-reprimierten weiblichen Puppen. Nichtsdestotrotz enthielten die Testioli der *tra-like*-reprimierten weiblichen Puppen männliche Keimzellen, und die geschlechtsspezifische Ausprägung sämtlicher larvaler und pupaler Anhangsorgane der Testes und des übrigen Somas unterschied sich nicht von den nicht-injizierten männlichen und den *csd*-reprimierten weiblichen Larven bzw. Puppen. Quantitative Effekte der siRNA-Injektion können dabei nicht ausgeschlossen werden, da die Injektion höherer Dosen lethal war. Allerdings bildeten Embryonen, die mit derselben Menge *csd* siRNA injiziert worden waren, keine

verkleinerten Testes aus. Effekte infolge der Vielzahl an Kreuzungen, die für die RNAi-Analysen verwendet wurden, können dagegen ausgeschlossen werden, da bei der RNAi von *csd* diesselben Kreuzungen zum Einsatz kamen und dort keine Effekte erkennbar waren. Schließt man experimentelle Artefakte aus, könnten die in der Anzahl reduzierten und verkürzten Samentaschläuche ein Hinweis darauf sein, dass bei der embryonalen Inaktivierung von *tra-like* in weiblichen Embryonen zwar eine Umstellung auf die männliche Regulationskaskade erfolgt, diejenigen Gene, die für Anzahl und Ausprägung der Testioli verantwortlich sind, jedoch nicht unter der Kontrolle von *tra-like* stehen. Ein alternatives Erklärungsmodell wäre, dass eine möglicherweise nur transiente Inaktivierung von *tra-like* das Zeitfenster nicht mehr erfasst, in dem die testesausrägenden Gene aktiv sind, die in der Folge durch aktives *tra-like* inhibiert werden.

#### 4.2.2 Die weibliche Spleißvariante *tra-like*<sup>F</sup> wird posttranskriptionell reguliert

Die Transkripte von *tra-like* sind in embryonalen Stadien ab 12-24h nachweisbar (Beye *et al.* 2003). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden erstmals geschlechtsspezifische Spleißvarianten von *tra-like* nachgewiesen, wie sie auch das *transformer*-Gen von *D. melanogaster* aufweist (Boggs *et al.* 1987). Die geschlechtsspezifischen Transkripte von *tra* bestehen in beiden Geschlechtern aus 3 Exonen, und männliches und weibliches Transkript unterscheiden sich dadurch, dass in der prä-mRNA von weiblichen Genotypen durch aktives Umlenken des Spleißapparats ein 5'-terminaler Abschnitt von Exon 2 herausgespleißt wird (Sosnowski *et al.* 1989). In der Honigbiene weist das männliche Transkript *tra-like*<sup>M</sup> 12 Exone und das weibliche Transkript *tra-like*<sup>F</sup> nur 10 Exone auf. *tra-like*<sup>F</sup> fehlen im Vergleich zu *tra-like*<sup>M</sup> sowohl ein 3'-terminaler Abschnitt von Exon 3 als auch die männlichen Exons 4 und 5 (vgl. Abb. 3.2). Die Spleißprozesse, die zu den geschlechtsspezifischen Transkripten von *tra* und *tra-like* führen, unterscheiden sich. Während in der prä-mRNA von *tra* das Herausspleißen eines 5'-Exonabschnitts ein dort lokalisiertes Stop-Kodon eliminiert, wird in der prä-mRNA von *tra-like* ein 3'-Exonabschnitt mit Stop-Kodon herausgespleißt. In beiden Fällen verhindert das Herausspleißen des Exonabschnitts ein Abbrechen des Leserasters im weiblichen Transkript. In der Honigbiene tritt in cDNA aus embryonalen Stadien *tra-like*<sup>M</sup> in beiden Geschlechtern, *tra-like*<sup>F</sup> dagegen ausschließlich in weiblichen Genotypen auf. Dieser Befund stützt ein Modell, das das männliche Transkript als voreingestellte ('default') Spleißvariante definiert und in weiblichen Genotypen einen zusätzlichen aktiven Faktor erfordert, der einen Teil der prä-mRNA von *tra-like* posttranskriptionell im weiblichen Modus spleißt.

### 4.2.3 Das TRA-LIKE<sup>F</sup>-Protein ist ein potentieller Spleißregulator

Der in dieser Arbeit angestrebte Nachweis des TRA-LIKE<sup>F</sup>-Proteins gelang bisher nicht. Ursache könnte eine niedrige Expression sein, wie es auch für TRA in *D. melanogaster* vermutet wird (D. Bopp, mündliche Mitteilung). Der putative ORF des aus einer Kreuzung isolierten weiblichen Transkripts *tra-like<sup>F</sup>* kodiert für ein Protein, TRA-LIKE<sup>F</sup>, das 403 Aminosäuren umfasst und infolge der prognostizierten RS-Domänen und der C-terminalen prolinreichen Region dem SR-Typ zuzurechnen ist. Im Gegensatz zu SR-Proteinen besitzen SR-Typ-Proteine kein RNA-Bindungsmotiv (RNA-recognition motif, RRM) (Blencowe *et al.* 1999), einige SR-Typ-Proteine weisen jedoch eine prolinreiche Region auf (Blencowe *et al.* 1998). Die SR-Typ-Eigenschaft teilt TRA-LIKE<sup>F</sup> mit TRA, das gleichfalls eine ausgedehnte RS-Domäne, eine C-terminale prolinreiche Region und kein RRM besitzt.

SR-Proteine und SR-Typ-Proteine sind hauptsächlich Spleißregulatoren, die die Nutzung alternativer Spleißstellen kontrollieren, indem die RS-Domänen Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, die die Bildung von konstitutiven und regulatorischen Spleißkomplexen ermöglichen (Bingham *et al.* 1988; Bandziulis *et al.* 1989; Wu & Maniatis 1993; Amrein *et al.* 1994). Die Komponenten des konstitutiven Spleißapparats sind vorzugsweise in einem subnuklearen Kompartiment ('speckled compartment') lokalisiert (Fu & Maniatis 1990; Fu 1995), und es konnte gezeigt werden, dass die etwa 120 Aminosäuren umfassende RS-Domäne von TRA nicht nur für den Proteintransport in den Nukleus verantwortlich ist, sondern das Protein auch direkt zu dem subnuklearen Spleißregulationskompartiment dirigiert (Li & Bingham 1991). In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise darauf gefunden, dass rekombinantes TRA-LIKE<sup>F</sup>:EGFP-Fusionsprotein bei Expression in Insektenzellen mit der nuklearen Matrix assoziiert ist (vgl. Abb. 3.18). Das in Säugerzellen exprimierte SR-Typ-Protein SRm160 ist ebenfalls mit der nuklearen Matrix assoziiert und als Ko-Aktivator durch Interaktion mit SR-Proteinen und dem konstitutiven Spleißkomplex über ESE-Elemente ('exonic splicing enhancer') in die spezifische Spleißregulation der prä-mRNA involviert (Blencowe *et al.* 1998; Longman *et al.* 2001). Dieser Befund steht in Einklang mit der Hypothese, dass TRA-LIKE<sup>F</sup> in der Honigbiene eine ähnliche Funktion ausübt.

Anders als TRA, das nur eine ausgedehnte RS-Domäne aufweist, besitzt das putative TRA-LIKE<sup>F</sup>-Protein zwei RS-Domänen, die deutlich voneinander abgegrenzt sind (vgl. Abb. 3.16/A). Die Anordnung der RS-Domänen ähnelt der Situation im TRA2-Protein in *D. melanogaster* (Amrein *et al.* 1988; Goralski *et al.* 1989) und MdTRA2-Protein in *M. domestica* (Burghardt *et al.* 2005), wobei TRA-LIKE<sup>F</sup> im Gegensatz zu TRA2 und MdTRA2 zwischen

den RS-Domänen kein RRM einschließt. In *D. melanogaster* interagieren das geschlechtsspezifisch exprimierte TRA als Aktivator und das in beiden Geschlechtern exprimierte TRA2 als Ko-Spleißregulator zusammen mit weiteren SR-Proteinen über die ESE-Elemente mit dem *dsx*-Spleißkomplex (Tian & Maniatis 1993; Lynch & Maniatis 1996). Sollte TRA-LIKE<sup>F</sup> als SR-Typ-Protein ähnlich wie TRA die Bildung eines Spleißregulationskomplexes vermitteln, wäre zur Bindung an das zu regulierende Zielgen mindestens ein Spleißregulator mit RRM in der Art von TRA2 notwendig.

Das vom putativen ORF des männlichen Transkripts abgeleitete TRA-LIKE<sup>M</sup>-Protein teilt die N-terminale RS-Domäne mit der weiblichen Proteinvariante TRA-LIKE<sup>F</sup>. Infolge eines Stop-Kodons in Exon 3 fehlen dem nur 170 Aminosäuren umfassenden TRA-LIKE<sup>M</sup>-Protein sowohl die zweite RS-Domäne als auch die C-terminale prolinreiche Region des weiblichen Proteins. Das auf diese Weise verkürzte TRA-LIKE<sup>M</sup>-Protein ist möglicherweise nicht funktionell, weist jedoch im Gegensatz zu dem inaktiven männlichen *tra*-Transkript in *D. melanogaster* eine RS-Domäne auf.

### **4.3 Das Gen *complementary sex determiner* aktiviert den allelischen Mechanismus posttranslational und reguliert seine Zielgene posttranskriptionell**

#### **4.3.1 *csd* ist das Haupt-Schaltergen der Geschlechtsbestimmung**

Das Gen *complementary sex determiner* (*csd*) wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals unabhängig von *tra-like* durch RNA-Interferenz inaktiviert. Die embryonale Repression von *csd* verursachte in weiblichen Genotypen eine vollständig männliche Ausprägung des Somas und die Produktion männlicher Keimzellen. Die frühembryonale Inaktivierung von *csd* ist ohne gleichzeitige Repression von *tra-like* hinreichend, die vom Genotyp implementierte weibliche Regulationskaskade zu unterbinden und dauerhaft die männliche Regulationskaskade zu aktivieren. Diese übergeordnete Schalterfunktion übt *csd* in der weiblichen Regulationskaskade der Somazellen als auch der Keimzellen aus.

*csd* ist wie *tra-like* in der weiblichen Regulationskaskade der Soma- und Keimzellen aktiv. In männlichen Genotypen bewirkte die embryonale Repression von *csd* weder in den Soma- noch in den Keimzellen einen geschlechtsspezifischen Effekt, was beweist, dass *csd* in der frühembryonalen männlichen Regulationskaskade keine Funktion ausübt und nicht aktiv ist (vgl. hierzu auch Beye *et al.* 2003). Anders als im Fall von *tra-like* waren bei der Repression von *csd* keine quantitativen Limitierungen der Testesentwicklung von weiblichen Embryonen zu beobachten. Dieser Befund ist ein Baustein zu der Hypothese, dass *csd* das Haupt-Schaltergen der Geschlechtsbestimmung von *A. mellifera* ist, dessen Aktivitätsstatus die männliche oder weibliche Regulationskaskade initiiert und alle peripheren Verzweigungen des geschlechtsspezifischen Regulationswegs umfasst.

#### **4.3.2 *csd* weist in einer Kreuzung unterschiedliche Allele auf, die die Voraussetzung für einen aktiven Genzustand darstellen**

Während die Befunde der funktionellen Analysen zeigen, dass sowohl *tra-like* als auch *csd* in der weiblichen Regulationskaskade eine aktive Schalterrolle besetzen, ermöglichen die aus einer Kreuzung isolierten Transkripte von *tra-like* und *csd* Rückschlüsse auf den Mechanismus dieser Regulation. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die in einer Kreuzung segregierenden Allele von *tra-like* und *csd* isoliert. Anders als *tra-like*, das geschlechtsspezifisch gespleißt wird, zeigen die Transkripte von *csd* keine geschlechtsspezifischen Spleißvari-

anten. Doch während die in einer Kreuzung segregierenden Transkripte von *tra-like* keine Allelvariation aufweisen, unterscheiden sich die aus einer Kreuzung isolierten Transkripte von *csd* durch singuläre Nukleotidaustausche, Insertionen, Deletionen und in der für dieses Gen charakteristischen hypervariablen Region (HVR) (vgl. Abb. 3.13 und 3.14). Die in einer Kreuzung segregierenden *csd*-Allele weisen eine Aminosäureidentität von durchschnittlich 96.6% auf, was umgekehrt einer Aminosäuredivergenz von durchschnittlich 3.4% entspricht. Die lückenintegrierte Aminosäureidentität der hypervariablen Region (HVR) dieser Allele ist auf durchschnittlich 64.9% reduziert, was einer lückenintegrierten Aminosäuredivergenz von durchschnittlich 35.1% entspricht. Die beobachtete Aminosäuredivergenz von *csd*-Allelen aus einer Kreuzung untermauert das Modell der komplementären Geschlechtsbestimmung durch heterozygoten Allelzustand am Geschlechtsbestimmungslokus (Whiting 1943). Infolge der durch das Sozialverhalten bedingten Letalität diploider Männchen ist der heterozygote Allelzustand in der Honigbiene vorteilhaft und wird durch Selektion begünstigt (Hasselman & Beye 2004). Andere Beispiele für repetitive NY-Motive und damit verbundene Allelpoly-morphismen sind in der Literatur nicht bekannt. Weitere Beispiele für eine mit einem Heterozygotenvorteil verbundene Allelvielfalt an einem Locus stellen der MHC-Komplex ('major histocompatibility complex') der Säugetiere (Takahata & Nei 1990; Takahata *et al.* 1992) und der S-Lokus ('self-incompatibility locus') der Solanaceae (Richman *et al.* 1996; Richman & Kohn 1999) dar.

#### **4.3.3 Das CSD-Protein ist ein potentieller Spleißregulator mit an den Aktivitätszustand gekoppelten Proteinbindungs-Eigenschaften**

In der vorliegenden Arbeit gelang der erstmalige Nachweis des CSD-Proteins durch einen polyklonalen Antikörper gegen ein Oligopeptid-Epitop von CSD. Das CSD-Protein ist während der gesamten Embryonalphase aktiv, was dem Transkriptionsmuster von *csd* entspricht (Beye *et al.* 2003). Mit einer Aminosäureidentität von durchschnittlich 75.4% sind sich die in einer Kreuzung segregierenden CSD- und TRA-LIKE<sup>F</sup>-Proteine sehr ähnlich. Auf struktureller Ebene drückt sich diese Ähnlichkeit in den RS-Domänen und der C-terminalen prolinreichen Region aus, wenngleich die N-terminale RS-Domäne von CSD im Vergleich zu der N-terminalen RS-Domäne von TRA-LIKE<sup>M/F</sup> weniger stark ausgeprägt ist (vgl. Abb. 3.16). Die RS-Domänen und die C-terminale prolinreiche Region ordnet das CSD-Protein den SR-Typ-Proteinen zu und verleiht ihm eine strukturelle Ähnlichkeit zu TRA (vgl. hierzu auch Beye *et al.* 2003). Wie TRA und TRA-LIKE<sup>F</sup> weist auch das CSD-Protein kein RRM auf. Der ange-

---

strebe Hinweis auf eine Assoziation des CSD-Proteins mit der nuklearen Matrix gelang in der vorliegenden Arbeit zwar nicht, doch sprechen die strukturellen Eigenschaften des CSD-Proteins und seine Ähnlichkeit zu TRA-LIKE<sup>F</sup> dafür, dass CSD an der Spleißregulation beteiligt ist.

Der auf Sequenz- wie Strukturebene augenfälligste Unterschied zwischen TRA-LIKE<sup>F</sup> und CSD besteht in der hypervariablen Region (HVR), die das TRA-LIKE<sup>F</sup>-Protein nicht aufweist. Die HVR besteht im wesentlichen aus einem repetitiven NY-Motiv (vgl. Abb. 3.14) und ist maßgeblich für die Längendifferenz der in einer Kreuzung segregierenden CSD-Proteine im Umfang von 4-16 Aminosäuren (vgl. Abb. 3.16/C-E) verantwortlich. Die HVR könnte bei der Spezifikation funktioneller Allele im Kontext der komplementären Geschlechtsbestimmung eine Schlüsselrolle spielen, indem sie eine relative Verschiebung der Proteindomänen verursacht und dadurch möglicherweise die Assoziation von gleichen und/oder ungleichen Allelen beeinflusst (Beye 2004). Durch Verschiebung der Domänen könnte die zunächst unspezifische Proteinbindungs-Eigenschaft der RS-Domänen die spezifische Assoziation von gleichen und/oder ungleichen Allelen begünstigen und *csd* auf diese Weise posttranslational aktivieren.

## 4.4 Modell der Geschlechtsbestimmungskaskade von *A. mellifera*

### 4.4.1 Das Schlüsselgen *csd* erzeugt das initiale Signal der weiblichen Regulationskaskade und reguliert ein wichtiges Schaltergen

Die obligate Heterozygotie am weiblichen Geschlechtsbestimmungslokus, die Schalterfunktion in der weiblichen Regulationskaskade, das Auftreten allelischer Varianten, die Absenz geschlechtsspezifischer Spleißvarianten und die prognostizierte SR-Typ-Eigenschaft machen *csd* zum Kandidatengen für die molekulare Entscheidungsfindung in der Geschlechtsbestimmungskaskade der Honigbiene. Gene mit einer übergeordneten Schalterfunktion, deren Aktivitätsstatus über die Initiation eines komplexen Regulationswegs mit weitreichenden Konsequenzen wie die Geschlechtsbestimmung entscheidet, werden als Schlüsselgene (key genes) bezeichnet (Schütt & Nöthiger 2000). In seiner durch den heterozygoten Allelzustand verursachten aktiven Form weist *csd* mit der Erzeugung des initialen Signals und der Regulation eines wichtigen Schaltergens eine Doppelfunktion auf, die seine Bezeichnung als Schlüsselgen der Geschlechtsbestimmung von *A. mellifera* rechtfertigen.

In dem hier vorgestellten Modell der Geschlechtsbestimmungskaskade (Abb. 4.1) ist *csd* als initiales Signal auf posttranslationeller Ebene aktiv und reguliert das geschlechtsspezifische Spleißen der prä-mRNA von *tra-like* oder einem anderen nachgeschalteten Gen posttranskriptionell. Die RS-Domänen könnten eine Protein-Protein-Interaktion zwischen CSD-Proteinen begünstigen und auf diese Weise das initiale Signal in Form einer noch zu bestimmenden funktionellen Proteinkomplementation erzeugen. Der auf diese Weise aktivierte CSD-Komplex könnte die Bildung eines Spleißregulationskomplexes vermitteln und damit das initiale Signal auf ein nachgeschaltetes Gen weiterleiten. Da CSD kein RRM aufweist, wäre bei diesem Modell ein zusätzlicher Spleißregulator mit RRM erforderlich, der den Spleißregulationskomplex an das Zielgen bindet.

Im Falle der Honigbiene *Apis mellifera* ist das Schlüsselgen der Geschlechtsbestimmung mit dem initialen Signal identisch. Für die Taufliege *Drosophila melanogaster*, die Mittelmeerfruchtfliege *Ceratitis capitata* und die Stubenfliege *Musca domestica* trifft dies jedoch nicht zu. Das initiale Signal der Geschlechtsbestimmung von *D. melanogaster* wird durch das in männlichen und weiblichen Genotypen unterschiedliche Verhältnis von Numeratorgenen auf dem X-Chromosom zu Denominatorgenen auf dem Autosom erzeugt, das auf transkriptioneller Ebene die geschlechtsspezifischen Transkripte des Schlüsselgens *Sex-lethal (Sxl)* und damit dessen Aktivitätsstatus reguliert (Parkhurst *et al.* 1990; Parkhurst & Ish-Horowicz 1992; Estes

*et al.* 1995). Aktives SXL kontrolliert auf posttranskriptioneller Ebene das geschlechtsspezifische Spleißen seiner eigenen Transkripte (Deshpande *et al.* 1996), der Transkripte von *male-specific lethal-2 (msl-2)* (Kelley *et al.* 1995; Bashaw & Baker 1997) und der Transkripte von *transformer (tra)* (Boggs *et al.* 1987; Sosnowski *et al.* 1989). Die autoregulatorische Aufrechterhaltung des Signals und die Regulation von zwei Schaltergenen an der Spitze verschiedener Regulationskaskaden (Dosiskompensation und Soma) machen *Sxl* zum Schlüsselgen der Geschlechtsbestimmung von *D. melanogaster*, das seinerseits von einem polygenen initialen Signal reguliert wird. Das Schlüsselgen der Geschlechtsbestimmung von *C. capitata* und *M. domestica* (*Cctransformer* bzw. *Feminizer*) ist mit dem initialen Signal ('Masculinizer'-Faktor) dieser Taxa ebenfalls nicht identisch. In *A. mellifera* ist dagegen initiales Signal und Schlüsselgen in Form von *csd* vereint, das zu den Genen des X:A-Signals keine Sequenz-, Struktur- und Funktionshomologie aufweist.

#### 4.4.2 Das Schaltergen *tra-like* wird posttranskriptionell reguliert und ist selbst ein Spleißregulator

Im Embryonalstadium der Honigbiene tritt die männliche Spleißvariante *tra-like*<sup>M</sup> in beiden Geschlechtern auf, die weibliche Spleißvariante *tra-like*<sup>F</sup> dagegen nur in weiblichen Genotypen. In dem hier vorgestellten Modell ist der männliche Spleißmodus voreingestellt, während der weibliche Spleißmodus aktiv erzeugt werden muss. Das Gen *tra-like* steht trotz seiner Schalterfunktion nicht an der Spitze der Geschlechtsbestimmungskaskade von *A. mellifera*, sondern wird auf posttranskriptioneller Ebene durch mindestens ein übergeordnetes Gen reguliert, dessen Produkt im aktiven Zustand die weibliche Spleißvariante *tra-like*<sup>F</sup> begünstigt. In *D. melanogaster* ist *Sxl* das posttranskriptionelle Regulatorgen für *tra* (Sosnowski *et al.* 1989), während in *A. mellifera* der initiale Signalgeber *csd*, dessen Transkripte bereits in der frühen Embryonalphase nachweisbar sind (Beye *et al.* 2003), ein plausibler Kandidat für das Regulatorgen von *tra-like* ist.

In der Modellvorstellung kodiert die durch aktives *csd* regulierte weibliche Spleißvariante *tra-like*<sup>F</sup> für ein aktives Protein, das dem SR-Typ angehört. Damit stellt TRA-LIKE<sup>F</sup> selbst einen putativen Spleißregulator dar, der ein oder mehrere nachgeschaltete Gene auf posttranskriptioneller Ebene kontrollieren könnte. Da TRA-LIKE<sup>F</sup> kein RRM aufweist, wäre auch auf dieser Stufe der Kaskade in dem von TRA-LIKE<sup>F</sup> als Aktivator vermittelten Spleißregulationskomplex ein zusätzlicher Spleißregulator mit RRM notwendig, der den Spleißregulationskomplex an das Zielgen bindet. Ein potentielles Zielgen von *tra-like* ist *Amdsx*, ein Sequenz-

und Struktur-Orthologon zu *doublesex (dsx)* in *D. melanogaster*, das auch in der Honigbiene in geschlechtsspezifischen Spleißvarianten vorliegt (Daten nicht publiziert).

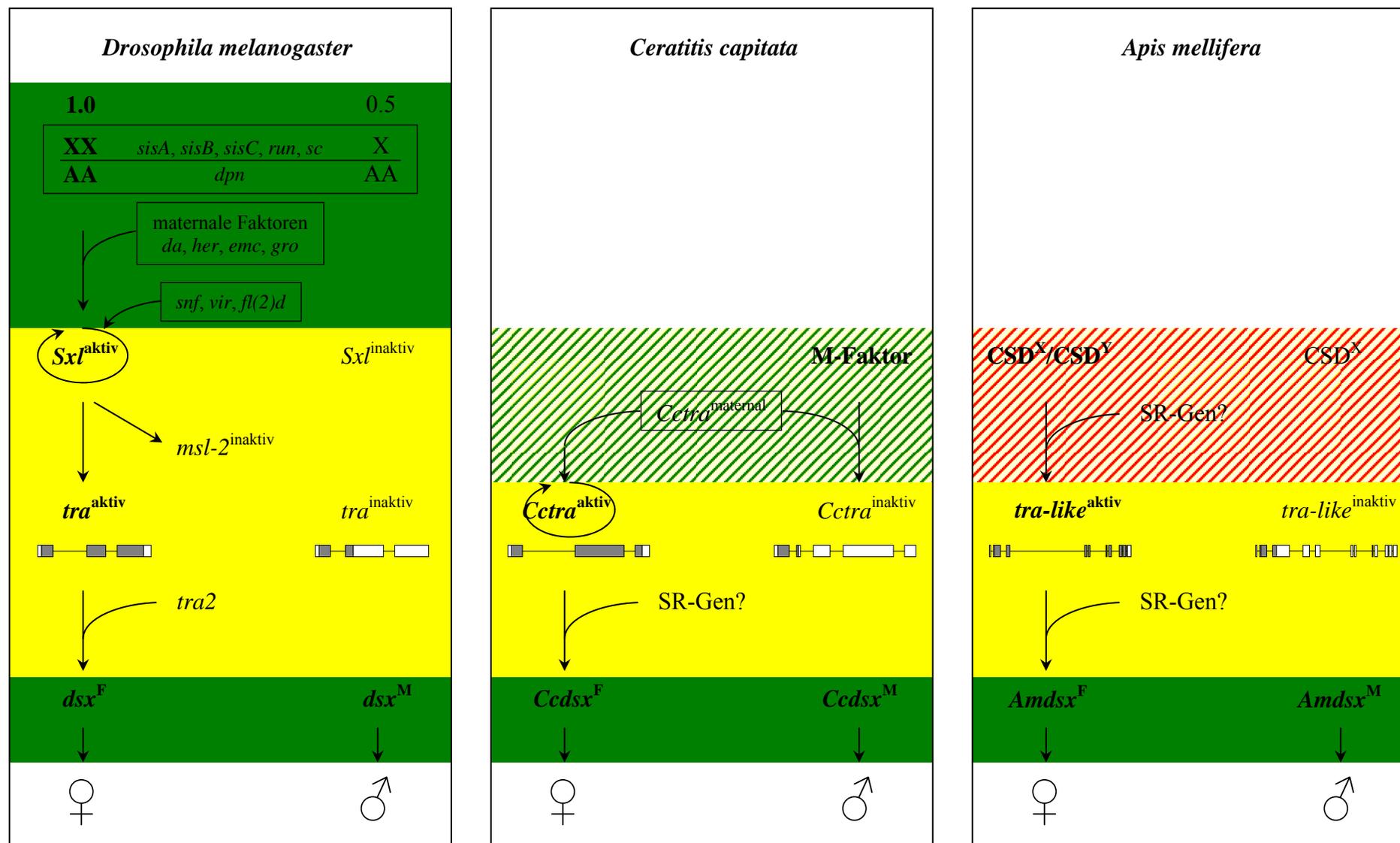
#### 4.4.3 Aufrechterhaltung des Signals?

Die vorliegenden Daten und das daraus abgeleitete Modell der Geschlechtsbestimmungskaskade in der Honigbiene können keine Auskunft darüber geben, wie und auf welcher Stufe der Kaskade das geschlechtsbestimmende Signal aufrechterhalten wird. Ein autoregulatorischer Mechanismus zur Aufrechterhaltung wäre auf einer Stufe mit geschlechtsspezifischen Spleißvarianten vorstellbar, wie er in *D. melanogaster* auf der Stufe von *Sxl* und in *C. capitata* auf der Stufe von *Cctra* vorkommt (s. Abschnitt 4.5).

Sollte *csd* nur während eines begrenzten Zeitraums aktiv sein und nur ein transientes initiales Signal erzeugen, wäre der von ihm generierte Vorrat an *tra-like*<sup>F</sup>-Transkripten endlich. In der Folge müsste das an *tra-like*<sup>F</sup> übermittelte Signal entweder von *tra-like*<sup>F</sup> aufrechterhalten werden, eine Vorstellung, die durch die nachgewiesene Schalterfunktion von *tra-like* unterstützt wird, oder durch ein unbekanntes drittes Gen, das dann ebenfalls eine Schalterfunktion aufweisen müsste. Im ersten Fall könnte aktives *csd* einen Autoregulationszyklus von *tra-like*<sup>F</sup> initiieren, indem die durch aktives *csd* erzeugten *tra-like*<sup>F</sup>-Transkripte den weiblichen Spleißmodus der eigenen prä-mRNA begünstigen und damit weitere *tra-like*<sup>F</sup>-Transkripte erzeugen. Zu dem Modell einer zeitlich limitierten Aktivität von *csd* mit anschließender Autoregulation von *tra-like*<sup>F</sup> passt die Beobachtung, dass nach der embryonalen Repression von *tra-like* der männliche Regulationsweg dauerhaft eingeschlagen wird, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass nach Störung der Autoregulationsschleife die weibliche Spleißvariante *tra-like*<sup>F</sup> nicht mehr etabliert werden kann.

Sollte *csd* dagegen permanent aktiv sein und ein permanentes initiales Signal erzeugen, würde es beständig *tra-like*<sup>F</sup> generieren und auf diese Weise die Aufrechterhaltung des Signals selbst gewährleisten. Für eine permanente Aktivität des *csd*-Gens spricht, dass seine Transkripte und Proteine während der gesamten Embryonalphase nachweisbar sind.

Abbildung 4.1. Vergleichende Darstellung ausgewählter Elemente der Geschlechtsbestimmungskaskade von *Drosophila melanogaster*, *Ceratitis capitata* und *Apis mellifera*. Geschlechtsspezifisch aktive Zustände sind fett gedruckt. Gene in grün unterlegten Bereichen regulieren auf Transkriptionsebene, Gene in gelb unterlegten Bereichen regulieren auf Posttranskriptionsebene. Der M-Faktor von *C. capitata* ist noch nicht charakterisiert und könnte *Cctra* sowohl auf transkriptioneller als auch posttranskriptioneller Ebene inhibieren. Der Allelzustand des Gens *csd* von *A. mellifera* wird auf posttranslationeller Ebene (rote Schraffur) aktiviert und reguliert *tra-like* auf posttranskriptioneller Ebene. Erläuterungen zu den einzelnen Stufen und Elementen der Kaskaden siehe Text. SR-Gen, Gen, das für einen Spleißregulator mit RRM kodiert. Modell von *D. melanogaster* modifiziert nach Schütt & Nöthiger, 2000; Modell von *C. capitata* modifiziert nach Pane *et al.*, 2002.



#### 4.5 Die Modelle der Geschlechtsbestimmung der Insekten konvergieren auf der Stufe der *transformer*-orthologen Gene

Vergleicht man das für die Honigbiene aufgestellte Modell der Geschlechtsbestimmung mit den Modellen anderer Insekten (Abb. 4.1) fällt zunächst auf, dass die Gene des X:A-Signals und das Schlüsselgen *Sex lethal (Sxl)* von *D. melanogaster* in der geschlechtsbestimmenden Regulationskaskade von *A. mellifera*, *C. capitata* und *M. domestica* keine Rolle spielen, während auf der Stufe des terminalen Doppel-Schaltergens *doublesex (dsx)* die *dsx*-orthologen Gene in *A. mellifera*, *C. capitata* und *M. domestica* konserviert sind. Eine weitere Gemeinsamkeit aller Regulationskaskaden besteht darin, dass der männliche Regulationsweg voreingestellt ist und mit Ausnahme von *dsx* die männlichen Zustände der Kaskadenelemente inaktiv sind, während der weibliche Regulationsweg bzw. die weiblichen Zustände der Kaskadenelemente aktiv erzeugt werden müssen und selbst aktiv sind.

Das initiale Signal von *A. mellifera* ist der heterozygote Allelzustand des Gens *complementary sex determiner (csd)*, das auf posttranslationeller Ebene aktiviert wird und das nachgeschaltete Schaltergen *transformer-like (tra-like)* posttranskriptionell reguliert. Dieses initiale Signal unterscheidet sich grundlegend sowohl von dem initialen Signal von *C. capitata* und *M. domestica*, wo ein M-Faktor in männlichen Genotypen das maternal vererbte aktive Transkript des *transformer*-Orthologons transkriptionell oder posttranskriptionell inhibiert (Dübendorfer & Hediger 1998; Dübendorfer *et al.* 2002; Pane *et al.* 2002), als auch dem initialen Signal von *D. melanogaster*, wo das Verhältnis von Numerator- zu Denominatorgenen die geschlechtsspezifische Expression von *Sxl* auf Transkriptionsebene reguliert (Parkhurst *et al.* 1990; Parkhurst & Ish-Horowicz 1992; Estes *et al.* 1995). Die autoregulatorische Aufrechterhaltung des initialen Signals erfolgt in *D. melanogaster* auf der Stufe von *Sxl* (Bell *et al.* 1991) und in *C. capitata* und *M. domestica* auf der Stufe von *Cctransformer (Cctra)* bzw. *Feminizer (F)* (Pane *et al.* 2002; Burghardt *et al.* 2005). Für die Honigbiene kann bezüglich der Aufrechterhaltung des initialen Signals noch keine Aussage getroffen werden.

Die auf so unterschiedliche Weise initiierten Geschlechtsregulationskaskaden der Insekten konvergieren auf der Stufe der *transformer*-orthologen Gene, die mit ihrer RS-Domäne und prolinreichen Region strukturell und möglicherweise auch funktionell in *A. mellifera* (*tra-like*), *C. capitata* (*Cctra*) und *D. melanogaster* (*tra*) konserviert sind.

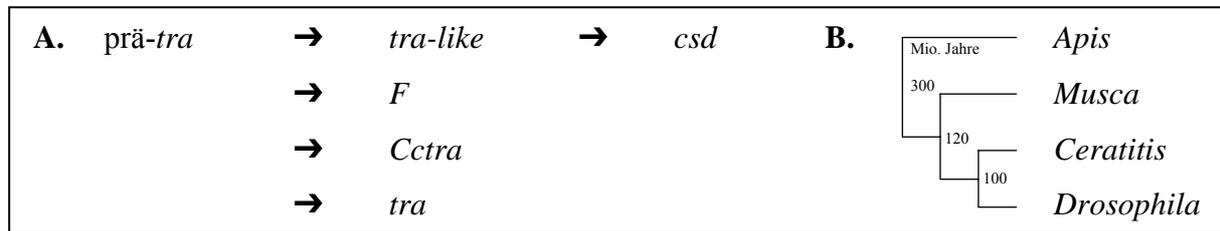
#### 4.6 Die *transformer*-orthologen Gene weisen eine hohe Evolutionsrate und ein bedeutendes plastisches Potential auf

Die geschlechtsbestimmenden Gene *tra-like* und *csd* von *A. mellifera* teilen wichtige Protein-domänen und möglicherweise auch die Spleißregulator-Funktion mit den *tra*-orthologen Genen von *D. melanogaster* und *C. capitata*, zeigen in ihrer Sequenz jedoch keine signifikante Ähnlichkeit. Dieser Befund relativiert sich vor der Tatsache, dass das Gen *transformer* (*tra*) bereits zwischen verschiedenen Arten der Gattung *Drosophila* eine hohe Sequenzdivergenz aufweist (O'Neil & Belote 1992). Die geringen Aminosäureidentitäten von TRA-Proteinen nahe verwandter *Drosophila*-Arten und verschiedener Zuchtlinien einer Art demonstrieren eine hohe Evolutionsgeschwindigkeit von *tra* (McAllister & McVean 2000; Kulathinal *et al.* 2003). Die eng verwandten Arten *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mauritiana* und *D. sechellia* spalteten sich vor etwa 3 bis 0.5 Millionen Jahren auf. Zwischen diesen Arten schwankt der Umfang des TRA-Proteins aufgrund von Tandem-Duplikationen zwischen 184 und 258 Aminosäuren, während der Anteil der SR-/RS-Dipeptide am Gesamtprotein mit Werten zwischen 15.5% und 19.2% relativ konstant bleibt (Kulathinal *et al.* 2003). Dieser Befund könnte ein Hinweis darauf sein, dass lediglich der Anteil der SR-/RS-Dipeptide, die in der RS-Domäne als Vermittler des TRA/TRA2-Spleißregulationskomplexes ein wichtiges Funktionsmerkmal des TRA-Proteins darstellen, selektiven Beschränkungen unterliegt, während die Sequenz der RS-Domäne nicht notwendig konserviert ist.

Die Aufspaltung von *D. melanogaster* und *C. capitata* erfolgte vor etwa 100 Millionen Jahren (Beverley & Wilson 1984). Das TRA-Protein und das CcTRA-Protein weisen eine Aminosäureidentität von nur 17.9% auf, und dennoch kann CcTRA in transgenen *tra*-Nullmutanten von *D. melanogaster* TRA bei der Spleißregulation von *dsx* und *fru* funktionell ersetzen (Pane *et al.* 2005). Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis darauf, dass bei der Evolution der *tra*-orthologen Gene ein funktioneller Anteil an SR-/RS-Dipeptiden und Prolin-Monopeptiden, nicht jedoch eine spezifische Sequenz dieser Domänen selektiert wurde.

Die Evolution der Hymenoptera und Diptera verläuft seit etwa 300 Millionen Jahren getrennt (Grimaldi & Engel 2005). In Anbetracht der bereits innerhalb der Diptera hohen Sequenzdivergenz der *tra*-orthologen Gene ist es nicht überraschend, dass die paralogenen Gene *tra-like* und *csd* von *A. mellifera* zwar keine Sequenzhomologie zu den *tra*-orthologen Genen der Diptera aufweisen, jedoch eine struktur- und möglicherweise auch funktionsorthologe RS-Domäne und prolinreiche Region mit diesen Genen teilen (Abb. 4.2).

Abbildung 4.2. Modell der Evolution von *transformer*-orthologen Genen. **A.** Aus einem Vorläufergen (prä-*tra*) entwickelten sich in den verschiedenen Insektentaxa unterschiedliche *tra*-orthologe Gene, die strukturell und funktionell, nicht jedoch in ihrer Sequenz konserviert sind. In *Apis mellifera* führte die Duplikation eines *tra*-orthologen Gens zu den paralogenen Genen *tra-like* und *csd*. **B.** Evolutive Distanzen ausgewählter Gattungen der Hymenoptera und Diptera, die *tra*-orthologe Gene aufweisen.



Nach dem sogenannten ‘Bottom-up’-Modell werden in der Evolution von Regulationskaskaden die Gene in der Reihenfolge von unten nach oben rekrutiert (Wilkins 1995). Am unteren Ende der Regulationskaskade befinden sich die älteren Gene mit konservierter Funktion, während am oberen Ende der Kaskade die jüngeren Gene mit neuer Funktion liegen. Neu rekrutierte Gene an der Spitze der Kaskade regulieren konservierte Gene am Ende der Kaskade. Dieses Modell impliziert, dass mono- oder oligoregulative Genbausteine an der Spitze einer Kaskade leichter durch einen anderen Genbaustein ersetzt werden können als vielfältig vernetzte Genbausteine am Ende einer Kaskade.

In den hier vorgestellten Modellen der Geschlechtsbestimmungskaskade der Insekten ist neben dem terminalen Schaltergen *dsx* auch ein oberhalb von *dsx* lokalisiertes Schaltergen in Form eines *tra*-orthologen Gens konserviert, das eine Funktion als Spleißregulator mit RS-Domäne und prolinreicher Region aufweist. Im Gegensatz zu *dsx*, dessen Sequenz und Struktur in allen *dsx*-orthologen Genen konserviert ist, sind die *tra*-orthologen Gene in der Regulationskaskade der Insekten strukturell und funktionell, nicht jedoch in ihrer Sequenz konserviert.

In Übereinstimmung mit dem ‘Bottom-up’-Modell wurde in der Honigbiene nach der Duplikation eines *tra*-orthologen Gens das Gen *csd* als neues Schaltergen an der Spitze der Regulationskaskade rekrutiert, das mit der allelischen Komplementierung eine Neofunktionalisierung erfuhr und damit einen neuen Mechanismus der Geschlechtsbestimmung etablieren konnte. Die Neofunktionalisierung von *csd* zeigt sich in der Ausbildung einer Vielzahl von Allelvarianten, die in Form des heterozygoten Allelzustands aktiviert werden. Funktionelle Allele von *csd* könnten dabei durch Sequenzvarianten und insbesondere die hypervariable Region, die einen vollständigen Neuerwerb des *csd*-Gens darstellt, spezifiziert werden. Andererseits behielt *csd* als Spleißregulator eines nachgeschalteten Gens die konservierte Funktion der *tra*-orthologen Gene bei, während im Fall seines ursprünglicheren Schwestergens *tra-like*

nicht nur die Funktion als Spleißregulator, sondern auch die Aktivierung durch geschlechtsspezifische Spleißvarianten konserviert ist.

Zusammen mit der hohen Evolutionsrate belegen die unterschiedlichen Arten der Aktivierung und Regulation eine bemerkenswerte Plastizität der *tra*-orthologen Gene in den Geschlechtsbestimmungskaskaden der Insekten (Tab. 4.1). Infolge der selektierten RS- und prolinreichen Domänen weisen alle *tra*-orthologen Gene eine Funktion als Spleißregulator auf. Während jedoch *csd* durch den heterozygoten Allelzustand aktiviert wird, werden die übrigen *tra*-orthologen Gene durch geschlechtsspezifische Spleißvarianten aktiviert. Von diesen wiederum regulieren *Cctra*, *F* und möglicherweise auch *tra-like* ihre aktiven Spleißvarianten über eine autoregulatorische Schleife, während die aktive Spleißvariante von *tra* durch *Sxl* fremdreguliert wird.

Tabelle 4.1. Eigenschaften von *transformer*-orthologen Genen der Hymenoptera und Diptera hinsichtlich ihrer Aktivierung und Regulation in der Geschlechtsbestimmungskaskade.

Gen	heterozygote Allelvarianten	geschlechtsspezifische Spleißvarianten	Autoregulation
<i>csd</i>	+	–	?
<i>tra-like</i>	–	+	?
<i>F</i>	–	+ (D. Bopp, mündl. Mitt.)	+ (Burghardt <i>et al.</i> 2005)
<i>Cctra</i>	–	+ (Pane <i>et al.</i> 2002)	+ (Pane <i>et al.</i> 2002)
<i>tra</i>	–	+ (Boggs <i>et al.</i> 1987)	–

## 5 Zusammenfassung

Die komplementäre Geschlechtsbestimmung der Honigbiene bringt bei homozygotem Allelzustand am Geschlechtsbestimmungsloкус männliche Tiere, bei heterozygotem Allelzustand weibliche Tiere hervor. In der vorliegenden Arbeit wurde der Geschlechtsbestimmungsloкус (SDL) der Honigbiene vollständig isoliert und die dort kodierten Gene strukturell und funktionell charakterisiert. Die genomische Region des SDL umfasst minimal ~36 kb, maximal ~48 kb und enthält fünf Gene: *GB11211*, *GB13727*, *tra-like*, *csd* und *GB30480*. *GB11211* und *GB13727* zeigen signifikante Sequenzähnlichkeiten zu nicht näher bekannten Genen anderer Insekten, die übrigen SDL-Gene besitzen keine signifikante Sequenzähnlichkeit zu Genen anderer Organismen. Die SDL-Gene *transformer-like (tra-like)* und *complementary sex determiner (csd)* weisen in einer Kreuzung eine Aminosäureidentität von durchschnittlich 75.4 % auf und tragen Signaturen von Duplikation. Von fünf SDL-Genen besitzen nur *tra-like* und *csd* eine nachweisbare Funktion in der frühembryonalen Geschlechtsbestimmung des Somas und der Keimzellen. Die embryonale Repression von *tra-like* und *csd* durch RNA-Interferenz führte in weiblichen Genotypen zu einem männlich differenzierten Soma und zu männlich differenzierten Keimzellen, während die embryonale Repression dieser Gene in männlichen Genotypen keinen phänotypischen Effekt bewirkte. *tra-like* zeigt in embryonalen Transkripten geschlechtsspezifische Spleißvarianten, wobei das weibliche Transkript nur in weiblichen Genotypen, das männliche Transkript dagegen in beiden Geschlechtern auftritt und gegenüber dem weiblichen Transkript einen deutlich verkürzten ORF aufweist. In einer Kreuzung segregieren unterschiedliche Allele von *csd*, die sich neben singulären Aminosäureunterschieden vor allem in der hypervariablen Region (HVR) unterscheiden, deren repetitives NY-Motiv eine Längendifferenz der verschiedenen Allele verursacht und möglicherweise funktionelle Allele spezifiziert. Das Haupt-Schaltergen *csd* und das Schaltergen *tra-like* kodieren für Proteine, die zwei RS-Domänen und eine C-terminale prolinreiche Region aufweisen und als SR-Typ-Proteine eine Funktion als Spleißregulator haben könnten. In der Modellvorstellung wird das CSD-Protein posttranslational und das TRA-LIKE<sup>F</sup>-Protein posttranskriptionell aktiviert. Die Modelle der Geschlechtsbestimmungskaskaden der Insekten haben die Voreinstellung des männlichen Regulationswegs gemein und konvergieren bei unterschiedlichen initialen Signalen auf der Stufe der *transformer*-orthologen Gene. Die *tra*-orthologen Gene der Insekten sind strukturell und funktionell konserviert, zeigen jedoch eine hohe Evolutionsrate und bedingt durch unterschiedliche Arten der Aktivierung und Regulation ein hohes plastisches Potential.

## 6 Literatur

- Adams, J., E. D. Rothman, W. E. Kerr, and Z. L. Paulino, 1977 Estimation of the number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics* **86**: 583-596.
- Albrecht, E. B., and H. K. Salz, 1993 The *Drosophila* sex determination gene *snf* is utilized for the establishment of the female-specific splicing pattern of *Sex-lethal*. *Genetics* **134**: 801-807.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, 1990 Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang *et al.* 1997 Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Amrein, H., M. Gorman, and R. Nothiger, 1988 The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein. *Cell* **55**: 1025-1035.
- Amrein, H., M. L. Hedley, and T. Maniatis, 1994 The role of specific protein-RNA and protein-protein interactions in positive and negative control of pre-mRNA splicing by Transformer 2. *Cell* **76**: 735-746.
- An, W., S. Cho, H. Ishii, and P. C. Wensink, 1996 Sex-specific and non-sex-specific oligomerization domains in both of the doublesex transcription factors from *Drosophila melanogaster*. *Mol.Cell Biol.* **16**: 3106-3111.
- Baker, B. S., 1989 Sex in flies: the splice of life. *Nature* **340**: 521-524.
- Baldo, A. M., and M. A. McClure, 1999 Evolution and horizontal transfer of dUTPase-encoding genes in viruses and their hosts. *J.Virol.* **73**: 7710-7721.
- Bandziulis, R. J., M. S. Swanson, and G. Dreyfuss, 1989 RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.* **3**: 431-437.
- Barbash, D. A., and T. W. Cline, 1995 Genetic and molecular analysis of the autosomal component of the primary sex determination signal of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **141**: 1451-1471.
- Bashaw, G. J., and B. S. Baker, 1997 The regulation of the *Drosophila* *msl-2* gene reveals a function for *Sex-lethal* in translational control. *Cell* **89**: 789-798.
- Bell, L. R., J. I. Horabin, P. Schedl, and T. W. Cline, 1991 Positive autoregulation of *sex-lethal* by alternative splicing maintains the female determined state in *Drosophila*. *Cell* **65**: 229-239.
- Bell, L. R., E. M. Maine, P. Schedl, and T. W. Cline, 1988 *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. *Cell* **55**: 1037-1046.

- Beverley, S. M., and A. C. Wilson, 1984 Molecular evolution in *Drosophila* and the higher Diptera II. A time scale for fly evolution. *J.Mol.Evol.* **21**: 1-13.
- Beye, M., 2004 The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *BioEssays* **26**: 1131-1139.
- Beye, M., R. H. Crozier, Y. C. Crozier, and R. F. A. Moritz, 1996 Mapping the sex locus of the honeybee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* **83**: 424-426.
- Beye, M., S. Hartel, A. Hagen, M. Hasselmann, and S. W. Omholt, 2002 Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Mol.Biol.* **11**: 527-532.
- Beye, M., M. Hasselmann, M. K. Fondrk, R. E. Page, and S. W. Omholt, 2003 The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* **114**: 419-429.
- Beye, M., G. J. Hunt, R. E. Page, M. K. Fondrk, L. Grohmann *et al.* 1999 Unusually High Recombination Rate Detected in the Sex Locus Region of the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Genetics* **153**: 1701-1708.
- Beye, M., R. F. A. Moritz, and C. Epplen, 1994 Sex linkage in the honeybee *Apis mellifera* detected by multilocus DNA fingerprinting. *Naturwissenschaften* **81**: 460-462.
- Bingham, P. M., T. B. Chou, I. Mims, and Z. Zachar, 1988 On/off regulation of gene expression at the level of splicing. *Trends Genet.* **4**: 134-138.
- Blencowe, B. J., J. A. Bowman, S. McCracken, and E. Rosonina, 1999 SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. *Biochem.Cell Biol.* **77**: 277-291.
- Blencowe, B. J., R. Issner, J. A. Nickerson, and P. A. Sharp, 1998 A coactivator of pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* **12**: 996-1009.
- Boggs, R. T., P. Gregor, S. Idriss, J. M. Belote, and M. McKeown, 1987 Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the transformer gene. *Cell* **50**: 739-747.
- Burghardt, G., M. Hediger, C. Siegenthaler, M. Moser, A. Dübendorfer *et al.* 2005 The transformer2 gene in *Musca domestica* is required for selecting and maintaining the female pathway of development. *Dev.Genes Evol.* **215**: 165-176.
- Burtis, K. C., and B. S. Baker, 1989 *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* **56**: 997-1010.
- Burtis, K. C., K. T. Coschigano, B. S. Baker, and P. C. Wensink, 1991 The doublesex proteins of *Drosophila melanogaster* bind directly to a sex-specific yolk protein gene enhancer. *EMBO J.* **10**: 2577-2582.
- Butler, B., V. Pirrotta, I. Irminger-Finger, and R. Nothiger, 1986 The sex-determining gene tra of *Drosophila*: molecular cloning and transformation studies. *EMBO J.* **5**: 3607-3613.

- Cabrera, C. V., and M. C. Alonso, 1991 Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *EMBO J.* **10**: 2965-2973.
- Charlesworth, B., and C. H. Langley, 1989 The population genetics of *Drosophila* transposable elements. *Annu.Rev.Genet.* **23**: 251-287.
- Cho, S., and P. C. Wensink, 1997 DNA binding by the male and female doublesex proteins of *Drosophila melanogaster*. *J.Biol.Chem.* **272**: 3185-3189.
- Cline, T. W., 1988 Evidence that sisterless-a and sisterless-b are two of several discrete "numerator elements" of the X/A sex determination signal in *Drosophila* that switch Sxl between two alternative stable expression states. *Genetics* **119**: 829-862.
- Cline, T. W., and B. J. Meyer, 1996 Vive la Difference: Males vs females in flies vs worms. *Annu.Rev.Genet.* **30**: 637-702.
- Cook, J. M., 1993 Sex determination in the hymenoptera: A review of models and evidence. *Heredity (Edinburgh)* **71**: 421-435.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, and S. Falkow, 1996 FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.
- Cronmiller, C., P. Schedl, and T. W. Cline, 1988 Molecular characterization of daughterless, a *Drosophila* sex determination gene with multiple roles in development. *Genes Dev.* **2**: 1666-1676.
- Deshpande, G., M. E. Samuels, and P. D. Schedl, 1996 Sex-lethal interacts with splicing factors in vitro and in vivo. *Mol.Cell Biol.* **16**: 5036-5047.
- Deshpande, G., J. Stuke, and P. Schedl, 1995 *scute (sis-b)* function in *Drosophila* sex determination. *Mol.Cell.Biol.* **15**: 4430-4440.
- Dübendorfer, A., and M. Hediger, 1998 The female-determining gene F of the housefly, *Musca domestica*, acts maternally to regulate its own zygotic activity. *Genetics* **150**: 221-226.
- Dübendorfer, A., M. Hediger, G. Burghardt, and D. Bopp, 2002 *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *Int.J.Dev.Biol.* **46**: 75-79.
- Duffy, J. B., and J. P. Gergen, 1991 The *Drosophila* segmentation gene runt acts as a position-specific numerator element necessary for the uniform expression of the sex-determining gene Sex-lethal. *Genes Dev.* **5**: 2176-2187.
- Erdman, S. E., H. J. Chen, and K. C. Burtis, 1996 Functional and genetic characterization of the oligomerization and DNA binding properties of the *Drosophila* doublesex proteins. *Genetics* **144**: 1639-1652.
- Erickson, J. W., and T. W. Cline, 1993 A bZIP protein, sisterless-a, collaborates with bHLH transcription factors early in *Drosophila* development to determine sex. *Genes Dev.* **7**: 1688-1702.

- Estes, P. A., L. N. Keyes, and P. Schedl, 1995 Multiple response elements in the Sex-lethal early promoter ensure its female-specific expression pattern. *Mol.Cell Biol.* **15**: 904-917.
- Evans, D. S., and T. W. Cline, 2006 D. melanogaster male somatic cells feminized solely by TRAF can collaborate with female germ cells to make functional eggs. *Genetics* .
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver *et al.* 1998 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Fu, X. D., 1995 The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* **1**: 663-680.
- Fu, X. D., and T. Maniatis, 1990 Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature* **343**: 437-441.
- Goodfellow, P. N., and R. Lovell-Badge, 1993 *Sry* and sex determination in mammals. *Annu.Rev.Genet.* **27**: 71-92.
- Goralski, T. J., J. E. Edstrom, and B. S. Baker, 1989 The sex determination locus transformer-2 of *Drosophila* encodes a polypeptide with similarity to RNA binding proteins. *Cell* **56**: 1011-1018.
- Granadino, B., J. A. San, P. Santamaria, and L. Sanchez, 1992 Evidence of a dual function in fl(2)d, a gene needed for Sex-lethal expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **130**: 597-612.
- Graveley, B. R., 2000 Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*. **6**: 1197-1211.
- Grimaldi D., and M. S. Engel, 2005 *Evolution of the insects*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hall, T. A., 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl.Acids.Symp.Ser.* **41**: 95-98.
- Hannon, G. J., 2002 RNA interference. *Nature* **418**: 244-251.
- Hasselmann, M., and M. Beye, 2004 Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 4888-4893.
- Hasselmann, M., and M. Beye, 2006 Pronounced differences of recombination activity at the sex determination locus of the honeybee, a locus under strong balancing selection. *Genetics* **174**: 1469-1480.
- Hasselmann, M., M. K. Fondrk, R. E. Page, and M. Beye, 2001 Fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insect Mol.Biol.* **10**: 605-608.
- Hastings, M. L., and A. R. Krainer, 2001 Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr.Opin.Cell Biol.* **13**: 302-309.

- Hediger, M., G. Burghardt, C. Siegenthaler, N. Buser, D. Hilfiker-Kleiner *et al.* 2004 Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator doublesex. *Dev. Genes Evol.* **214**: 29-42.
- Hilfiker, A., H. Amrein, A. Dübendorfer, R. Schneiter, and R. Nothiger, 1995 The gene virilizer is required for female-specific splicing controlled by Sxl, the master gene for sexual development in *Drosophila*. *Development* **121**: 4017-4026.
- Hinson, S., and R. N. Nagoshi, 1999 Regulatory and functional interactions between the somatic sex regulatory gene transformer and the germline genes ovo and ovarian tumor. *Development* **126**: 861-871.
- Holland, P. W., 1999 Gene duplication: past, present and future. *Semin. Cell Dev. Biol.* **10**: 541-547.
- Hoshijima, K., A. Kohyama, I. Watakabe, K. Inoue, H. Sakamoto *et al.* 1995 Transcriptional regulation of the Sex-lethal gene by helix-loop-helix proteins. *Nucleic Acids Res.* **23**: 3441-3448.
- Hunt, G. J., and R. E. Page, 1994 Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*). *Mol. Gen. Genet.* **244**: 512-518.
- Hunt, G. J., and R. E. Jr. Page, 1995 Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* **139**: 1371-1382.
- Kelley, R. L., I. Solovyeva, L. M. Lyman, R. Richman, V. Solovyev *et al.* 1995 Expression of msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*. *Cell* **81**: 867-877.
- Keyes, L. N., T. W. Cline, and P. Schedl, 1992 The primary sex determination signal of *Drosophila* acts at the level of transcription. *Cell* **68**: 933-943.
- Kramer, S. G., T. M. Jinks, P. Schedl, and J. P. Gergen, 1999 Direct activation of Sex-lethal transcription by the *Drosophila* runt protein. *Development* **126**: 191-200.
- Kulathinal, R. J., L. Skwarek, R. A. Morton, and R. S. Singh, 2003 Rapid Evolution of the Sex-Determining Gene, transformer: Structural Diversity and Rate Heterogeneity Among Sibling Species of *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 441-452.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei, 2001 MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* **17**: 1244-1245.
- Li, H., and P. M. Bingham, 1991 Arginine/serine-rich domains of the su(wa) and tra RNA processing regulators target proteins to a subnuclear compartment implicated in splicing. *Cell* **67**: 335-342.
- Longman, D., T. McGarvey, S. McCracken, I. L. Johnstone, B. J. Blencowe *et al.* 2001 Multiple interactions between SRm160 and SR family proteins in enhancer-dependent splicing and development of *C. elegans*. *Curr. Biol.* **11**: 1923-1933.
- Lucchesi, J. C., 1996 Dosage compensation in *Drosophila* and the 'complex' world of transcriptional regulation. *BioEssays* **18**: 541-547.

- Lynch, K. W., and T. Maniatis, 1996 Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the *Drosophila* doublesex splicing enhancer. *Genes Dev.* **10**: 2089-2101.
- Maeda, N., and O. Smithies, 1986 The evolution of multigene families: human haptoglobin genes. *Annu.Rev.Genet.* **20**: 81-108.
- Marin, I., and B. S. Baker, 1998 The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* **281**: 1990-1994.
- McAllister, B. F., and G. A. McVean, 2000 Neutral Evolution of the Sex-Determining Gene transformer in *Drosophila*. *Genetics* **154**: 1711-1720.
- Merriam, J., M. Ashburner, D. L. Hartl, and F. C. Kafatos, 1991 Toward cloning and mapping the genome of *Drosophila*. *Science* **254**: 221-225.
- O'Neil, M. T., and J. M. Belote, 1992 Interspecific comparison of the transformer gene of *Drosophila* reveals an unusually high degree of evolutionary divergence. *Genetics* **131**: 113-128.
- Ohno S., 1970 *Evolution by gene duplication*. Springer, New York.
- Omholt, S. W., A. Hagen, O. Elmholt, and S. Rishovd, 1995 A laboratory hive for frequent collection honeybee eggs. *Apidologie* **26**: 297-304.
- Otto, S. P., and P. Yong, 2002 The evolution of gene duplication, pp. 451-483 in *Homology Effects*, edited by J. Dunlap, and C.-T. Wu. Academic Press, San Diego, CA.
- Pane, A., S. A. De, G. Saccone, and C. Polito, 2005 Evolutionary conservation of *Ceratitis capitata* transformer gene function. *Genetics* **171**: 615-624.
- Pane, A., M. Salvemini, P. D. Bovi, C. Polito, and G. Saccone, 2002 The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development* **129**: 3715-3725.
- Parkhurst, S. M., D. Bopp, and D. Ish-Horowicz, 1990 X:A ratio, the primary sex-determining signal in *Drosophila*, is transduced by helix-loop-helix proteins. *Cell* **63**: 1179-1191.
- Parkhurst, S. M., and D. Ish-Horowicz, 1992 Common denominators for sex. *Curr.Biol.* **2**: 629-631.
- Paroush, Z., R. L. Finley, Jr., T. Kidd, S. M. Wainwright, P. W. Ingham *et al.* 1994 Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy- related bHLH proteins. *Cell* **79**: 805-815.
- Pultz, M. A., and B. S. Baker, 1995 The dual role of *hermaphrodite* in the *Drosophila* sex determination regulatory hierarchy. *Development* **121**: 99-111.
- Rastogi, S., and D. A. Liberles, 2005 Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC.Evol.Biol.* **5**: 28.

- Richman, A. D., and J. R. Kohn, 1999 Self-incompatibility alleles from *Physalis*: implications for historical inference from balanced genetic polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 168-172.
- Richman, A. D., M. K. Uyenoyama, and J. R. Kohn, 1996 Allelic diversity and gene genealogy at the self-incompatibility locus in the Solanaceae. *Science* **273**: 1212-1216.
- Saccone G., A. Pane, G. Testa, M. Santoro, G. de Martino *et al.* 2000 *Sex determination in medfly: a molecular approach. Area-wide control of fruitflies and other pest insects.* Penerbit USM, Penang.
- Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Schüpbach, T., 1985 Normal female germ cell differentiation requires the female X chromosome to autosome ratio and expression of sex-lethal in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **109**: 529-548.
- Schütt, C., and R. Nöthiger, 2000 Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* **127**: 667-677.
- Sequencing Consortium, 2006 Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **444**: 512-530.
- Sosnowski, B. A., J. M. Belote, and M. McKeown, 1989 Sex-specific alternative splicing of RNA from the transformer gene results from sequence-dependent splice site blockage. *Cell* **58**: 449-459.
- Staden, R., K. F. Beal, and J. K. Bonfield, 2000 The Staden package, 1998. *Methods Mol.Biol.* **132**: 115-130.
- Steinmann-Zwicky, M., 1994a Sex determination of the *Drosophila* germ line: *tra* and *dsx* control somatic inductive signals. *Development* **120**: 707-716.
- Steinmann-Zwicky, M., 1994b *Sxl* in the germline of *Drosophila*: A target for somatic late induction. *Dev.Genet.* **15**: 265-274.
- Steinmann-Zwicky, M., H. Amrein, and R. Nothiger, 1990 Genetic control of sex determination in *Drosophila*. *Adv.Genet.* **27**: 189-237.
- Steinmann-Zwicky, M., H. Schmid, and R. Nothiger, 1989 Cell-autonomous and inductive signals can determine the sex of the germ line of *drosophila* by regulating the gene *Sxl*. *Cell* **57**: 157-166.
- Takahata, N., and M. Nei, 1990 Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* **124**: 967-978.
- Takahata, N., Y. Satta, and J. Klein, 1992 Polymorphism and balancing selection at major histocompatibility complex loci. *Genetics* **130**: 925-938.

- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins, 1997 The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- Tian, M., and T. Maniatis, 1993 A splicing enhancer complex controls alternative splicing of doublesex pre-mRNA. *Cell* **74**: 105-114.
- Valcarcel, J., R. Singh, P. D. Zamore, and M. R. Green, 1993 The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of transformer pre-mRNA. *Nature* **362**: 171-175.
- Van Doren M., H. M. Ellis, and J. W. Posakony, 1991 The *Drosophila* extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes. *Development* **113**: 245-255.
- Wang, H. Y., W. Lin, J. A. Dyck, J. M. Yeakley, Z. Songyang *et al.* 1998 SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J.Cell Biol.* **140**: 737-750.
- Whiting, P. W., 1943 Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics* **28**: 365-382.
- Wilkins, A. S., 1995 Moving up the hierarchy: A hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays* **17**: 71-77.
- Wu, J. Y., and T. Maniatis, 1993 Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**: 1061-1070.
- Yeakley, J. M., H. Tronchere, J. Olesen, J. A. Dyck, H. Y. Wang *et al.* 1999 Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J.Cell Biol.* **145**: 447-455.
- Younger-Shepherd, S., H. Vaessin, E. Bier, L. Y. Jan, and Y. N. Jan, 1992 deadpan, an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator in *Drosophila* sex determination. *Cell* **70**: 911-922.
- Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk, and M. B. Roth, 1992 SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* **6**: 837-847.

## 7 Anhang

Abbildung 6.1. Vollständige genomische Sequenz des Geschlechtsbestimmungslokus (SDL). **Rote** Nukleotide indizieren die Sequenzen der Oligonukleotide, die zur Amplifizierung der Marker-Fragmente verwendet wurden. **Gelb unterlegte** Nukleotide indizieren den ORF von *GB11211*, **gelbe** Nukleotide dessen 3'UTR. **Grün unterlegte** Nukleotide indizieren den ORF von *GB13727*, **grüne** Nukleotide dessen 5'UTR. **Rosa unterlegte** Nukleotide indizieren den weiblichen ORF von *tra-like*, **rosa** Nukleotide dessen 5'UTR und 3'UTR. **Türkis unterlegte** Nukleotide indizieren das 3'-Ende des männlichen ORFs von *tra-like*, **türkise** Nukleotide den Beginn von dessen 3'UTR. **Blau unterlegte** Nukleotide indizieren den ORF von *csd*, **blaue** Nukleotide dessen 5'UTR und 3'UTR. **Rot unterlegte** Nukleotide indizieren den ORF von *GB30480*, **rote** Nukleotide dessen 3'UTR. ORF, durchgehendes Leseraster. UTR, nicht-translatierte Region.

ACATAACTTGCATAATTCTCAAGGACGAGCATAGCAAGATAATTTTATGTCCTTTAGATACATCATCTTTTTTACC  
 GACTTATGATAAGTATTTTTTAAAAATAAATATTCATCATTTAATTCCTAAATTAGCAAAAAATAAAAAACG  
 TCTTTGGAAATATTTTTTATTATCGTTGTTATAAATACAGTTATCTATATATAAACCTGTACATTTCTACTAGAATT  
 TTATCTTTCTAGTGCAGACATAAACCGATAAAAATTTTACACGATATAACATAAACAGCTACTGCTTTAACGATA  
 AAGATTTTTTAAAGTAAAAATAAAAAATATTTTCGATATTTTCGCAATCTACTAGATAATACACATTTATTTCTCTC  
 ACAAAAATTCGAATTATTGCAATTTATATAATTCTAGTCTCGAGCTAGTAACTTTTTTCGATACGAATTTCCGGAT  
 GACACTAGAAGTTCGCAAAATAAGTGGCAAAAATTCGAAGAAGAAGATTGAGGGAAAAAAAATCTCGATCGATT  
 AATAGATCGATAGATTTATCGATACAAATTGTCTCGAGAAGAAGACGAATAGGCCGAATCAGTTGGGGAAATCCA  
 AACGGTGGATATTACTTTTCTACTCCGTGATGAAACGAAGAAAACGGCGAAGCGTGAATGCATTTCTCGCGCACA  
 TCGGCCACCGTATAATTACACCTTGTACAGAGCCGCGAAAATTTGCTGCTTCTGCGATCTGCCTCTGCCTCCAT  
 AAATTCACCGCTTGGCTCGCTGCCAGCTTTATTACACCCTGACACAACGTTTTCGAGACCACCACCAGAGCC  
 GCAACACAGTTCTAGTTGAACGCGAAACAAAACCATTTCCCCCTTCGTTCTGTTATTACGTTTCTACTGTTGTTT  
 TAGAGAGACGAGGCCTTCTTCTATAGACGGCCCTATCCCCTGCTCAACTGCCATTTACTTTTGAATAAACGCTT  
 CTTTAACTAGCACGCGATAGGTGTTCTTTTTATTCTTAAAACGCTTCTCTTTGACCGTGCAACGATGGGGAGTGGGA  
 TTGTTGCTAACGTTGTTGGAACGTCATAAATTTTATAACGCGAAAAGGAAAAGAGAGATAATATTTGAGAGAACGTG  
 CGTGTA AAAATGAACGATATAGTTGGAGCAATATTTTTTAAAAAAGAAATATTTAAAAATATTATCGTATTATTAT  
 TTTTTCTTTTACATTGCAAAATCAATTTTTGATCTCGTAGTTACGGGATTATTTTTTAAACGATAGTTTTCTAATA  
 TAGATGTTATTAACAAAGTTTAAAGGTTTGATAAATCGATTTTCAGAAATTTGTGAAGCGAGCTAAACGCTGTTGG  
 TGCAAAATTAAGTGTCAAAGTTTTTAGAATTTATAACGTGATTTGGGATATTTTCATGAAGTGAAAAAATTTACCT  
 TTGTTGTTGATCGGTGTTGTTATCCCGTCGAACTTTATAGTTAAATAAAGAAGTGAACGCGTTTCGATCCATAT  
 TTGCTCACTTACTTAGACCCATTTTGCTTATAAAAATTTTCGAATTCGTGTGAAAAATCGTGTTCGAACTCGATAC  
 AAATATTTTGATCATTAAATTAATTTTAAACAAACCTTCTCCCTTTTCGAATAAAAATCGTATTAGAAATTCGATAC  
 AAATATTTTTTATTTTTTATAAAAATACTCTTTTTTTCGAATACAAAATTTTCGATTACTAAAATTAATTTTAAATA  
 AACCTTTTTTCGAAAATCGTATTAGAATTCGATACAAAATATTTTTTATATAAAATCTTTCTTCTTTTTTAAATATT  
 TGAATTAATTTTAAATAAATCTCCCGTCTTTTCGCTAAAACATGATCAATGACATTAATAATAAATTCGAATATT  
 GTTTTATCGTTGCCTAAGTGTCTTTGAAACGAAATGTCCGGAAGTGGAACTCCCACCATAAATTTCTTGCCGCG  
 ATTCGTTATCTTGAAGCGCACTTTAATTGAAAAGACGCGTTCTCGTTCTAGTCGCGATTAGCATTTCTGTGATTT  
 AATTGCGCGCTCGAGCCTCGTCGATACGATTTTTTACACCCTCGATAAATTTGAATCGATCGATTTTATTATTAA  
 CAAGAATCGATTTAACAAGAAGAGGAAAAATTTAATTTAACAGCGATTACAATAATTTACGATGATTTTTAGT  
 CGACGAATTCATCCGTCCCCTTTGAAGAATAAAAATAGACTCTTTTCGGCAAAGAATTCGAACAATGGAATCCCCT  
 TTTTATATCGCCTGGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTTTTTTTTTTTTTCGTCGTGTTGGCTTGCCAATTC  
 TGCAGGTCAGGTCCTTCCGGTCTTTCGTCTACACCTGGATGAATTCCAAAGTTTCTGCCCCGGAGTFCAGCCTTCC  
 ACATTTTTTTGTGCGTTAACAAAGCGAAGGGTCCATCTTTCGTTTCGTTTCGTTTCTTTTTCTCGTTTCGATCATGCGCA  
 AATCATTTTCATCGTCACCTTATCTCTAAATATTACTAGACTCTAAATCTAGTAATATTTAGAGATAAGTCTGAAT  
 TTATATAATAGAGAGTCTGAATTTTTTATTGCATATACGCGAAATTTATACACTTGAACCCTGATAATCAACCAT  
 TAATAATAATTCGATATTTTTTAAATATTTTATTCAATATTTCAATTTTGAATTTTCGTAGACAGATGTTCTAT  
 AATCGATGATA  
 ACAAGCTTGTCTAATGGTCAAATTTGTTTTCCAGATGGAAACCGAGGTGCGGACGCTCAAGCAAGAGCTGGTTTCGT  
 ACCCAAGAGGCCCTGAAGGTGGCCACAAAGAAATGCCGTGATCTGGTGAAAGAGCTGGACAATCGCACCACGAGT  
 CACGAGTCCGAGAGGAGTCTTCGGATCAACAGTTGTGCGGTATACTTCGCGCTCTGCTGGTGTCTCGAGGCCGG  
 CTCAAGCAGGAGCAGAAATCGATTAGGCAGCTGCTGTGCGAGAAGGACAACGTGATCAGGAATCAACAGCTCGAA  
 ATCGCGAGGCTGAGACGTTACACCAAGAATTACATCAAATGTAAACCGGAACAGACGCTTGGCAAAATCGTCCATG  
 AAGGTCGAAACGGCGACCGATATCGAGAACAACGATCTTCAAACGTCCAACGTGATGTAAGTTTTTTTTCAATTT  
 CCTCGATCGATTTTCGTCGTTTCGATAAATTTAATTGTATCGCGTTTAAACTAACCTTATTTTTTCGATCATAGCGATG  
 ATGAAATTCCAAATGTATCTTTGTAAGTCAATATTTTATACCGATTTCTTTACAAATCTTGTTTTTTTTCATTTCA  
 TTCGAAGTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTT  
 AGTGACAATGAAATTCCAAATGTATCTTTGTAAGTCAATATTTTATACTGATTTATACTGATATATTATACTGAT  
 TTCTTTACAAATCTTTTTTCTTTTTCTTTTTTCGATAATAATAATAATAATAGTAATTTGTCAACGAAGTAACTTAACTT

AATCTTAATCGTGTTGATTTGAACTAACGTTACTTTTCGATCATAGTGACGATGAAATTCCAAATGTATCCTTGT  
AAGTCAATATTTTATACTGATTTCTTTACAAATCTTGTTTTCTTTTCTTTTCGATAATAATAATAATAGTAATC  
GTCAACGAAGTAACTTAACCTTGATTTAACTAATGTTACTTTTCGATCATAGTGACGATGAAATTCCAAATGT  
ATTCTTGTAATTAATATTTTATACTGATTTCTTTACAAATCTTGTTTTCTTTTCTTTTGTATAATAATA  
ATAGTAATCGTACGAAGTAACTTAACCTTAATCTTAATCGTGTTAATTTGAACTAACGTTACTTTTCGATCATA  
ATGACAATGAAATTCCAAATGTATCCTTGTAATTAATATTTTATACTGATTTCTTTACAAATCTTGTTTTTCAT  
TTCATTTTCGATAATAACAATAATAATCGTCAACGAAGTAACTTAACCTTGATTTAACTAATATTACTTTT  
CGATCATAGTGACGATGAAATTTCAAATGTATCTTTGTAATCAATATTTTATACTGATTTCTTTACAAATCTCT  
AGGTTTTTTTCGTTTTCAATTTGATAATAATAATAATAGTAATCGTCAACGAAGTAACTTAACCTTGATTTAACT  
TAATGTTACTTTTCGATCATAGTGACGATGAAATTCCAAATGTATTTCTTGTAATCAATATTTTATACCGATTTT  
TTTACAAATCTTGTTTTCTTTTCGTTTTCAATTTTCGATAATAATAATAAACAATCGTCAACAAAGTAACTTAACCTT  
AACCTTAACCTTAATTTTAATCTTAACCTGTTCAATTTAGGTTAGCTCGAGGCAGGATTGCAGTATTAGTAAAGA  
CATTTCAGAATTTGAAATGCGAGATAATCACGAACTGAATCCGTTAGAAAGTACCTGTTGCGCTCGACGACCTGGA  
CAGGGGGTGAAGAAAACGCACAGCTTTGCCGGGAGCGACATCTCGAAAAAAGTCTGACGAGCAGCGAGAATAC  
GGATGTGTGATTATCACGACCACCACGGAGGGCAGTCCCTCGTTGCTCAGCACCAGGTTTTTTCGAGGGTGA  
GAGCACCAGCATCGCCAAGTTCACGTTGAATAAATCCAATAGGTGTACGCCACAATGGTTACCGACAGCGA  
GAACGAGACCACGATGATATACGACGACGACGACGACGAGGAGGAGAAAAAGTATGAGAAACGGTTG  
TAAATTTGTCGAAGAAAAGTTGGGGATCGGCAGGGATCGGAGAACGCAGAAAGCGTTGAAGGAAATGGACGTGAT  
CGAATCGACGAATATCGCGAGGACAGAGAGCAAGGACGATGGGATGGATTGTAATTTTCGCGTTCGGGAGATGAACA  
GGAGAGGGAACAGGAACCTATTTACGTAAATTTCTTTCAACGAGACAAATTCGAGGAACCATCGCGAAAAATGTAAT  
CGCGCCGAAGATGAACGAGGATTATAGTAATAATAACGGCAACAGTAATAATACCGGGAACAATAATAATAGTAT  
GTGAGTATTTGTTTTCTTGAAAAAATGTAAGCATAAATGCAAAACAATGTTTCGTTATTTACTGTATATATATATAT  
ATATTAATTTATGTAATAATTAATATTATAATTTGCATAGATCCTTGAAAAATGGAATGGAAGAGCATAA  
CGTGAAGATACCAGCGGGAATGGTATAGCGATCCTGACGAAGATAAAATGAACGATGATGTTTTTCAGGCAGCA  
TAGCATGTATCGACCGAATAGCAATCATAATTCGTTTTGGAATGCGTTAATCAGATCCTCTTCGCTGATATGGA  
GGACGAAGAAAACATCTTTCAATGTCCAGAAGATTTAAGCATCGAGGGAGAATGTACGGTTTTCAACCGGCTAA  
ATTGTGCGACATCGAGTCGGTAGGATCTGAAATGGAAAGGAAAAACTCCGAAGAAGTATCATGAAAAAGAAATC  
GGTTGACAACGAGTTCCACCGATGTTTCTACCAACAGTTTCGAACCTACTGCTACGGAAGACGAGTTTTGGAATGAG  
CCTTACCCAAAGTGTTCACACTCAAACGTTACAACCACAATCACGAATCACGTCGAGTCGAGTCTTGAGGAAGA  
ATCGGAAGAAGCAAAAGCTATTCCAATTTGTCATTATAGAGCCAAAGATCAAGATGGAAGAAAACGAGACACGCAGC  
TTTCCAATCTTCGCAAGTATCGCAAAAGATCAAAACATCTGTAAACGCCTCGAATCCGCTTTGAAATTTGGAACG  
AATCGAGGAAAAGACTTGTTTACAGATGTCTACAAAGGGACTAACTATAGCAAAAAATTTAGATTACGAGGATAT  
CGAATCGCTCCCGGAAATTTATATCACCACTCCTAAAACACCTCCTGCCTTGCCCCGAAACCACAGTTTAAAAA  
CAACACGTTGATCTTGAAAAAATTTCTAGTCTTCTGTTTTCTGATCGATGAGACACGAAAGAAAACAACACTCCT  
TGAATCCGTTCTGCTGAACACAGCAAGAAGATATTTGGCTTTATATCCTCTCCTTTAAAATCTACAGGGATTAA  
TGTATCGTCTGCAAGAAGCTTAAATTTTCGATGATACGACTAATAAAGGTACAGGAAAACAACGAAGAAGGAACTT  
CTGGAAGAACAGATTCAACAATGTTTCGATCCTCCTTTCAAACCGCTCAGAACCACGAGATTAGTGGAGAACAAT  
GCGAAAAATACCCAAAGTCACCAATATTGTTTCGTCATTTTGAAGAGTTTAAAATTTGGTGGTGATTTCGGAAGATCA  
AGCAAGAAAACGCACGAAAACGAAGGAAAAACACGTCATTTCGGAATTCGATCAAGAAATTTGATATTAGACAAAA  
TTTTGAGGAATTCATTTGGATGAATGTGATCTATCGGATGATCCAGATAGACCAGGAAAGGCGATGGATCGGAAAG  
ACTTGGCAATCTTGGGGTAACAATTAGTCAGAATGAGAAAACCTGCTGCAACCAAAAGACAATAATAATGTTCTCT  
TGCTGCGAGCAATTCGAATAGCGGTTACGATCACTTTCTAGAAGCAACAGGTCTTAGCAACAAAATCCATACTGAC  
TCCCTCAAGTTATTGAGTAATCATAAGAGCATGTTAAAGCTCGAAAGATGTAATAATAAAGAAAACAAAATCAAAGC  
AACAGCTGTTATGGAAGAACATGGTGTTCACACAAGACTACTACTGTTAGACATTTGACAGGCCCCATTTGT  
CTGACGATTTGGCACAAGTTTTTCCAAAAAATCTATTCCGACAAAGAAAACCCCGACGAAAGAAAGATAAATAGACA  
AATATGATCTATATTAACGAAAGTTGAAAGAAACCGTGGTTCAAACGAAATTTCTTCTTTGTACATGAAATATATA  
ATTTTCGTTAAATTTATTAATATTTTCTTTTCTTTTAAATATTTTATCAAATTTTTTGTATTATTAAGAAAT  
TGAAAGTTAATTTATTTAATTTAATTTGAAAAATACTTTTATGTATTGTATATTTTAAATGAAATATGTCCACTT  
ATTTAAAATATTAATACGATTGACAAAATAATTAATTTGAATGATAATTTGACAATATTATACATACATTAATATTT  
AGTTTTTTTCGCTGTAAATTTGCAATTTAGTACTTTATTTACTATGGAAATGTTTTTATGAAAACGTTTTTATTTTAT  
TTTTACTGAAAATCCTGAATAAAAAATTTGAAAATGTTAAATAAATAAATATTGTTATATTGTATGAAATGAAACA  
AATAGACAAATTCATTATAATAAAAAATGATTATATAAATTTAAATTTATTATGTTTTTACTTTAACCCTGAATTA  
CACTCATGTTATATAACACTGTATATAAATTTACAAAATTTTAAATATTTCAATTTGATCGTTATTTAAATTTTGA  
TGAATGATATTTAAGAATCCGTATGTATATAAATTAATTAATTTTGTGATTAAATAGTATAAAAGCAAAT  
CATATGATTTTTGTAATAAAGATTAAATATACACAATGACAAAAATCAGTTTCGAGGATAAAAAATAAAAAATGTAT  
TTTTTTTCGGAATAAAATTAATAAATAATTTTATTGAAAGATTTTTGCGTTTTGATTAAAGAAATAGGAATACACCA  
GTATAATATTAAGTATTTTATGACGATTTATAAACTAGAACATATGATACAATTTATATATAATTTCTACTAC  
CTATAAAAAATACAACGCAACTCTATAAAAAATACAACGCTAACTGTCCTGTTTCAAATCTAAATAGAATATGG  
AAGAAAAAGTACTTTGGAAAATGGACAATATTTAAATTTCAAACATTTTCATCGGTAAATGTTTTTAAAGGATTC  
ATTTTCGAGATTAGTATGAATCATTTCGTTTCAGGCACCTTATTACACTTGGCTAGTGTACATTATCAATACAAA  
TGTATAGACATAGCTGAAAAATTCGATGAAGAATCACACAATTAATTTGGCACAGTGGTTTTCTTCAAGTTTCTCT



TAAAAAAGCATACAATATAGTTTACATAGTTCATATACAATATAGTACATAGCAACTTCAATTTTTCTTTGGAA  
CCTATATCTATACTAATAAGAACATTTAAAAACTTTTTAAAAATATTAAAAAATTTTATTGATAATCTTATTTTTGA  
TTAGTCAGTTTTTGAATTATCAGTCAATTTTTGATAACTAATCGTACTAAAAGTTAATAATATAAACAAATAAAAAAA  
AGAATAGGGTTTTTAAAGTTTTTCTATTAGCAGCAATGTACGCGTGAATGATTTATATGTAAGTATGTGTATACC  
TTGAAAATTTAGAGAATTTTTATAATTTTATTTTATAACAATGTTTGTCTCTTTTCATTTATTATAATAATATTA  
TTATATTAATTATATAAGATATTTCTTTATACATCGTATGATGTAATGTACATATTTAAATCTTATTATATTTCT  
AACCTAAAACAAGATTTGCGAGATTAATTTTCATAAATATATATATATATATATATATACTTCTTCGGTATTTA  
TCATAAAAATGAAACGGAATACAACAATCATTTCGCATCATGATGAGAGATTTAGACAATCACGCAGTGAAGATA  
GCGAAACTGGTCTGCGTTCAAGAACACAAGAAGAACGATTACGACGTAGACGCGAATGGATGATACAACAAGAAC  
GGGAACGAGAACACGAAAGATTGAAGAAAAAATGATTTTGAATACGAATTACGACGTCTCGTGAGAAAAAAT  
TATCGAAAAGAAGTAAAAGTAGATCCCCAGAAAAGCCGAGGTAGAAGTAATGCATCAAAACACGCTCTAAAACATTTA  
TATTATCTGAAAAGTATGTATGAATAAATTAATAAATTTTTAGTTTTAGTTATTTTATATAAAAAATTATTTTAAATAT  
AAATAAAAAATAGAATTTAAAAAACATTTGAATATTATAGAAAATTATGTTATATTAAATATGCAATATAATTTGAA  
AAATTGTAAATAAGTACATAAAAATAATATAATGTAATAATTTCCAATATAAGATATATTTATTTTTATATGTAATAT  
TCAAGAAAATTTAATTTATAATTTTTTACATGAAGTTTATTAGATAGTTTATTATATTTTCATATAATAATTCCTTT  
TTTTAAATAAAAAATTTATTTTATACCGCAGATTAGAATCTTCAGATGGTACATCTTTATTTAGAGGACCAGAAGG  
TACTCAAGTTAGTGCAACGAACTACGAAAAATTAAGGTAGATATTCATAGAGTTTTGCCAGGAAAACCAACAAC  
AACATCTGATGAACTTAAACGGGATATTATCAATCCTGAAGATGTGATGCTCAAAGAAGAACGGGTAAAATGTT  
ATTTTTGTTTTGATTTATTAACAATTTAAAAATTTATCATCATTTCATAAAAAAATAGCAAAGGTATGTATAAATTC  
AGAGCAAAAGACTAATTTTTCATCAGAGAAAGATGAAACTTTTTTCAGCAGAACTCGTCAAAAATGTATGTAATAT  
ATGTAAACTCAACATTTGAAGATGACTTTAATCATTTTTTTTTAAAAATATAAATTAATAAGTTTTTTTTATA  
AACTAACAAATTTAATCTTTTTGCATTCCGGGCTGTTTCGTTTCGATCGATCCGAGTAACTTCAGATGATTTGAA  
TCCGCGCGTTCCGGTGCATTTTTGCGGTGCTGGAATCATCGTTGAAGTTATGGCATTAAATTCAGTGGTAACTGAGA  
GTCACCGTTGGAGGGCAAAGAGTTAAGCTTTATAATATTAATAAAGATTTTTATTTTTATTTTTTTTTTATTAAT  
TATCTTTTTTTATTTATGATCAAAATATTAATTTGAATAATACAAATTTTATTTTACTTATTTTCAAATGCAACA  
TTTTGAAGAATTTGTAATATGTAATATAAGTTTTCTACAACAAGAATAATTTATTTGTCATATCTTTTTATAAGTG  
AAAATATTTTTGAAGTTAATAACATATTTTTAATTCATCAACAAAGAATAATTTGGACAATGCTGGATCAATATA  
TTGAAAATGCAATGTGCAATATGTAAGCACAAATATTTATCTTAAAGTATTCTAAACTTTTTATTTATTTCTT  
TGCAACAATTGCATAAAATATTATGCTTTTTAGAATATTAATAATATAAAAAATAATTATATTGTTATTGCTGTTAT  
ATTGTTATTAAAAAACAATTTCTTTAAAAATATGCTTTAAATTTTTGTTTTCTTTTATGCATTCTATTTTATGCT  
TTTGAATGCTTATATATTAATAATATAAAAAATTTATTATAAATTAATAAATTAATAAATTAATAAATTAATA  
TATTTATTATAGTAATTTATATATATTACCACTAAATCATTAAGTTTTCTTCTATAGAACTTATAAATTTGCAACA  
ACAGATCATTTAGAAGCTTTGCATTAAGTTTGCATTGCATTTTATCAATATTAATTTTATTTCTTGATTGATTATA  
TTATAGTTTTTTTTTATTTCTGCTTTTTTAATTAGTTACAAAATTAATACTATTCAATTAATTAATAAATTTCTATC  
TTTTATTAATAATTTCTTCTATTAGAAATAATTACCATGTATATATATAAAAATGTAGAAAATTTTTATAAATTTG  
TTATTTATAAATTTATAAATTTATTTCTTTTTATTTATAAATAATTTTTGTGTATTGTTTTATATATTGATATGTATT  
TTTTATATATCATTGATCTAATTAGATTTTATTATATTTCCAACATAAAAAAATTTTTTCAGATTAATTTTTA  
CATATATTCATATATTTCTCTGATATTTATCATAAAAAATGAAAAGAAAATACATCAAGTCAATTCGCATCATGATGA  
GAGATTTAGACAATCATGCAGTAAAAATAATGAAACTGGTCTGCGTTCAAGAACACAAGAAGAACGATTACGACG  
TAGACGCGAATAGATACAACAAGAACGAAACGAAAATACGAAAGATTGAAGAAAAAATGATTTTGAATACGA  
ATTACGACGTGCTCGTGAGAAAAAATTCGAAAAGAAGTAAAAGTAGATCCCCAAAAGCCGAGGTAGAAGTAA  
TGCATCAAACATATCTAAAACATTTATATTATCCGAAAAGTATGTATGAATAAATTAATAAATTTTTAGTTATTT  
ATATAAAATATTTAAATATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATA  
AAATATGCAATATAAATTTGAAAATTTGTATAAATAGTAAAGTACATAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
AAGATATATTATTTTTATATATAAATTTCAAAAAAATTTAATTTATAAATTTTACATGAAGTTTATTAGAGTCA  
ATAATAATAAGTCATATAAATAATTCCTTTTTTTAAATAAAAAAATTTATTTTATACCGCAGATTAGAATCTTCAGAT  
GGTACATCTTTATTTAGAGGACCAGAAGATACTCAAGTTAGTGCAACAGAATTACGAAAAATTTAAAGTAGATATT  
TATAGGATTTTGCAGGAAAATCAACAACAACCTGATGAAATGAGATATTATCAATCCTAAAAGATGTGATGGTCAA  
AAGAAGAATGGGTAAAATGTTATTTTTGTTTTGATTGTTAAACAATTTAAAAATTTTATCATCATTTCATAAAAAAAT  
AGCAAAGGTATGTATAAATTTCAATGCAAAAGACTAATTTATTTTCATCAGACGAAGAACTTTTTCAACAGAACTCA  
TCATTGAAGATTGACGCAATATCAAAATTTATTGTGATATTATAAATAATCATCAGAATACGATATCGAAATGAATA  
ATTAATGAAAATATTTAAATAATAGATTAATTTTTAAAGTAGTATATTTTTTTTTCATTTTTTTTTTAAATGCAAAA  
ACTCGCCAATTATATTTAAACATTTTAAATATTTTGAATTAAGAAAAATTTAAAAAATTCAAAAATAAAAATTTA  
TACTTGTATATTATATTTATATTATAATCAGATATATTTAGATTAATTAATAATAAAGATTAATAATATTTA  
AGATATAATGTATTAGTTCATATGATACAATTCATTAAGAGAGGAATATTTTTAATCATCTCGAAGATGATTTTG  
TAATAGCAATTTTATTTTATAGATTTTTTCTACTATAAATTTTTTATGTAAAAATTTATTATTTTTTTAATTAAT  
GTTTAATAAAAAATAAATAATTAATTTTTTAAAGCTATATATAAAGTCAAAAAGATTAATTTATTTGCATAAGAAGAA  
GATAAAATTTCAAAGGAAGATAAAAATTTTTTCATCCAGAACTCATCAAAAATATATTTAATAAAAAATTTTAT  
TTAACATTATTTATTTAAAAATATATTAATATATTTATGAATTTCAACATTGAAGATTGATGTGATATCAGAATTAC  
TATAATATTATAGTATCATCAGAATAATACAATACTGAAATGATTAATTAATAATATCTATTTAAATTTTCAAGTAA  
TAATTTTTTTTTGTTTTTTTTGAATTTACAAAAATTTGTCAATTATATTTAAACAATTTCTGAATTAAGAAAAATTTT

AAAAATTCAAAAAATAAAATTTGTGCATCATATTTTTTTTGTATATCATGTTTATGTTATTAGTCAAATATATAAT  
ATAAGATAATAATAAATACAATATATTTTTTATCAAGAGAGGAAGATTTTAAATCAGAGATGATTTTATGACTTTAA  
AATAATTTTATTAGATATGGATTTTTTCCATAACTTTTTTATGTAGAAAATTTATTATTTTTTAAATTAATAATTTA  
ATAAAAAATGAGTTGATCTTCTAATTTCAAAAAAAGCACAAAAAAATTAAAAAAATACATAATATAAAATGAAAA  
ATATATATTTCCATAAATTTATAATTTGGATTTATGTATATCATTTTTATAACATTTAATATTCAAGAAAAATTGTA  
AGCTATATATAGTTTGCTAAATTTCTGAAAAGATATTTTTTATTAATAAAGATTGAATAAATTTATGAATTTATATAT  
TTTTTTGAAAATATGAAGCAATGAAAGTTTGATTAATTATGATATTCATATGTCTACATCTATATTTTTTAAATTA  
TTATATAAAAAATAATAACAAATGATATGAAAAATAATTATTGTTATCTTTTTTCATAATTTGTAGCTAGTTTAT  
TTATATAGTTTTCATATATTTATTTATATTTTATTATTATAAAAAAGATCTGGCTTACAATTTGTTAAGAAATAGTCA  
ATTTATTTTATGTATGAATCTAAATAATATGATTTTTTATTCTAAAAAGTTTAACTAAAAATTTAATTTATAGGAG  
AAGGATCTAAGCCTATATTTGAAAAGAGAAGAAATAAAAAATATATTAAATAAAAACAAATGAAATTTACAGAACATC  
GTACAGTTTTAGCTGTAAATATTGAAAAATCAGGTATATTTCTTTAAAAATTAAAAAATTAAAAAATATAAACTTTTTA  
TCATTATAACTTAAATTTACATATAATTTTTAGAAAAACGAAACTAAAAACATGTAAAAAATATGCTATTTTCGTCAAA  
TTCTTTAAGAAGTCGAAGTCGTAGTTTTCAACGTACATCATCCTGTCAATCCAGGTTTTGTTTATGTAGCGATAAT  
AATATTGAATTTGGTAATTATATCTTGTAAAGTAGCAAAATTTGATACAATAATTTTTTAGTTATTTATATATAAGAT  
TATTGTATTATATTTTATTTAGAAAATTTTTATATATTGAATTTAGCCGAAATTTGATCTTTATATAAATTCCTAAATA  
AATATAACATTTATGTTTTTTATAACTAAAAAATATATTAATTAATTATGTGAACGATATTCAAAATTTATATTT  
TACATATATTTTTGTTAAAAATAATATTATATAAATTTATACAAATTTTAAAAATATAAAATTTATAAAAATCTTTGA  
TATTTTAATATTTTTTGTCTAAATGAGTACTAAGTAAATTTTTTATTATTTTATTGATAATTTAATAAAATTTATTA  
CTAGCATATTTTTCTTCATTTGGCATATAATATAAAATTTTTTAAATATATTTTTTTATTTCAGGTAAATATAATATA  
ATGTTAATATTAATGTTTAAATAAAAAATTAGAAGTAAAAAGAGATAAGTAATATGAAATTTTTTAAATTAATTTGTT  
ATTAAAAAAGTTTTTAAAAAAATTAATAATTTAATTTAATTTAGTCATTAATCAATAAGAATTAATAAATGAG  
AGATTTAGATTTCTAATTTACTTTTTATATAAATATTTATATACTTAGATAAGAGGAGAAAAAATTTGTGCAATAT  
AATATTGATATATGTATAATAAACATAGAGTATTATATATTATAATAAATAAAGGATTAAGCATTATATATTT  
ATTTAACAATTTGTTAAATTTAACAATATAATTAATATACTAGAAAATTAGATTTTTTATTAATTTCTTATTTCT  
TTTTTAGATATGAATTTCAAGCATGAAGCAGAAAATAGTTATAGAAAATGATGGGTAACATAATGCTTTATAAAT  
TATATTTTTATCTAATATCTTTTATTTCTAATTTTTATTAATCATTTAAATTTATATTGATTTGTTTCAGGGAAA  
GAAGTTGCAGTAGAGATAGAAGTAGAGAATACAAAAAAGGATAGACGATATGACCAATTCACAAATGTAGAAG  
AAAAGCATTACGAGAAAGAACAAGTCGTAGACGTTATTCCCCTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAAGTACGTTAACGA  
GATACATGAAATATGTAATATTCGTATCTCTTTAAAAATTTTCATATTTAACTCCTTAACTTACAATCGTATGAGA  
GACATAGTCGATTGAGCTAAATCTAAACAACCGTGTAAAGACATGGTACAATGATCGGACTGCGCGCGATGAAC  
GCTTACTAATTTTTCTTGACATTCGGACATACAGATATATTTTTCTTGAAAAATTTAATAAAAAATGCTTTTTAATAA  
TTTTAAAAACGTTGTGCGAAAAGTATATTAACATCATAAGACATGTGATTTGAACAATTCGAAAAGTTCAATCAA  
AGCGTGAATGGCATGAGACTGACATTTCTTATTGTTTATGGCACGTGCTATTGAAAATATAAAACAAGGGACTTC  
AAATTGAATTTTAATTAATATTTTTATTACAGATCATATAAAAAATGAAAGAGAATATCGAGAATATCGAGAAACA  
TCGAGAGAAAGATCTCGAGATAGAAGAGAACGAGGAAGATCTAGAGAACATAGAATAATTCATCTCATTATATT  
GAACAAATTCCTGTTCTGTTTACTATGGGGTAAGTATTTTATTTATCTTCAATATGAAAAAATATCTTAAAAA  
TATTAATTTTTATTAGAATTTTCCACCAAGACCAATAATGGTTAGACCTTTGGGTTCCAATGCGGGGTCAGTACC  
AGGATCTAGACATATTTGGTCCACTAACACCATTTCCACCACGATTTATTCTCCAGATATGTATAGACTTCGTCC  
ACCTCCAAATCCTAGTATGTTTATAAATCTATATAATATATGTATATAAAGTGTATATTAATTTTTTGTATTTT  
ATTTAGGATTTGGACCTATGTATTAATGACAAATATGAAAATTTTATAAATATGCCAATAATGAATAATGAATTGA  
ATAATATTGAATAATGAATAATGAGATGACATTTGATAAAAAATAAGAATTTCTAAAAATTTGTCTATGATATATCGA  
AATTTGGATAACTAGCAGCTCACAAAGTCAATTTGATATTTATTTCTGTTTGTTCAAAAAACTGTAAAAAAAGTCTT  
CTTTTATACCTCTAAAAAATTTTGTCTTTAAATAATTTCAAGAATATTTTCTTTTATTATATAATACATAATACTAC  
ATAATATATTTTTTTAAATCTTTTCGCTATTACAATCATATTTTATATATTTTGTTTTACATAATATATATATGTA  
ATAATGGTTAGTATGTTTCATGCTGAAAGAATCAATTAATTAAGAGTAGAAGTCATATATGTTCCCTTGAAGAAAATG  
AAGGAAACTATTTAATCGAAAGTCGGAGAGCTCGCAAAAAGTTAGTGAAATATATATTAATAAATTTGGCTGTATAT  
ATTTACAATTTAAGATAGTCAATGTATAAGATATAGAAACACTGTAATTTTTTTTAAATTTATATGTTATAAGAATT  
TTGAAAATTTGTAATTTCTTATAAGTAATATATATATATATTATTATTGATATAGCAAGATCATAAATTTCAAATTA  
TTGTAATTTTTTAATTTTTTAAATATGATATAGTTAAAAATTTGATTAATAATTTTGTATTTCTCTTTTGAAATATTT  
GCTAATGATTTCTTTGATTCTTTTCTTATAAATTTTAAATGATTGAATTTTACGATTTTGCTATAAATATAGAA  
CACACTTTTAAAGAAATAATTCGTAAAGAAATTTAGAGTGAATCTATTTTATTTTTTTTTTAAATTTTGATTACT  
ATCTAAAATGTATATTTTATTTTATAAATATATATATATTATATAATATATATTTATTTTAAATTTATAGTTTTCAA  
TCATCAATTTGTGATCATTAAATAATTAACAATGATAATTAACACACTTGTGCTATTTTATGTTTAAATATATTTTT  
ATATTAGCTTTATGTAGTGAATAGAAAATAATCTTTTTCGTATAAATATATGCATGTATATTTCAATAGATTTAATA  
TTAAATATATTATATTTAAATAAAAAGATTTCTTTAAATTTTTTGTATTAATAAATAAATTTTTTATTAATCATTTGA  
TATAAGTTAGTTATTTTTGAAACTTTCTGTAAACTATATAAATATATTTCTATAAACTATATCTTTGTTGTACAA  
GAAATTTTTTATCAGTATAGATCAATTTAAAAAAGAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
AATCATTTCAAATTTTATACGTAACCTTATAGCTTTACAGTTAATCAATAAAGAAAAAAGAAAAAATTTGTTGATAA  
TAAATATTATCAATTTCTACAAATAAATAAATAAATAAATTTTATATAAAGCAATTTGAAATCAAATCTTCATAAAT  
ATATTTGTATTAATAAATATATAAGAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

ATATTATTGTATTGTAATTTAATACAAATAATAAAGATAAATAACAATAGTACCATGAATGTATTCTTATTGACG  
CCAAATAAAATATCAGTAAAGATCATTGATATTTAAAAGACGTTTTTTTTTCAAATCTGTAAATAGTATTTTGCATAG  
TTACCAAACAAAACGTAAACATATTTTGAATTCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAATTTATTTAAAA  
GATGGATAGAGATATATCTCATTACGATGAGAGATTTAAATCACGCAATAGAGATAGCGAAATTTGATCAAAAACT  
GTTTAAAAACAGAAAAAGAACGTGCTATATTACGACGTAGACGTGAATAGATGATACAACATTTAAAAA  
ATTTTAGAATATGAACATGCTCGAACGTCAACATTTAAAAAATTTGAAAAATAAAAGTAGATCTTCAG  
AAAACCTCCAGAGATAAAAGTAATATATCAAAGAGATAAATATATCAAGAGATAAATACATCTAAAACATTTATAT  
TATCCGAAAATTTATAATTTATAATTTTACATGAAGTTTATTAGAGTTATATAATAATTCCTTTTTTTAAATAA  
AAAATAATTTTGTACTACAGATTAGATTTCTTCAGATGATACGTCTTTTAGAGGATCAAAAGGTATCAATTTGAT  
ATAAAGAAGTACGAAAAATTAAGTATATATTGACAGAGATTTCAATAGCAGGAACATCATTTGGTAAAGAAAA  
AGATATTCTCCATAATATTATTAATCCGAATGATGATCAAAAAGACGAATCGGTAAAATGTTATTTTTGTAATTTA  
TTGTAATTATTAATTTTAATTGTAATTTAATACAAATAATAAAGATAAATAGCAATATTATCATGAATACACTCA  
CATTTCTTGACGCCAAATAAAATATCAGTAAAGTATACGCATTGAAGGATATTATGAGCAATAGTAGTATTTGAT  
AGTGCAAAATCCAAATCATCGATATTAAGGGCATTTTTTTGAATTTGTGTCATAGTATTCTCCATAGTTACCAA  
ACAAAACTTTGACATATTTCGAATTCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAACAATTCCTTTGGGTGATCGAATGTTT  
AAATTCGGCACTGAATTTGATTAGTTCATCTATTATAAAGTCTTATTTGACTGCTGTCATCATGTTATTAGTAAT  
TGTAAGTATTATTAGTATATAATTTTTTATCCAACGAATTTAAAATAATTCAGAAAATTTTTTAAACGACGATTA  
ATCCATTAATTTAATTTAATTTCTTTAAAAAATTAAGAATACTAAATTAAAAATGAATTTATPATATAAATCTA  
GAAATAATAATTTGTTTCTAAAGAATGGAGAATATTTTTTTGATGATTTGTGCATATAATTTTATCATAATAATG  
TTACATTGAGTATCAAGACATAAATCTTGAAATTTAACAGTATCATCCCTTCAAACCTAAAAGTAAATAAATCATG  
GCCAATTTATTTATTGATTTCAATGATTATCATGGTTCTAATATGGATTTATCGATTCTGTACAATTTTTTTGAC  
AAAATTTCTGTTGTTGAAAAGGAAGTAATAAATATTATTAAGAATTTCAATGTCAATTTGTTAAATCGATTTTGTA  
TAGATAGCGCATAAAAAATTTATTTAGTTCCTTTTTTATAATCAAATATTGTTTATTGTACATCAATTTTTTTAT  
GATTTTTAACGTATATTTAATTAATCTAAAACCTTTTAACTCTTATAAATACTTAGATATTGGATTAGTATAG  
ATACGTAATAAAATAAATATTTAATCACGTAATAAAATAAATATTTGGTGAAGTCTCAAGAATTTCTGTAAAGCA  
GTTTATAATAAATTTGGTTTTCTTCTATATAATTTTTTTTATACTAAAAAATTTTTTAAACAAATCAGATA  
AATACATTTAAATCGATTAATAATAATAATAAATAAATAAATTAATTAAGTGAACAAACGCTTTAATTTATCCATAAT  
GTTTATAATACTATCTTTTTTATTGCAAGTTTAAATTCATTAACAACATATCTGCGACTACGACCAATTTGTA  
TAATAGTGCAATTTCAAGTCTTTCTCGCCATATTGCTTTCTAATTTCTATTTTCATAATAGAAAATTTTTTTA  
AATTATATCGAATCTAAAAAATAGTTTATATTTTTGCTATACCAATTTATTTATGTTTATGAAAAATGGATTGAAT  
TATTTTTTTTTCCCAATTTAAACAAAAAATGATTTTCGACATTTTTTAAATGACATTTGTTTCTTGAAGATTTGCAA  
TATGTTATTACAAAAATTTATTGAAAACAAAAGAAATCCTTTTTTCCCCTAACTTCAATTTCAACCACTATGAA  
GCTAACTTCGCACTATGAAGTTAGCAATGTAACAATGAAAATTTGAATACAGAATTTCTCAAAAATTTCTACTAGC  
GTCTTCTCTAAGCACTTTGGGAGATTTTTACGTAAGTATATGTGATTTGTAAGTTTTAGAGAGTTTTTGTAAT  
TTATTTTATATTGTATAATGTTTGTCTCTTTTTATTTATTATAATAATATGATATTTCTTATACATCAATTTAT  
GTAATGTACATATTTAAATCTTATTCTATTTTTAACCTAAGAAAAGATTTGCAGATTAATTTCAATTAATATACT  
TGTTCCGAATTTATCATAAAAAATTTATCATAAAAAATGAAACGAAATATATCAAATTTATCATAACGATGAAAA  
TTTTAAACAATTCGGAATGAAAATTTGCAAAATTTGATCTGCGTTCAAGAACAAAAAGAAACGATTACAACATAGA  
CGCGAAGCGTGGTTGGTACAAGAACGCGAACAAAGAAATCGAAAAATTTGAAAAGGAAGATGATCTTAGAATATGAA  
TTATAAATATTAAATATTGACGTAATCATGAAAAAATTTAGTATTGGAAAAGAACTAAAAAGTAAATCCC  
CAGAAAGTCGTGATAGAAGTAATACATCAAAACACATCTAAAACATTTATATTATCCGATAAGTATGTATGAATAA  
ATTAATAAATTTTAGTTTAGTTATTTATATAAAATTTATTTTAAATAAAAAATAGAATTTAAAAAATAATTTGA  
ATATAGAAATTTATATTATTAATATGTAATATAATTTGAAAATTTACGAATAAGCATATAAAACAATATAATG  
TAAATTTCCAGTCAAGATATATTATTGTATATATATATCATTTGCAAAAAATTTAATTTATAATTTTGATATA  
AAGTTTTGAAGTAGTATTAGAATAATAAATCATAATAATTTCTTTTTTTTAAATAAAAAAATTTTTTATACCGCA  
GATTAGAATCTTCAGATGATACATCTTTATTTAGAGGACCAAAAGGTATTCAAATTAATGCAACAGAACTACAAA  
AAGTTAAGGTGGAATTTCAAAGAGATTTGCCAGGAAAATCAACAACAACACTGTGGAAGATCAATGAGATATTA  
TCAATCCTGAAGATGTGATTCTCATAAGAAGAACGGGTAATTTGTTATTTTTTTGTTTCGATTATTAACAACCTTAA  
AATTTTATCATCATTGATAAAGAAATAGCAAAGATATGTATAAATTTCAATATAAAAAATTAATTTATCCATCAA  
GGAAGATGAACTTTTTCAACAGAATTTCAACATGAAAATGACTTCAACTATTTTTTATCTTTATCTTTTATATT  
AAGTGTCTTAAGTTTTATTTTACAAGTATTTTTACTTGTTTTTTTTTTAATTTTTTTGCAAGTTGGATTTAAGTT  
TGCATGAAAAATTTTTAAATAATAAATTTTTTTTTTCAATTTTTTAAATTTGTAATAATTTGTCAATTTATTTAAA  
CAATTTCTGAATTAAGAAAAATTTAAAGAATTTAAAAAATAAATTTTTTTGCATAACTTGTATATCATATTTATGT  
TATTAGTAAATATATTTAACAAAATATAATATAATAATAAAGCATATAATTCATCAAGTGAAGATTTTAAAT  
CATCTTAGAAGATATGATTTTACAATTTCAATTTTATTATATGAAAATTCATTCTACATAATTTTCAAATTTTAT  
TATTTTTTAATTAATGTTTAAATAAAAAAACAATTTTATAAAGTCATGAAAAGAAAAAGATATAAAGTGAAAGTTA  
TATATTTTCAATAATTTATATTTATTATGGATTTATATATATCATTTTACATCTAATTTTCAAGATAATTACGTA  
TCATATATTTTCAACTGCAAAATTTGAAAAGACATTTTTTATTAATAATATTATTAATACATTTTATTTAATAATG  
AAGATTGAATAAATTTTATATTTATATATTTTTTTTCAAATATTGTACGAAGCAGTGAAGTTCAATTTAGTCTTA  
ATTCATATTTATGATTTTACATCTATATATGTATATTTCTACATTTATATAAAAAATAAATTTATATATAAT  
TAAATATATAATTAATAATATAATATAAATAAATTAATATATATACAAATGATATATGAAATCATATAAAT

AATTTAGTTACAAAACATGAAAAAGATAATAATTATTTAAGTACATTTTAAAGTTTATTTTGTTTTACATATGT  
TTTGTACTATAGTTTTGTTTCTTTACTTTGTTTCACAAGAGATATAAGAAATGGCAGGATGAACAGAATATT  
TGTCACCTTTCTGTGCCAACGTTATCTTCTCTTCAAAAAAAAAAAGCAATCGTCTCGCGGTAACCTTCATTTAATTT  
CATTTTATTTACTGCTGGATATTTTTCTATTTAAAAAAGAGATTTATAAAATTTTATTATTTGTGTGACTTTCTT  
CAGATAGTAAATGCTTCGATATTTATCCTTCTTACAAGAATTTTCTCACAAGAAAAATTTGAGTAAGACGCTAAT  
ATTTGAATATTGTTATTTTTCTTTGGATTTCATCGAGTCTCGTCTCTATTTGAATTTTTTGTGTTGAATTTTTTT  
TTTTCTTAAATTTTTCTTTCTTGAATTTTCAGATTCTAAATTTACAGAGTAAATTTCTTCTTTGATTTCTCAGAA  
GAATTCCTCTTATATCAAAAGAATTTTCATCTTCTCTTAAAATGAATCTTATTTTCAGCATACTTCTTCACCGAAC  
CACCATCTTTTGTATTTAAATTTGTAGTTTGAATTTTTCCCAAGATAAAAAATCCATCAAAACATAGAACTTTGT  
GTCACGTATCCAAATATATATATATATATATATATATATATAGATTTCGAAAATGAAGCATAAAACCGAAATGATTTGT  
TGTTCATACAGCTATAATTTTTATGTTTACAATATTCGAATTTTACAAAAGCAATTATCTATCTCTGTCCTGTTT  
TCGCTATTCAAAATATTCTAGGATTATTGTTAATAATAGAAGACAGTGATGTTGCTCTTCGAAACGAGCGAGTCTT  
TTATTTACTATTACACATCGATGAATTTCCACTTTCTTTATCTTCTGCTTCTTTTTTGTAGAATTGCCTGATGTTT  
CTTTTCTGTGCTGATTATTTCAAAGATGATGTTCTGTGAATTTCTCTCAATGATAAAAAATCAATCATCAACTTTA  
TAAAAAGAGAACCTTCTTCCGCCAATTCAATAAATTGGACCAGTGGACATTTCTTTTTCTTTTTAAAAAGAAAAGA  
AATCCTCCAACATATCATTCTGATATGTATCCAATATTGTATCCATTATTACTTGTCTTCTTCATAGTAACT  
TTATTTATACATACAATTTAATATCAATTTGAATCTTCTTCAATGGAACTCATCTATTATAAAAACAATAATCT  
CCAGAAAACAGAAAACAACATATTTGTTCTGTTCTGTGACTGATTAAACTCTTGCTTTATCAATATATCTAATTT  
CGATGACAACCTGATGTTGTTATCTTCTATGTCATGGTTCAATTTGGTCATGATGTTCCATATTTGATGCTATTATG  
CTTATAATAATATTTTCCATATATTTTTGATAAAAAATAACAATATGCAATATTTATTCCAAACTTTAAAAATGATG  
ATTTATAAAATCTTTGATACTTCGATATTTTTTGCTAAATAATGACTAATATAAAATTTTTTATTATTTTATTAAT  
AACTTTAATAGAATTTATTATTAGCATTTTTTTCAATTTCATATTGATATATAAATAAAAAATTTTAGTTATACTT  
TTTTTTTCAGATAATAATAATGTTAATAATAATAATTATAAAATAAAAAATTACTAGAAAGGACGTAAGTAATATAA  
TTAAATTTTAAATTAACCTTTATATAATTATAAAATAATTTTAAAAATAACTTTACATAAAATAACTGTTTCATATACG  
AGAAAATCGCTAGCAAAGCAAAGAAGCAAAAATATTTACCCACTATTTGATATTTTTACGTCGTATGTAATATTT  
TCCTAATTTGAATAAAATAGTATATGTAATAGTAATTTGAATTTGCAAAAAAAATTAATATTATGATATATATGTA  
AGAATATTGCAAAAAAATAAGCATAAAATTAAGCATAATTAATTTATTTAATTTAATTTAATTTAATTTAATTTA  
ATTAATGATCTAGAACTAGAATCTGTATCAATTAATTTCTCATACTTTTTTAAATCTGCATAATGGAATAAAAA  
TGATAAATATATAAATAACATAACTATTTAAAAATTTATATATTTGTTTAAATATGTTTCATTTTCTTAAATGATTTA  
ATAAATTTTTATAATTTTATAATTTAATTTTTATTTAATTTTTATATAATTTTATATAATTTTTTATATAATTTAAAT  
TTATTAATAAATTTATTATTGAGAGAAAAGATTCCAATAAAAAATAAAGAAATATAAAAAAAGGATAGGCAAGA  
ACAAAATAAAAAACATATCGGGACTCAATAGAATCAAGATATGAAACGAAATACATGAAATATGTAATATATCG  
TATTTGTTAAAAATTTGAATTTTAAATAAAAAATTTTAAAAAATTTTTAAAAAGTATTACTACAGATCATATGAA  
AAATCCTAATAACAAAACACTAGGAGAAAAGATCTCAAGATAAAGAAAGATCTCCAGATAAAGAAAGATGTCAAGA  
TAAAGAAAGATCAGAAGATAGAGAAAATCTGAAGATAAAGAAAGATCTGGAGATATAGAAAGATCTGCAGATAGA  
GAAAGATCTAGAGAACAAGGAGTAATATTATCTCTATCAAATAGTTATAGATCGCTGCAATATTATAATATTAAAT  
TATAGCGAGCAAATATATATTCCAGTTTCTGTTCTGTTTATTATGGAGTGAGTATTTATATCTCAATTTAAAA  
GAAAATTTCTCAACAATATTTAAATTTGCATTATTTAAAACGTCCACGGAATCCAAGAATTTATTGAACCTAGAATAC  
AGTATATCCAAAGATCAAGATTCAACACTCCAATTTCTGCTCGAGGATCTATTCCTTCAACAATTTATATATTTCC  
GCAATGTAAATCCTAATATGTTATGAATTTGAATTTATATTGATGCACATAATATTAGTAATGCTGTATTATATA  
ACGAAAAATCTTAAAGATAAAGGAAAATGTGGAGATAGAGGAAGATTTACAGCTAGAGAAAAGATCTGCAAAATATGA  
AAAGTCTTATAACAAAACATTAGGAGAAAAGATCTGGAGATAAAGAAAATCTCGAGATAAAGAAAAGATCTTCAGA  
TAAAGAAAATCTGAAGATAAAGAAAATCTGAAGATAGAGGAAGATCTGCAGCTAGAGGAAGATCTGCAAAATAT  
GATGAAAAATCTTAAAACAAAACATTAGAAGAAAGATCTGGAGATAAAGAAAATCTCGAAAATAAAGAAAGATCT  
CCAGATAAAGAAAATCTGAAGATAGAGAAAGATCTGGAGATAGAGAAAAGATCTAGAGAAAAGATCTAGAGAAAATATTA  
TCTCTATCAAATAGTTGTAGATCGCTGCAATATTGTAATATTAATTTATAGGGAGCAAATATAAGTTCCAGTTCCCT  
GTTCCCTATTTATTATGGAATGAATTTTTATATCTCAATTTATAAAGAAAATTTCTTAAAAATATTAAATTTTCATT  
ATTAGAACATCACACCGAATCCAAAAATTTATTGGACCTAGAATATAGTATATCCAAAAGGTCAAGATCAACACTTC  
AATATTTCTGTTTCCGAGGATCTATTCCTCCAACAATTTATATATTCCGTAATGTAAATCTAGTATGTTATAAAT  
TTAAATTTATATTGATGCACATAGTATTAGTAATGCTGTATTCTGTAAACGAAAAATCTCAAGATAAAGGAAAATC  
TGGAGATAGAGGAAGATCTATAGCTAGAGAAAATCTGCAAAATATGAAAGTCTTATAACAAAACACTAGGAGAA  
AGATCTAGAGATAAAGAAAATCTCGAGATAAAGAAAAGATCTTTAGATAAAGAAAATCTGAAGATAGAGGAAGA  
TCTAGAGATAGAGAAAAGATCTGCAGCTAGAGAAAAGATCTGCAAAATATGAAAAATCTTATGACAAAATACTAGGAG  
AAAAATCTGGAGATAAAGAAAATCTTGAGATAAAGAAAAGATCTGCAGATAAAGAAAATCTGAAGATAGAGAAA  
GATCTAGAGAACAAGGAGCAATATTATCTCTATCAAATAGTTGTAGATCACTGCAATATTATAATATTAAATTTATA  
GCGAGCAAATATATATTCCAGTTCCCTGTTTCTGTTTATTATAGAGTGAGTATTTATATCTCAATTTAAAAAGAAA  
ATTTCTTAAAAATATTTAATTTTCATTATTAGAAGTCCCAACAAATCCAAAAATTTATTGGACTTAGAATACAGTA  
TATCCCAAGATCAAGATTCAACACTCTAATATTTCTGTTTCAAGATCTATTCCTCCGACCATTTATAGATTTCCG  
CCATCTATAATCCTAATATGTTATGAATTTATATTGATGCAAAAAGAATAAACATTTTTTAAATCACAAAAAATA  
AAATGTTGTGTTACTGTATTGTAATTTGAATTTAATAAAGAGAAAATAGCAATAGTACCGTGAATGTACTCACATT  
TCTTAATGCCAAATATATCAGTAAAATAGTACGCATTGAAGGATATTATGAACAATATTAGTATTTGATAACTCG

AAATGCGGATCATCGATATTAAGGACGTTTTTTTTCGAATTCTGTGCATAGTATTTTCCATAGTTAACAAACAAAA  
ACTTTGACATATTTTGAATTCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATAAACAAATCTTTGGGTGATCGAATGTTCAA  
TTCGGCACTGAATTTGATTAGTTCATCTATTATAAAGTCTTATTTGACTGCTGTGCATCATGTTATTAGTAATGT  
AGTAATTATTAGTATATAATTTTTATCCAACGAATTTAAAAATAATCTAAAAATCTAAAAGAAATTTCTTAAAAACG  
ACGATTAATCCATTAATTTCTAATTTAATTTCTTTAAAAAATTAAGAATACTAAATTAAAAAATGAATTTATTATAT  
AATAGAAATAATAATTGTTTCTAAAGAATGGAGAATATTTTTTTGATGTATTTGTGCATATAATTTTATCATAAT  
AATGTTACATTGAATATCAAGACATAAATCTTGAAATTAATAGTATCATCCCTTCAAACGAAAAGTAAATAAATC  
TTGGCCAATTTATTTATTGTATTTAATGATTATCCATGGTTCTAATATGGATTTATCGATTTTGTACAATTTTT  
TGACAAAATTTCTGTTGTTGAAAAGGAAGTAATAATATTATTAAGAATTTCAATGTCAATTTGTTAAATCGATTT  
TGTATAGATAGCGCATAAAAAATTTATTAGTCTTTTTTTTATAAATCAAAATATTGTTTATTGTACATCAATTTT  
TTTTATGATTTTTAACGTATATTTAATTACTCTAAAACTTCTTTAAACTTTTATAAATAACTTAGATATTTGGATTA  
GTATAGATCACGCAATAAAATAAATATTTGATGAAGTCTCAAGAATTTCTTGTAAGCAATTTTTCAATAATAAAT  
TGGTTTTCTTCTATATAATTTTTTTTTTATACTAAAAAATTTTTTAATACAAAATCGGATAGAATACAAATTTAA  
TCGATTAATAATAATAATAATAAATATTAATGATAGTAAACAAACGCTTTTAATTATCCATAATGTTTATTAATAC  
TATCTTTTTTATTGCAGTTTTAATTCATTAACAACATATCTGCGACTACGACCAATTTGAATAATAGTGCAAT  
TATTCAAAGTCTTTCTCGCCATATTGCTTTCTAATTTCTATTTTTCATAATAGAACTATTTTTAAATTTATATCGAA  
TCTAAAAAATAGTTTATATTTTTGCTATACCAATTACTTATGTTTATGAAAATGGATTGAATTTATTTTTTTTCC  
GCAATTTAAACAAAAAATGATTTTCGACATTTTAAATGACATTTGTTTCTTGAAATTTGCAATATGTTGTTACG  
AAAAATTATTGAAAACAAAAAATCCTTTTTCCCTACTAACTTCAATTTCAACCACTATGACGCTAACTTCGCA  
CTATGAAGTTAGCAATATAAGCAATGAAAATTTGAAGAATTTCTCAAAATATTCTACTAGCGTCTTCTCTAAGCACT  
TGGGTGATTTATACGTAAGTATATGTGTACTGTAAAAAGTTTTAGAGAGTTTTTGTAAATTTTATTTTATATTTTAA  
TGTTTGTCTCTTTTATTTATTATAATAATATGATATTTTGTATACATCATTTGATGTAATGTACATATTTAA  
TCTTAGTGTACTTTAATTTATAAAAAAGATTTGCAGGTTAAATTTTCATTAATATACGTATACTTGTTCGGTATTA  
TCATAAAAAATTTATCATAAAAATGAAACGAAATATATCAAATTTATCATATCACGATGAGAAATTTAAACAAATTA  
CGGAATGAAGATAACAAAATTTGATCTGCGTTCAAGAACAAGAAGAAGCAATFACAATATAGACGCGAAGCGTGG  
TTGGTACAACAAGAACGCGAACAAGAATACGAAAAATTTGAAAAGGAAGATGATTTTGAATATGAATTTATATTT  
AAATATTACACTACTGTAAGAAAAAATTTAGTATTTGAAAGAAGTAAAACCTAAAAGTAAATCCCAGAAAGTCGT  
GATAGAAGTAATACATCAAACACATCTAAAAATTTATATTATCCGATAAGTATGTATGAATAAATTAATAAAT  
TTTTAGTTTATGTTATTTATATAAAATTTATTTTAAATAAAAAATAGAATTTAAAAAATAATTTGAATGTAGAAAT  
AAATATTATATAAATATGTAATATAATTTGAAAAATACGAATAAGTATATAAAAACAATATAATGTAAAAATTC  
CAGTCTAAGATATATTATTTGTATATATATATCATTGAAAAATTTAATTTATAATTTTGATATAAAGTTTAT  
AAAATCATAATAATTCCTTTTTTAAATAAAAAATTTATTTTATACCACAGATTAGAATCTTCAGATGATACATCT  
TTATTTAGAGGACCAAAAGGTATTCAAATTAATGCAACAGAACTACAAAAATTAAGCTAGAAAATTCACAGAGAT  
TTGCCAGGAAAATCAACAACAACAACCTGTGGAAGTTAAACGAGATATTATCAATCTGAAGATGTGATTCTCATA  
AGAAGAACGGTAAAATGTTATTTTTTTGTTTTCGATTATTAACAACCTTAAAAATTTATCATCATTGATAAAGAAGT  
AGCAAAGGTATGTATAAATTCATATAAAAAGATTAATTTATCCATCAAAGGAAGATGAAACTTTTTTCAGCAGAAG  
TCGTCAAAAATATTTGTGAACTCAACATTGAAGATAACTTTAACTATTTTTTATCAATATCTTTTATCTTAAATG  
TTCTTAAGTTTTATTTTAAAGTATTTTTTACTTGTCTTTTTTAAATTTTTCTGCAAAATTTGATTTAAGTTTGCAT  
AAAAATATTATTAGCATAAAAAATAATGTTATGTTTTTAAATATATTGCTTTTTAACAAATTTTTTTTTAAAAATATCT  
TTAAATTTAGTTAAATTTAATTTATTTTCTGCATTCTTTTTATTGATTTAGCTTGATTTTTGGAACATTTGTAT  
ATTTAAAAATAGAAAGAATTTTTACAAGATTTGAATTTTTACTATAAAAATGATTCCTTATTATAAATTCAGTTTT  
TTATTGTTAGAATTTAATTTATAGAAAAAATTTAATTTATAGAAAAAATAATTTACTTCTATTATTTTGCATTT  
AAACATGTAGAGTTTCGATATTAATGCTAAAAGTAGTGCTACAACCTGAAGAAAAAATATTGAAGAATAAAACGCTC  
TGAAGATTGATTGCTATATCAAATTTATTAATAATGATGACTGAAATGAATAATTAATGAAAATTTTAAATAGA  
AGCATTTTCTATTAAATTTTAAAAATAAAAAAGTTTTTTTTTCAATTTCTTTAATTTGTAATAAATTTGTCAATTTAT  
ATTTAAACAATTTCTGAATTAAGAAAAATTTAAAGAAATTTTCAAAAAATAAATTTGTTTGCATAACTTGTATAT  
CATATTTATGTTATTAGTCAAATATATTTAATAAGATATAATATAAATAATAGTAAACATATAATTCATTGAGTGG  
AAGATTTTAAATCATCTTAGAAGATATGATTTTTAAATTTACAACCTTTATTACATTTATAAAGATTCATTCTACATA  
GCTTTCAAAATTTTACTTTTTTAAATTAATATAAATAAAAAATAAGATCATAATTTGATAAAGAAATAGCAGAG  
GTATGTATAAATTCAGTATAAAGATTAATTTATCTTCAGGTATAGATAAATTTTTCCAGCAGAAATCATCAAAA  
ATATATGTGAACTCAACGTGGAAGATAACTTTAAACAATTTTTTTTTAAAAATATAAATTTGAAATTTTATATTTTAA  
TAGACTTTTGCATTTATTTTTTTTTCTATGATTAATATTAATTTTTAAATAATAATTTCAATTTTATTAATATAAC  
ATCGTGAAAAATCATAACTATAATATGAAAAATCATAATTATAATCATTGTTTATAAATTTCTACAGACAAGAAG  
ATGGATTTATATGTCATATATTTTCTAATATTTAACAATTTACTCAAATATAAAAAATATTTTATGAAGTTAATAA  
CATATTTCTAATTTATCAAAGAAGAAAATTTGGAATACACACGATTAGGATTACGCAGGATCAGAGTATTGAAAC  
GTGCAATATGTAGGCACAATATCTTTTATCTTAAAGTGTCTAAGAGTACTTTTTGTTCTTTTTTAAATTTTTTTGGCA  
TTTGAGTTTGCATGAAAAAATTTATGCTTTTTAATATTAATAACATATATTAATATTAATAATTTAATAACATAA  
AAATAACGTTATGTTTTTAAATATATTGCTTTTTAACAAATTTTTTTTTAAAAATGCTTTAAATTTATTTAAATTTAAT  
TTATTTTGCAGATTCTCTTTATTGATTTAACTTGATTTTTTGAATATTTTATATATTTAAAAATAGAAAGAATTTT  
TACAAGATTTGAATTTCTATTATAAATTAATTCCTTATTATAAATTCATTTTTTATTATTAGAAATTTAATTTAT  
AGAAAAAGAAAATTTATTTCTATTATTTTGCATTTCAAACATGTAGAGTTTCGATATTGATGCTAAAAATAGTGCTA

CAACTGAAGAATAAATATTGAAGAATAAATCGTCTTGAAGATTGGTGCATATCAAAAATTATTATTAATATGATA  
TTGAAATGAATAATTAATGAAAATATTTAAATAATAGAAGCATTATGTCTATTAAATTTTAAAAATAAAAAAT  
TCTTTTTTCATTTTTTTAATTGCAAAAATTTGTCAATTATATTTAAACAATTTCTGAATTAAGAAAAATTTAAAGAA  
ATAAAAATTTTTGCATAAATTGTATATCATATTTATGTTATTAGTAAAAATATATTTAACAAAAATAAATAAATA  
ATAATAAGCATATAATTCATCAAGTGAAGATTTTAATCATCTTAGAAGATATGATTTTACAATTACAATTTTAT  
TATATGAAAATTCATTCTACATAATTTTCAAAAATTTATTACTTTTTAAATTAATGTTTAAATAAAAAAACAATTT  
TTATAAAGTCATGAAAGAAAAAGATATAAAGTGAAGATATATATTTCCATAAATTTATATTTATTATGGATTTA  
TATATATCATTTTATAACATCTAATTTTCAAGATAATTATGTATCATATATTTTCAACTGCAAAATTTGAAAAAAA  
GATTTTTTATAATAATATTATTAATAAAATTTTATTTAATAATAAAAAATTGAATAAATTTTAAATCTTTATATTTT  
TTCAAAAATAGTACGAAGCAGTGAAGTTCAATTAGTTGTAATTCATATTTATATATCTACATCTCTATATATG  
TATATTTCTACATCATCATATAAAAAGTAATAACATAAAATGATATGAAAAATAATTTATTGTTACTTTTTTTCATGTT  
TTGTAGCTAATTTATTTATGCAGTTTTCATATATCATTGTATATATATTTTATTATTAAAAAGATCTTATTATAT  
TATTATAATTATCAAGAAATATTCAATTTATATATCATTCTAATCTATCATCTATTATATAGTTATATTTTATGG  
TTTTATGGTTATTTCTAAAAAATTTTATCTAATTTTAAATTATAGGAGAAAGGATCTAAGCCTATATTTGAAAG  
AGAAGAATAAAAAATGTATTTAAACAAAAATAAATAAAATTTAAAGAACATGATACAGTTTTAGTTGTAAATATTGA  
AAAATCAGGTATATTTTTTACTAAATAAAATATATACTAATTTTATACTAAATTTATATTAAATTTTATACTAAAATA  
TAACTTTTTTATCATTATAAATTTAAATTTATATATAATTTTATTTTTAGGAAACGAAAGCAAAAAATATGCTACT  
TCATCAAAATCTTTAAGAAATCGAACTCATGGTTTTCAACATACATCGTCTCGTTATTCCAAGGTATGTAATGACA  
ATAAAATTTGATGATTTATTACCATTATACTACAATTTGCATATTTACTATACAATTTGCTTTATTTTTTAAAAATTTAG  
AATATAAATTTGATATAAATATAAATAAATTTAATAAGAATATAATTAATCTGAAAAAACCAGACAAAACCTTA  
TCGAATTTTTTTCACCTTAGAAAATTTTTTTCATTCCGAAAATTTCTGAAAAATTTATTTATTTTTTAAATTCAGGATC  
AAAAATCATAATTAATATATATATACATATATCTGATTTGAATTTCTTTCTATGGTTAATATTATTATTTTTTA  
TAAAAAATTTCAATAATTGAATTTTTAAATGATAATTTTTTATATAGAATAATAGTAGAATAAATTCATGAATTT  
TTTTAAATTTTTTATTAATTTATTTTATATTTAAATTTTTTATATATATATATAAATAATATATATATATATAT  
ATGTATTTTCATGAATTCATGAATTTTTTAAAGTTTGATTACAGATGTGAAATATATTTAAAAATGTTTTTCAA  
TTGATTTATTTGCTTTTTGAATTTTCTATAATATCTTATAATATAGATAAATCATTTTATACAAAATGTCAAAAAT  
ATCATTTGTAAGTAACTGAAATTAATTTCAAGCAACATTTTCTTCTGCAAAAAATTTTGTATTTGTAGCTTTT  
ATTAATAAAAAATACTAATCATAGAATCAATATTGCGTGCTGTTGATGAACAAGCAAAAAATACTCGAAGAAATTT  
GTGTTGAATACAAATATTTTTTTTATTGATAAAAAATTTATATTGAATTACACCATGAATAAATAAATAAATAATTT  
GGGTTGGCAACTAAGTAATTTGCGGATTTTTTTTTAGAAAATCAAAGACAATTTTTTTCACGGAACATAAATACTTTA  
TTCTGTAATGTGTTGCCATTTTGTATCAATGATCTTTTTGCCATTTTTTTCAGGCAGCATCATAATCCCACGTTCCATA  
AACTTTGTGGTTTTTATTAGCAAAAACTGAATCAGGTACGATTTGATATCATCATCATTTATTGAAATTTTTTACC  
ATTTCAAGGAGTTTTGTAAAGATCGAAACAAAAAGTAATCAGATGGTGCATATCAGGATTTATATGGTGGATGTGG  
CAAAACATCCCAACCAAACTCCAATAATTTTTTCCGAGTGACCAAAGATGTGTGTGGCCTTGCATTTGCATGATG  
GAATACAACACCTTTTTCGATTTGTCAATTTCCGGCCGCTTTTTCTTCAACCGCATTGTTTAAATTTCTGTTAGTTGTT  
AATGTAACAACAGAATTGATCGTTCCGATTTGGGTGGTAAGAGTTCAAATAAGACAATTTCTTTGTAATCCCACCA  
AACTGATAACAAAACCTTTCTTTTGTGAAATACCAGCTTTTTGATGTTGTTTGTGAGCTGGTTCCAGTGGCTGCTCCA  
CCATCTTTTTCCGCTTGATATTGTTGTAACAACCCATTTTTTTCATCGTCAGTTATCAGTCGTTTTTAAAAATGGATC  
ATTTTCATTACGTTTTCTTTAGCAAAATCGCAGCTGTTAATGCGTTGCGTTAAATGCTTTTTCTTTTCAGTTCCGTGAGG  
AACCCATGTATCGAGTTTTTGAACATAGCCAAGTTGTTTTAAGTGGTTTTTCAATGCATGTATGTGATACATGAAG  
CTTCTCTGCAATCTCACGAGTTGTACTGTGACGATCCGAATTTGATTATTGCTTTGATTAGGTCGTCATCAACTTC  
AACTGAAATCTGCAATTACTTAGTTGCCAACCAATAATACTTTTTTTGAGATATGCTGCTTTGGATAGTTATT  
CGTATTTAATCGAGAATTTATGAGTCAATGTTATTGTGCGGGTTTCTGACTAACTAGACTAGACTAGACTATCTTT  
CCTAATTTGACCAATATTTTTTAAATATAAATTTTAAATGTTAATAACTCGTTAACAAGCTGTAATGAAAGTTT  
TTGTAATGAAAATCTTGTTTGAATTTATCCAGAAATTTTCAAGTTTGTGGAATGCTAATATTTGAATTTGTTA  
TTTTTCTTTGGATTCATCGAATCTCTATTTGCATTTTTTTCGTTGAAATTTTTTCTTTCTTAAAAATTTTTCTCTAA  
ATTTCTAAGAATAAATTTCTTTCTTCAATTTACCAGAAAGAAATTTCTCTTATATCAAAAAAATTTTCATCTTCTCTT  
AAAATGAATCTTATTTTCAGCATAACCATAACATCTTACCACAAACCACTATCTTTTTGTACTTAAATTTCTTGTAGTTT  
AAATTTCTTCCCAAGATAAAAAATCCATCAAAACATAGAACTTTGTACAGTATGCAAAATGTATATATGGATTCGAAA  
ATGAAGCATAAATGAAAGAAATCTGTTAACAGATTATCTGTTTACATCTCTAATTTTTCATATTTACAATATT  
CAAATTTACTTACTTAAAGGCAATCTATCTCCTCGTTTTTTCGCTGTTCAAATATTCTAGGATTTATTGTTAATAA  
TAGAAGACAATGATATTGCTCTTTCGAAACAAGCGATTTCTTCAATTTACTATTACACATCATTGAGTTTCCACTTT  
CTCTATTTTCTGCTTCTTTTTGTAGAATTGTCTAATGTTTCTTTTCTTATGGATTATTTCAAAGATGATGTTCTG  
TGAATTTCTTCAATGATGAAAATCAATCATCAACTCTACAAAATCTTTCTTCCAAGTAAATTTGGTACCAGTGG  
ACATTTCTTTTTCTTTTTCAAAAAAAGAATCCTCCAACATATCATTCTGATACCAATATTGCATCCATTATCACT  
CGTTTTCTTCTCATAGTAACTTTATTTATAAATAAATATCAATTTAATATCAGTTTGAATTTATTTTTTTTCAATGT  
AACTCATCTATTATAAATAACAATAATCTTTAGGAAAAGAGAGGACATTTGCTCTTTCGTGGCCGATATTAATTC  
TTGCTTTATCGATATATTTAATTTTCGATGACAACCTGATGTTGTCATCTTCTATGCCATGATTCATTTTGGTTCATG  
ATGTTCCATATTGTAGCTGTTATGCTTATAATAATATTTTTTTCATATATTTTTGATAAAAAATAACAATATGCAATA  
TTTATTCCAACTTTGAAAATATAGATTTATAAATCTTTGATACTTCGATATTTTTTGTCTAAATAAGGACTAATA  
TAAATTTTTTATTATTTTATTAATAAATTTAATAGAAATTTATCATTAGCATTTTTTTTTCATTTCTGATTGACATAT

AATATAAAATTTTTAGATATACTTTTTATTTCAGATAATATAATGTTAATAATAATGATAAAATAAAATTTACTAGA  
AGGAACGTAAGTAACATTAATTAATTTTTAAATTAACCTTTTATATTATGTAGAAATATATACATAAAAAATTTTTG  
TTTGTATATAATAAATTTGTTTCATATAAATCCAAGAAAATTTGCTAGCAAAGCAAGCGAAAAAGCGAAAAATATT  
TACGCACTATTTAATATTTTTATATTAATGTATATGTAATATTTTCTTAATTTGAAAAATAGTATATGTAATAGTA  
ATTGAATTTGCAAAACAAATTAATATTATGTATATAGAATATTGTATAAAAAAATAGATATAAAATTTAAATATTATA  
TTTTATTATTATTAATTTTTAAATTTAATAAACAATATAACTGAATATATCTAGAACTTATCAATTTCTGTACTT  
TTTTAAATTTTCCACAATGGAATAGAAATGATAAATATATGATAACATAATTACTTGAATTTTACATATTTATT  
TAATATGTTTCATTTTCTTAAATGATTTAATAAAAAATTTTATATTTTATTAATTTATATAATTTAATTTATATAAAT  
GGATTTTATTAATAAATTTTATTATTCAAGGAGAGAAGTTGCAGTAGAGATAGAAATAGAGAATATAGAAAAAGG  
ACAGACGATATGAAAAATTACACAATGAAAAAGAAAACTTTTGAAGAAAAGAACAAGTCGTAAGCGTTATTCTC  
GTTCAAGAGAACGAGAGCAAAAGTATGGAACGAAATATATGAAATATATCAGATATATCATATTTGTTAAAAAT  
GAATTTTAATTAATATTATTACAGATTCATATAAAAAATGAGAATTTCTTATCGAAAAATTCGAGAAACATCGAAAG  
AACGATCTCGAGATAAAACGGAACGAGAGAGATCTAAGAACGTAATAATTTTATCTTTATCGAACCAATTACA  
TTTCTAACATTTCTAATTATAATAATAATAAATTTATAAATAAAAAATTTATATTACAATATTAATTTATATTGAAC  
AAATTTCTGTTTCTGTTTCTGTTTCTGTTTCTGTTTCTGTTTCTGTTTCTGTTTCTGTTTCTGTTTCTGTTTCTGTTT  
TAACAATATTAATTTTATTATTAGAAATTTTCCACCAAGACCAATGGGACCTTGGATTTCAATACAAGAACAAT  
ACCAAGATTTAGGTATATTGGTCCACCAACACCATTTCCACGATTCATTCTCAAATGCGTATAGATTTTCGACC  
ACCTCAAATCCTAGTATGTTTATGAATTTATATTGATGCACATAGTATTAATGCTGTATTAATTTTCTGTTTTT  
TTTTTAGGATTTGGACCTACGCATCAATGAAGAACTATAAAAAATTTTATATAATAAAAAAGTTAATGATGCGAACAT  
ATTGAATAATGAAATATGAGATGACATTTTACAAAAATAGAAATGTAAAATCATAATATATATCGAAATTTGGAC  
AATTAATGGTTCAAGAGTCAAATAACTTGTACATCTTTTTCTTTGTTTCAAAAAGAAATCGTAAAAAAATGACTCCTT  
ACTTTTAAAGAATTTGAGAAGAGAACACAGCATCTTTGCATCATTAAATAGATCATGTAATATACTTTTTTAATTA  
TTTCCCTATTCCATAATTATATTTTATATGTTTTGTTTCATTAATTTATGCATGCTATATATATATCATTAATAAC  
ATATATATATAACATATATATATACATCATGTTTGATATATGTTATTGATAATTTAAGATAATATCAATATATAA  
GATAGAAAGATAGAAAGATAGAAAGATTCTAATTTTTTTAATTTGATTATAAAAAACGATTTGTTTTATCTATCGT  
GGAAATACTAAAAAATTTAGTGTTCAGTGTATTATAAATTTTAGTTTTTAAATTTTTATTTTTTAAACTGTGTAAA  
TTCTTAATCCTTTGCACCTCGACTCTGTTTTCGAAACCAACACCCAGACTCGAACTCAGCTCAGCTGCGTTCGTA  
TGCGTTGTTGTCGAGAGTCACTGTTGGAGTTACTGCATTATCTCAAGTGGTGACCGAGAGTCACTGTTTTGGACT  
GCAAAGGATTAATAATATTATTTAAGATTAGTAAGATTATTATAATTAATTTATATATAATTAATTTATAATAAT  
ATAATAATTAAGTTATTATAATTTTTTATTTTTTAAAGTATGATATAGTTAAGATATATTGATCAAGATTTCTTTC  
TTTTTTTTGCTAATCATTCCATTCCGTATATCTTTATAAATTTTTATGGTTGAATTTTATGATTTTACTATATT  
ATAGAATATATGTGTAATTATATTTATAAATACAAAATTTGAAATCTATCTTATTTTCAATTTTTTAAATTTTGATC  
ATTATCTTTAATATATCTATTTTTAAATTTATAGTTTTTCAAATCATTAACTCGTGATCATTAAATAATTAATAATA  
GATATTTTATACTATTTTATATTTAATATATTTTTTATGTAAAATACTTTTACATTTTGCATGTGATAAATATATT  
ATATATAAGTAAAGTATTTCTTTAAATTTTTGATTAAATTAATATTTTTTTTTTAAAGTTTTGTTAATATATAATA  
ATCTTTGATAGATCATCGATATAAGCTAATTTATTTTAGGAATATGTGTGAACATTTATATATATATATATCAAT  
TATTAATAAAGTTGTGAAATCTATCATCTATTAGCCATCTTTTAAAGTGTAAAAATATCTCATTAATAATTTCTA  
AATCTTTCTAAAAGTATTCAAGTTAATGATTAGTTCAATATTTTATTCAATATTACACTTCTATATACTTTATATTG  
CTTGTCTATTATTTCTCTCACCTTGTCTTCTGTATTTGTTTTATTTGCGACACTGTACAGATGGCGCTGTGCGAA  
ATTTTAATTTATTTCTATCCTTTTCTCCTTTATGCACCTTGTCTATATTTTCTTTTGCACGTTGCTGAAGAAA  
CATATATTAATAACAGATTCATAAACACATTTTTATTATAAAAAATTAATTTTTAATCTTTAATATAAAAAATGTT  
AATATTATAATAGATATTATATTTTTCGATTTATGAATCATAATGAATCTGTAAAATATACTTTCATATATGTCTGC  
AAGATATTGTGTAACAGAATATTGTCTTACCTTTTATAATTTTATATTGAGATTTGATTTTCAATTTAAT  
ACAATTTGCAATTTCTATTCTAATCAATGTTTATTAATGTTTAAAGATCAGATTAATAATGATGTTGATTTCTGT  
TAGATTGAACAAAAATGCATTGAATGTTACATTTTTTCTATACCTCGTTTGCATATGGCAAATTTTTCTGCGC  
ATAGTGAGGTAATTTGTCAGTCGACAAGCAACCATCGGTACGTGCGTATTATAAAAAACGATTTGTTTTATCTATT  
GTGGAATATTAAAAAATTCAGTGTTAATAAATAGTGAATTTTAAAAAAATTAACAGATTAATTTTTTAAAAAA  
TTAAATAAAATATTACAAATATTTCAATATTACAAAGATTTATATAAATTTATATAATTTATTAATATTTCGCA  
TATATATTTTCACTTATATAAATTTTCTTTATGCGAAAATAGTTTTATATATCAATTTATAAATTTAGTTTCATAA  
ATTAATTTCCATGATTTCAATTTTTAAATTTGTTAATTGATAAAGTTTTTATAAATAAAATTTTATTAATA  
ATATTAATTAATATTTAAAAAATATTTTTTAAATGAAATTTATAAAGATTTATTCAATTTATCTTTATTAATTTCAAT  
GATTTTTTAAATAAATATTTGTAATTAATACTTAAAATAATTTAAACAGTATTTATTTCAGAAAAAATCTTAAGA  
AGTTTTGATACGTGATTTAGTTAGTATGTAT  
AAAGTAGATTGTTGATTGTCATTTTTATTTTATCTTGAATCTATCAATATTATCAATTTTATATATG  
ATAAATATACATTGTAATATACATATGTATACGTATGTGATTATTATTGTCAGATTTGTTTTCTCTATTTTTCTT  
TTTTTTTTTTTTGATATTTTTTTTTTACCCTAAATTTTTCTTTTTTATTCTTTTTCTATCCTTATATTTTTTATT  
TATTATTTTTTTTTTCAATCCACAAAATTTTGAATTCATGAAATTTAAATTTGATTTATATTTTTAAATTTGATCAA  
TTATAATTTTTTTTTACTATCAAATATGTCAATTAGTGAACAATAAATCAATCTGTAAATTTTTGTATTTATATC  
ATAAATATTTGCAAGGGTATATATATTTAGTTACAAGCATACTTTTTATTGTTCTATTTTTTTTTTATTGTTTATT  
AAACTGATATCAATTAAGAAGAAATTAATTTAATTTTCAATTTATCTTATTAATTTATATGACAAAAAGATAAT  
ATTCGAAATAGAGAATCTTCACCGATTTCAATGATTTTTTAGATATATTACAGAAACATTTTGAACAATTTTTTAC

TTTGCATATCGCTGCAGCTTAGTTTTAGAAATATTTGCAAAAAAGATTGCTATTATTACATAGAATTTCTTTTAT  
GTGTATGTATCTTTGATTGCGTGTGTGTAAACATGCGATCCTCTGTAAACACATGACGGCAGCAGGCAACTAAGA  
CGTTATAACGGGTGAACTAACCAAAAATCTAGTTGCTCGTATATTATGATGGACTTAAAAATTTCAAATCCAAC  
GTCGAGTTTGGACATTCGATCGCCTAAAGAATTATTTTATATTTTATTTTTCTTCGAATCGTGAAATATATCAA  
ATTTAATATTAATTTGGAGACATTTTAAAGTTGAATATAATCTAGGAGCAAGTAGATTTTTAATTGATCTATCTCT  
TATACATTTTGGATTTTATAATGTTTACAGTGGTGATCACAGATATTTCTATATAAAAAAATTACATATATAAG  
AATAACAGTATTTTTTTTTGTAAATATCTCAAAAACATAAATAACAATGCAAAGAATAATATATAGAGAGAGAAG  
AAACAAATAAAGAATAATAATATGCAAAGAAAAAATTTGTTAAAAATCTTATTTTCTAGATACGTATCCAAAA  
TCATGAAAATCGATAAGAATAATAATATTAACATAATAATTTGCAAATTTATTTCTATTGATCAATACATTTGCAAA  
TTTTTCTGCATTATAAATGATGAACGATGTAACATATTAATATTTTAAAGTTAGTGGTATTTAGTGATATTTTAAAA  
GAATAATCGTTAATAATTTAAAACTATCGACTTTCTCTATAAATATATGATGCATATAGTATAGTATGTATATA  
CATTATTAGAGCGTGAGATATTTCAACGAAATATGACTTTGAAATATTTAGAACATGGAAAGATACTTTTATGATT  
TATGTGATGATTCAAACAAATTTTATAATTTAATAAATTTTGCAGGACAGTTTATAAAACAATGCCATTTATCGAC  
GAATAAGACTCGATAAACTTATCTAAAATTTATTCTGAATAAATTTGTTTGAATTGAAATTTGATATTTTCAATCCAA  
ATAAAAATTTGTTAATATTTACTTATCATACAAATTTATATATTTTTAATATTTTCTGTTTGAATTCGTGTATATTTG  
ATTCCCTTTCTATCACAGATTCGATGTTAATTTTTCTTTGGTACTATGGAGAATAGTAATATGACAGAAATTCGA  
AGAAAACGTGTCCTTCGATATCGATGACCCGGACTTTGCACCATCGAAAAATACTACTATTTACTCATAATATTTCT  
TCGAGGCATGCAATTCACCGATATTACATTTGGTGTAAATAAATGTAAGTACATTCACGTTACTTATTGCTACTT  
ATTATTTATTATCTTTATTATTTGTATTAAATTTATTGTACAATACAGTAATATAAACTACAATGTTTTTATTCTT  
TTAATAGATTTATTTTGTGATGATTTTATTTCAACTGCTATTTAAAATTTATTTTATTTAAAAAGTTTATAAACA  
AACTCATGTTGTTTTAACTGTTAATTAAGTAACATTGATTAATAAATAAGACTACCAATTACAATGATCGTAA  
AGCTATAAGTTACACATAAAAATTTGAAACGATTTTTCATGGCCAAGGAAGAAAATGAATCATCACATTTTTCTGTTCCG  
TTAAGTCAATTTACAAATACATATATATGTACACGTAACATATAATATTACTTGTATATGAATATAATATATTTT  
TGAGAATTTGTTATTATAATTATTAAAAATTTATTATTATTATTATTTTTATTATAATTTTTCTATTGATTTT  
ATTTATGTTAATATTTCAATTACTTTTCGTAATATTTTATGTATAAAAATTTGTATCAATTAATTTAAAAAAT  
TTAAATTTATAATCAATTAATAATAATAAATAAAGAAAGAAATTAACATTAAGTTGTTAAAAATTTAAAAAGAT  
TAAACTTTTCTAGCATATATTTTATTTTAAATTAATTAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA  
TGACATATTTAGATAAAATATTTAAATTTAAATCGAATCATAGAATGCATTATCATTTGTGTATATATTCATGTA  
ATATATATATATATATATACAAAAAACATAAATTATCTTAATTCGTATCGACCTATTATTATATTAGGGAGCAA  
GTATGCATAGTTGTGCGACGGAAACTCGAAGAAAATTTGGATCCACGTGGATATCAGTTTTCTTTCTCGAGAAAATCA  
ACCTCGAGTCGGTGTGCCGTATATGAACAAACGATTTCTTCAATCAATGTCTGGCGCGTGCAGTAATCGCTTAG  
ATAACGATATTTCTTTGTTCAACTAGCGGATAAGATTCGTTCCATCAAGAAAATGACAGTAACCTGTTGCACAGT  
AATAGCACTCAGATATGTCATTAATTTTTCTTTTTCTTTGTTCTTCTATTCTATTCTATTTTTATTTTTAAATGT  
TTAAACTTTTATTTTACGGAATATTATAAACTCTTGGATCCTATATTTTTTGTATAGTACTCAACGTATATTATT  
CTTTCTATTTGAATATTATTTTCAATTTTAAAGTCAAAATATATGATATATTTTTTAAATTTGAATTTAAATGTTTTGTT  
TATATTTAATAATTTTATTAAATTTTTTTCATAAAAATTAGGAATATTTAAATATTTGCTATTTGTTTTATATATT  
TTTTATTCTACCATTATATAGTAGCGTTCTTCAATATCAACGATTTTATTTCTGTACAAAATTTACTAATAG  
ATGGAGTTAAAAATCCATATTTATAAAAATAAAAATAATTTTTTTCTGATAAATAATTTATTTCCGATAAAAAATTTTAT  
TTATTTTTATAATATTATTAGCATTAAATTTTATACTAAAATTTATAATTTAGTTTATTTTATTTTCAATAAGTACT  
ATTAATGCTCAAATGTACTTTAAATATTAATTTTAAATCATTCTTAAATTTGTTTATTGCTAAATCTAACAA  
CAAAATCTAACAAATTTGAAATTTTCTGCGATTGAAGTCATAAGTTTATCAAGACCCCTGTGTATAGTAACATA  
ATTTTTAACTCTTTTACGATAATGACTTTTTTTTTATTATAAATTTATTCGCAATTTCTACTTATCAATAACGATA  
AAAACGTACATTTATATATGCAAAATTAACATTTCTCTCTTTCTAAATGTGATAAGCCATTTGGATATATTTGATTT  
ATTATAGTTTTAATTTTTTTTTAGATTTAAATACAATCTATATTAATGATGAAAATATTCAAATGATTTACTTCACTT  
TACATTATTATAAAAATGAAATACAAAACAATATATTTTTATTATTAAATTTAAATTTAAATTTAAATTTTATTTCTTAA  
TACTTTTTAAAAATTAATATTATTAATAAATTTTTTTAATTTTTTTAGAAAATTTAAAAAACCCTATTTTTATTGCGAT  
TGATACATGAAATATGATCTTATTAAGACATGTAATATTCTTTTTTACAAATATATTAGATCGAATCGAATCGAT  
ACGCTTTTTATTTCTTGCAATTATTAATATCATTATATTAGATTCGTTTTTACAATCTTCTAAAACAAAAATTTACA  
TTTTTTATTATTTTTTTTTTTTTTTGAAGATAAAAATAATCTTGAATCTTCAATTTTATTAAATTTAATTTGAATTTT  
ATTCAGCAATTTTTTAAATAAAAATTAATAGAAATAGGATTTATTATATTCTATTGTTATACTTATCTCTTATATT  
GTAGGAAAGTAAATAGATTTTTTAAACACCTTTATAAGTGTGATTAAAAAATATTTTAAATTTACAAGAGATAAAGT  
CGAATATTTAGAATATCACACACATTATTAATATTAGAATCGTTACGACGCAATTCGTTGCAATTTCCATTTAACG  
TATACACGACAATGTAACATATTTGCGTTGCATTTTAAATCAATAATGGATCAATAATGATCCTTGTGTTGTCAC  
TCTATCGTTGGACAATCATTGATCATTAAATCGAGCAAAATAATTTCAAAATGATATTCATGTCCTATTTGAA  
CGAATTGCTTCAAATGATAATTAATTTCAATTTTAAATTAACAAATATAAATATCATTATATTATCATTTAGATC  
ATAGATTGAAAGTACTTATCAAAAAATCTATAATTTTAAATTAACCTTTAAATTTGAAAAGATGTTATAAATATTCTGTT  
TGATTTTTTCAAATAATGCTTATAAAAAATTTATAAATTTAAATAAGTCAATATTTATGATGAAATTAATACATTTCC  
TTACATATATAAAAAATATTATTTTTGTAAATTTCTACTTTCAATTTTTTTATTATGAATCTTATTGATTTATGATC  
GTACTCTGACCAAAATCTTCTCTGCGACAAATCATAAAAAATTCGAATATAAAAATGTCCAAAAGACATAACCTTT  
ATCCTGTAATTTATACTTATTCAAATTTTAAATTTGGTAAAAACCTCTAGCAAAAAATTTCTAATAAGATCGAATG  
ATTCCAAGAAATATCAAACCTCTTTTTCTTTCTTTCTAAACAAGATTTTCAAGTACAACCTTGACTTCGTTTCAC

GCAGTTACATGGAAAACAACATCCGGGTAACGAGTTTTAGATGCACAATCGATCTGTTCCCTTCGAAGTTGAACGA  
TACCAGAGACGCCTATCCTTCAGGGCCGTGATTATTTTTAGGGAACTCTCGAGTTCGAATAGGAAATTCGCCTTG  
GTCGGCAACATATTATATTACACATCGGCATGGATTAAGAAACATGCAAAATTCGCAATAATTATATTTAGTTCT  
TGTTATCTGATTACAAGTGAACAATGCAGATGCAATATTAACCTGAGGATTTGCTAAATTCATTCAGTCATAATG  
CGGTATTATGATGCGTAACAAAAATTCAGTTCAGTGAACATACTTCGTGTCATCTTTGACGTCAATACGATTAT  
TTATGATAATTTATTTGATCGAAAATATTTAATCGAATAGTTAGTTTTCGATAGAGGAAAGTGAAAAATTGAAAGAG  
GAAAAAAGAGAGAATGATATTTCAAGGAAACGAATGAATAGAAAACCTAACCTACAAATAGAGTCAATTCGACTT  
TTAATTTTTATTTTTCTTTTTCTGATCAAAAAGAATCGATGCCAATTTTTTAAAAATAATAAACTTCATACAAT  
TCAATTTATCTGGAATAAAGATATATAATATAAATATTTAACAATAATAAATCTTTGAAACAGTTGAACTTCAG  
TATAGTCTCGTCTCGTTACAGCCTAATTAATTTGGCAAACGAAAATAAACCGATGTTTGTCTATATATAACCG  
CGACAATTATTTGATTGCTAAATATAAATTTAATTTATTAGGATGTTATTAATCTTTGCATATGGAAGCACGAGA  
TTCTGCTTTAAATAAATACACATAATATGTTTTATGTTTTTAAACGAATAATATAAATCTTTATATAGATTTAAT  
TATACACTTTGGTTACTAATAAAATTAGAAAAAGAGAATATTTTTATAACCATTTACTATGTAATAACTATGAA  
ATTTCGATAGCTGTAGAACTATTTTTATATTGTATTTTATTAGGTTTTCAAGACAAAACAATATATAAATAGTTTA  
GGATTATATAATAACAAAATATTGTAAATTTGAATTTCTGGCAGTGAATATTAATTGTCTTTAATAGTCTTTGAA  
AATGTTTCATATTTTATTATATCAAATTAATTAATTTCTAAATATAATCTTGTTCAATTTTTTTTTTTTTTATA  
AATTTTAAATGAATACTTATTTATGATCAATTAATAAAAGTTAACATAATGAATTTAATTATAAAAATAATAAA  
TTTAATAATCATTCTACAAAAAGAAAATTATCTATCTATTGTATTAATGAAAATGATACATTTGAACAATTTTTT  
TTGGATTTCAAAAATTGATTTATCGTATCTAAATGAATTTATTTAAGAAGTAGAACATATATACATGAATGTATA  
TATAACACTATTTAGAGTTCTATATTTATACTATTTAGATTATGACCCTTGACAAAAATAAGGTTAAATATATTT  
TCCTTCTTTCAAGGAAATGGTCTATTTCTATGATTGTTA

Abbildung 6.2. Schlupf- und Überlebensraten weiblicher (rot) und hemizygot-männlicher (blau) Genotypen, nicht-injizierte Kontrollen und nach embryonaler Injektion von RNAi-Sonden und RNAi-Kontrollen. RNAi, RNA-Interferenz. Definition von Schlupf- und Überlebensraten siehe Text.

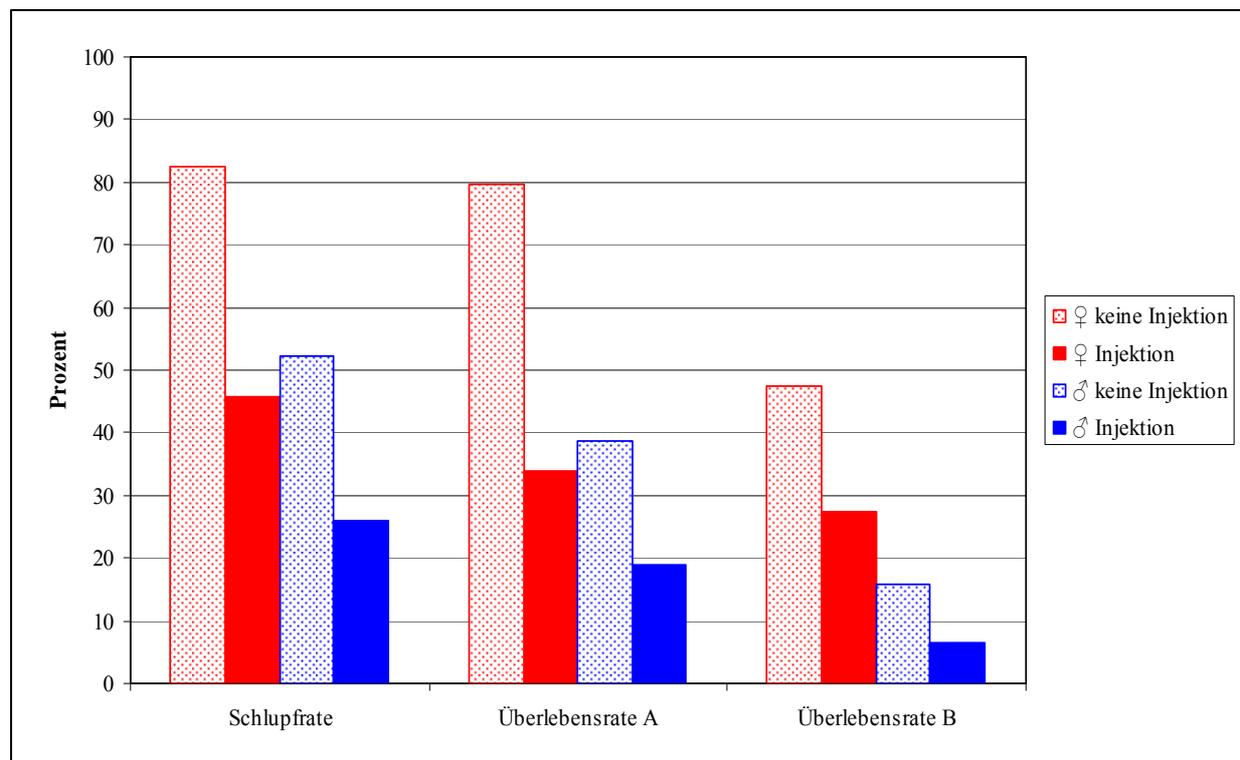
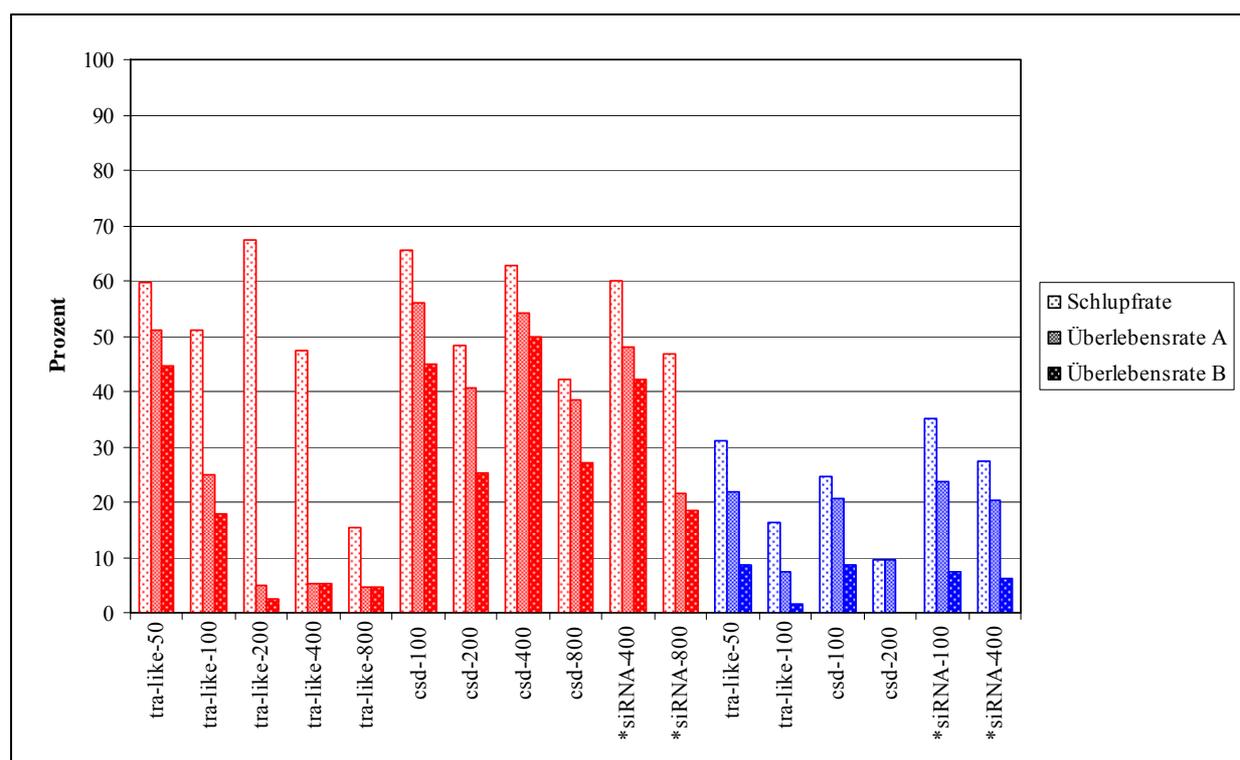


Abbildung 6.3. Schlupf- und Überlebensraten weiblicher (rot) und hemizygot-männlicher (blau) Genotypen nach embryonaler Injektion unterschiedlicher Mengen siRNA. Die Zahlen der X-Achsenbeschriftung geben die injizierte Menge siRNA in pg an. siRNA, small interfering RNA. Definition von Schlupf- und Überlebensraten siehe Text.



## **Danksagung**

Die vorgelegte Arbeit wurde am Institut für Molekulare Ökologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Anleitung von Prof. Dr. Martin Beye angefertigt. Ihm möchte ich für die Überlassung des Themas, die umfassende Unterstützung und zahlreiche erhellende Diskussionen danken.

Prof. Dr. Rüdiger Simon danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Martin Hasselmann danke ich für seinen vielfältigen und prompten Beistand in allen Belangen des Labors und der Datenverarbeitung, für die Anfertigung der dsRNA-Sonden und für seine Unterstützung bei den Mikroinjektionen. Morten Schioett danke ich für seine Unterstützung bei der Assemblierung der SDL-Region. Gerd Hause und seinen Mitarbeitern danke ich für die Anfertigung der histologischen Schnittpräparate und deren Fotodokumentation.

Marion Müller-Borg und Eva Theilenberg danke ich für ihre Unterstützung bei der Genotypisierung der verwendeten Kreuzungen.

Angela Peterson danke ich für ihre nahezu unerschöpfliche Bereitschaft, fehlendes Labormaterial aller Art aus dem eigenen Fundus zur Verfügung zu stellen. Margret Köck danke ich für die Überlassung des pEGFP-Plasmids und Elmar Wahle für die Überlassung von Sf21-Zellen.

Den Teilnehmern des ‘Sex Determination Workshop’, insbesondere Daniel Bopp, Giuseppe Saccone und Lucas Sánchez, danke ich für intensive Tagungen in freundschaftlicher Atmosphäre und mit vielen wertvollen Anregungen.

Außerdem danke ich Martin Hasselmann und Miriam Müller für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

## **Erklärung**

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 12.12.2006