

**Entwicklung transgenbasierter Systeme zur Anwendung  
im Rahmen der Sterilen Insekten Technik, einer  
ökologisch verträglichen Schädlingsbekämpfungsmethode**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

**Carsten Horn**

2003



Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Promotionsgesuch eingereicht am: 14. April 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Oktober 2003

Erstgutachter: Prof. Dr. Christian F. Lehner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Konrad Dettner



„Der Geist der Medizin ist leicht zu fassen;  
Ihr durchstudiert die groß' und kleine Welt  
Um es am Ende gehn zu lassen,  
Wie's Gott gefällt.“

**Johann Wolfgang Goethe**  
(Faust I)



**Meinen Eltern**

**&**

**Thi**



## Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom Juni 2000 bis zum April 2003 am Lehrstuhl für Genetik der Universität Bayreuth angefertigt.

Bei Prof. Dr. Christian Lehner möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft, seinen Scharfsinn und vielerlei wertvolle Anregungen bedanken.

Bei Dr. Ernst A. Wimmer bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und für die Freiheit, eigene Ideen und Ansätze in die Realität umsetzen zu können.

Ich bedanke mich des weiteren bei Nils Offen für seinen äußerst engagierten Einsatz im Rahmen seines Praktikums (und darüber hinaus). Nils steuerte einen wesentlichen Anteil zu dem Erfolg des Transposon-Mutagenese-Projektes bei. Bei den Praktikanten Frank Götschel und Nicola Horstmann bedanke ich mich für deren Mithilfe am SIT-Projekt und bei Ralf Ackermann für diverse Funktionstests der „Mutatorkonstrukte“.

Bei Dr. Claas A. Meyer, Dr. Joachim Reischl und (in Kürze auch Dr.) Alf Herzig bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft, vielerlei technische Kniffe und Anregungen. Für die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanke ich mich bei Dr. Stefan Heidmann. Mein herzlicher Dank gilt darüber hinaus Brigitte Jaunich für ihre unermüdliche und tatkräftige Unterstützung, insbesondere bei der Generierung transgener Taufiegen. Ein Dankeschön sei auch an alle anderen Mitglieder des Genetik-Lehrstuhls gerichtet. Es hat Freude bereitet, in dieser Gruppe zu arbeiten.

Bei P. Atkinson, A. Bergmann, H. Bujard, U. Häcker, S. Nystedt, P. Rørth, C. Savakis, G. Struhl, M. Scott, P. Sung und S. Thibault bedanke ich mich für Plasmide bzw. Fliegenstämme. Das Transposon-Mutagenese-Projekt wurde in Kooperation mit dem Labor von Prof. Udo Häcker, Lund, Schweden durchgeführt.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die großzügige finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre stets abrufbare Unterstützung in allen Lebenslagen. „Last but not least“ danke ich Thien-Thi Mac, mit der ich in erlebnisreichen Berlin-Wochenenden Kontrapunkte zum Laboralltag setzen konnte.



Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Horn, C. & E.A. Wimmer (2003). A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. *Nature Biotechnology* 21: 64-70.

Horn, C., Offen, N., Nystedt, S., Häcker, U. & E.A. Wimmer (2003). *piggyBac*-based insertional mutagenesis and enhancer detection as a tool for functional insect genomics. *Genetics* 163: 647-661.

Horn, C., Schmid, B.G.M., Pogoda, F.S. & E.A. Wimmer (2002). Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1221-1235.

(Übersichtsartikel)

Horn, C., Jaunich, B. & E.A. Wimmer (2000). Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Development Genes and Evolution* 210: 623-629.

Horn, C. & E.A. Wimmer (2000). A versatile vector set for animal transgenesis. *Development Genes and Evolution* 210: 630-637.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
3.1	Insekten als Schädlinge .....	5
3.2	Konventionelle SIT .....	6
3.3	Molekulargenetische Voraussetzungen zur Konstruktion transgenbasierter SIT-Systeme .....	7
3.3.1	Keimbahntransformationssysteme für Insekten .....	7
3.3.2	Das proapoptotische Gen <i>hid</i> als letalitätsverursachender Effektor .....	9
3.3.3	Nachweis gewebs-, stadien- oder geschlechtsspezifischer Enhanceraktivität .....	10
3.3.4	Heterologe binäre Systeme zur konditionalen Genexpression .....	11
3.4	Konstruktionsansätze transgenbasierter SIT-Systeme .....	12
3.4.1	Transgenvermittelte Geschlechterseparation .....	12
3.4.2	Transgenvermittelte Sterilisierung .....	13
3.5	Zielsetzung der Arbeit .....	14
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>15</b>
4.1	Molekularbiologie .....	15
4.1.1	Oligonukleotidsequenzen .....	15
4.1.2	Konstrukte .....	16
4.1.2.1	Konstrukte des universellen Transformationssystems .....	16
4.1.2.1.1	Modifizierte Serie der universellen Transformationsvektoren .....	17
4.1.2.1.2	Auf 3xP3-DsRed basierte <i>Minos</i> - und <i>piggyBac</i> -Transformationsvektoren .....	17
4.1.2.1.3	Transformationsvektoren mit Isolatorelementen .....	17
4.1.2.1.4	Helferkonstrukte .....	18
4.1.2.2	Konstrukte für SIT-Systeme .....	18
4.1.2.2.1	Transaktivatorkonstrukte .....	18
4.1.2.2.1.1	<i>sry</i> $\alpha$ -tTA und <i>nullo</i> -tTA Konstrukte .....	18
4.1.2.2.1.2	FBE-tTA Konstrukte .....	20
4.1.2.2.2	Effektorkonstrukte .....	20
4.1.2.2.3	Konstrukte in pBluescriptKS zur Herstellung markierter RNA .....	20
4.1.2.3	Konstrukte des Transposon-Mutagenese-Systems .....	21
4.1.2.3.1	Jumpstarterkonstrukte .....	21
4.1.2.3.2	Mutator-konstrukte .....	21

4.1.2.3.3	Reporterkonstrukte.....	22
4.1.2.3.4	BCD6-Transaktivatorkonstrukte.....	23
4.1.3	Herstellung von RNA-Sonden .....	23
4.1.4	PCR-Experimente .....	24
4.1.4.1	Einzelebryonen-Multiplex-PCR .....	24
4.1.4.2	Inverse PCR .....	25
4.1.4.3	PCR von <i>piggyBac</i> -Exzisionsstellen.....	26
4.2	<i>Drosophila</i> -Kultur und Genetik.....	26
4.2.1	Experimente mit embryo- und weiblich-spezifisch letalen Stämmen.....	26
4.2.1.1	<i>Drosophila</i> -Medium mit tTA-Inhibitorsubstanzen .....	26
4.2.1.2	Analyse der Sterilität von EL-Stämmen .....	27
4.2.1.3	Analyse der Reversibilität der EL#42-Sterilität.....	28
4.2.1.4	Kompetitionsexperimente mit EL#42-Männchen.....	28
4.2.1.5	Analyse der Sterilität und der weiblich-spezifischen Letalität in FSLEL-Stämmen .....	29
4.2.2	Funktionsanalyse der Jumpstarter-, Mutator- und Reportertransgene .....	29
4.2.3	Durchführung der Pilot-Mutagenese.....	30
4.2.3.1	Jumpstarter-, Mutator- und Reporterlinien der Pilot-Mutagenese .....	30
4.2.3.2	Kreuzungsschritte der Pilot-Mutagenese .....	31
4.2.4	Remobilisierung genomischer Transgeninsertionen und Reversionsanalysen .....	31
4.2.4.1	Remobilisierung von Dm[ $P\{w^{+mC}, 3xP3-EGFP\}$ ]-Insertionen.....	31
4.2.4.2	Exzision von <i>piggyBac</i> -Mutatorinsertionen und Reversion letaler Phänotypen.....	32
4.2.4.3	Komplementationsanalyse von $\{GAL4\Delta\}\#150$ und $\{GAL4\Delta\}\#166$ .....	32
4.2.5	Keimbahntransformation .....	32
4.3	Angaben zu Fluoreszenzproteinen und zur Epifluoreszenzstereomikroskopie.....	33
4.3.1	Charakteristika von ECFP, EGFP, EYFP und DsRed .....	33
4.3.2	Epifluoreszenzstereomikroskopie .....	34
4.3.2.1	Angaben zum Fluoreszenz-Stereomikroskop und zu verwendeten Filtersystemen.....	34
4.3.2.2	Fluoreszenzbeobachtung und -dokumentation in <i>Drosophila melanogaster</i> .....	36
4.4	Embryologie.....	36
4.4.1	Fixierung der Embryonen .....	36
4.4.2	<i>In situ</i> Hybridisierung an Embryonen.....	37
4.4.3	TUNEL- und DNA-Färbung an Embryonen .....	37
4.4.4	X-Gal-Färbung an Embryonen .....	37

<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
5.1	Weiterentwicklung des Systems insektenuniversell einsetzbarer Transformationsvektoren.....	39
5.1.1	Etablierung diskriminierbarer Transformationsmarker für genetische Multikomponentensysteme.....	39
5.1.2	Modifikationen der insektenuniversell einsetzbaren Transformationsvektoren.....	41
5.1.3	Erweiterung der <i>piggyBac</i> -Transformationsvektoren um Isolatorelemente.....	42
5.2	Ein System supprimierbarer embryonaler Letalität zur Erzeugung steriler Insekten.....	43
5.2.1	Supprimierbare embryonale Letalität als Sterilisierungsmöglichkeit.....	43
5.2.2	Konstruktion eines transgenbasierten Systems für supprimierbare embryospezifische Letalität.....	45
5.2.2.1	Transaktivatorkonstrukte für embryospezifische Genexpression.....	45
5.2.2.2	Effektorkonstrukte mit <i>hid</i> <sup>Ala5</sup> .....	46
5.2.2.3	Die Kombination aus Transaktivator- und Effektorlinien vermittelt Sterilität.....	47
5.2.3	Etablierung homozygoter, supprimierbar embryonal letaler <i>Drosophila</i> -Stämme.....	48
5.2.4	Charakterisierung homozygoter, supprimierbar embryonal letaler <i>Drosophila</i> -Stämme hinsichtlich tTA-Inhibitorbedarf.....	49
5.2.5	Reversibilität und Zeitabhängigkeit supprimierbarer Letalität.....	51
5.2.6	Charakterisierung supprimierbar embryonal letaler <i>Drosophila</i> -Männchen.....	53
5.2.6.1	Untersuchungen zum Mechanismus transgenvermittelter Letalität.....	53
5.2.6.1.1	Visualisierung der EL#42-Transgenexpression in Embryonen.....	53
5.2.6.1.2	Kontrollen zur <i>hid</i> <sup>Ala5</sup> -Transgenexpression.....	55
5.2.6.1.3	Phänotypische Konsequenzen der EL#42-Transgenexpression in Embryonen.....	56
5.2.6.2	Effizienz der embryospezifischen Letalität.....	57
5.2.6.3	Simulation einer SIT-Situation und Analyse des Paarungserfolges steriler EL#42-Männchen.....	57
5.2.7	Kompatibilität des Systems embryonaler Letalität mit einem transgenbasierten System weiblicher Letalität.....	61
5.3	Ein Transposon-Mutagenese-System zum Nachweis von Enhanceraktivität.....	63
5.3.1	Architektur des Enhancernachweissystems.....	63
5.3.1.1	Jumpstarter als Transposasequelle.....	63
5.3.1.2	Mutatoren zum Enhancernachweis.....	64
5.3.1.2.1	3xP3-EYFP zur sensitiven Identifizierung von Mutatorinsertionen.....	64
5.3.1.2.2	Mutatoren mit Reporterfunktion für Enhanceraktivität und Transaktivatorfunktion.....	65
5.3.1.2.3	Enhancernachweis mit dem <i>{GAL4A+UAS}</i> -Mutator.....	67
5.3.1.3	Prinzip der insertionellen Mutagenese mit differenzierbaren Fluoreszenzmarkern.....	68
5.3.2	Pilot-Mutagenese und Enhancernachweis in <i>Drosophila melanogaster</i> .....	69

5.3.2.1	Statistische Daten der Pilot-Mutagenese.....	70
5.3.2.2	Analyse von <i>{GAL4A}</i> - und <i>{tTA}</i> -Neuinsertionen hinsichtlich rezessiver Letalität.....	71
5.3.2.3	Validierung rezessiv letaler Mutatorlinien.....	72
5.3.2.4	<i>In vivo</i> Enhancernachweis in larvalen Entwicklungsstadien .....	74
5.3.2.5	<i>In situ</i> Enhancernachweis in embryonalen Entwicklungsstadien .....	74
5.3.2.6	Hinweise auf signalverstärkten Enhancernachweis mit <i>{GAL4A+UAS}</i> .....	76
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
6.1	Anwendungspotential fluoreszenzmarkierter Insekten zur SIT-Erfolgskontrolle .....	77
6.2	Anwendungspotential des transgenbasierten Sterilisierungssystems.....	78
6.2.1	Schadinsekten von Bedeutung für SIT-Anwendungen .....	78
6.2.2	Übertragbarkeit des transgenbasierten Sterilisierungssystems auf Schadinsekten .....	79
6.2.2.1	Übertragbarkeit des Transformationssystems .....	79
6.2.2.2	Übertragbarkeit des Tet-Systems .....	80
6.2.2.3	Übertragbarkeit von HID als letalitätsvermittelndem Effektor.....	81
6.2.2.4	Übertragbarkeit von regulatorischen Sequenzen der Zellularisierungsgene.....	81
6.3	Potentielle technische Probleme des transgenbasierten Sterilisierungssystems .....	82
6.3.1	Sind transgenvermittelt sterilisierte Insekten ausreichend kompetitiv ?.....	82
6.3.2	Stabilität der Transgene im industriellen Produktionsmaßstab.....	84
6.3.3	Mit dem Tet-System verbundene mögliche Anwendungshindernisse.....	85
6.4	Gefahrenpotential der Freisetzung gentechnisch sterilisierter Insekten.....	85
6.4.1	Gefahrenpotential durch Interspeziestransfer der Transgenkonstrukte des Sterilisierungssystems.....	85
6.4.2	Gefahrenpotential letalitätsverursachender Effektorgene .....	87
6.5	Kombination des Sterilisierungssystems mit Geschlechterseparationssystemen.....	88
6.5.1	Kombination des Sterilisierungssystems mit einem klassisch genetischen Geschlechterseparationssystem.....	88
6.5.2	Kombination des Sterilisierungssystems mit einem transgenbasierten Maskulinisierungssystem .....	90
6.6	Das Enhancernachweissystem zur Identifizierung adäquater Enhancer in Schadspezies..	91
6.6.1	Enhancernachweis mit <i>piggyBac</i> -basierten Mutatoren .....	91
6.6.2	Übertragbarkeit des Enhancernachweissystems auf Insektenspezies .....	92
6.6.3	Identifizierung von Mutatorneuinsertionen in Nicht-Modellinsekten .....	93
6.7	Funktionelle Genomanalyse im Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i> .....	93
6.7.1	Funktionelle Genomanalyse mit dem <i>P</i> -Element .....	94
6.7.2	Funktionelle Genomanalyse mit <i>piggyBac</i> .....	95
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>

## Abkürzungen

3xP3	artifizieller Enhancer, der sich aus drei P3-Bindungsstellen für Dimere des Transkriptionsfaktors Pax6 aufbaut
<i>A. gambiae</i>	<i>Anopheles gambiae</i>
ATc	Anhydrotetracyclin
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
DsRed	<i>Discosoma</i> species red fluorescent protein, rot fluoreszierendes Protein aus einer <i>Discosoma</i> -Spezies
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	enhanced cyan fluorescent protein, verstärkt cyanfarben fluoreszierendes Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced GFP, verstärktes GFP
EST	expressed sequence tag, exprimiertes Sequenz„etikett“
EtOH	Ethanol
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein, verstärkt gelb fluoreszierendes Protein
GFP	green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IPM	integrated pest management, integrierte Schädlingsbekämpfung
ITS	invertierte terminale Sequenzwiederholung
kb	Kilobasenpaare
MeOH	Methanol
n.d.	not determined, nicht bestimmt
ORF	open reading frame, offenes Leseraster
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PNS	periphäres Nervensystem
RT	Raumtemperatur
SIT	Sterile Insekten Technik
Tc	Tetracyclin
TRE	tTA-responsives Element (entspricht heptamerisierter Tet-Operatorsequenz)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
tTA	tetracyclinkontrollierter Transaktivator
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
TUNEL	TdT (Terminale Desoxynukleotidyltransferase) mediated fluorescein-dUTP nick end labeling
U	Units (Enzymeinheit)
UAS	upstream activating sequence, stromaufwärts liegende Aktivierungssequenz
UTR	untranslated region, nicht translatierter Bereich
v/v	volume per volume, Volumen pro Volumen
w/v	weight per volume, Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem

Für die Abkürzung von Aminosäuren und Nukleobasen wurde der international gebräuchliche Einbuchstabenkode verwendet.



# 1 Zusammenfassung

Biologische Strategien zur Bekämpfung ökonomisch relevanter Schadinsekten bieten sich als Alternative zur insektizidbasierten Kontrolle an. Die Sterile Insekten Technik (SIT) ist eine ökologisch verträgliche Methode zur flächendeckenden Populationskontrolle. Sie beruht auf dem Prinzip der Reduktion einer Schädlingspopulation durch wiederholte Massenfreesetzungen steriler Artgenossen. Für viele Schadinsekten ist SIT am wirksamsten, wenn ausschließlich sterile Männchen freigesetzt werden. Zur Sterilisierung wird konventionell ionisierende Strahlung eingesetzt, welche die Fitness behandelter Insekten und damit die Wirksamkeit der SIT vermindert.

Diese Arbeit dokumentiert die Etablierung eines Sterilisierungssystems, das Transgene anstelle ionisierender Strahlung verwendet. Das neuartige Sterilitätskonzept beruht auf supprimierbarer Induktion embryospezifischer Letalität. Um dieses Konzept im Modellinsekt *Drosophila melanogaster* zu realisieren, wurden 5' genregulatorische Regionen der Zellularisierungsgene *serendipity α* (*sry α*) und *nullo* ausgewählt, die ausschließlich in einem engen Zeitfenster während der frühen Embryonalentwicklung aktiv sind. Diese Regulatorsequenzen steuern die Genexpression des tetracyclinkontrollierten Transaktivators *tTA*. Zur Erzeugung von Letalität stimuliert tTA die Expression eines hyperaktiven Allels des proapoptotischen Gens *head involution defective* (*hid*). Da die DNA-Bindung des tTA-Proteins durch Tetracyclin (Tc) inhibiert wird, kann tTA als Schalter zwischen restriktiven und permissiven Bedingungen fungieren: In *Drosophila*-Embryonen, die eine einfache Kopie der Transgenkombination erben, manifestierte sich unter restriktiven Bedingungen (ohne Tc) die Letalität mit einer Penetranz von 99,9%. Unter permissiven Bedingungen hingegen (mit Tc) konnte embryonale Letalität supprimiert werden, was die kontinuierliche Produktion großer Mengen steriler Insekten ermöglicht. Mit sterilen Männchen wurden SIT-Situationen im kleinen Labormaßstab simuliert. Dabei zeigte sich, daß sterile Männchen wirksam mit fertilen Männchen um Weibchen konkurrierten und die Nachkommenzahl reduzierten.

Um homologieunabhängig embryo- oder geschlechtsspezifisch aktive Enhancer in Schadinsekten identifizieren zu können, wurde in dieser Arbeit außerdem ein System zum Aufspüren von Enhanceraktivitäten etabliert. Dieses System beruht auf der kontrollierten Mobilisierung von „Mutatoren“, die auf dem Transposon *piggyBac* basieren und deren Reporterfunktion erfolgreich zum Nachweis von Enhanceraktivitäten eingesetzt werden konnte. Diese *piggyBac*-Mutatoren erwiesen sich in *Drosophila melanogaster* als effizient mobilisierbar und erzeugten homozygot letale Mutationen mit einer Frequenz von 7,6%. Das System besitzt somit Anwendungspotential zur funktionellen Insekten-Genomanalyse.

Beide Systeme sind in ein Keimbahntransformationssystem eingebettet, das auf speziesunabhängig funktionierenden Breitband-Transposons und separierbaren Transformationsmarkern basiert. Diese Systeme sollten daher direkt auf Schadinsekten übertragen und auf ihre Funktionalität überprüft werden können.



## 2 Summary

Biological approaches to insect pest management offer alternatives to insecticidal control. The Sterile Insect Technique (SIT) is regarded as an ecologically safe method for area-wide control. SIT reduces the pest population by mass release of sterilized pest organisms. For many pest species, SIT proved to be most effective if only sterile males were released. However, conventional sterilization by ionizing radiation lowers insect fitness and therefore impairs effectiveness of the SIT.

In this thesis a transgene-based approach to cause sterility without the need of irradiation is reported. A novel concept of sterility was developed that employs suppressible dominant embryo-specific lethality. In order to investigate this principle, the model insect, *Drosophila melanogaster*, was chosen: 5' regulatory sequences of the cellularization genes *serendipity α* (*sry α*) and *nullo* were selected, which mediate gene expression exclusively during early embryogenesis. The tetracycline-controlled transactivator gene *tTA* was placed under control of these cellularization gene enhancer-promoters. To mediate lethality, a hyperactive allele of the pro-apoptotic gene *head involution defective* (*hid*) was placed under control of the transactivator tTA. Due to the inhibition of the tTA-DNA binding by tetracycline (Tc), the tTA protein functions as a switch to discriminate restrictive from permissive conditions: Under restrictive conditions (without Tc) lethality manifested with a penetrance of 99.9% in *Drosophila* embryos, which inherited one copy of the transgene combination. Under permissive conditions (with Tc) lethality could be suppressed, which allows for continual generation of large quantities of sterile insects. Sterile males were examined in small laboratory scale SIT simulations. In these situations, sterile males effectively competed with fertile males for females and lowered numbers of progeny. Taken together, these data provide a proof-of-principle of the transgene-based sterility concept.

In order to identify embryo-specifically active enhancer in pest insects independently of homology-based cloning strategies, a system to trap enhancer activity was established. This system relies on the controlled mobilization of “mutators”, which were constructed using the transposable element *piggyBac*. Mutators were designed to include reporter functions and were successfully employed to detect enhancer activities. *piggyBac* mutators were shown to be efficiently mobilizable in *Drosophila melanogaster* and produced homozygous lethal mutations with a frequency of 7.6%. Therefore, the *piggyBac* insertional mutagenesis system holds application potential for the aim of functional insect genomics.

Both systems have been integrated into a germline transformation system, which relies on species-independent broad host-range transposable elements and species-independent transformation markers that can be discriminated phenotypically. This provides the means to transfer and functionally analyze both the sterility and the insertional mutagenesis systems in a large variety of pest insects.



## 3 Einleitung

### 3.1 Insekten als Schädlinge

Insekten interferieren auf unterschiedliche Weise mit der Aktivität des Menschen. Als Fraßschädlinge, als Überträger von Pflanzenpathogenen sowie als Vorratsschädlinge verursachen sie weltweit einen geschätzten Wertverlust an landwirtschaftlichen Produktionsgütern von einem Fünftel pro Jahr (Übersicht: Gillot, 1995). Neben dieser ökonomischen Bedeutung bedrohen Insekten als Überträger humanpathogener Erreger die Gesundheit von Menschen besonders in tropischen Regionen der Welt (Übersicht: Kettle, 1995).

Kontrollmaßnahmen stützten sich in den letzten 50 Jahren vor allem auf den Einsatz von Insektiziden. Die chemiebasierte Schädlingsbekämpfung bringt jedoch eine Reihe von Problemen mit sich: Viele Insektizide stellen aufgrund ihrer akuten oder chronischen Toxizität und ihrer Persistenz in der Nahrungskette eine Gesundheitsgefährdung für den Menschen dar. Aus der Unspezifität der Insektizidwirkung resultiert zudem ökologischer Schaden. 75% der 1997 am Weltmarkt vertriebenen Insektizide fallen in nur drei Substanzklassen (Pyrethroide, Organophosphate und Carbamate) und greifen an nur zwei biologischen Zielmolekülen an (der Acetylcholinesterase und dem spannungsabhängigen Natriumkanal). Daher sind Resistenzentwicklungen vorprogrammiert, die häufig gegenüber mehreren Insektiziden einer Substanzklasse auftreten (Kreuzresistenz). Resistenzen beschränken die Anwendungsdauer eines Insektizids, was die Aufwendungen für Erforschung und Entwicklung neuartiger Substanzen in die Höhe treibt (Übersicht: Dettner & Zwölfer, 1999; Hemingway & Ranson, 2000).

Die Erkenntnis des Zusammenhangs zwischen Insektizidresistenzen und Kostenexplosion leitete den Wandel vom ausschließlich chemiebasierten zum integrierten Ansatz der Schädlingsbekämpfung (IPM, integrated pest management) ein. IPM verfolgt die Strategie, eine Schädlingspopulationsdichte nachhaltig unter der ökonomischen Schadensschwelle zu stabilisieren und dabei nur minimal in das Agrarökosystem einzugreifen. Die Umsetzung dieser Strategie setzt allerdings profunde populationsbiologische und ökologische Kenntnisse der Schadspezies voraus. Im IPM-Konzept besitzen nicht-chemische Kontrollmaßnahmen einen hohen Stellenwert: die Regulation der Schädlingspopulation durch natürliche Feinde (biologische Kontrolle); die Beeinflussung insektenspezifischer Prozesse durch Insektenwachstumsregulatoren oder Verhaltensmodulatoren; die Selektion insektenresistenter Pflanzen durch klassisch genetische Züchtung; die gentechnische Modifikation einer Kulturpflanze mit insektenspezifischen Toxingenen (Übersicht: Pedigo, 2002).

Einen weiteren Baustein mit zunehmender Bedeutung im IPM-Konzept stellt die Sterile Insekten Technik (SIT) dar. Die SIT zeichnet sich durch Speziespezifität und somit hohe ökologische Verträglichkeit aus. Die Grundlagen, die Anwendungsmöglichkeiten sowie gegenwärtige Limitationen der konventionellen SIT sollen im folgenden Abschnitt erläutert werden.

### 3.2 Konventionelle SIT

Die SIT stellt eine Methode der „Geburtenkontrolle bei Insekten“ dar (Übersicht: Pedigo, 2002, Kap. 14): Die wildtypische Population eines Schadinsekts wird mit sterilisierten Individuen des gleichen Schädlings überschwemmt. Da aus der Paarung wildtypischer Weibchen mit sterilen Männchen keine Nachkommen entstehen, kann die Schädlingspopulation nachhaltig kontrolliert werden, indem kontinuierlich wiederholte, flächendeckende Freisetzungen steriler Insekten durchgeführt werden (Knipling 1955, 1998; Krafur, 1998). Im Gegensatz zur Insektizidkontrolle ermöglicht die SIT eine maximale Reduktion der Schadspezies und ihre Wirksamkeit erhöht sich mit abnehmender Populationsdichte (Abb. 3.1).

Gene- ration	sterile Insekten (♂)	Verhältnis sterile ♂ : fertile ♂	Wild- population (♀)	Wildpopulation (♀) bei 90% Insektizideffizienz
1	9 Mio	9:1	1 Mio $\hat{=}$ 100%	●
2	9 Mio	18:1	50% vs. 50%	●
3	9 Mio	68:1	13% vs. 25%	●
4	9 Mio	944:1	1% vs. 13%	●
5	9 Mio	18000:1	0,0005% vs. 6%	●

**Abb. 3.1: Wirkungsprinzip der SIT im Vergleich zur insektizidbasierten Schädlingskontrolle.** Modellrechnung der Dynamik einer hypothetischen Population von 2 Millionen Schadinsekten (je 1 Million ♂ und ♀) mit folgenden Annahmen: (i) Insektenweibchen produzieren durchschnittlich fünf weibliche Nachkommen pro Generation, die das Adultstadium erreichen und Nachkommen hervorbringen. (ii) Pro Generation werden 9 Millionen sterile Insektenmännchen freigesetzt. (iii) Sterilisierte Insektenmännchen sind kompetitiv zu Männchen der Wildpopulation. (iv) Pro Weibchen findet nur ein Paarungsereignis statt. (v) Migrationsbewegungen und dichteabhängige Faktoren der Schädlingspopulation bleiben unberücksichtigt. Ein unter diesen Idealbedingungen ausgeführtes SIT-Programm führt zur praktischen Auslöschung der Population nach fünf Generationen und übertrifft damit Kontrollmaßnahmen mit Insektiziden, für die eine Reduktion um 90% pro Generation angenommen wird. Modifiziert nach Knipling (1955) und Pedigo (2002).

Die Praktikabilität des SIT-Konzeptes wurde erstmalig 1955 am Beispiel einer geologisch isolierten Population der Schraubenwurmfliege (*Cochliomyia hominivorax* (Coquerel)) demonstriert (Baumhover et al., 1955). Dieser Rinder- und Schafparasit konnte anschließend in einem seit über 40 Jahren andauernden SIT-Programm sukzessive aus dem Süden der Vereinigten Staaten, Mexiko und Lateinamerika entfernt werden (Wyss, 2000). Ein Befall dieses Schädlings in Libyen konnte ebenfalls mittels SIT erfolgreich bekämpft werden (Lindquist, 1992). Auch die Verbreitung des Roten Kapselwurms (*Pectinophora gossypiella* (Saunders)), eines der Hauptschädlinge von

Baumwollpflanzen, wird seit 1970 durch Freisetzung steriler Artgenossen in Kalifornien kontrolliert (Walters et al., 2000). Des Weiteren führte die Freisetzung steriler Tsetsefliegen der Art *Glossina austeni* (Newstead) zur Ausrottung dieser Überträgerspezies in Sansibar (Vreysen et al., 2000; Vreysen 2001). Die Summe abgeschlossener und gegenwärtig laufender SIT-Programme (IAEA, 2003) verdeutlicht das Potential dieser Technologie zur Kontrolle oder Entfernung sowohl endemischer als auch (anthropogen) eingeschleppter Schadinsekten. Das Anwendungsspektrum wird abgerundet durch präventive Freisetzungsprogramme: So leistet die präventive Freisetzung steriler Mittelmeerfruchtfliegen (*Ceratitis capitata* (Wiedemann)) einen wesentlichen Beitrag zum Schutz der Fruchtindustrie Kaliforniens, die 1998 einen Umsatz von 18 Milliarden US \$ erzielte (IAEA/UNDP, 1998).

Der konventionelle SIT-Ansatz bringt zwei wesentliche Limitationen mit sich: Erstens kann die Freisetzung sterilisierter Weibchen den agrarökonomischen Schaden verstärken. Dies ist insbesondere bei Fruchtfliegen der Fall, deren Weibchen auch nach Sterilisierung reife Früchte anstecken und damit Ertragseinbußen verursachen. Ein anwendbares System, das sterilisierte Männchen und Weibchen separiert, ist jedoch bislang nur für die Mittelmeerfruchtfliege verfügbar (Franz et al., 1994; Hendrichs et al., 1995; Robinson, 2002a). Zweitens reduziert die Verwendung von  $\gamma$ -Strahlen zur Sterilisierung (Bushland, 1971) die Fitness von Schadinsekten und damit die Wirksamkeit eines SIT-Programmes.

Alternative Geschlechterseparations- oder Sterilisierungsmethoden basierend auf der Wirkung von Transgenen könnten diese Limitationen umgehen. Im folgenden Abschnitt sollen die molekulargenetischen Voraussetzungen zur Konstruktion solcher transgenbasierter Systeme dargestellt werden.

### **3.3 Molekulargenetische Voraussetzungen zur Konstruktion transgenbasierter SIT-Systeme**

Eine transgenbasierte Variante der SIT setzt Techniken zur stabilen Verankerung homologer oder heterologer DNA im Schadinsektengenom voraus (siehe Kap. 3.3.1). Des Weiteren wird ein cytotoxisches Effektorgen (siehe Kap. 3.3.2) benötigt, welches unter Kontrolle adäquater Enhancer-Promotoren (siehe Kap. 3.3.3) exprimiert wird. Um permissive Zuchtbedingungen der Schadspezies abzugrenzen von restriktiven Bedingungen, unter denen das Effektorgen wirkt, ist darüber hinaus ein konditionales Genexpressionssystem (siehe Kap. 3.3.4) erforderlich.

#### **3.3.1 Keimbahntransformationssysteme für Insekten**

Keimbahntransformation bezeichnet die stabile und vererbare Integration exogener DNA im Genom eines Organismus. Keimbahntransformationssysteme bei Insekten stützen sich auf die Verwendung von DNA-Transposons als mobilisierbare Agentien und funktionieren nach folgendem Prinzip: Zwei Plasmide, ein Transgenkonstrukt und ein Helfervektor, werden in Embryonen der zu transformierenden Spezies koinjiziert. Die Injektion geschieht unter Bedingungen, die einen Import

beider Plasmide in Nuklei von Urkeimzellen (Vorläufer der Keimzellen) wahrscheinlich machen. Das Transgenkonstrukt enthält exogene DNA sowie ein Transformationsmarkergen, flankiert von Transposonenden mit invertierten terminalen Sequenzwiederholungen (ITS). Der Helfervektor kodiert für die Transposase, ein Enzym, das nach Erkennung korrespondierender ITS und einer spezifischen DNA-Zielstellensequenz den Transpositionsprozeß vom plasmidalen Ursprungs- zum genomischen Zielort katalysiert. Ein Transpositionsereignis in einer Urkeimzelle führt dazu, daß im adulten Insekt von dieser Urkeimzelle abgeleitete Keimzellen transformiert sind (Keimbahnmosaik) und in der Nachkommenschaft transgene Individuen auftreten. Die Identifizierung transgener Insekten geschieht anhand des Transformationsmarkerphänotyps.

Dieses Prinzip fand erstmals Anwendung in der *P*-Transposon-vermittelten Keimbahntransformation der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Rubin & Spradling, 1982; Spradling & Rubin, 1982). Die Möglichkeit der Herstellung transgener Taufliegen revolutionierte die *Drosophila*-Genetik (Übersichtsartikel: Engels, 1996). *P*-Transposons sind jedoch in ihrem Wirtsspektrum auf die Familie der *Drosophilidae* beschränkt (Handler et al., 1993) und ihre Mobilisierung ist von drosophilid-endogenen Wirtsfaktoren abhängig (Rio & Rubin, 1988; Beall & Rio, 1996; Kusano et al., 2001). Die Generalisierung dieses Prinzips auf nicht-drosophilide Insektenspezies gelang daher erst unter Verwendung wirtsunabhängigerer Breitband-Transposons, zu denen *piggyBac*, *Hermes*, *Minos* und *mariner* zählen. Die Charakteristika dieser Transposons sind in Tab. 3.1 zusammengestellt.

	<i>piggyBac</i>	<i>Hermes</i>	<i>Minos</i>	<i>mariner</i>
Größe des Transposons und der ITS <sup>1</sup>	2,5 kb, 13 bp	2,7 kb, 17 bp	1,8 kb, 255 bp	1,3 kb, 30 bp
Isolierungsspezies	<i>Trichoplusia ni</i>	<i>Musca domestica</i>	<i>Drosophila hydei</i>	<i>Drosophila mauritiana</i>
Sequenz der DNA-Zielstelle	TTAA	GTNCAGAC <sup>2</sup>	TA	TA
Zielstellenduplikation nach Exzision?	nein	ja	ja	ja
Transposonfamilie	bildet eigene Familie	<i>hAT</i>	<i>Tc1/mariner</i>	<i>Tc1/mariner</i>
Phylogenetische Verbreitung <sup>3</sup>	Lepidoptera, Diptera	verbreitet in vielen Stämmen der Metazoa		

**Tab. 3.1: Charakteristika der Breitband-Transposons *piggyBac*, *Hermes*, *Minos* und *mariner*.**

<sup>1</sup> ITS = invertierte terminale Sequenzwiederholungen

<sup>2</sup> Präferenz für dieses Oktanukleotid

<sup>3</sup> bezieht sich auf Mitglieder der Transposonfamilie

Unter Verwendung dieser Transposons konnten ökonomisch und medizinisch relevante Insektenspezies transformiert werden (Übersichtsartikel: Handler, 2001; 2002; Atkinson et al., 2001; Atkinson & James, 2002; Atkinson, 2002). Die Identifizierung transgener Insekten wurde entscheidend durch generische Transformationsmarker erleichtert, die auf dem grün fluoreszierenden Protein (GFP; Übersichtsartikel: Tsien, 1998) beruhen. Das Speziesspektrum eines Fluoreszenzmarkergens wird durch seinen Promotor festgelegt, dessen Aktivität daher phylogenetisch möglichst

weitreichend konserviert sein sollte. Der Augenentwicklung unterliegt ein über die Phyla hinweg konserviertes genetisches Regelwerk, in dem der Transkriptionsfaktor Pax6 eine Schlüsselfunktion einnimmt (Übersichtsartikel: Callaerts et al., 1997; Gehring & Ikeo, 1999; Gehring, 2002): Pax6 besitzt das Potential, die Augenmorphogenese ektopisch zu induzieren (Halder et al., 1995). Aus Pax6-Bindungsstellen konnte ein artifizieller Promotor (*3xP3*) konstruiert werden, der die Expression eines Reportergens in *Drosophila*-Photorezeptorneuronen vermittelt (Sheng et al., 1997). Die Kombination dieses *3xP3*-Promotors mit *EGFP* (*enhanced GFP*) bildet einen Transformationsmarker (Berghammer et al., 1999; Horn et al., 2000), der die evolutionäre Konservierung der Pax6-Transaktivierung mit der leichten GFP-Nachweisbarkeit verknüpft: Transgene Individuen können aufgrund der EGFP-Fluoreszenz im Auge identifiziert werden.

Der *3xP3-EGFP*-Marker, eingebunden in Breitband-Transformationsvektoren (Berghammer et al., 1999; Horn, 1999; Horn et al., 2000), fand bereits Anwendung in der Transformation von Vertretern der Insektenordnungen Diptera, Coleoptera und Lepidoptera (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2:** Expression des Transformationsmarkers *3xP3-EGFP* in Photorezeptorzellen der Dipterenart *Aedes aegypti* (Gelbfiebermoskito; A), der Lepidopterenart *Bombyx mori* (Seidenspinner; B) und der Coleopterenart *Tribolium castaneum* (Mehlkäfer; C). Referenzen: (A) Kokoza et al. (2001), (B) Uhlřova et al. (2002) und (C) Berghammer et al. (1999). Bilder zur Verfügung gestellt von V. Kokoza (A), M. Jindra (B) und F. Pogoda (C).

Neben GFP und EGFP ist ein Satz an spektralvarianten Fluoreszenzproteinen charakterisiert worden (detaillierte Beschreibung in Kap. 4.3). Sofern diese Spektralvarianten *in vivo* eindeutig unterscheidbar sind, können mehrere Transgene in komplexen genetischen Systemen wie z.B. einer transgenbasierten SIT-Variante unabhängig voneinander markiert werden.

### 3.3.2 Das proapoptische Gen *hid* als letalitätsverursachender Effektor

Transgene, welche die Expression eines cytotoxischen Effektorgens vermitteln, können im transformierten Schadinsekt systemische Letalität hervorrufen. Zu diesem Zweck kommen Gene in Frage, die für Toxine, z.B. das Diphtherie-Toxin A (DtA), oder für Regulatorproteine in zellulären Signalkaskaden, z.B. Ras, kodieren. Gentechnische Modifikation von potentiell freizusetzenden Insekten mit eukaryontenuniversell aktiven Toxingenen (*dtA*) oder mit krankheitsassoziierten Proto-onkogenen (*ras*) ist jedoch aufgrund von zu erwartender mangelnder Akzeptanz problematisch.

In dieser Arbeit wurde daher auf ein Effektorgen zurückgegriffen, das ein zelluläres Suizidprogramm auslöst: In Metazoen reguliert der programmierte Zelltod (Apoptose) zusammen mit der Zellproliferation das Gleichgewicht zwischen Zellverlust und Zellzuwachs für die embryonale Entwicklung und die Gewebshomöostase (Übersichtsartikel: Abrams, 2002; Baehrecke, 2002; Shi, 2002; Tittel & Steller, 2000). Proapoptotische Gene kodieren für apoptoseinduzierende Proteine (Übersichtsartikel: Meier & Evan, 1998; Abrams, 1999; Song & Steller, 1999; Bangs & White, 2000). Zu diesen proapoptotischen Genen zählt *hid* (*head involution defective*), benannt nach dem Phänotyp der Mutante (Defekte bei morphogenetischen Bewegungen der embryonalen Kopfinvolution; Abbott & Lengyel, 1991). Sowohl der Funktionsverlust (*hid*-Nullmutation) als auch die induzierte Überexpression des wildtypischen *hid*-Allels führen in *Drosophila*-Embryonen zur Letalität (Grether et al., 1995). Der Mechanismus HID-induzierter Apoptose konnte in den letzten Jahren aufgeklärt werden: HID wirkt über physikalische Interaktion antagonistisch zu den IAP-(inhibitor of apoptosis proteins)-Proteinen DIAP1 und DIAP2 (Vucic et al., 1998; Wang et al., 1999; Goyal et al., 2000). Die Neutralisierung der IAP-Funktion ist ein Stimulus zur Apoptoseinduktion und wird posttranslational vermittelt durch Polyubiquitin-Markierung dieser Proteine zur Proteindegradation (Yoo et al., 2002). In *Drosophila* scheint HID zudem der Verknüpfungspunkt zwischen mitogenen und apoptose-induzierenden Signalwegen zu sein (Bergmann et al., 2002): Die Aktivierung des Ras-Signalwegs führt zu einem dazu, daß die *hid*-Expression transkriptionell herunterreguliert wird (Kurada & White, 1998). Zum anderen inhibiert Rolled, eine Ser/Thr-MAP-(mitogen activated protein)-Kinase, HID durch Phosphorylierung. Um dies nachzuweisen, wurden die Phosphoakzeptor-Reste von fünf MAPK-Konsensus-Phosphorylierungsstellen durch nicht-phosphorylierbare Alanine ausgetauscht. Das generierte mutante Protein, HID<sup>Ala5</sup>, wirkte sowohl in Insektenzellkultur als auch *in vivo* (*Drosophila*) konstitutiv, d.h. von der mitogenen Regulierbarkeit entkoppelt, apoptoseauslösend (Bergmann et al., 1998).

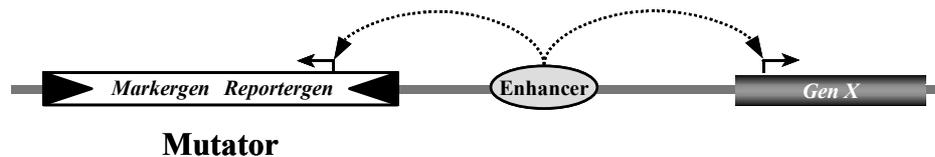
Bislang konnte in Vertebraten kein zu *hid* homologes Gen isoliert werden. Dennoch ist HID sowohl in Insekten- als auch in Säugerzellen funktionell (Haining et al., 1999; Varghese et al., 2002), so daß HID (und insbesondere HID<sup>Ala5</sup>) in verschiedenen Insektenspezies als cytotoxischer Effektor anwendbar sein sollte.

### 3.3.3 Nachweis gewebs-, stadien- oder geschlechtsspezifischer Enhanceraktivität

Das cytotoxische Effektorgen sollte nur in bestimmten Situationen exprimiert werden. Genregulatorische Sequenzen des Effektorgens definieren das Geschlecht, die Entwicklungsstadien und die Zelltypen bzw. Gewebe, in denen Genexpression stattfindet. Sofern Enhancer mit adäquatem raumzeitlichen Aktivitätsprofil in der Insektenspezies nicht bereits charakterisiert sind, ist eine Methode zur Identifizierung geeigneter Enhancer erforderlich: Mittels kontrollierter Mobilisierung eines Transposonderivats können genomische Positionen ungerichtet adressiert werden. In einem solchen Transposon-Mutagenese-Experiment inseriert ein „Mutatortransposon“ in neue genomische

Loci. Um eine stabile Insertion zu gewährleisten, werden dabei nicht autonom mobilisierbare Mutatoren verwendet. Ein „Jumpstartertransposon“ stellt *in trans* die Transposaseaktivität zur Verfügung. Eine Neuinsertion des Mutators sollte aufgrund seines Transformationsmarkers leicht identifiziert werden können. Darüber hinaus kann der Mutator mit einem Gen versehen werden, das für ein phänotypisch *in vivo* oder *in situ* leicht nachweisbares Protein kodiert. Ein solches Reporter-gen trägt nur einen basalen Promotor und kann die Enhanceraktivität am Insertionslocus aufspüren und visualisieren (Abb. 3.3; O’Kane & Gehring, 1987; Bier et al., 1989; Bellen et al., 1989; Wilson et al., 1989). Da Sequenzinformation einer genomischen Mutatorinsertion leicht erhalten werden kann (Ochman et al., 1990), ist die Klonierung des zum Phänotyp korrespondierenden Gens bzw. der genregulatorischen Region und nachfolgend die Charakterisierung des identifizierten Enhancers möglich.

In der *Drosophila*-Genetik trug die *P*-Element basierte Transposon-Mutagenese entscheidend zur Charakterisierung gewebs-, stadien- oder geschlechtsspezifischer Enhancer bei (Übersichtsartikel: O’Kane, 1998; Bellen, 1999). Aufgrund der Einschränkung der *P*-Mobilisierbarkeit auf drosophilide Insekten (Handler et al., 1993) war ein vergleichbares Transposon-Mutagenese-System mit Enhancernachweisfunktion für Schadinsekten bislang jedoch nicht verfügbar.



**Abb. 3.3: Prinzip des Enhancernachweises.**

Enhancersequenzen im Genom (grauer Balken) einer Spezies steuern die raumzeitliche Expression eines Gens. Ein Reporter-gen, welches innerhalb eines Mutatortransposons lokalisiert ist, trägt einen basalen Promotor (Pfeil) und kann daher die Enhanceraktivität aufspüren und visualisieren. Der Transformationsmarker des Mutators ermöglicht die Identifizierung einer neuen genomischen Mutatorinsertion.

### 3.3.4 Heterologe binäre Systeme zur konditionalen Genexpression

Heterologe Genexpressionssysteme sind ein Werkzeug zur zielgerichteten Expression eines Transgens *in vivo*. Sie zeichnen sich durch eine Zwei-Komponenten-Bauweise aus: Eine genregulatorische Sequenz, welche das Expressionsmuster eines Transgens definieren soll, kontrolliert im Transaktivator-konstrukt die Expression eines heterologen Transaktivatorgens. Das Transaktivatorprotein wiederum stimuliert die Expression eines Zielgens, welches in einem separaten Transgenkonstrukt lokalisiert ist. Die Trennung von genregulatorischer und kodierender Region erhöht die Flexibilität der Transgenexpression (Wahl verschiedener Transaktivatorlinien) und schafft die Möglichkeit, auch toxische Transgene *in vivo* zu raumzeitlich definierten Bedingungen zu exprimieren. In der *Drosophila*-Genetik findet das GAL4/UAS-System (Brand & Perrimon, 1993), bestehend aus dem Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 und der GAL4-Bindungssequenz (*UAS*, upstream activating sequence) vielfältige Anwendung (Übersichtsartikel: Phelps & Brand, 1998; Duffy, 2002).

Da die GAL4-Aktivität (im ursprünglichen GAL4/UAS-System) nicht regulierbar ist, kann die Transgenexpression jedoch nicht induziert oder supprimiert werden. Diese zusätzliche Ebene der Konditionalität ist im Tet-Repressor basierten Genexpressionssystem (Tet-System) realisiert (Gossen & Bujard, 1992; Baron & Bujard, 2000). Das Tet-System verwendet das Transaktivatorprotein tTA (tetracyclinkontrollierter Transaktivator), eine synthetische Chimäre aus dem bakteriellen Tet-Repressor und der Transaktivierungsdomäne des *Herpes simplex* VP16-Proteins. tTA ist regulierbar durch Tetracyclin (Tc): In Anwesenheit des Antibiotikums ist die tTA:DNA-Bindungsaffinität stark erniedrigt und somit sinkt die Expression eines *TRE*-(tTA responsive element)-kontrollierten Zielgens auf ein Basalniveau ab. Bei Tc-Abwesenheit hingegen bindet tTA an *TRE* und stimuliert die Zielgenexpression.

Das Tet-System ist charakterisiert durch stringente Regulierbarkeit (quantitativ über vier Größenordnungen in Zellkultur, Yin et al., 1996), schnelle Induktionskinetik sowie die Abwesenheit pleiotroper (nicht die Zielgenexpression betreffender) Effekte (Harkin et al., 1999). Die tTA-kontrollierte Expression des hochtoxischen Diphtherie-Toxins im Mausmodell (Lee et al., 1998) demonstriert die erfolgreiche Etablierung transgener Linien mit äußerst niedrigem basalen Expressionslevel der Transaktivator- und Effektortransgene. tTA-vermittelte stringente und reversible Kontrolle der Transgenexpression konnte auch in *Drosophila* demonstriert werden (Bello et al., 1998).

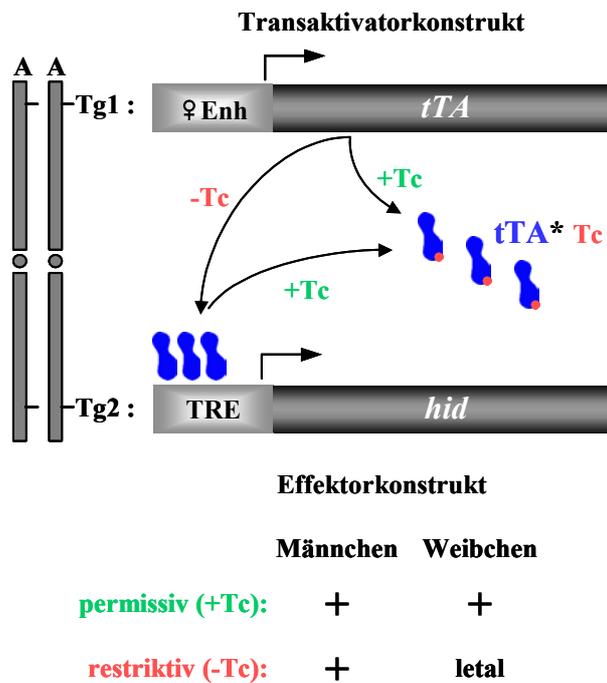
### 3.4 Konstruktionsansätze transgenbasierter SIT-Systeme

Nachdem die molekulargenetischen Voraussetzungen für eine transgenbasierte SIT-Variante dargestellt worden sind, soll auf erste Konstruktionsansätze eingegangen werden. Bislang veröffentlichte Prototypen transgenbasierter SIT-Systeme wurden in *Drosophila* etabliert. Taufliegen bieten sich aufgrund der hervorragenden experimentellen Zugänglichkeit und der extensiven genetischen Charakterisierung als Modellorganismus an, obwohl *Drosophila* als Schädling unbedeutend ist.

#### 3.4.1 Transgenvermittelte Geschlechterseparation

Zwei Prototypen für ein transgenbasiertes System zur Geschlechterseparation von Insekten konnten etabliert werden. Diese beruhen auf der konditionalen weiblich-spezifischen Expression eines dominant letal wirkenden Effektorgens (Abb. 3.4; Heinrich & Scott, 2000; Thomas et al., 2000). In diesen Systemen steuern *cis*-regulatorische Sequenzen der *Drosophila*-Dotterproteingene mit weiblich-, fettkörper- und larvalstadienspezifischer Aktivität (Garabedian et al., 1986; Ronaldson & Bownes, 1995; Liddell & Bownes, 1991) die tTA-Expression. tTA wiederum kontrolliert die Expression des proapoptotischen *hid*-Gens (Heinrich & Scott, 2000) oder eines *ras*-Allels (Thomas et al., 2000). Da die Zellen des Insektenfettkörpers essentielle Funktionen übernehmen (z.B. Nährstoffeinlagerung und -metabolisierung, Telfer & Kunkel, 1991) und das Effektorgen weiblich-

spezifisch in diesen Zellen exprimiert wird, resultiert in *Drosophila*-Stämmen, die bzgl. der Transaktivator- und Effektorstrukture transgen sind, weiblich-spezifische Letalität. Über das Tet-System erfüllen beide Separationssysteme das Kriterium der Konditionalität: Bei Tc-Anwesenheit entstanden Männchen und Weibchen, während die Kultivierung auf antibiotikafreiem Futter ausschließlich adulte Männchen hervorbrachte.



**Abb. 3.4: Geschlechterseparations-system** (nach Heinrich & Scott, 2000). Konstruierte *Drosophila*-Linien sind bzgl. zweier autosomaler (A) Transgene, Tg1 und Tg2, homozygot. Im Transaktivatorkonstrukt kontrolliert ein weiblich-spezifischer Enhancer (♀Enh) die Expression des *tTA*-Gens. Im Effektorkonstrukt steht das proapoptische Gen *hid* unter Kontrolle des *TRE*-Promotors. Das Transaktivatorprotein *tTA* stimuliert bei Tc-Abwesenheit (restriktive Bedingung) via Bindung an den *TRE*-Promotor die *hid*-Expression, woraus Letalität der Weibchen resultiert.

### 3.4.2 Transgenvermittelte Sterilisierung

Ein Prototyp für ein transgenbasiertes System zur Sterilisierung von Schadinsekten als Alternative zur konventionellen  $\gamma$ -Bestrahlung stand bislang nicht zur Verfügung. Eine bestrahlungs-unabhängige Sterilisierungsmethode könnte die Anwendungsmöglichkeiten der SIT entscheidend erweitern: Die Verwendung von  $\gamma$ -Strahlen zur Sterilisierung induziert Chromosomenbrüche und andere Mutationen (Übersichtsartikel: Müller, 1954). Die Akkumulation von Mutationen erniedrigt im allgemeinen die Fitness des Insekts und im speziellen den Paarungserfolg der Männchen im Vergleich zu wildtypischen Artgenossen (Holbrook & Fujimoto, 1970; Hooper & Katiyar, 1970; Mayer et al., 1998). So zeigten in SIT-Programmen eingesetzte  $\gamma$ -bestrahlte Männchen der Mittelmeerfruchtfliege einen um 50% erniedrigten Paarungserfolg (im Vergleich zu unbehandelten Männchen; Calcagno et al., 2002; Lux et al., 2002). Der Verlust an Kompetitivität erniedrigt die Wirksamkeit und erhöht somit die Kosten eines SIT-Projektes, da zur Kompensation größere Mengen an sterilen Männchen freizusetzen sind. Die Etablierung von Bestrahlungsprotokollen zur effizienten irreversiblen Sterilisierung erwies sich insbesondere bei Lepidopterschädlingen mit holozentrischen

Chromosomen als schwierig. Bei diesen besitzt das gesamte Chromosom Zentromereigenschaften, so daß auch fragmentierte Chromosomen korrekt vererbt werden können und die Strahlungstoleranz im Hinblick auf die Sterilisierung erhöht ist.

### 3.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit läßt sich in drei Teilziele untergliedern: Erstens sollte ein Keimbahntransformationssystem, das auf Breitband-Transposons und den Transformationsmarkern 3xP3-EGFP, 3xP3-EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) und 3xP3-ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) basiert (Horn, 1999), um 3xP3-DsRed (*Discosoma* species red fluorescent protein) erweitert werden. Der Einsatz der drei Fluorophore ECFP, EYFP und DsRed als *in vivo* unabhängig voneinander nachweisbares Markertrio sollte überprüft werden und gegebenenfalls die Grundlage zur Markierung mehrerer Transgene in den folgenden Systemen bilden.

Das zweite und Hauptziel beinhaltet die Entwicklung eines transgenbasierten Ansatzes zur Sterilisierung von Insekten als Alternative zur konventionell im Rahmen der SIT verwendeten physikalischen Sterilisierungsmethode. Als Werkzeuge sollten hierzu das Tet-System und ein dominantes cytotoxisches Allel eines proapoptischen Gens (*hid*<sup>Ala5</sup>) verwendet werden. Dieser Teil der Zielsetzung schloß die Identifizierung und Charakterisierung einer geeigneten genregulatorischen DNA-Sequenz zur Kontrolle der *hid*<sup>Ala5</sup>-Expression ein. Das Prinzip transgenvermittelter Sterilität sollte im Modellorganismus *D. melanogaster* überprüft und evaluiert werden. Das Sterilisierungssystem sollte die Kriterien der stringenten Regulierbarkeit und der konditionalen Supprimierbarkeit erfüllen. Mittels SIT-Simulation im kleinen Labormaßstab sollten transgenvermittelt sterilisierte *Drosophila*-Männchen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Nachkommenzahl zu reduzieren, und hinsichtlich ihres Paarungserfolges im Vergleich zu wildtypischen Artgenossen untersucht werden. Schließlich sollte analysiert werden, ob das transgenbasierte Sterilisierungssystem mit einem bereits existierenden transgenbasierten Geschlechterseparationssystem (Heinrich & Scott, 2000) kombinierbar ist.

Das dritte Teilziel der vorliegenden Arbeit war die Konstruktion eines Systems, das Enhanceraktivitäten in bestimmten entwicklungsstadien-, gewebs- oder zelltypspezifischen Situationen nachweisen kann. Um die Limitationen bisher verfügbarer, auf dem *P*-Element basierender Transposon-Mutagenese-Systeme zu umgehen, sollten Breitband-Transposons (*piggyBac*, *Hermes*, *Minos*, *mariner*) verwendet werden. Im Rahmen eines Pilot-Mutagenese-Experiments sollte die Funktionsweise des Systems in *D. melanogaster* untersucht werden. Darüber hinaus sollten wichtige Kenngrößen zur Mobilisierbarkeit *piggyBac*-basierter Mutatortransgene, die Analyse mutierter Loci hinsichtlich letaler Phänotypen eingeschlossen, ermittelt werden.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Molekularbiologie

Molekularbiologische Experimente wurden, sofern nicht näher spezifiziert, nach Standardmethoden und unter Verwendung von Standardlösungen und Standardkulturmedien ausgeführt (Sambrook et al., 1989).

#### 4.1.1 Oligonukleotidsequenzen

Primerbezeichnung	Sequenz 5' → 3'
<b>Primer für Klonierungsschritte:</b>	
NH_FgyBss	CCC GCG CGC TTG AAT TCG AGC TCG GTA CC
NH_RgyAsc	CCG GCG CGC CAA TTG ATC GGC TAA ATG G
NH_FgyFse	CCG GCC GGC CTT GAA TTC GAG CTC GGT ACC
NH_RgyNgo	CCC GCC GGC AAT TGA TCG GCT AAA TGG
CH_5'PIAasp718_2	CCG GTA CCT CGA TAG CCG AAG CTT ACC
CH_3'PIClaI_2	CCA TCG ATG GAA TGA ACA GGA CCT AAC GC
CH_5'hs43Asp718	CCG GTA CCT CGA GGA GC
CH_3'hs43ClaI	CCA TCG ATG GAT TGT TTA GC
CHsryaRev	GCT CTA GAC ATG CTG TTC TAT CAG ATG TG
CHsrya1Fwd	TTG GCG CGC CAG TTC TTT GCC GTT CTT C
CHsrya2Fwd	TTG GCG CGC CTT TGC TAG ATT AAT CTA AGA AG
CH40F	TTG GCG CGC CAG TAG GTA AAG TAG CGG
CH41F	GGA ATT CCG TAG CGG ATT TCG CGA ATT T
CH42R	CCG CTC GAG CTT TGC CAA GCG CAC AGG T
CH43R	CCG CTC GAG GTA GAA AGG ACC TAT TTT GG
CH44R	GCT CTA GAC ATT TTG AGA TTT CTT GAG AAT G
CH45F	TTG GCG CGC CTT ACA GCG GGC AAT TAT G
CH46F	TTG GCG CGC CTA GGG GTT AGG ATT TTA TGA
CH_FBE_FWD	TTG GCG CGC CTT GAT CAA ATC CGG TGC AC
CH_FBE_REV	CCG CTC GAG GCC TAC CTA TAG CTG AC
<b>Sequenzierprimer:</b>	
M13R	AAC AGC TAT GAC CAT G
CH_6dm3_hstTAFWD	ATT AAG CAG CTC TAA TGC GC
CH_PLSeq	CGG CGA CTG AGA TGT CC
CH_PRSeq	TAC GCA TGA TTA TCT TTA ACG

<b>Primer zur Einzelebryonen-Multiplex-PCR:</b>	
DH2C07	AGG CCA AAG TCA GCC ACC TGG
AK/03/2C	CAG GTG GAG CAG GAC TGT GAT
CH_tTAm_F	GGA AGA TCA AGA GCA TCA AGT C
CH_tTAm_R	CTG TAC GCG GAC CCA CTT TC
CH_hidm_F	CAC TCG AGC AGC AGC AAT AAT C
CH_hidm_R	TCA TTC GAT TAC ACG TCT CCT G
<b>Primer zur inversen PCR:</b>	
PLF	CTT GAC CTT GCC ACA GAG GAC TAT TAG AGG
PLR	CAG TGA CAC TTA CCG CAT TGA CAA GCA CGC
PRF	CCT CGA TAT ACA GAC CGA TAA AAC ACA TGC
PRR	AGT CAG TCA GAA ACA ACT TTG GCA CAT ATC
<b>Primer zur PCR-Amplifikation von <i>piggyBac</i>-Exzisionsstellen:</b>	
CH_29_Fwd	GTA AGT ATT TAC GGT CAT TAC C
CH_29_Rev	GTG GAC TGC AGT GTG TCC
CH_51_Fwd	CTA AGC CAT GTT ATT CTT GAT C
CH_51_Rev	TAA GCG TGG CAA GGA GTG G
CH_139_Fwd	CAT TGC CAT GAG TTC GAT GG
CH_139_Rev	AGC TGT TGC CGG AGA TCC

**Tab. 4.1: Oligonukleotidsequenzen.**

## 4.1.2 Konstrukte

Im Verlauf dieser Arbeit hergestellte und verwendete Vektoren sind im folgenden zusammengestellt. Bei veröffentlichten Vektoren, welche zur Verfügung gestellt oder bereits im Rahmen der Diplomarbeit (Horn, 1999) erstellt wurden, wird auf die Publikation verwiesen, in der die Klonierungsdetails dargelegt sind. Vektoren mit direkten Sequenzwiederholungen wurden zur Minimierung von rekombinativen Ereignissen während der Amplifikation in STBL2<sup>TM</sup> kompetenten Zellen (Life Technologies, Rockville, USA) nach Herstellerangaben propagiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden Vektoren mit den gleichen Restriktionsenzymen behandelt, wie die in sie einklonierten Fragmente.

### 4.1.2.1 Konstrukte des universellen Transformationssystems

*Hermes*-basierte Transformationsvektoren (**pHer{3xP3-EXFPaß}** mit  $X=G, Y, C$ ) sind beschrieben (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000). Die Konstruktion des *P*-Element-basierten Transformationsvektors **pP{w<sup>tm</sup>C, 3xP3-EGFP}** ist veröffentlicht (Horn et al., 2000).

#### 4.1.2.1.1 Modifizierte Serie der universellen Transformationsvektoren

**pMos{3xP3-EGFPafm}**: Das 1,3 kb *EcoRI*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*NruI* Fragment wurde aus pSL-3xP3-EGFPaf (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) isoliert und in pBSMos1 (Medhora et al., 1991) kloniert, der mit *SalI*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*NruI* geöffnet worden war. Der modifizierte Transformationsvektor enthält eine 0,6 kb Deletion im offenen Leseraster des *mariner*-Transposasegens.

**pMos{3xP3-EYFPafm}**: Erzeugt analog zu pMos{3xP3-EGFPafm}, aber aus pSL-3xP3-EYFPaf (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000).

**pMos{3xP3-ECFPafm}**: Erzeugt analog zu pMos{3xP3-EGFPafm}, aber aus pSL-3xP3-ECFPaf (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000).

**pBac{3xP3-EGFPafm}**: Das 0,1 kb *FseI*-*BglII* Fragment wurde aus dem versatilen Kloniervektor pSLfa1180fa (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) isoliert und in den Transformationsvektor pBac{3xP3-EGFPaf} (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) kloniert. Im modifizierten Transformationsvektor sind 0,8 kb des *piggyBac*-ORF deletiert.

**pBac{3xP3-EYFPafm}**: Erzeugt analog zu pBac{3xP3-EGFPafm}, aber durch Klonierung in den Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFPaf} (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000).

**pBac{3xP3-ECFPafm}**: Erzeugt analog zu pBac{3xP3-EGFPafm}, aber durch Klonierung in den Transformationsvektor pBac{3xP3-ECFPaf} (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000).

#### 4.1.2.1.2 Auf 3xP3-DsRed basierte *Minos*- und *piggyBac*-Transformationsvektoren

**pBac{3xP3-DsRedaf}**: Das 1,3 kb *EcoRI*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*NruI* Fragment wurde aus pSL-3xP3-DsRedaf isoliert und in p3E1.2 (Cary et al., 1989) kloniert, der mit *BglII*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*HpaI* geöffnet worden war. Die transkriptionelle Richtung des eingefügten Transformationsmarkergens ist in entgegengesetzter Richtung zum *piggyBac*-Transposasegen. Im Transformationsvektor sind 0,8 kb des *piggyBac*-ORF deletiert.

**pSL-3xP3-DsRedaf** (Horn et al., 2002): Das 0,7 kb *SalI*-*NotI* Fragment wurde aus pDsRed1-1 (Clontech, Palo Alto, USA) isoliert und in pSL-3xP3-EGFPaf (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) kloniert, so daß der *EGFP*-ORF durch den *DsRed*-ORF ausgetauscht wurde.

**pMi{3xP3-EXFP}** ( $X=G, Y, C$ ; Geschenk von C. Savakis): Transformationsvektoren, die auf dem Breitband-Transposon *Minos* (Franz & Savakis, 1991) basieren und die Transformationsmarkergene *3xP3-EXFP* ( $X=G, Y, C$ ) als 1,3 kb *EcoRI*-*AseI*-Fragmente aus pSL-3xP3-EXFPaf ( $X=G, Y, C$ ; Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) enthalten.

**pMi{3xP3-DsRed}**: Das 1,3 kb *EcoRI*-*AseI* Fragment wurde aus pSL-3xP3-DsRedaf isoliert und in pMi{3xP3-EYFP} kloniert, so daß der *EYFP*-ORF durch den *DsRed*-ORF ausgetauscht wurde.

#### 4.1.2.1.3 Transformationsvektoren mit Isolatorelementen

**pSL-3xP3-EYFP>>af**: Das 2,4 kb *EcoRI*-*BamHI* Fragment des Konstruktes pJC13-1 (Chung et al., 1993) trägt eine Tandemwiederholung der als Isolator fungierenden 5' DNaseI-hypersensitiven Stelle (5'*HS4*; symbolisiert durch „>>“) der  $\beta$ -*Globin*-Domäne des Huhns. Dieses Fragment wurde aus pJC13-1 isoliert und nach Auffüllen beider Schnittstellen in pSL-3xP3-EYFPaf (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) kloniert, der zuvor mit *BsiWI* (Schnittstellen mit Klenow aufgefüllt) geöffnet worden war. Die Orientierung wurde gewählt, in der die 5'*HS4*-Tandemwiederholung in 3'-5' Orientierung stromaufwärts zur *AseI*-*FseI* Klonierstelle steht.

**pBac{3xP3-EYFPaf>>}**: Das 2,4 kb *EcoRI*-*BamHI* Fragment (beide Schnittstellen aufgefüllt) des Konstruktes pJC13-1 (Chung et al., 1993) wurde in den Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFPafm} eingesetzt, der zuvor mit *BglII* (Schnittstellen mit Klenow aufgefüllt) geschnitten worden war. Die Orientierung wurde gewählt, in der die 5'*HS4*-Tandemwiederholung in 3'-5' Orientierung stromabwärts zur *AseI*-*FseI* Klonierstelle steht.

**pBac{3xP3-ECFPaf>>}**: Erzeugt analog zu pBac{3xP3-EYFPaf>>}, aber durch Klonierung in den Transformationsvektor pBac{3xP3-ECFPafm}.

**pBac{3xP3-EYFP>>af>>}**: Das 2,7 kb *NotI*-*AscI* Fragment wurde aus pSL-3xP3-EYFP>>af isoliert und in den Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFPaf>>} kloniert. Der resultierende *piggyBac*-Transformationsvektor enthält zwei Tandemwiederholungen des 5'*HIS4*-Isolators, welche die *AscI*-*FseI* Klonierstellen in 3'-5' Orientierung einrahmen. Der Vektor wurde in STBL2<sup>TM</sup> kompetenten Zellen propagiert.

**pBac{3xP3-ECFP>>af>>}**: Erzeugt analog zu pBac{3xP3-EYFP>>af>>}, aber durch Klonierung in pBac{3xP3-ECFPaf>>}. Der Vektor wurde in STBL2<sup>TM</sup> kompetenten Zellen propagiert.

**pBac{3xP3-DsRed>af}**: Das 0,4 kb, mit *Bss*HII geschnittene PCR-Amplifikat (Primer: NH\_FgyBss und NH\_RgyAsc) von pBS-*gypsy* HIII (Geschenk von V. Pirrotta) wurde in den Transformationsvektor pBac{3xP3-DsRedaf} kloniert, der zuvor mit *AscI* geöffnet worden war. Nach Ligation des PCR-Produktes entsteht die *AscI*-Schnittstelle wieder am 3' *gypsy* Ende. Die Insertion, symbolisiert durch >, enthält die Isolatorregion des *gypsy*-Retrotransposons mit 12 Su(Hw) Bindungsstellen (Scott et al., 1999).

**pBac{3xP3-DsRed>af}**: Das 0,4 kb, mit *Ng*oMIV geschnittene PCR-Amplifikat (Primer: NH\_FgyFse und NH\_RgyNg) von pBS-*gypsy* HIII (Geschenk von V. Pirrotta) wurde in pBac{3xP3-DsRed>af} kloniert. Nach Ligation des PCR-Produktes entsteht die *FseI*-Schnittstelle wieder am 5' *gypsy* Ende. Der resultierende *piggyBac*-Transformationsvektor enthält zwei direkte Sequenzwiederholungen der *gypsy*-Isolatorregion, welche die *AscI*-*FseI* Klonierstellen in 5'-3' Orientierung einrahmen.

#### 4.1.2.1.4 Helferkonstrukte

Zur Mobilisierung von Transgenkonstrukten in Keimbahntransformationsexperimenten von *D. melanogaster* wurden Helferkonstrukte verwendet. Diese exprimieren Transposase, welche zu den Transposontermini eines Transformationsvektors korrespondiert.

**phsp-pBac** (Handler & Harrell, 1999): Helferkonstrukt zu *piggyBac*-basierten Transformationsvektoren. Basiert auf p3E1.2 (Cary et al., 1989), in dem das 5' Ende (*SacI*-Deletion) durch ein 457 bp Fragment des *hsp70*-Promotors von *D. melanogaster* ersetzt wurde.

**pKhsp82-Hermes** (Sarkar et al., 1997): Helferkonstrukt zu *Hermes*-basierten Transformationsvektoren. Enthält das offene Leseraster des *Hermes*-Transposasegens, die 5' genregulatorische Sequenz des *D. pseudoobscura* *hsp82*-Gens und die 3' Transkriptionsterminationssequenz des *actin5C*-Gens aus *D. melanogaster*.

**pKhsp82-MOS** (Coates et al., 1997): Helferkonstrukt zu *mariner*-basierten Transformationsvektoren. Enthält das offene Leseraster des *Mos1*-Gens (*mariner*-Transposase), die 5' genregulatorische Sequenz des *D. pseudoobscura* *hsp82*-Gens und die 3' Transkriptionsterminationssequenz des *actin5C*-Gens aus *D. melanogaster*.

**pHSS6hsILMi20** (Klinakis et al., 2000): Helferkonstrukt zu *Minos*-basierten Transformationsvektoren. Enthält das prozessierte intronfreie offene Leseraster des *Minos*-Transposasegens, eingebettet zwischen der 5' genregulatorischen Sequenz und der 3' Transkriptionsterminationssequenz des *D. melanogaster* *hsp70*-Gens.

### 4.1.2.2 Konstrukte für SIT-Systeme

#### 4.1.2.2.1 Transaktivatorkonstrukte

##### 4.1.2.2.1.1 *sry* $\alpha$ -tTA und *nullo*-tTA Konstrukte

**pBac{3xP3-EYFPafm; n1-tTA} = n1-tTA**: Das 2,5 kb *XbaI*-*FseI* Fragment, das die *tTA* kodierende Region und den *K10*-Transkriptionsterminator trägt, wurde aus pSLfa\_p-tTA-K10\_fa isoliert. Die *nullo*-Nukleotidsequenz -413 bis +110 (*n1*; relativ zur Transkriptionsstartstelle) wurde mit den Primern CH44R und CH45F von dem Konstrukt pCNFHA38 (Hunter et al., 2002) amplifiziert und das PCR-Produkt mit *AscI*-*XbaI* geschnitten. Beide Fragmente wurden in den *AscI*-*FseI* geschnittenen Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFPafm} kloniert, so daß das *nullo*- und das *tTA*-Fragment am ATG-Startkodon fusionierten. Die Integrität der *n1*-Region wurde durch Sequenzierung mit CH\_6dm3\_hstTAFWD bestätigt.

**pBac{3xP3-EYFPafm; n2-tTA} = n2-tTA**: Erzeugt analog zu *n1-tTA*, aber mit der *nullo* Nukleotidsequenz -133 bis +110, welche mit den Primern CH44R und CH46F von dem Konstrukt pCNFHA38 (Hunter et al., 2002) amplifiziert wurde. Die Integrität der *n2*-Region wurde durch Sequenzierung mit CH\_6dm3\_hstTAFWD bestätigt.

**pBac{3xP3-EYFPafm; s1-tTA} = s1-tTA:** Das 2,5 kb *XbaI-FseI* Fragment wurde aus pSLfa<sub>p-tTA-K10\_fa</sub> isoliert. Die *sry*  $\alpha$ -Nukleotidsequenz -276 bis +46 (*s1*; relativ zur Transkriptionsstartstelle) wurde mit den Primern CHsryaRev und CHsrya2Fwd von dem Konstrukt pNRsry  $\alpha$  (Vincent et al., 1986) amplifiziert und das PCR-Produkt mit *AscI-XbaI* geschnitten. Beide Fragmente wurden in den *AscI-FseI* geschnittenen Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFPafm} kloniert, so daß das *sry*  $\alpha$ - und das *tTA*-Fragment am ATG-Startkodon fusionierten. Die *s1*-Sequenz wurde mit CHsrya2Fwd als Sequenzierprimer verifiziert.

**pBac{3xP3-EYFPafm; >>s1-tTA>>} = >>s1-tTA>>:** Erzeugt analog zu *s1-tTA*, aber durch Klonierung der *sry*  $\alpha$ - und *tTA*-Fragmente in den isolatorflankierten Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFP>>af>>}. Der Vektor wurde in STBL2<sup>TM</sup> kompetenten Zellen propagiert. Die *s1*-Sequenz wurde mit CHsrya2Fwd als Sequenzierprimer verifiziert.

**pBac{3xP3-EYFPafm; s2-tTA} = s2-tTA:** Erzeugt analog zu *s1-tTA*, aber mit der *sry*  $\alpha$ -Nukleotidsequenz -181 bis +46, welche mit den Primern CHsryaRev und CHsrya1Fwd von dem Konstrukt pNRsry  $\alpha$  (Vincent et al., 1986) amplifiziert wurde.

**pBac{3xP3-EYFPafm; >>s2-tTA>>} = >>s2-tTA>>:** Erzeugt analog zu *s2-tTA*, aber durch Klonierung der *sry*  $\alpha$ - und *tTA*-Fragmente in den isolatorflankierten Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFP>>af>>}. Der Vektor wurde in STBL2<sup>TM</sup> kompetenten Zellen propagiert. Die *s2*-Sequenz wurde mit CHsrya1Fwd als Sequenzierprimer verifiziert.

**pBac{3xP3-EYFPafm; s3-tTA} = s3-tTA:** Erzeugt analog zu *s1-tTA*, aber mit der *sry*  $\alpha$ -Nukleotidsequenz -143 bis +46, welche mit den Primern CHsryaRev und CH40F von dem Konstrukt pNRsry  $\alpha$  (Vincent et al., 1986) amplifiziert wurde. Die Integrität der *s3*-Region wurde durch Sequenzierung mit CH\_6dm3\_hstTAFWD bestätigt.

**pBac{3xP3-EYFP; s4-tTA} = s4-tTA:** Das 1,7 kb *AscI* Fragment aus pSLfa<sub>s4-tTA\_fa</sub> wurde in den Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFPafm} kloniert. Zur Keimbahntransformation wurde die Insertion mit *tTA* und dem Transformationsmarkergen in gleicher Orientierung gewählt.

**pSLfa<sub>s4-tTA\_fa</sub>:** Das 1,7 kb *XhoI-HindIII* Fragment, das die *tTA* kodierende Region unter Kontrolle des minimalen *hsp70*-Promotors und mit dem SV40-Transkriptionsterminator trägt, wurde aus pSL\_fa-TRE-hs43-tTA-SV40\_fa isoliert. Die *sry*  $\alpha$ -Nukleotidsequenz -131 bis -34 (*s4*; relativ zur Transkriptionsstartstelle) wurde mit den Primern CH42R und CH41F von dem Konstrukt pNRsry  $\alpha$  (Vincent et al., 1986) amplifiziert und das PCR-Produkt mit *EcoRI-XhoI* geschnitten. Beide Fragmente wurden in den *EcoRI-HindIII* geschnittenen Vektor pSLfa1180fa kloniert, so daß die *sry*  $\alpha$ -Enhancerregion an den heterologen *hsp70*-Promotor fusionierte. Die Integrität der *s4*-Region wurde durch Sequenzierung mit M13R bestätigt.

**pBac{3xP3-EYFP; s5-tTA} = s5-tTA:** Erzeugt analog zu *s4-tTA*, aber aus pSLfa<sub>s5-tTA\_fa</sub>.

**pSLfa<sub>s5-tTA\_fa</sub>:** Erzeugt analog zu pSLfa<sub>s4-tTA\_fa</sub>, aber mit der *sry*  $\alpha$ -Nukleotidsequenz -131 bis -49, welche mit den Primern CH43R und CH41F von dem Konstrukt pNRsry  $\alpha$  (Vincent et al., 1986) amplifiziert wurde. Die Integrität der *s5*-Region wurde durch Sequenzierung mit M13R bestätigt.

**pSL-fa-TRE-hs43-tTA-SV40-fa:** Das 0,25 kb *Asp718* Fragment (Schnittstellen mit Klenow aufgefüllt) wurde aus pCaSpeRhs43AUG $\beta$ gal (Thummel & Pirota, 1992) isoliert und in das Konstrukt pSLfa<sub>TRE-tTA-SV40\_fa</sub> kloniert, das zuvor mit *EcoRI*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*StuI* geöffnet worden war. Durch diesen Klonierschritt wurde der *hCMV*-Basalpromotor gegen den *hsp70*-Basalpromotor (*hs43*) ausgetauscht. Die richtige Orientierung der *TRE-hs43*-Fusion wurde durch einen *KspI*-Verdau verifiziert.

**pSLfa<sub>TRE-tTA-SV40\_fa</sub>:** Das 1,0 kb *EcoRI-BamHI* Fragment aus pTet-Off (Clontech, Palo Alto, USA) wurde in das Konstrukt pSLfa<sub>TRE-SV40\_fa</sub> kloniert.

**pSLfa<sub>TRE-SV40\_fa</sub>:** Das 0,9 kb *XhoI*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*HindIII* Fragment wurde aus pUHD10-3 (Gossen & Bujard, 1992) isoliert und in pSLfa1180fa kloniert, der zuvor mit *EcoRI*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*HindIII* geöffnet worden war.

#### 4.1.2.2.1.2 FBE-tTA Konstrukte

**pBac{3xP3-EYFPafm; FBE-tTA}**: Das 1,7 kb *XhoI-FseI* Fragment, das die *tTA* kodierende Region unter Kontrolle des minimalen *hsp70*-Promotors und mit dem SV40-Transkriptionsterminator trägt, wurde aus pSLfa-*TRE-hs43-tTA-SV40* fa isoliert. Die Sequenz des „*Fat Body Enhancers*-(FBE)“ der intergenischen Region der *D. melanogaster* Dotterproteingene *Yp1* und *Yp2* (-322 bis -197 relativ zur *Yp1* Transkriptionsstartstelle; Garabedian et al., 1986) wurde mit den Primern CH\_FBE\_FWD und CH\_FBE\_REV von genomischer *Drosophila*-DNA amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit *AscI-XhoI* geschnitten. Beide Fragmente wurden in den *AscI-FseI* geschnittenen Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFPafm} kloniert, so daß der FBE an den heterologen *hsp70*-Promotor fusionierte. Die Sequenz des FBE wurde durch Sequenzierung mit CH\_6dm3\_hstTAFWD verifiziert.

**pBac{3xP3-DsRedaf; >FBE-tTA}**: Das 1,8 kb *AscI* Fragment mit der *FBE-tTA* Sequenz aus pBac{3xP3-EYFPafm; FBE-tTA} wurde in den isolatorflankierten Transformationsvektor pBac{3xP3-DsRed>af>} kloniert.

#### 4.1.2.2.2 Effektorstrukturen

**pBac{3xP3-ECFPaf; >>TREp-hid<sup>Ala5</sup>>>}**: Das 5,0 kb *AscI* Fragment aus pSLfa *TREp-hid<sup>Ala5</sup>* fa wurde in den isolatorflankierten Transformationsvektor pBac{3xP3-ECFP>>af>>} kloniert. Zur Keimbahntransformation wurde die Insertion mit *hid<sup>Ala5</sup>* in entgegengesetzter Orientierung zu den Tandemwiederholungen des 5'*HS4*-Isolatorelements gewählt. Der Vektor wurde in STBL2<sup>TM</sup> kompetenten Zellen propagiert.

**pBac{3xP3-ECFPafm; TREp-hid<sup>Ala5</sup>}**: Das 5,0 kb *AscI* Fragment aus pSLfa *TREp-hid<sup>Ala5</sup>* fa wurde in den Transformationsvektor pBac{3xP3-ECFPafm} kloniert. Zur Keimbahntransformation wurde die Insertion mit *hid<sup>Ala5</sup>* und dem Transformationsmarkergen in gleicher Orientierung gewählt. Das Effektorkonstrukt trägt die *hid<sup>Ala5</sup>* kodierende Region (Bergmann et al., 1998) unter Kontrolle der heptamerisierten Tet-Operatorsequenz fusioniert an den basalen *P*-Promotor.

**pSLfa *TREp-hid<sup>Ala5</sup>* fa**: Die *hid<sup>Ala5</sup>* kodierende Region wurde als 3,9 kb *Clal-BamHI* Fragment aus pBluescriptSK-*hid<sup>Ala5</sup>* (Geschenk von A. Bergmann) isoliert. Der *P*-Basalpromotor wurde mit den Primern CH\_5'PIA<sub>sp718\_2</sub> und CH\_3'PIC<sub>clal\_2</sub> von pSLfa *UASp* fa (Horn et al., 2003) als 0,2 kb Fragment amplifiziert und mit *Asp718-Clal* nachgeschnitten. Beide Fragmente wurden in das *Asp718-BamHI* geschnittene Konstrukt pSLfa *TRE-SV40* fa ligiert.

**pBac{3xP3-ECFPaf; >>TREhs43-hid<sup>Ala5</sup>>>}**: Das 5,0 kb *AscI* Fragment aus pSLfa *TREhs43-hid<sup>Ala5</sup>* fa wurde in den isolatorflankierten Transformationsvektor pBac{3xP3-ECFP>>af>>} kloniert. Zur Keimbahntransformation wurde die Insertion mit *hid<sup>Ala5</sup>* in entgegengesetzter Orientierung zu den Tandemwiederholungen des 5'*HS4*-Isolatorelements gewählt. Der Vektor wurde in STBL2<sup>TM</sup> kompetenten Zellen propagiert.

**pSLfa *TREhs43-hid<sup>Ala5</sup>* fa**: Die *hid<sup>Ala5</sup>* kodierende Region wurde als 3,9 kb *Clal-BamHI* Fragment aus pBluescriptSK-*hid<sup>Ala5</sup>* (Geschenk von A. Bergmann) isoliert. Der *hsp70*-Basalpromotor („*hs43*“-Fragment) wurde mit den Primern CH\_5'hs43<sub>Asp718</sub> und CH\_3'hs43<sub>Clal</sub> von pCaSpeR/hs43/AUG/βgal (Thummel & Pirrotta, 1992) als 133 bp Fragment amplifiziert und mit *Asp718-Clal* nachgeschnitten. Beide Fragmente wurden in das *Asp718-BamHI* geschnittene Konstrukt pSLfa *TRE-SV40* fa ligiert.

**pBac{3xP3-ECFPafm; TRE(hCMV)-hid<sup>Ala5</sup>}**: Das 4,9 kb *AscI* Fragment aus pSLfa *TRE(hCMV)-hid<sup>Ala5</sup>* fa wurde in den Transformationsvektor pBac{3xP3-ECFPafm} kloniert. Nur die Orientierung, in der die beiden SV40-Terminatoren maximalen Abstand zueinander einnehmen, wurde erhalten. Das Effektorkonstrukt trägt die *hid<sup>Ala5</sup>* kodierende Region (Bergmann et al., 1998) unter Kontrolle des *TRE-hCMV*-Promotors (Nukleotide 319-438 aus pUHD10-3, Gossen & Bujard, 1992).

**pSLfa *TRE(hCMV)-hid<sup>Ala5</sup>* fa**: Das 3,9 kb *EcoRI* Fragment aus pBluescriptSK-*hid<sup>Ala5</sup>* (Geschenk von A. Bergmann) wurde in pSLfa *TRE-SV40* fa kloniert. Die Orientierung, in der das 5' *hid<sup>Ala5</sup>*-Ende an den *hCMV*-Basalpromotor fusioniert ist, wurde gewählt.

#### 4.1.2.2.3 Konstrukte in pBluescript zur Herstellung markierter RNA

Die Vektoren pBluescriptSK und pBluescriptKS (Stratagene, Amsterdam) enthalten flankierend zur multiplen Klonierstelle Promotoren für die T3- oder T7-RNA-Polymerasen, so daß die Synthese (markierter) RNA (*in vitro* Transkription) in Sinn- oder Antisinn-Richtung zur DNA-Sequenz eines inklonierten Fragmentes möglich ist.

**pBluescriptSK-*hid*<sup>Ala5</sup>** (Geschenk von A. Bergmann): Enthält die *hid*<sup>Ala5</sup> kodierende Region als *Eco*RI Fragment in pBluescriptSKII.

**pBluescriptKS-*tTA***: Das 1,0 kb *Eco*RI-*Bam*HI Fragment aus pTet-Off, welches die *tTA* kodierende Region trägt, wurde in pBluescriptKSII kloniert.

#### 4.1.2.3 Konstrukte des Transposon-Mutagenese-Systems

Von den konstruierten Jumpstarter-, Mutator- und Reportervektoren wurden die unterstrichen markierten funktionell in *D. melanogaster* analysiert (siehe Kap. 4.2.2). Für Konstrukte, die nicht von mir selbst oder unter meiner Anleitung hergestellt wurden, ist die Referenz angegeben, in der Klonierungsdetails zu finden sind.

##### 4.1.2.3.1 Jumpstarterkonstrukte

**pBac{3xP3-ECFP, hsp70-Hermes}** (Horn et al., 2003): Enthält das *Hermes*-Transposasegen unter Kontrolle des *hsp70*-Promotors im 3xP3-ECFP-markierten *piggyBac*-Transformationsvektor.

**pMi{3xP3-DsRed, hsp70-piggyBac}**: Das 3,5 kb *Asc*I Fragment aus pSLfa\_ *hsp70-piggyBac\_fa* (Horn et al., 2003) wurde in pMi{3xP3-DsRed} kloniert. Zur Keimbahntransformation wurde die Orientierung gewählt, in der das *piggyBac*-Transposasegen unter Kontrolle des *hsp70*-Promotors in entgegengesetzter Orientierung zum Transformationsmarkergen 3xP3-DsRed steht.

**pHer{3xP3-ECFP, hsp70-piggyBac}** (Horn et al., 2003): Erzeugt analog zu pMi{3xP3-DsRed, hsp70-piggyBac}, aber durch Klonierung in pHer{3xP3-ECFPaf} (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000).

**pHer{3xP3-ECFP,  $\alpha$ tub-piggyBacK10}** (Horn et al., 2003): Enthält das *piggyBac*-Transposasegen unter Kontrolle des  $\alpha$ 1-tubulin-Promotors im 3xP3-ECFP-markierten *Hermes*-Transformationsvektor. Zur Keimbahntransformation wurde die Insertion mit dem Transposasegen in entgegengesetzter Orientierung zum Markergen gewählt.

**pHer{3xP3-EYFP,  $\alpha$ tub-piggyBacK10}** (Horn et al., 2003): Zu pHer{3xP3-ECFP,  $\alpha$ tub-piggyBacK10} analoges Jumpstarterkonstrukt, aber mit dem Transformationsmarkergen 3xP3-EYFP.

**pMos{3xP3-ECFP,  $\alpha$ tub-piggyBacK10}** (Horn et al., 2003): Zu pHer{3xP3-ECFP,  $\alpha$ tub-piggyBacK10} analoges Jumpstarterkonstrukt, aber im 3xP3-ECFP-markierten *mariner*-Transformationsvektor. Zur Keimbahntransformation wurde die Insertion mit Transposasegen und Markergen in gleicher Orientierung gewählt.

**pMos{3xP3-EYFP,  $\alpha$ tub-piggyBacK10}** (Horn et al., 2003): Zu pMos{3xP3-ECFP,  $\alpha$ tub-piggyBacK10} analoges Jumpstarterkonstrukt, aber mit dem Transformationsmarkergen 3xP3-EYFP.

##### 4.1.2.3.2 Mutatorkonstrukte

**pBac{3xP3-EYFP, p-GAL4 $\Delta$ -K10} = {GAL4 $\Delta$ }** (Horn et al., 2003): Enthält im 3xP3-EYFP-markierten *piggyBac*-Transformationsvektor die kodierende Region der GAL4-Deletionsvariante II-9 (Ma & Ptashne, 1987) unter Kontrolle der basalen Promotorregion (inkl. des ersten Introns aber ohne Initiatorcodon) des *P*-Element-Transposasegens (Rørth, 1998). Die transkriptionelle Terminations- und Polyadenylierungssignalsequenz für GAL4 $\Delta$  entstammt der 3' UTR des *D. melanogaster* K10-Gens. Zur Keimbahntransformation wurde die Insertion mit GAL4 $\Delta$  in entgegengesetzter Orientierung zum Markergen gewählt.

**pHer{3xP3-EYFP, p-GAL4 $\Delta$ -K10}** (Horn et al., 2003): Zu pBac{3xP3-EYFP, p-GAL4 $\Delta$ -K10} analoges Mutatorkonstrukt, aber im *Hermes*-Transformationsvektor.

**pBac{UASp-3xP3-EYFP, p-GAL4 $\Delta$ -K10} = {GAL4 $\Delta$ +UAS}**: Das 2,9 kb *Asc*I-*Fse*I Fragment aus pSLfa\_p-GAL4 $\Delta$ -K10\_fa (Horn et al., 2003) wurde in pBac{UASp-3xP3-EYFPafm} kloniert. Mutatorkonstrukt mit zu pBac{3xP3-EYFP, p-GAL4 $\Delta$ -K10} analogem Aufbau, aber einer zusätzlichen UASp-Sequenz stromaufwärts zum EYFP-ORF. UASp konstituiert sich aus 14 GAL4-, „Upstream-Activating-Site“-Bindungsstellen (inkl. benachbarter GAGA-Transkriptionsfaktorbindungsstellen) fusioniert an die basale *P*-Promotorregion.

**pBac{UASp-3xP3-EYFPafm}**: Das 0,1 kb *FseI*-*Bgl*II Fragment aus pSLfa1180fa wurde in pBac{UASp-3xP3-EYFPaf} kloniert.

**pBac{UASp-3xP3-EYFPaf}**: Das 3,2 kb *Eco*RI-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*Nru*I Fragment wurde aus pSL-UASp-3xP3-EYFPaf isoliert und in p3E1.2 (Cary et al., 1989) kloniert, der zuvor mit *Hpa*I geöffnet worden war. Die Orientierung, in der die UASp-Sequenz an die *piggyBac*R-Sequenz fusioniert ist, wurde gewählt.

**pSL-UASp-3xP3-EYFPaf**: Das 0,5 kb *Eco*RI-*Bst*Z17I Fragment wurde aus pSLfa\_UASp\_fa (Horn et al., 2003) isoliert und in pSL-3xP3-EYFPaf (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) kloniert, der zuvor mit *Eco*RI-*Sma*I geöffnet worden war.

**pBac{3xP3-EYFP, p-tTA-K10} = {tTA}**: Das 3,1 kb *Asc*I-*Fse*I Fragment aus pSLfa\_p-tTA-K10\_fa wurde in pBac{3xP3-EYFPafm} kloniert. Das Mutatorkonstrukt enthält im 3xP3-EYFP-markierten *piggyBac*-Transformationsvektor die kodierende Region des *tTA*-Gens (Gossen & Bujard, 1992) unter Kontrolle der basalen *P*-Promotorregion und mit der Transkriptionsterminationssequenz des *D. melanogaster* *K10*-Gens.

**pSLfa\_p-tTA-K10\_fa**: Das 2,8 kb *Eco*RI-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*Bam*HI Fragment wurde aus pTetOff (Clontech, Palo Alto, USA) isoliert und in pSLfa\_p-K10\_fa (Horn et al., 2003) kloniert, der zuvor mit *Not*I-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*Bam*HI geöffnet worden war.

**pBac{TRE-3xP3-EYFP, p-tTA-K10} = {tTA+TRE}**: Das 2,8 kb *Asc*I-*Fse*I Fragment aus pSLfa\_p-tTA-K10\_fa wurde in pBac{TRE-3xP3-EYFPafm} kloniert. Finales Mutatorkonstrukt mit zu pBac{3xP3-EYFP, p-tTA-K10} analogem Aufbau, aber einer zusätzlichen *TRE*-Sequenz stromaufwärts zum *EYFP*-ORF. *TRE* (tTA responsives Element) konstituiert sich aus einer heptamerisierten Tet-Operatorsequenz (Gossen & Bujard, 1992).

**pBac{TRE-3xP3-EYFPafm}**: Das 0,1 kb *Fse*I-*Bgl*II Fragment aus pSLfa1180fa wurde in pBac{TRE-3xP3-EYFPaf} kloniert.

**pBac{TRE-3xP3-EYFPaf}**: Das 1,6 kb *Eco*RI-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*Nru*I Fragment wurde aus pSL-TRE-3xP3-EYFPaf isoliert und in p3E1.2 (Cary et al., 1989) kloniert, der zuvor mit *Hpa*I geöffnet worden war. Die Orientierung, in der die *TRE*-Sequenz an die *piggyBac*R-Sequenz fusioniert ist, wurde gewählt.

**pSL-TRE-3xP3-EYFPaf**: Das 0,3 kb *Xho*I-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*Sma*I Fragment wurde aus pUHD10-3 (Gossen & Bujard, 1992) isoliert und in pSL-3xP3-EYFPaf (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) kloniert, der zuvor mit *Sma*I geöffnet worden war. Die Orientierung, in der der *hCMV*-Basalpromotor in der gleichen transkriptionellen Orientierung wie der 3xP3-Promotor steht, wurde gewählt.

#### 4.1.2.3.3 Reporterkonstrukte

**pBac{3xP3-DsRed, UASp-EYFP-K10}**: Das 2,9 kb *Asc*I-*Fse*I Fragment aus pSLfa\_UASp-eyfp-K10\_fa (Horn et al., 2003) wurde in den Transformationsvektor pBac{3xP3-DsRedaf} kloniert. Das Transformationsmarkergen und das *EYFP*-Reportergen sind in entgegengesetzter Orientierung. Das finale Reporterkonstrukt enthält im 3xP3-DsRed-markierten *piggyBac*-Transformationsvektor *EYFP* unter *UASp*-Promotorkontrolle und mit der *K10*-Transkriptionsterminatorsequenz.

**pBac{3xP3-EYFP, UASp-EYFP-K10}** (Horn et al., 2003): Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, UASp-EYFP-K10}, aber durch Klonierung in pBac{3xP3-EYFPafm}.

**pBac{3xP3-ECFP, UASp-EYFP-K10}** (Horn et al., 2003): Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, UASp-EYFP-K10}, aber durch Klonierung in pBac{3xP3-ECFPafm}.

**pHer{3xP3-EYFP, UASp-EYFP-K10}** (Horn et al., 2003): Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, UASp-EYFP-K10}, aber durch Klonierung in pHer{3xP3-EYFPaf} (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000).

**pHer{3xP3-ECFP, UASp-EYFP-K10}** (Horn et al., 2003): Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, UASp-EYFP-K10}, aber durch Klonierung in pHer{3xP3-ECFPaf} (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000).

**pBac{3xP3-DsRed, UASp-lacZ-K10}**: Das 5,8 kb *Asc*I-*Fse*I Fragment aus pSLfa\_UASp-lacZ-K10\_fa (Horn et al., 2003) wurde in den Transformationsvektor pBac{3xP3-DsRedaf} kloniert. Das Transformationsmarkergen und das *lacZ*-Reportergen sind in entgegengesetzter Orientierung. Finales Reporterkonstrukt mit zu pBac{3xP3-DsRed, UASp-EYFP-K10} analogem Aufbau, aber mit *lacZ* als Reportergen.

**pBac{3xP3-EYFP, UASp-lacZ-K10}** (Horn et al., 2003): Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, UASp-lacZ-K10}, aber durch Klonierung in pBac{3xP3-EYFPafm}.

**pBac{3xP3-ECFP, UASp-lacZ-K10}** (Horn et al., 2003): Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, UASp-lacZ-K10}, aber durch Klonierung in pBac{3xP3-ECFPafm}.

**pHer{3xP3-EYFP, UASp-lacZ-K10}** (Horn et al., 2003): Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, UASp-lacZ-K10}, aber durch Klonierung in pHer{3xP3-EYFPaf} (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000).

**pHer{3xP3-ECFP, UASp-lacZ-K10}** (Horn et al., 2003): Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, UASp-lacZ-K10}, aber durch Klonierung in pHer{3xP3-ECFPaf} (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000).

**pBac{3xP3-DsRed, TRE-EYFP-SV40}**: Das 1,7 kb *AscI* Fragment aus pSLfa\_TRE-EYFP-K10\_fa wurde in den Transformationsvektor pBac{3xP3-DsRedaf} kloniert. Das Transformationsmarkergen und das EYFP-Reportergergen sind in gleicher Orientierung. Das Reporterkonstrukt enthält im 3xP3-DsRed-markierten piggyBac-Transformationsvektor EYFP unter TRE-hCMV-Promotorkontrolle und mit dem SV40-Transkriptionsterminator.

**pBac{3xP3-ECFP, TRE-EYFP-SV40}**: Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, TRE-EYFP-SV40}, aber durch Klonierung in pBac{3xP3-ECFPafm}.

**pBac{3xP3-DsRed, TRE-lacZ-SV40}**: Das 4,4 kb *AscI* Fragment aus pSLfa\_TRE-lacZ-K10\_fa wurde in den Transformationsvektor pBac{3xP3-DsRedaf} kloniert. Das Transformationsmarkergen und das lacZ-Reportergergen sind in gleicher Orientierung.

**pBac{3xP3-ECFP, TRE-lacZ-SV40}**: Erzeugt analog zu pBac{3xP3-DsRed, TRE-lacZ-SV40}, aber durch Klonierung in pBac{3xP3-ECFPafm}.

**pSLfa TRE-EYFP-SV40\_fa**: Das 0,7 kb *NotI*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*EcoRI* Fragment, das den EYFP-ORF beinhaltet, wurde aus pEYFP-1 (Clontech, Palo Alto, USA) isoliert und in pSLfa\_TRE-SV40\_fa kloniert, der zuvor mit *XbaI*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*EcoRI* geöffnet worden war.

**pSLfa TRE-lacZ-SV40\_fa**: Das 3,6 kb *XbaI* Fragment aus pCHABΔSal (Wimmer, 1995) enthält ein 130 bp *D. melanogaster Adh-5'*UTR-Fragment fusioniert an das *E. coli lacZ*-Gen. Dieses Fragment wurde in das Konstrukt pSLfa\_TRE-SV40\_fa kloniert. Die Orientierung wurde gewählt, in der das lacZ 3' Ende an den SV40-Terminator fusioniert ist.

#### 4.1.2.3.4 BCD6-Transaktivatorkonstrukte

**pBac{3xP3-EYFPafm; BCD6-tTA}**: Das 1,9 kb *AscI* Fragment wurde aus pSLfa\_BCD6-tTA\_fa isoliert und in den Transformationsvektor pBac{3xP3-EYFPafm} kloniert. Nur die Orientierung mit maximalem Abstand der beiden SV40-Transkriptionsterminatoren wurde erhalten und zur Keimbahntransformation verwendet.

**pSLfa\_BCD6-tTA\_fa**: Das 63 bp *Sall*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*NotI* Fragment, das drei BCD Bindungsstellen trägt, wurde aus pKS-BCD3 (F. Pogoda, pers. Mitteilung) isoliert und in pSLfa\_BCD3-tTA\_fa kloniert, der zuvor mit *SpeI*-(Schnittstelle mit Klenow aufgefüllt)-*NotI* geöffnet worden war.

**pSLfa\_BCD3-tTA\_fa**: Das 1,7 kb *Asp718-HindIII* Fragment, das die tTA kodierende Region unter Kontrolle des minimalen *hsp70*-Promotors und mit dem SV40-Transkriptionsterminator trägt, wurde aus pSL\_fa-TRE-hs43-tTA-SV40\_fa isoliert. Das 0,15 kb *EcoRI-BsiWI* Fragment, das drei BCD-Bindungsstellen (Ronchi et al., 1993) trägt, wurde aus pSLfaBCD3-lacZfa (F. Pogoda, pers. Mitteilung) isoliert. Beide Fragmente wurden in den *EcoRI-HindIII* geöffneten Vektor pSLfa1180fa kloniert.

### 4.1.3 Herstellung von RNA-Sonden

Zur Herstellung von Sonden bestehend aus zur tTA- oder hid<sup>Ala5</sup>-Sequenz komplementärer RNA (Antisinnrichtung) wurden je 2 µg des Plasmids pBluescriptKS-tTA mit *EcoRI* bzw. des Plasmids pBluescriptSK-hid<sup>Ala5</sup> mit *EcoRV* linearisiert. Die Matrizen-DNA wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gereinigt und anschließend EtOH-präzipitiert. Das Pellet

wurde in 10 µl DEPC-(Diethylpyrocarbonat)-H<sub>2</sub>O aufgenommen. 1,5 µg der gereinigten, linearisierten DNA wurden für die Sondenherstellung eingesetzt. Die Sonde wurde nach dem „DIG-(Digoxigenin)-RNA-labeling“ Protokoll von Roche (Basel) hergestellt. Bei der *in vitro* Transkription wird (statistisch bei jeder 20. bis 25. Adeninpaarung) anstelle von UTP DIG-markiertes UTP in die RNA eingebaut. Die *in vitro* Transkription wurde 2 h bei 37°C durchgeführt unter Verwendung der T7-RNA-Polymerase (Herstellung der *tTA*-Sonde) bzw. der T3-RNA-Polymerase (Herstellung der *hid*<sup>Ala5</sup>-Sonde). Die RNA wurde EtOH-präzipitiert und in Hybridisierungslösung (50% Formamid, 5x SSC, 0,1% Tween20, 50 µg/ml Heparin, 100 µg/ml sonifizierte Heringsspermien-DNA) aufgenommen.

#### 4.1.4 PCR-Experimente

PCR-Amplifikationen erfolgten im „Gene Amp PCR System 9600“ (Perkin Elmer, Überlingen). Zur Herstellung von klonierenden Amplifikaten aus vektorialen Matrizen wurde generell die *Pfu*-Polymerase (Promega, Mannheim) verwendet, welche eine Korrekturlesefunktion besitzt. Ein 50 µl Reaktionsansatz enthielt *Pfu*-Polymerase und *Pfu*-Puffer nach Herstellerangaben sowie 10 pmol beider Primer, 10 nmol jedes der vier dNTPs und 50 ng Matrizen-DNA. Als Reaktionsbedingungen der PCR wurden gewählt: 2 min 94°C, dann 25 Zyklen mit (1 min 94°C, 1 min [Mittelwert der Primer-Schmelztemperaturen minus 5°C]°C, 1 min 72°C) und final 7 min 72°C.

Zur Herstellung von klonierenden Amplifikaten aus genomischer *Drosophila*-DNA wurde die *Taq*-Polymerase (Amersham Biosciences, Freiburg) mit Puffer und Reaktionsbedingungen nach Herstellerangaben verwendet. Genomische DNA wurde erhalten durch Homogenisieren von 1-5 adulten Fliegen in 100 µl Lösung A (100 mM Tris/HCl pH 9, 100 mM EDTA, 1% SDS), Zugabe von 14 µl 8 M Kaliumacetat, 30 min Inkubation bei 0°C, zweimalige Zentrifugation (15 min, 4°C, 14000 Upm), Transfer des Überstands in ein frisches Reaktionsgefäß und Isopropanolpräzipitation der DNA. 1 µl von 20 µl resuspendierter genomischer DNA wurde im 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

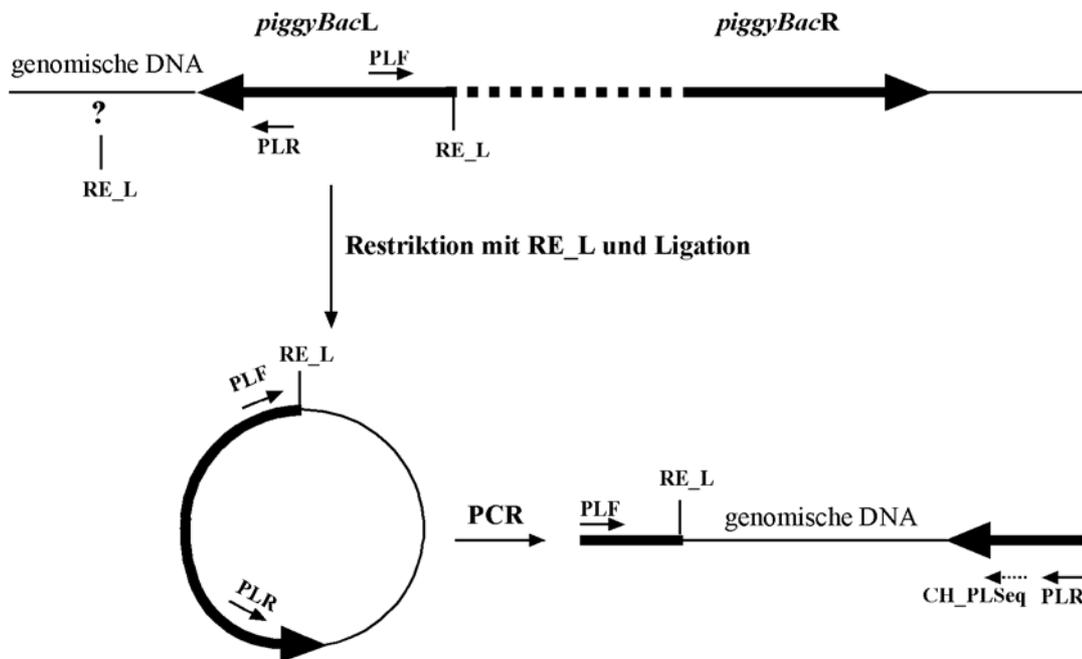
##### 4.1.4.1 Einzelebryonen-Multiplex-PCR

*Drosophila*-Eier (Alter: 3-5 h, 25°C) wurden dechorionisiert und mit Wasser gespült. Sich entwickelnde Embryonen wurden identifiziert anhand der Ausprägung des elongierten Keimstreifs und in 10 µl „squishing buffer“ (10 mM Tris/HCl pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/ml Proteinase K) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 1 h bei 50°C und, zur Inaktivierung der Proteinase K, für 10 min bei 95°C inkubiert. 5 µl Homogenat wurden zu einem PCR-Ansatz pipettiert, der in einem Gesamtvolumen von 25 µl 1,25 mmol KCl, 43,8 nmol MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mmol Tris/HCl pH 9, 5 nmol der vier dNTPs, 1 U *Taq*-Polymerase sowie 10 pmol eines jeden Primers enthielt. Das Primerpaar DH2C07 und AK/03/2C amplifiziert ein 0,7 kb genomisches *cdc2c*-Fragment (Lehner & O'Farrell, 1990) und kontrolliert den Erfolg der DNA-Präparation und PCR. Das Primerpaar CH\_tAm\_F und CH\_tAm\_R amplifiziert ein 191 bp *tTA*-Fragment und weist somit die Präsenz des Transaktivatortransgens nach. Das Primerpaar CH\_hidm\_F und CH\_hidm\_R amplifiziert ein 253 bp

Fragment der *hid*<sup>Ala5</sup>-cDNA und weist somit die Präsenz des Effektortransgens nach. Die genomische *hid*-Sequenz trägt zwischen diesen Primerbindungsstellen ein Intron und ergäbe ein 2,2 kb Amplifikat, das jedoch unter den gewählten PCR-Bedingungen nicht erhalten wurde: 3 min 95°C, 33 x [1 min 95°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C], 7 min 72°C. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen wurden wattegestopfte Pipettenspitzen in allen Pipettierschritten verwendet. Das *cdc2c*-Amplifikat wurde in keiner der Negativkontrollreaktionen erhalten (jeder 16. Ansatz enthielt 5 µl ddH<sub>2</sub>O statt Homogenat). Positivkontrollansätze (Embryonenhomogenate aus der Kreuzung von EL#42-Männchen gegen *white*-Jungfrauen) hingegen lieferten grundsätzlich die *cdc2c*-, *tTA*- und *hid*<sup>Ala5</sup>-spezifischen Amplifikate.

#### 4.1.4.2 Inverse PCR

Die Bestimmung der molekularen *piggyBac*-Integrationspositionen im *Drosophila*-Genom erfolgte über die Technik der inversen PCR. Das Prinzip ist in Abb. 4.1 dargestellt.



**Abb. 4.1: Prinzip der inversen PCR.**

Zur Bestimmung der *piggyBacL*-flankierenden Sequenz wurde genomische DNA isoliert und mit einem tetramerspezifischen Restriktionsenzym (RE\_L) mit bekannter Schnittstelle innerhalb von *piggyBacL* verdaut. Fragmente wurden zirkularisiert und anschließend in einen PCR-Ansatz mit *piggyBacL*-spezifischen Primern (PLR, PLF) eingesetzt. Erhaltene Amplifikate wurden mit dem Primer CH\_PLSeq sequenziert. Analoge Reaktionsschritte wurden zur Bestimmung der *piggyBacR*-flankierenden Sequenz angewendet.

Detaillierte Angaben zu den Einzelschritten sind beschrieben (Huang et al., 2000 bzw. <http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>). Im folgenden sind daher nur *piggyBac*-spezifische Anpassungen des Protokolls aufgeführt: Genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Hae*III (schneidet *piggyBacR* und *piggyBacL*), *Taq*I (schneidet *piggyBacR*) und *Msp*I (schneidet *piggyBacL*) verdaut. Zur PCR-Amplifikation (5 min 95°C, 35 x [30 sec 95°C, 1 min 65°C, 2 min 72°C], 7 min 72°C) der *piggyBacL*-Verknüpfung wurde das Primerpaar PLR und PLF,

zur PCR-Amplifikation der *piggyBac*R-Verknüpfung das Primerpaar PRR und PRF verwendet. Amplifikate wurden nach Entfernung der Primer („QIAquick PCR purification“ Protokoll von Qiagen, Hilden) in 25 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und mit CH\_PLSeq (*piggyBac*L-Verknüpfung) bzw. CH\_PRSeq (*piggyBac*R-Verknüpfung) sequenziert. Sequenzen wurden mittels des Computerprogramms BLASTN (Altschul et al., 1990) gegen die Nukleotidsequenz des *Drosophila*-Genoms abgeglichen (Datenbank: <http://www.fruitfly.org/blast/>).

#### 4.1.4.3 PCR von *piggyBac*-Exzisionsstellen

Zur Analyse von *piggyBac*-Exzisionsstellen wurden Fliegen ausgewählt, die eine Exzision der Mutatorinsertion  $\{GAL4\Delta\}\#29$ ,  $\{GAL4\Delta\}\#51$  bzw.  $\{GAL4\Delta\}\#139$  tragen (siehe Kap. 4.2.4.2). Von diesen Fliegen wurde genomische DNA präpariert (siehe Kap. 4.1.4). Die PCR-Amplifikation wurde mit in Tab. 4.1 verzeichneten Primern sowie *Taq*-Polymerase und Ingredienzien nach Herstellerangaben (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt und die Amplifikate mit den Primern CH\_29\_Rev, CH\_51\_Rev bzw. CH\_139\_Rev sequenziert.

## **4.2 *Drosophila*-Kultur und Genetik**

Zur Zucht und Haltung der verschiedenen *Drosophila*-Stämme wurden Standardmethoden angewendet (Roberts, 1998). Eine Beschreibung verwendeter Markermutationen und Balancier-Chromosomen findet sich in Lindsley & Zimm (1992). *D. melanogaster* besitzt vier Chromosomenpaare. In der verwendeten Nomenklatur für *Drosophila*-Linien bezeichnet .x Transgenlokalisierung auf dem X, .II auf dem zweiten und .III auf dem dritten Chromosom. M bezeichnet ein männliches, F ein weibliches Individuum der Gründergeneration. Sofern nicht anders angegeben, wurden Inkubationen bei 25°C durchgeführt.

### **4.2.1 Experimente mit embryo- und weiblich-spezifisch letalen Stämmen**

#### 4.2.1.1 *Drosophila*-Medium mit tTA-Inhibitorsubstanzen

*Drosophila*-Medium enthielt pro l deionisiertem H<sub>2</sub>O 8 g Agar-Agar, 22 g Zuckerrübensirup, 80 g Maltzin, 80 g Maismehl, 18 g Trockenhefe, 10 g Sojamehl und 6,25 ml Propionsäure. Zur Herstellung wurde Agar-Agar nach Vorquellen in kaltem Wasser in einen Kochkessel mit auf ca. 90°C vorgeheiztem Wasser gegeben und anschließend für 1 h unter Rühren gekocht. Maismehl, Sojamehl und Hefe wurden erst trocken und dann mit kaltem Wasser zu einem homogenen Brei durchmischt und nach Zugabe des in wenig heißem Wasser gelösten Rübensirups in den Kochkessel gegeben. Maltzin wurde ebenfalls in etwas heißem Wasser gelöst und dann in den Kochkessel gegeben. Die Futtermischung wurde für mindestens 1 h unter Rühren gekocht und abschließend mit Propionsäure versetzt. 10x konzentrierte wäßrige oder, wenn >1 mg/ml, 50% (w/v) ethanolische Lösungen von Tetracyclin\*HCl (Tc; Sigma-Aldrich, Taufkirchen), Doxycyclin\*HCl (Dox; Sigma-Aldrich) oder

Anhydrotetracyclin\*HCl (ATc; Acros Organics, Pittsburg, USA) wurden mit dem Futtermisch 1:10 verdünnt und anschließend manuell in Futterröhrchen portioniert.

#### 4.2.1.2 Analyse der Sterilität von EL-Stämmen

Die minimal erforderliche Tc-Mediumkonzentration zur Suppression der Sterilität wurde bestimmt, indem 10-20 Fliegen eines EL-Stammes, angezogen auf 100 µg/ml Tc-(Tc<sub>100</sub>)-Medium, auf Medium mit Tc-Konzentrationen von 0; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100 oder 1000 µg/ml drei sukzessive Zweitageseiablagen ausführten. Bei dem minimalen Tc-Konzentrationswert (Tab. 5.3) entstanden reproduzierbar aus allen drei Zweitagesablagen adulte Nachkommen. Bei der höchsten Tc-Konzentration wurde eine Verzögerung der Entwicklungszeit von mehreren Tagen beobachtet.

Die minimal erforderliche Tc-Konzentration im parentalen Medium zur Suppression der Sterilität wurde bestimmt, indem Elterntiere der EL-Stämme, angezogen auf Medium der Konzentrationen 0,1; 1; 3; 10; 30; 100 oder 1000 µg/ml, eine 6-tägige Eiablage auf inhibitorfreiem Medium ausführten. Die minimale parentale Tc-Konzentration, bei der adulte Nachkommen beobachtet wurden, ist angegeben (+Tc → -Tc; Tab. 5.3). 20 männliche Nachkommen eines EL-Stammes aus Ansätzen mit der oder den niedrigstmöglichen parentalen Tc-Konzentration(en) wurden in Einzelansätzen gegen 5 *OreR* ♂ verkreuzt. Sofern nach einer 30-tägigen Inkubationszeit (25°C) mit bloßem Auge keine larvalen, pupalen oder adulten Nachkommen beobachtet wurden, wurde der EL-Stamm als heterozygot steril klassifiziert (Tab. 5.2).

Um die Effizienz der Sterilität von EL#42-Männchen im Detail zu analysieren (Tab. 5.4), wurden diese in jeweils 30 unabhängigen Einzelkreuzungsansätzen gegen 5 *OregonR* (*OreR*) ♀ bei 18°C, 25°C bzw. 29°C für 30 Tage inkubiert. Alle Ansätze wurden auf Nachkommen in postembryonalen Stadien untersucht. Zudem wurde die Anzahl abgelegter Eier in 3 repräsentativ ausgewählten Röhrchen pro Temperaturwert ausgezählt und auf die Gesamtzahl der Ansätze extrapoliert. Als Fertilitätskontrolle bei 29°C dienten zehn unabhängige Ansätze mit je 1 ♂ und 5 ♀ des Stammes *OreR*, welche Nachkommen hervorbrachten.

Daten zu den Dosis-Wirkungskurven (Abb. 5.7) wurden erhalten, indem 15 EL#42-Weibchen pro Ansatz 6-tägige Eiablagen auf inhibitorfreiem Medium ausführten. Diese Weibchen waren zuvor auf Medien der Tc- bzw. Dox-Konzentrationen 0,1; 1; 3; 10; 30; 100 oder 1000 µg/ml angezogen worden und auf frisch hergestellten Medien gleicher Konzentration für vier Tage mit EL#42-Männchen verpaart worden. Die Gesamtzahl adulter Nachkommen aus den inhibitorfreien Ansätzen wurde nach einer Inkubationsperiode von 20 Tagen aufgezeichnet. Insgesamt wurden 2 ([Tc] = 0,1 µg/ml), 4 ([Dox] = 0,1 µg/ml) bzw. 7-9 (alle weiteren Tc- und Dox-Konzentrationen) unabhängige Ansätze ausgewertet. Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Abb. 5.7 angegeben.

#### 4.2.1.3 Analyse der Reversibilität der EL#42-Sterilität

Zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit des Eintritts und der Revertierbarkeit der Sterilität (Abb. 5.8) führten EL#42-Fliegen, angezogen auf Tc<sub>100</sub>-Medium, zehn serielle 12 h Eiablagen auf inhibitorfreiem Medium aus. Anschließend wurden zwei weitere sukzessive 12 h Eiablagen dieser Fliegen auf Medium mit einem Tropfen an aktiver Hefe, suspendiert in Tc-Lösung (100 µg/ml), durchgeführt. Die Nachkommenzahl jeder 12 h Eiablage wurde nach 16-tägiger Inkubationszeit ausgewertet.

Zur Bestimmung der Reversibilität bei zeitlicher Trennung von Eiablagefläche und Tc-Quelle (Abb. 5.9) wurden EL#42-Fliegen, angezogen auf Tc<sub>100</sub>-Medium, zunächst für 72 h auf inhibitorfreiem Medium und nachfolgend, zum Entzug der Proteinquelle, für 48 h auf Apfelsaftagarplatten inkubiert. Die Sterilität im Zeitintervall 108-120 h wurde bestätigt (Abwesenheit geschlüpfter Larven bei 224 ausgewerteten Eiern). Auf die 120. Stunde nach Tc-Entzug folgend, wurde ein Fütterungsschema durchgeführt: EL#42-Fliegen, denen für 1 Zeiteinheit (1 h bzw. 4 h) Tc<sub>100</sub>-haltige Hefesuspension angeboten wurde, führten anschließend für 3 Zeiteinheiten (3 h bzw. 12 h) eine Eiablage auf inhibitorfreier Apfelsaftagarplatte aus. Die Gesamtzahl abgelegter Eier und der prozentuale Anteil geschlüpfter Larven (larvale Schlüpftrate) wurden bestimmt.

#### 4.2.1.4 Konkurrenzexperimente mit EL#42-Männchen

Für Konkurrenzexperimente eingesetzte Elternfliegen waren 1-7 Tage alt und wurden zur Mittelung des Alterseinflusses auf die Fekundität gemischt. Für Konkurrenzexperimente um unbefruchtete wildtypische Weibchen (Abb. 5.13) wurden 15 jungfräuliche Weibchen des Wildtypstammes *OreR* mit 15 *OreR*-Männchen und einer unterschiedlichen Anzahl (15 für Ratio 1:1 bis zu 135 für Ratio 1:9) an EL#42-Männchen verpaart. Kontrollansätze enthielten 15 jungfräuliche *OreR*-Weibchen entweder mit 15 EL#42-Männchen (Negativkontrolle) oder mit 15 *OreR*-Männchen (Positivkontrolle +) oder mit 150 *OreR*-Männchen (Positivkontrolle ++). Zweitageseiablagen aller Ansätze wurden nach 13 Tagen hinsichtlich der Anzahl entstandener Nachkommen ausgewertet. Die Werte von 14 unabhängigen Ansätzen pro Verhältnis (und Kontrollen - und ++) wurden normalisiert auf die Positivkontrolle +. Mittelwerte und Standardfehlerbalken der Mittelwerte sind angegeben. Insgesamt wurden 5070 (Positivkontrolle +), 2729 (Positivkontrolle ++), 4028 (wt:EL#42=1:1), 3172 (wt:EL#42=1:3), 2253 (wt:EL#42=1:5), 1601 (wt:EL#42=1:7), 750 (wt:EL#42=1:9) bzw. 4 (Negativkontrolle) adulte Nachkommen gezählt.

Für Einzelembryonen-PCR-Genotypisierungen (Abb. 5.14) wurden 50 jungfräuliche *OreR*-Weibchen und 50 EL#42-Männchen entweder mit 50 wildtypischen, augenpigmentierten *OreR*-Männchen oder mit 50 nicht augenpigmentierten *white*-Männchen in ein großes Kollektionsgefäß gegeben und für drei Tage verpaart. Anschließend wurden drei sukzessive 0-2 h Eiablagen wie beschrieben prozessiert (siehe Kap. 4.1.4.1). Die Zählung der Fliegen nach Abschluß des

Experimentes bestätigte, daß für jeden Genotyp mindestens 90% der eingesetzten Individuen überlebt hatten, so daß sich das 1:1:1 Verhältnis im Laufe des Experimentes nicht verschob.

Für Konkurrenzexperimente um bereits befruchtete Weibchen (Abb. 5.15) wurden 135 EL#42-Männchen zu 15 Männchen und 15 Weibchen des Stammes *white*, welche zuvor mehrere Tage verpaart worden waren, am Tag 0 gegeben. Eine Zeitserie von sechs sukzessiven Zweitagesablagen (0-2; 2-4; 4-6; 6-8; 8-10 und 10-12 Tage nach Hinzufügen der EL#42-Männchen) wurde nach einer jeweiligen Inkubationszeit von 13 Tagen auf adulte Nachkommen hin ausgewertet. Die Werte sind normalisiert auf die Positivkontrolle ohne EL#42-Männchen. Insgesamt wurden drei Zeitserien durchgeführt. Mittelwerte und Standardfehlerbalken der Mittelwerte sind angegeben.

#### 4.2.1.5 Analyse der Sterilität und der weiblich-spezifischen Letalität in FSLEL-Stämmen

Zur Untersuchung heterozygoter Sterilität (Tab. 5.6) wurden 10 FSLEL-Männchen in Einzelansätzen gegen 5 *OreR*-Jungfrauen verkreuzt. Sofern nach einer 20-tägigen Inkubationszeit keine larvalen, pupalen oder adulten Nachkommen beobachtet wurden, wurde der FSLEL-Stamm als heterozygot steril klassifiziert. Zur Untersuchung der minimal zur Propagierung notwendigen Tc-Konzentration wurden FSLEL-Stämme auf Tc-haltigem (3, 10, 30 oder 100 µg/ml) Medium auf Nachkommen analysiert. Zur Untersuchung, ob parental verfüttertes Tc in FSLEL-Stämmen hinreichend zur Suppression der Letalität sein kann, wurden Elterntiere zunächst auf Tc-haltigem Medium der Konzentration 0 (Sterilitätskontrolle), 3, 10, 30 oder 100 µg/ml angezogen. Anschließend wurden je 10 Männchen und 10 Weibchen pro Konzentrationspunkt und FSLEL-Stamm auf Futter der gleichen Konzentration für 2 Tage verpaart und danach für Eintageseiablagen sukzessive wiederholt auf inhibitorfreies Medium übertragen. Nach 14-tägiger Inkubationszeit der inhibitorfreien Ansätze wurde die Anzahl entstandener männlicher und weiblicher Nachkommen ausgewertet.

Zur Kontrolluntersuchung des bzgl. *yp1-tTA* und *tetO-hid* homozygoten Stammes wie auch zur Analyse des bzgl. *pBac{3xP3-DsRed; >FBE-tTA>}* M1.II und *>>TREP-hid<sup>Ala5</sup>>>* F1.II homozygoten Stammes wurde folgendermaßen verfahren: Elterntiere, die auf Tc-(10 µg/ml)-Futter angezogen worden waren, wurden zunächst für eine Zweitageseiablage und dann für drei sukzessive Eintageseiablagen wiederholt auf inhibitorfreies Medium übertragen. Nach 14-tägiger Inkubationszeit wurde die Anzahl der Nachkommen ausgewertet.

## **4.2.2 Funktionsanalyse der Jumpstarter-, Mutator- und Reportertransgene**

Die Funktionalität der Jumpstarterkonstrukte (siehe Kap. 4.1.2.3.1) in transgenen *Drosophila*-Linien wurde durch Remobilisierung einer nicht autonomen, genomischen *Hermes*- bzw. *piggyBac*-Insertion funktionell untersucht (R. Ackermann & N. Offen, pers. Mitteilung): In diesem Testsystem mobilisierten als funktionell klassifizierte *piggyBac*-exprimierende Jumpstarterlinien ein *pBac{3xP3-EYFP}*-Transgen und als funktionell klassifizierte *Hermes*-exprimierende Jumpstarterlinien ein *pHer{3xP3-EGFP}*-Transgen auf Balancier-Chromosomen. In Kreuzungsansätzen mit unter

Hitzeschockpromotorkontrolle *Hermes*- oder *piggyBac*-exprimierenden Jumpstarterlinien wurden im zweiten und dritten Larvalstadium Hitzeschocks (je 3 h, 37°C) an drei nachfolgenden Tagen gegeben.

Die Funktionalität der Mutatorkonstrukte  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  und  $\{tTA+TRE\}$  (siehe Kap. 4.1.2.3.2) wurde folgendermaßen untersucht: In Linien, die bzgl.  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  transgen sind, wurden verschiedene Fluoreszenzmuster beobachtet, welche nicht auf die  $3xP3-EYFP$ -Expression zurückführbar sind. In Linien, die bzgl.  $\{GAL4\Delta\}$  transgen sind, traten  $3xP3$ -unabhängige Fluoreszenzmuster nur sehr selten auf. Das gehäufte Auftreten in  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ -Linien weist auf die Funktionalität des *GAL4*-Gens und der *UASp-3xP3*-Promotorfusion hin. Hingegen zeigten zehn Insertionen des  $\{tTA+TRE\}$ -Transgenkonstruktes keine  $3xP3$ -unabhängigen Fluoreszenzmuster. Wurden  $\{tTA+TRE\}$ -Linien jedoch gegen eine *Bac* $\{3xP3-EYFPafm; BCD6-tTA\}$ -Transaktivatorlinie (siehe Kap. 4.1.2.3.4) gekreuzt, so produzierten die  $\{tTA+TRE\}$ -Linien Nachkommen mit verstärktem Fluoreszenzsignal (im Vergleich zur Kontrollkreuzung von *Bac* $\{3xP3-EYFP, BCD6-tTA\}$ -Linien gegen eine *Bac* $\{3xP3-ECFP, TRE-EYFP\}$ -Linie). Dies weist auf die Funktionalität der *TRE-3xP3*-Promotorfusion und auf das Vorhandensein einer Autoaktivierungsschleife im  $\{tTA+TRE\}$ -Mutator hin.

Die Funktionalität der Reporterstrukturen (siehe Kap. 4.1.2.3.3) wurde durch folgende Testkreuzungen untersucht (R. Ackermann, pers. Mitteilung): *UASp-EYFP*- und *UASp-lacZ*-Reporterlinien wurden gegen die Transaktivatorlinie *en-GAL4* (exprimiert *GAL4* unter *engrailed*-Promotorkontrolle; E.A. Wimmer, pers. Mitteilung) gekreuzt. *TRE-EYFP*- und *TRE-lacZ*-Reporterlinien wurden gegen eine *Bac* $\{3xP3-EYFPafm; BCD6-tTA\}$ -Transaktivatorlinie gekreuzt. Als funktionell klassifizierte Reporterlinien produzierten in Nachkommen der Kreuzungen gegen *en-GAL4* ein Segmentpolaritätsmuster bzw. in Nachkommen der Kreuzungen gegen *BCD6-tTA* ein frühembryonales, anterior begrenztes Muster.

### 4.2.3 Durchführung der Pilot-Mutagenese

#### 4.2.3.1 Jumpstarter-, Mutator- und Reporterlinien der Pilot-Mutagenese

Alle verwendeten Linien sind bzgl. des angegebenen Transgens homozygot (bzw. hemizygot).

Jumpstarterlinien (Abb. 5.20A):

Dm[*Her* $\{3xP3-ECFP, \alpha tub-piggyBacK10\}$ ] M1.III, M6.II, M10.III.

Mutatorlinien (Abb. 5.20B):

Dm[ $\{GAL4\Delta\}$ ] M8-2x, M19-2x, M19-3x.

Dm[ $\{GAL4\Delta+UAS\}$ ] M5.x, FM26.x, FF36.x.

Dm[ $\{tTA\}$ ] x.1, x.2, x.5, x.7.

Sekundäre Reporterlinien (Abb. 5.20C):

Dm[*Bac* $\{3xP3-DsRed, UAS-EYFP-SV40\}$ ] M2.II (Reporterlinie für  $\{GAL4\Delta\}$ -Mutator).

Dm[*Bac* $\{3xP3-DsRed, TRE-EYFP-SV40\}$ ] M8.II, M5.III (Reporterlinien für  $\{tTA\}$ -Mutator).

### 4.2.3.2 Kreuzungsschritte der Pilot-Mutagenese

Kreuzungsschritte der Pilot-Mutagenese wurden nach dem Schema der Abb. 5.19 ausgeführt. Für jeden Mutator wurde eine Matrix aus drei ( $\{GAL4\Delta\}$ ,  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ ) bzw. vier ( $\{tTA\}$ ) unabhängigen Linien gegen drei unabhängige Jumpstarterlinien verkreuzt ( $G_1$ -Kreuzung in Abb. 5.19). Pro Kombination wurden 27 Einzelkreuzungen und somit insgesamt pro Mutator  $9 \times 27 = 243$  ( $\{GAL4\Delta\}$ ,  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ ) bzw.  $12 \times 27 = 324$  ( $\{tTA\}$ ) Einzelkreuzungen gegen die korrespondierende Reporterlinie (bzw., im Falle des  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ -Mutators, gegen *white*) angesetzt ( $G_2$ -Kreuzung in Abb. 5.19). Als unabhängige und stabile Neuinsertionen des Mutators wurden  $G_3$ -Männchen klassifiziert, die  $3xP3-EYFP^+$  und  $3xP3-EGFP^-$  waren. Da solche dysgenen  $G_3$ -Männchen mit der Mutatorlinie  $Dm[\{tTA\}] \times 1$  kaum erhalten wurden, wurden Daten zu dieser Linie nicht in die Auswertung (Tab. 5.7) miteinbezogen. Sofern mehrere dysgene  $G_3$ -Männchen aus einem  $G_2$ -Kreuzungsansatz entstanden, wurde diese nur bei eindeutig unterschiedlicher Augenfluoreszenzintensität (oder bei unterscheidbarem Enhanceraktivitätsphänotyp) als unabhängige Neuinsertionen eingestuft.

Zur Etablierung von balancierten Linien wurden unabhängige  $G_3$ -Männchen mit  $\{GAL4\Delta\}$ - und  $\{tTA\}$ -Neuinsertionen gegen Jungfrauen des Stammes *w*; *SM5*, *Cy*; *TM3*, *Sb* / *T(2;3) ap<sup>Xa</sup>* gekreuzt. Anhand der Segregation der EYFP-Fluoreszenz (Mutator) gegenüber der DsRed-Fluoreszenz (Reporter, dessen chromosomale Lokalisation bekannt war) wurde die chromosomale Lokalisation einer Mutatorneuinsertion bestimmt. Zweitchromosomale Mutatorneuinsertionen wurden mit *SM5*, *Cy*, drittchromosomale mit *TM3*, *Sb* balanciert. Balancierte Männchen und Jungfrauen einer Linie wurden gegeneinander verkreuzt. Die folgende Generation wurde hinsichtlich des Auftretens bzgl. des Mutatortransgens homozygoter Individuen (ohne Balancier-Chromosom) untersucht. Im Falle der Anwesenheit des Balancier-Chromosoms in allen bzw. in  $>90\%$  der Nachkommen wurde die Linie als rezessiv letal bzw. als rezessiv semiletal klassifiziert.

## 4.2.4 Remobilisierung genomischer Transgeninsertionen und Reversionsanalysen

### 4.2.4.1 Remobilisierung von $Dm[P\{w^{+mC}, 3xP3-EGFP\}]$ -Insertionen

Männliche Individuen, welche das *P*-Element-Konstrukt  $pP\{w^{+mC}, 3xP3-EGFP\}$  (Horn, 1999; Horn et al., 2000) trugen und keine sichtbare Augenpigmentierung aber starke EGFP-Augenfluoreszenz aufwiesen, wurden in Einzelansätzen gegen Jungfrauen des *P*-Element-Jumpstarter-Stammes *Bc Elp* / *CyO HoPI(w<sup>+</sup>)* (O’Kane, 1998) verkreuzt. Männliche Nachkommen dieser Kreuzungen mit mosaikartiger Augenpigmentierung wurden gegen Jungfrauen des Stammes *white* gekreuzt. Die Nachkommenschaft dieser Kreuzung wurde sowohl auf Augenpigmentierung als auch auf Augenfluoreszenz hin untersucht.

#### 4.2.4.2 Exzision von *piggyBac*-Mutatorinsertionen und Reversion letaler Phänotypen

Um zu analysieren, ob ein rezessiv letaler Phänotyp nach Exzision des Mutatortransposons revertiert werden kann, wurden letale Mutatorlinien gegen folgende Jumpstarterlinien gekreuzt: Jumpstarterlinie Dm[*Her{3xP3-ECFP, atub-piggyBacK10}*] M6.II für zweitchromosomale bzw. Linie M1.III für drittchromosomale Mutatorinsertionen. In der folgenden G<sub>2</sub>-Generation wurden Männchen, welche den ECFP-markierten Jumpstarter und den EYFP-markierten Mutator auf homologen Chromosomen trugen, gegen Jungfrauen mit Balancier-Chromosomen ausgekreuzt (CyO für zweitchromosomale bzw. TM3 für drittchromosomale Mutatorinsertionen). Unter den Nachkommen dieser Kreuzung (G<sub>3</sub>-Generation) wurden Individuen, die ein Exzisionschromosom über dem homologen Balancier-Chromosom trugen, anhand der Abwesenheit von ECFP- und EYFP-Fluoreszenz identifiziert. Diese Individuen wurden rückgekreuzt gegen die letale, balancierte Mutatorlinie (10 unabhängige Einzelansätze pro untersuchter letaler Mutatorlinie). Eine erfolgreiche Reversion wurde in der folgenden G<sub>4</sub>-Generation durch das Auftreten von Fliegen ohne Balancier-Chromosom indiziert (Genotyp: Mutatortransgen und Exzisionsstelle auf homologen Chromosomen).

#### 4.2.4.3 Komplementationsanalyse von *{GAL4Δ}#150* und *{GAL4Δ}#166*

Zur Komplementationsanalyse der Mutatorinsertion *{GAL4Δ}#150* wurden Individuen mit Balancier-Chromosomen gegen Individuen mit balancierten, rezessiv letalen *ttk*-Allelen (*ttk*<sup>1</sup> bzw. *ttk*<sup>1e11</sup> [Xiong & Montell, 1993]) vereinzelt gekreuzt. Alle Nachkommen (n=135) beider Kreuzungsansätze trugen das Balancier-Chromosom. Zur Komplementationsanalyse der Mutatorinsertion *{GAL4Δ}#166* wurde eine analoge Kreuzung mit den rezessiv letalen *shn*-Allelen (*shn*<sup>1</sup> [Staepling-Hampton et al., 1995] bzw. *shn*<sup>04738</sup> [Arora et al., 1995]) durchgeführt. Unter der Nachkommenschaft (n=240) traten Individuen ohne Balancier-Chromosom zu 35% (*shn*<sup>1</sup>; n=123) bzw. 42% (*shn*<sup>04738</sup>; n=117) auf.

#### **4.2.5 Keimbahntransformation**

Keimbahntransformationsexperimente wurden durch Mikroinjektion von Transgenkonstrukten in Präblastoderm-Embryonen des *D. melanogaster* Stammes *white* durchgeführt. Die Methodik der *P*-Element-vermittelten Transformation (Rubin & Spradling, 1982) wurde für Breitband-Transposons übernommen (Horn et al., 2000). Injektionslösungen enthielten 500 ng/μl an Transgenkonstrukt und 300 ng/μl an korrespondierendem Helferkonstrukt in Injektionspuffer (5 mM KCl, 0,1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Zur Injektion von *hid*<sup>Ala5</sup>-Effektorkonstrukten wurde die Konzentration des Transgenkonstruktes auf 250 ng/μl erniedrigt.

Transgene Nachkommen wurden anhand des Erwerbs von Augenfluoreszenz identifiziert. Transgentragende Chromosomen wurden nach Segregationsanalyse mit CyO (auf dem zweiten Chromosom) bzw. TM2 *Ubx* (auf dem dritten Chromosom) balanciert.

### 4.3 Angaben zu Fluoreszenzproteinen und zur Epifluoreszenzstereomikroskopie

#### 4.3.1 Charakteristika von ECFP, EGFP, EYFP und DsRed

Zur Entwicklung separierbarer Transformationsmarker wurden Gene für fluoreszierende Proteine mit verschiedenen biophysikalischen Eigenschaften (Tab. 4.2 und Abb. 4.2; Patterson et al., 2001) unter die Kontrolle des *3xP3*-Promotors gestellt. In der Spektralvariante **ECFP** (Cubitt et al., 1999) sind sechs Aminosäuren gegenüber wildtypischem GFP (Prasher et al., 1992) substituiert (F64L, S65T, T66W, N146I, M153T, V163A). Das Emissionsmaximum wurde damit blauverschoben, die Leuchtstärke allerdings abgeschwächt. Bei der rotverschobenen Variante **EGFP** (Cormack et al., 1996; Yang et al., 1996) konnte die Leuchtstärke durch zwei Aminosäureaustausche (F64L; S65T) gegenüber GFP gesteigert werden. Zudem sind sowohl Löslichkeit als auch thermische Stabilität erhöht. Die Spektralvariante **EYFP** (Cubitt et al., 1999) besitzt gegenüber GFP vier Aminosäureaustausche (S65G, V68L, S72A, T203Y) und ein Fluoreszenzmaximum, das noch weiter in den gelbgrünen Spektralbereich rotverschoben ist. Die Leuchtstärke konnte in dieser Variante relativ zu EGFP erneut gesteigert werden. Schließlich vervollständigt das rot fluoreszierende Protein **DsRed** (Matz et al., 1999) die Abdeckung des sichtbaren Spektralbereichs. Im Gegensatz zu GFP, welches *in vivo* als Dimer vorliegt, bildet DsRed1, die in der vorliegenden Arbeit verwendete Variante, eine tetramere Quartärstruktur und neigt zudem zur Aggregation (Baird et al., 2000). DsRed1 weist eine langsame Faltungskinetik und somit eine Reifungszeit von Tagen auf. Im vollständig aktiven Zustand besitzt DsRed1 jedoch einen hohen Extinktionskoeffizienten und eine effiziente Quantenausbeute (Tab. 4.2). Da zudem die Autofluoreszenz biologischer Gewebe (vorwiegend im gelben Spektralbereich) nur wenig mit der DsRed1-Fluoreszenz überlagert, kommt DsRed1 unter den hier zusammengestellten Varianten das günstigste Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu.

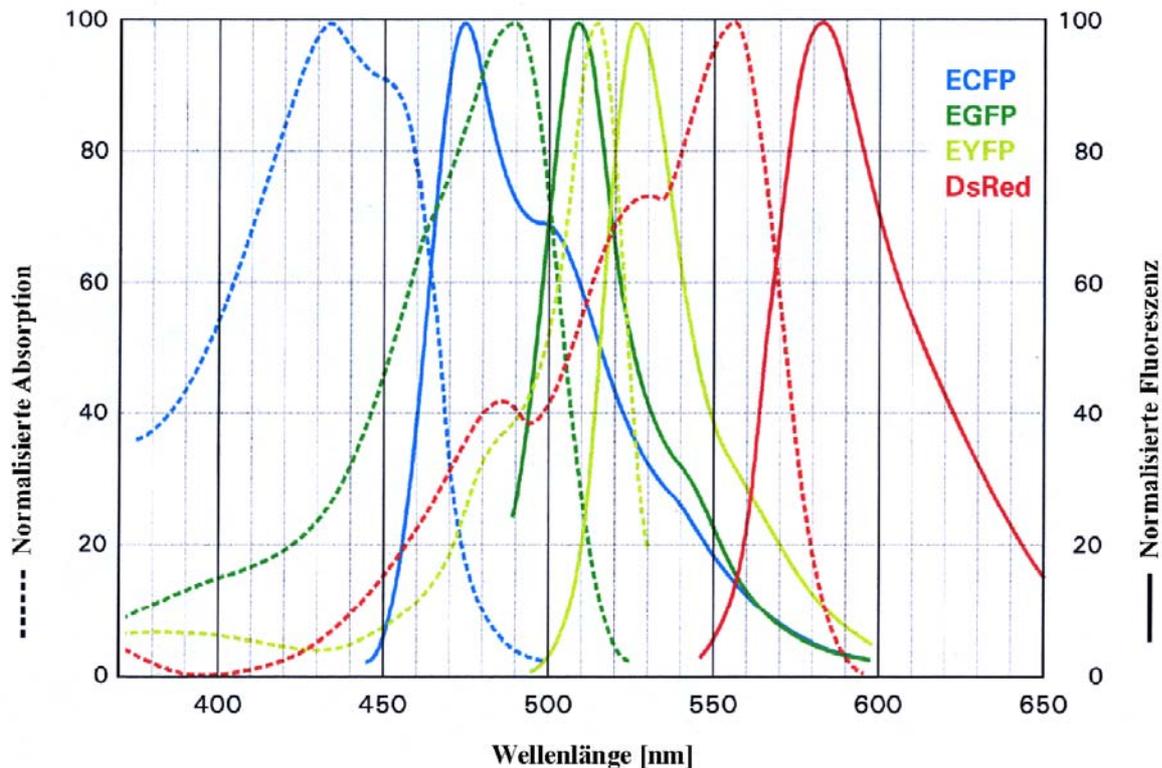
Fluoreszenzprotein	Absorptionsmaximum (nm)	Extinktionskoeffizient ( $\epsilon(\lambda_{\max})$ ; $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	Emissionsmaximum (nm)	Quantenausbeute	relative Leuchtstärke <sup>a</sup>
ECFP	434	26000	477	0,40	0,47
EGFP	489	55000	508	0,60	1,49
EYFP	514	84000	527	0,61	2,32
DsRed1	558	72500 <sup>b</sup>	583	0,68 <sup>b</sup>	2,23

**Tab. 4.2: Biophysikalische Eigenschaften der Fluoreszenzproteine ECFP, EGFP, EYFP und DsRed.**

<sup>a</sup> Leuchtstärke ist definiert als Produkt aus maximalem Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeute. Die Referenz ist wildtypisches GFP aus *Aequorea victoria* (Leuchtstärke = 1,0).

<sup>b</sup> Werte beziehen sich auf vollständig aktives DsRed1-Protein (Baird et al., 2000). (nach Patterson et al., 2001)

Aus den Normalspektren der Fluoreszenzproteine (Abb. 4.2) kann abgeleitet werden, daß die Emissionsspektren von EGFP und DsRed nur minimal überlappen, so daß die physikalische Voraussetzung zur unabhängigen Nachweisbarkeit als gegeben erscheint. Dies trifft auch für die Emissionsspektren von EYFP und DsRed zu. Zudem überlagern sich die Absorptionsspektren von ECFP und EYFP nur geringfügig. Diese spektralen Eigenschaften sind die Grundlage des differentiellen Nachweises der drei Fluoreszenzproteine ECFP, EYFP und DsRed.



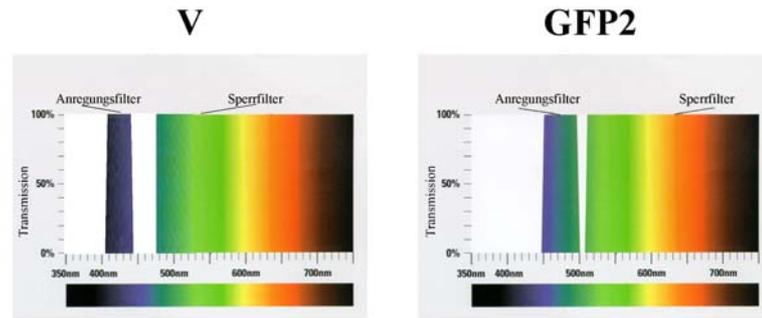
**Abb. 4.2: Spektrale Eigenschaften der Fluoreszenzproteine ECFP, EGFP, EYFP und DsRed1.** Absorptionsspektren sind mit unterbrochenen, Fluoreszenzspektren mit durchgezogenen Linien dargestellt. Modifiziert nach Living Colors™ User Manuals (Protokolle PT2040-1 [PR8Z149] und PT3404-1 [PR9X217], Clontech, Palo Alto, USA).

### 4.3.2 Epifluoreszenzstereomikroskopie

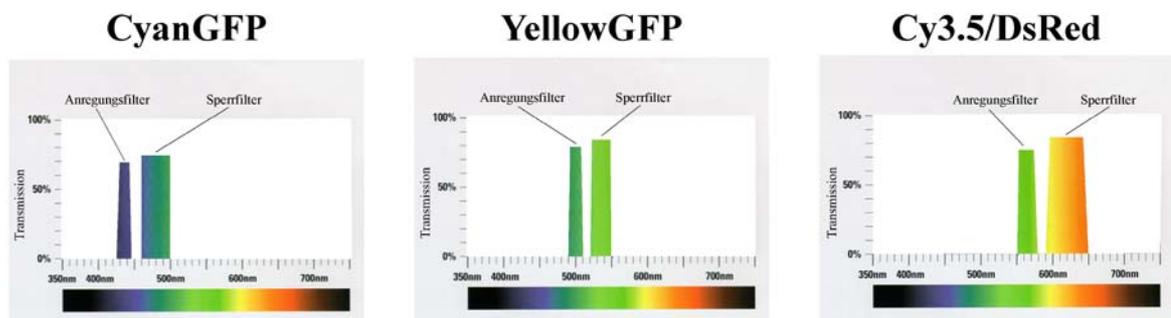
#### 4.3.2.1 Angaben zum Fluoreszenz-Stereomikroskop und zu verwendeten Filtersystemen

Fluoreszenzbeobachtungen wurden am Leica MZ FLIII Fluoreszenz-Stereomikroskop durchgeführt. Dieses Stereomikroskop besitzt drei Strahlengänge: Zwei separate von den beiden Okularen über das Hauptobjektiv zum Objekt und zusätzlich einen dritten Strahlengang für den Fluoreszenzilluminator. Als Anregungslicht für Fluoreszenzbeobachtungen dient das Emissionsspektrum einer Quecksilberdampf Lampe. Dieses passiert einen Anregungsfilter und trifft auf das Objekt. Von Fluorophoren des Objektes emittiertes Licht wird nach Durchgang durch einen Sperrfilter beobachtet, der entweder als Langpassfilter Licht oberhalb einer bestimmten Minimalwellenlänge oder als Bandpassfilter ein eingegrenztes spektrales Fenster passieren läßt (Abb. 4.3).

## Langpassfiltersysteme



## Bandpassfiltersysteme



**Abb. 4.3: Spektralbereich der verschiedenen Filtersysteme zur Anregung und Objektbeobachtung.**

Gezeigt ist die Transmission von Licht im sichtbaren Spektralbereich bei den Langpassfiltersystemen V und GFP2 bzw. den Bandpassfiltersystemen CyanGFP, YellowGFP und Cy3.5/DsRed. Gezeichnet nach Herstellerangaben zu den spektralen Eigenschaften.

Anregungs- und Sperrfilter bilden ein Filtersystem, das spektral den Erfordernissen eines Fluorophors angepaßt ist. Die spektralen Eigenschaften der Langpassfiltersysteme (V, GFP2) und der Bandpassfiltersysteme (CyanGFP, YellowGFP, Cy3.5/DsRed), welche zur *in vivo* Fluoreszenzbeobachtung bzgl. *3xP3-EGFP*, *3xP3-EYFP*, *3xP3-ECFP* bzw. *3xP3-DsRed* transgener Täufliegen eingesetzt wurden, sind in Tab. 4.3 zusammengestellt.

Filtersystem	Anregungsfilter ( $\lambda_{\max}$ /spektrale Breite)	Sperrfilter ( $\lambda_{\min}$ oder $\lambda_{\max}$ /spektrale Breite)	Hersteller und Produktbezeichnung
V	425 nm/40 nm	510 nm	Leica, Bensheim
GFP2 (GFP Plus)	480 nm/40 nm	475 nm	Leica, Bensheim
CyanGFP	436 nm/20 nm	480 nm/40 nm	Chroma #31044v2; AHF Analysentechnik AG, Tübingen
YellowGFP	500 nm/20 nm	535 nm/30 nm	Chroma #41028; AHF Analysentechnik AG, Tübingen
Cy3.5/DsRed	565 nm/30 nm	620 nm/60 nm	Chroma #41021; AHF Analysentechnik AG, Tübingen (#F41-035)

**Tab. 4.3: Spektrale Eigenschaften verschiedener Filtersysteme zur Fluoreszenzbeobachtung *in vivo*.**

#### 4.3.2.2 Fluoreszenzbeobachtung und -dokumentation in *Drosophila melanogaster*

Die Langpassfiltersysteme V und GFP2 bieten gegenüber den Bandpassfiltersystemen CyanGFP und YellowGFP den Vorteil höherer Luminosität und ermöglichen den sensitiven Nachweis von Fluoreszenzproteinen im Komplexauge von *D. melanogaster*. Das Bandpassfiltersystem Cy3.5/DsRed gewährleistet eine hohe Lichtstärke zum Nachweis von DsRed-Augenfluoreszenz.

Für Durchmusterungsanalysen (Identifizierung transgener Individuen nach Keimbahntransformationsexperimenten oder von Neuinsertionsereignissen im Rahmen der Pilot-Mutagenese) wurde generell ein Langpass- oder das Cy3.5/DsRed-Filtersystem verwendet. Der Nachweis adulter und larvaler Enhanceraktivität erfolgte unter Verwendung des GFP2-Filtersystems. Zur individuellen Identifizierung einer einzelnen Transgenkomponente in Stämmen mit mehreren, unabhängig fluoreszenzmarkierten Transgenen wurden generell Bandpassfiltersysteme eingesetzt, die eine eindeutige Differenzierung von 3xP3-ECFP-, 3xP3-EYFP- oder 3xP3-DsRed-Augenfluoreszenz erlauben.

Adulte Fliegen wurden unter Verwendung des planachromatischen 0,5x Objektivs beobachtet. Fliegenköpfe (Abb. 5.1; 5.2; 5.16; 5.18B,D; 5.19) sind mit diesem Objektiv und 5x finaler Vergrößerung dokumentiert. Larven, die den  $\{GAL4A+UAS\}$ -Mutator tragen (Abb. 5.21), wurden zunächst in 20%iger (w/v) Glucoselösung von Futterbestandteilen getrennt, dann mit einer Pasteurpipette in ein Rundsieb mit feinmaschigem Gazeboden überführt, mit NaCl-Tx (0,7% (w/v) NaCl, 0,07% (w/v) Triton X) und anschließend mit Wasser gespült und in 96% Glycerin eingebettet. Nach 5 min Inkubation des Präparats bei 65°C waren Larven immobilisiert. Die EYFP-Fluoreszenz wurde mit dem planapochromatischen 1,6x Objektiv beobachtet. Zur Dokumentation wurden eine aufsetzbare digitale Kamera (Axiocam HR, Zeiss, Jena) und das Computerprogramm Zeiss AxioVision 2.05 verwendet.

## **4.4 Embryologie**

Kontinuierliche Kollektionen von *Drosophila*-Embryonen wurden mittels Eiablage auf Apfelsaftagarplatten erhalten (Roberts, 1998). Sofern nicht näher spezifiziert, wurden Reaktionen bei Raumtemperatur ausgeführt. Gefärbte Embryonen wurden mit dem Zeiss Photomikroskop Axiophot bei 160x Vergrößerung beobachtet.

### **4.4.1 Fixierung der Embryonen**

Die Fixierung dient der Konservierung embryonaler Gewebsmorphologie und beinhaltet die Schritte der Dechorionisierung (Entfernung der Chorionschicht) und Devitellinisierung (Entfernung der Vitellinmembran). *Drosophila*-Embryonenkollektionen wurden mit 1,5% Natriumhypochlorid-lösung 3 min dechorionisiert und 20 min in 1,5 ml Embryo-Fix (0,1 M HEPES pH 6,9, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA pH 8,0) und 2 ml Heptan mit 187,5 µl Formalin (37% Formaldehydlösung, stabilisiert

mit 10-15% MeOH) unter konstantem Schütteln fixiert. Nach Abnehmen der wäßrigen Phase wurden 3,5 ml Methanol hinzugefügt und die Vitellinmembran durch kräftiges Schütteln aufgebrochen.

Für *in situ* Hybridisierungsexperimente eingesetzte Embryonen wurden nach der Devitellinisierung rehydratisiert durch jeweils 5 min Waschgänge in MeOH/PBS-(140 mM NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)-Gemischen mit zunehmendem PBS-Anteil (MeOH:PBS = i.) 7:3, ii.) 1:1, iii.) 3:7). Anschließend wurden die Embryonen 20 min in einer 3,7%igen Formaldehydlösung in PBS rotierend fixiert. Nach dieser zweiten Fixierung wurden die Embryonen, sofern nicht umgehend verwendet, erneut mehrmals mit Methanol gewaschen und bei -20°C verwahrt.

#### 4.4.2 *In situ* Hybridisierung an Embryonen

*In situ* Hybridisierungen mit RNA-Sonden ermöglichen die Visualisierung des räumlichen Transkriptmusters eines Gens in einer zeitlichen Kollektion fixierter Embryonen. Die Einzelschritte, nach denen verfahren wurde, sind beschrieben (Reischl, 2001).

#### 4.4.3 TUNEL- und DNA-Färbung an Embryonen

Die TUNEL-Reaktion (TdT mediated fluorescein-dUTP nick end labeling; Sgonc et al., 1994) ermöglicht die Visualisierung apoptotischer Zelldegeneration *in situ*. Dabei werden TdT-(Terminale Desoxynukleotidyltransferase)-vermittelt fluoreszierende Nukleotide in DNA-Einzelstrangbrüche inkorporiert.

Zunächst wurden 0-18 h Embryonenkollektionen der Kreuzung ♂EL#42 x ♀*OreR* sowie des Wildtypstammes *OreR* zunächst wie beschrieben dechorionisiert und devitellinisiert (siehe Kap. 4.4.1). Die TUNEL-Färbung wurde nach Wang et al. (1999) mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Nach einem 5 min Waschgang in PBX (140 mM NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X) wurden Embryonen permeabilisiert (30 min bei 65°C in 100 mM Na-Citrat, 0,1% Triton X). Anschließend folgten Waschgänge in PBX (2x 10 min) und in TUNEL-Verdünnungspuffer (2x 10 min; 30 mM Tris/HCl; 140 mM Na-cacodylat, 1 mM CoCl<sub>2</sub>). Embryonen wurden nachfolgend für 1 h in 50 µl TUNEL-Markierungslösung (25 mM Tris/HCl, 1 mM CoCl<sub>2</sub>, 0,25 mg/ml BSA, pH 6,6 sowie dNTP-Mischung und Fluorescein-dUTP in nicht spezifizierter [Roche, Basel] Konzentration) und schließlich für 3 h bei 37°C in TUNEL-Reaktionslösung (5 µl TdT in nicht spezifizierter Aktivität + 45 µl TUNEL-Markierungslösung) inkubiert. Nach 10 min Waschen in PBX und einem 5 min Inkubationsschritt mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 (1 µg/ml in PBS) wurden Embryonen direkt in Embryomontagekleber (70% (v/v) Glycerin, 50 mM Tris/HCl pH 9,5, 10 mg/ml Propylgallat, 0,5 mg/ml p-Phenylendiamin, 1x PBS) eingebettet.

#### 4.4.4 X-Gal-Färbung an Embryonen

Die Expression des *lacZ*-Reportergens kann *in situ* visualisiert werden, indem das chromogene Substrat X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) von dem Enzym β-Galactosidase

in ein unlösliches blaues Präzipitat umgesetzt wird. Zur X-Gal-Färbung wurden Embryonen dechorionisiert und fixiert (siehe Kap. 4.4.1), aber nicht devitellinisiert. Nach Abnehmen der unteren wäßrigen Phase und der oberen Heptanphase wurden die Embryonen in PB3X (wie PBX, aber mit 0,3% Triton X) dreimal für je 5 min gewaschen. PB3X wurde abgenommen und die Embryonen wurden in vorgewärmter (20 min, 37°C) Färbelösung (5 mM  $K_3[Fe^{III}(CN)_6]$ , 5 mM  $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$ , PB3X) für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Hinzufügen von X-Gal-Lösung (Endkonzentration: 2 mg/ml in Färbelösung) und einer Inkubation für 5 min bei 37°C wurden die Embryonen bis zur sichtbaren Blaufärbung rotiert. Anschließend wurden die Embryonen dreimal mit PB3X gewaschen. Nach Entfernung des PB3X und Zugabe von 300 µl Heptan und 500 µl MeOH wurde die Vitellinmembran durch heftiges Schütteln entfernt. Devitellinisierte Embryonen wurden mehrmals in MeOH gewaschen, dann dreimal je 20 min in 100% EtOH rotiert und schließlich in GMM (Gary's Magic Mounting; 1,2 ml Kanadabalsam, 0,3 ml Methylsalicylat) eingebettet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Weiterentwicklung des Systems insektenuniversell einsetzbarer Transformationsvektoren

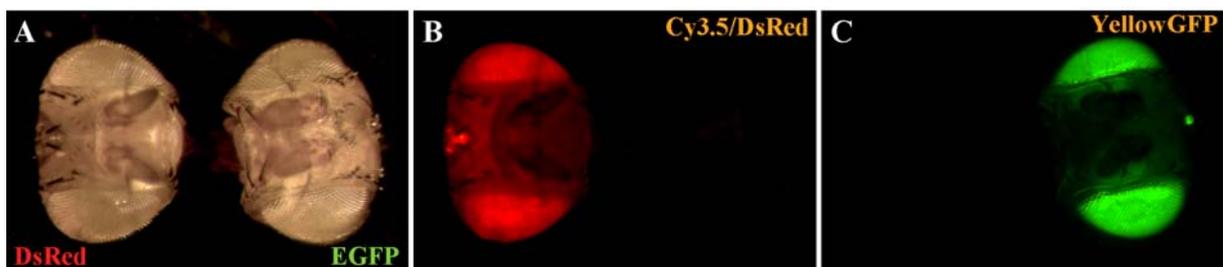
Im Fokus dieser Arbeit stehen Entwicklungen auf dem Gebiet der Sterilen Insekten Technik. Um die Voraussetzung zur Anwendung konstruierter und im Modellinsekt *Drosophila melanogaster* evaluierter Systeme zu schaffen, wurden entsprechende Konstrukte in ein potentiell universell in Insektenpezies einsetzbares Keimbahntransformationssystem eingegliedert (Horn & Wimmer, 2000). Weiterentwicklungen der Transformationsvektoren sollen zunächst dargestellt werden.

#### 5.1.1 Etablierung diskriminierbarer Transformationsmarker für genetische Multikomponentensysteme

Genetische Werkzeuge basieren oftmals auf mehreren Transgenkomponenten. Während in *Drosophila* die simultane Präsenz unterschiedlicher Transgene durch verschiedene speziesendogene Phänotypenmarker nachgewiesen werden kann, könnten in weniger gut charakterisierten Insektenpezies unterscheidbare, fluoreszierende Transformationsmarker diesen Zweck erfüllen.

Zusätzlich zu den bereits erfolgreich eingesetzten und diskriminierbaren Spektralvarianten EYFP und ECFP (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) wurde DsRed, das rot fluoreszierende Protein einer Spezies der Seeanemonengattung *Discosoma* (Matz et al., 1999), als möglicher weiterer Transformationsmarker untersucht (die biophysikalischen Eigenschaften der Fluoreszenzproteine sind beschrieben in Kap. 4.3.1). Dazu wurden Taufliegen mit Konstrukten, die das Transformationsmarker-genen *3xP3-DsRed* exprimieren, transformiert.

Im unpigmentierten Komplexauge zeigen bzgl. *3xP3-DsRed* transgene Taufliegen ein leicht und eindeutig erkennbares Fluoreszenzsignal (Abb. 5.1B und Abb. 5.2B). DsRed-Fluoreszenz kann (im Gegensatz zu EGFP-Fluoreszenz) durch die Kopfkutikula hindurch erkannt werden (vergleiche Abb. 5.1B und Abb. 5.1C). Der Grund hierfür liegt möglicherweise in der Tatsache, daß biologische Gewebe im längerwelligen sichtbaren Spektralbereich weniger Energie absorbieren.

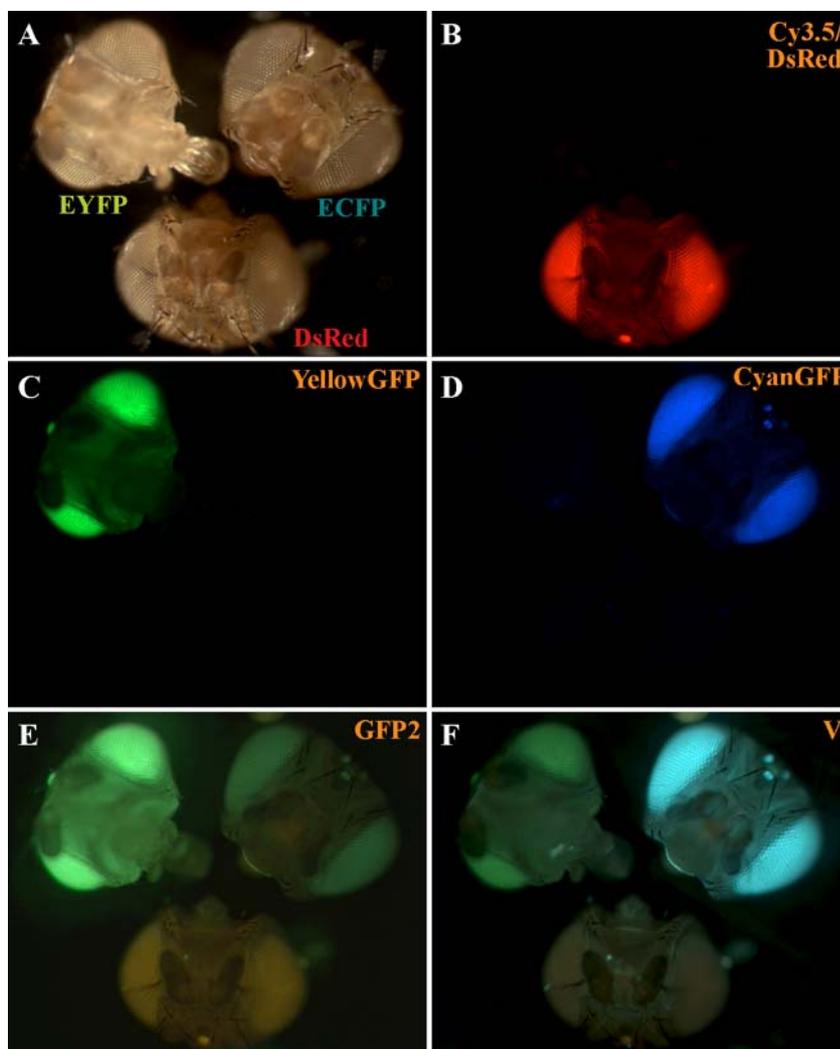


**Abb. 5.1: DsRed und EGFP als unabhängig nachweisbare Transformationsmarker.**

Bzgl. der Transformationsmarker-genen *3xP3-DsRed* und *3xP3-EGFP* transgene Fliegenköpfe wurden mit einer Kaltlichtquelle (A) oder mit Anregungslicht und den Filtersystemen Cy3.5/DsRed (B) und YellowGFP (C) beobachtet.

Da DsRed eine Reifungszeit von Tagen besitzt (Baird et al., 2000), wurde der Frage nachgegangen, ob der Transformationsmarker *3xP3-DsRed* im Vergleich zu *3xP3-EGFP* in Stadien der *Drosophila*-Entwicklung zeitlich verzögert nachweisbar ist. DsRed-Fluoreszenz konnte frühestens im letzten Stadium der Embryogenese (im Bolwig'schen Organ, dem larvalen Lichtsinnesorgan) erkannt werden und ist gegenüber der frühesten Nachweisbarkeit des EGFP-Signals (Horn et al., 2000) verzögert. Für larvale und pupale Stadien hingegen konnte das für *3xP3-EGFP* beschriebene Expressionsmuster (Horn, 1999; Horn et al., 2000) bestätigt werden.

Im *Drosophila*-Komplexauge lassen sich DsRed und EGFP mit Hilfe der Filtersysteme Cy3.5/DsRed und YellowGFP eindeutig unterscheiden (vergleiche Abb. 5.1B und Abb. 5.1C), was mit den spektralen Eigenschaften der beiden Fluorophore übereinstimmt (siehe Abb. 4.2). Somit können DsRed und EGFP als unabhängig voneinander nachweisbares Markerduo verwendet werden.



**Abb. 5.2: ECFP, EYFP und DsRed als unabhängig nachweisbares Markertrio.**

Bzgl. *Bac{3xP3-DsRed}*, *Bac{3xP3-EYFP}* und *Her{3xP3-ECFP}* transgene Fliegenköpfe wurden mit einer Kaltlichtquelle (A) oder mit Anregungslicht (B-F) beobachtet unter Verwendung der Bandpassfiltersysteme Cy3.5/DsRed (B), YellowGFP (C) bzw. CyanGFP (D) oder der Langpassfiltersysteme GFP2 (E) bzw. V (F). Mit den Bandpassfiltersystemen können die Fluorophore ECFP, EYFP und DsRed jeweils spezifisch im Komplexauge nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob sich DsRed auch unabhängig von EYFP und ECFP nachweisen läßt, wurden bzgl. *3xP3-DsRed*, *3xP3-EYFP* und *3xP3-ECFP* transgene Fliegenköpfe mit unterschiedlichen Bandpass- (Cy3.5/DsRed, YellowGFP, CyanGFP) und Langpassfiltersystemen (GFP2, V) beobachtet (Abb. 5.2). Die verwendeten Bandpassfiltersysteme erwiesen sich als spezifisch für die jeweilige Spektralvariante: Der Cy3.5/DsRed-Filter für DsRed (Abb. 5.2B), der YellowGFP-Filter für EYFP (Abb. 5.2C) sowie der CyanGFP-Filter für ECFP (Abb. 5.2D). Hingegen scheinen im GFP2-Filter (Abb. 5.2E) neben EYFP auch ECFP und DsRed etwas durch und auch im V-Filter (Abb. 5.2F) sind alle drei Markerproteine sichtbar.

Mit *3xP3-ECFP*, *3xP3-EYFP* und *3xP3-DsRed* liegt somit ein Trio an unabhängig voneinander nachweisbaren Transformationsmarkern vor. Die Integration dieser Markergene in Transformationsvektoren schafft die Voraussetzung zur Markierung unterschiedlicher Transgene in komplexen genetischen Multikomponentensystemen.

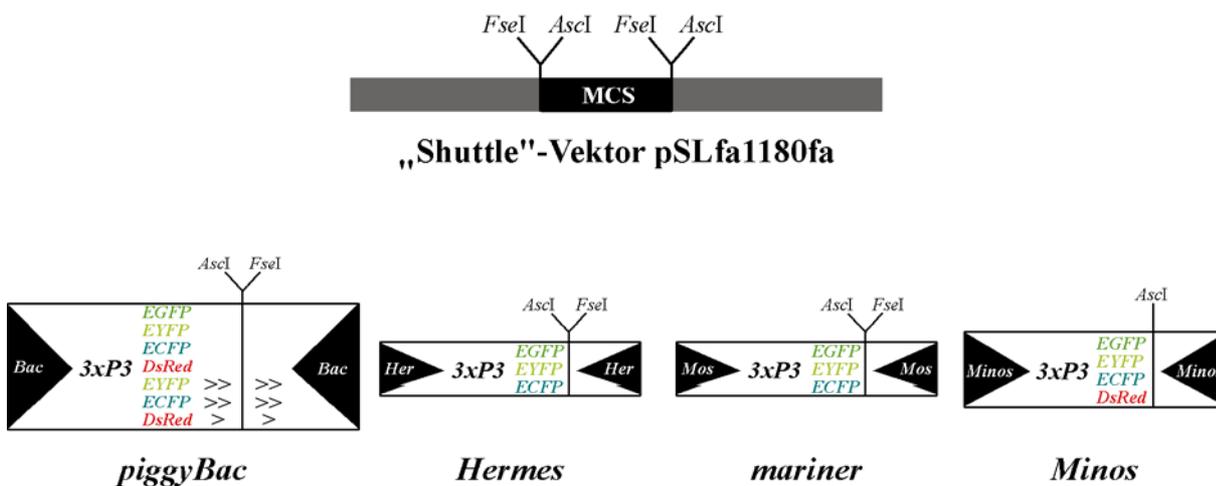
### 5.1.2 Modifikationen der insektenuniversell einsetzbaren Transformationsvektoren

Ein Satz von neun Transformationsvektoren, die auf den Transformationsmarkergenen *3xP3-EGFP*, *3xP3-EYFP* und *3xP3-ECFP* sowie auf den Breitband-Transposons *piggyBac*, *Hermes* und *mariner* basieren, wurde bereits detailliert dokumentiert (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000). Die initiale Version der *piggyBac*- und *mariner*-Transformationsvektoren trug eine Insertion des Transformationsmarkergens innerhalb der transposasekodierenden Sequenz. Eine einfache Insertionsinaktivierung schließt jedoch die Rekonstitution eines funktionellen Transposasegens nicht aus (z.B. über kryptische Spleißstellen oder genetische Umlagerungsprozesse). Daher wurde eine modifizierte Serie dieser Transformationsvektoren hergestellt (bezeichnet mit dem Appendix „afm“; siehe Kap. 4.1.2.1.1). In diesen Vektoren sind 0,8 kb (*piggyBac*) bzw. 0,6 kb (*mariner*) des offenen Leserasters des Transposasegens deletiert. Die Funktionalität dieser Transformationsvektoren wurde exemplarisch für  $pBac\{3xP3-ECFPafm\}$  und  $pMos\{3xP3-EYFPafm\}$  mittels *Drosophila*-Keimbahntransformation nachgewiesen. Mit  $pMos\{3xP3-EYFPafm\}$  wurden dabei  $G_0$ -Männchen, welche transgene Nachkommen hervorbrachten, mit einer im Vergleich zu nichtmodifizierten *mariner*-Transformationsvektoren höheren Frequenz erhalten (10% vs. 4%; bezogen auf die Gesamtzahl fertiler  $G_0$ -Männchen). *Hermes*-basierte Transformationsvektoren (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) wurden nicht modifiziert, da sie Derivate des Konstruktes  $pHermes[EGFP]$  (Pinkerton et al., 2000) darstellen, in dem bereits 1,5 kb des *Hermes*-Transposasegens deletiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden über bereits beschriebene Vektoren (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000) hinausgehend auf dem Transposon *Minos* (Franz & Savakis, 1991) sowie auf dem Transformationsmarkergen *3xP3-DsRed* basierte Transformationsvektoren hergestellt (siehe Kap. 4.1.2.1.2) und verwendet.

### 5.1.3 Erweiterung der *piggyBac*-Transformationsvektoren um Isolatorelemente

Um die Möglichkeit der Abschirmung von Transgenen gegenüber der Wirkung am genomischen Integrationslocus aktiver Enhancer zu bieten, wurden *piggyBac*-Transformationsvektoren mit Isolatorelementen ausgestattet (siehe Kap. 4.1.2.1.3): Zum einen wurde dazu ein Isolatorelement in ECFP- und EYFP-markierte *piggyBac*-Vektoren integriert, welches die konstitutive 5' DNaseI-hypersensitive Stelle (5'*HS4*) aus der Locus-Kontrollregion der  $\gamma$ -Globin-Domäne des Huhns umfaßt. 5'*HS4* vermittelt Isolierung eines Transgens gegenüber Enhanceraktivierung sowohl in Humanzellkultur als auch in *Drosophila* (Chung et al., 1993). Zum anderen wurde die Isolatorregion des *D. melanogaster gypsy* Retrotransposons (Geyer & Corces, 1992) in einen DsRed-markierten *piggyBac*-Vektor eingegliedert. Mit Isolatorelementen flankierte finale Transgenkonstrukte sind gekennzeichnet (>> symbolisiert eine Tandemwiederholung der 5'*HS4*-Sequenz; > bezeichnet das *gypsy*-DNA-Element). Der vollständige, aktualisierte Satz an zur Verfügung stehenden universellen Transformationsvektoren ist in Abb. 5.3 schematisch dargestellt.



**Abb. 5.3: Aufbau universeller Transformationsvektoren und Prinzip der Zwei-Schritt-Klonierungsprozedur.** Auf *piggyBac*, *Hermes*, *mariner* bzw. *Minos* basierende Transformationsvektoren sind dargestellt. > symbolisiert das *gypsy*-, >> das 5'*HS4*-Isolatorelement. Komplexe Transgenkonstrukte können nach einer Zwei-Schritt-Klonierungsstrategie konstruiert werden: Vorstufen werden im ersten Schritt im „Shuttle-Vektor“ pSLfa1180fa (Horn & Wimmer, 2000) zusammengesetzt. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) des pSLfa1180fa baut sich aus allen statistisch möglichen palindromischen Hexamersequenzen auf. Flankierend zur MCS trägt pSLfa1180fa Oktamer-Schnittstellen der Restriktionsenzyme *FseI* und *AscI*. Da universelle Transformationsvektoren ebenfalls *FseI* und *AscI*-Klonierstellen tragen, können Vorstufen im zweiten Schritt aus dem „Shuttle-Vektor“ flexibel in einen oder mehrere der Transformationsvektoren übertragen werden.

## 5.2 Ein System supprimierbarer embryonaler Letalität zur Erzeugung steriler Insekten

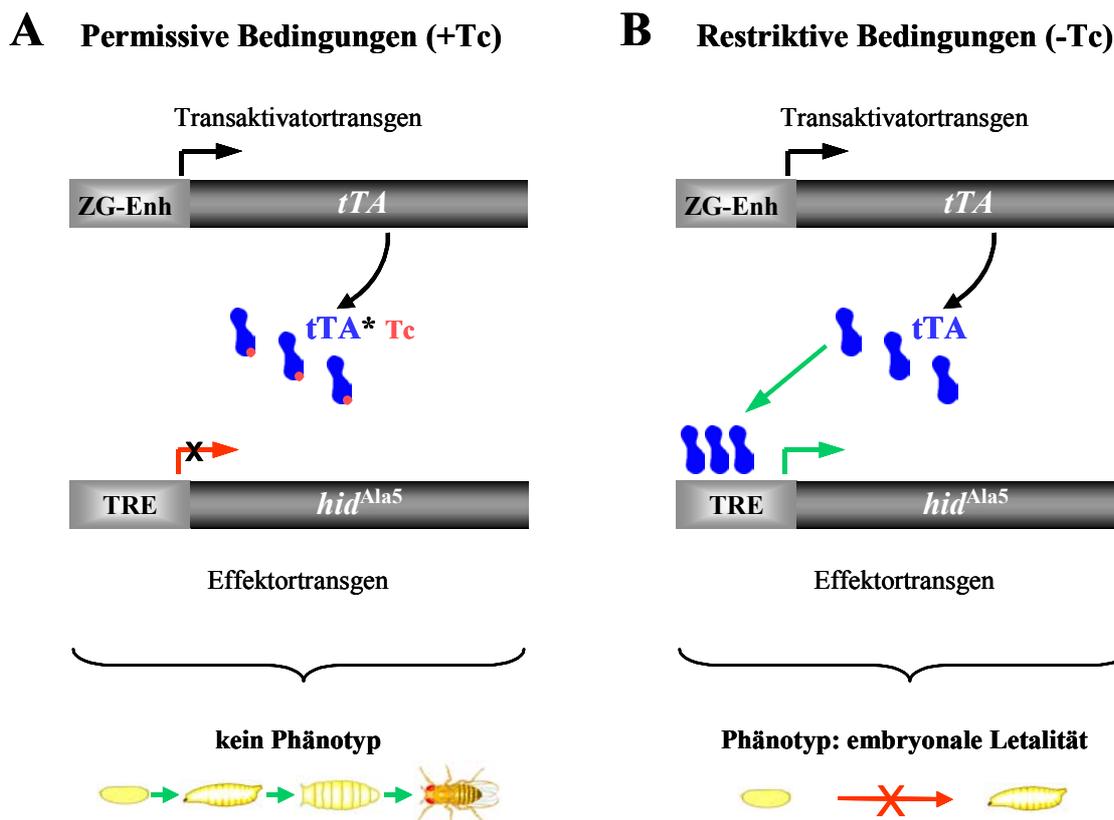
Die Verwendung von  $\gamma$ -Strahlen zur Sterilisierung reduziert die Kompetitivität von Schadinsekten und limitiert die Anwendungsmöglichkeiten des konventionellen SIT-Ansatzes (siehe Kap. 3.4.2). Eine Alternative zur physikalischen Sterilisierungsmethode basierend auf der Wirkung von Transgenen könnte diese Limitationen umgehen. Ein solches System transgenvermittelter Sterilisierung, welches auf dem Prinzip supprimierbarer embryonaler Letalität beruht, wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt.

### 5.2.1 Supprimierbare embryonale Letalität als Sterilisierungsmöglichkeit

Für viele Schadinsekten ist SIT am wirksamsten, wenn ausschließlich männliche Insekten freigesetzt werden (Robinson et al., 1999). Grundsätzlich sind verschiedene Szenarien der transgenvermittelten Sterilisierung vorstellbar: Zum einen könnte ein Effektorgen seine cytotoxische Wirkung in männlichen Gameten oder deren Vorläuferzellen entfalten. Dazu müßte es unter Kontrolle einer genregulatorischen Region mit spermien-spezifischer transkriptioneller Aktivität stehen. Die Weibchen vieler Insektenarten sind jedoch polyandrisch, so daß Spermien verschiedener Insektenmännchen um eine Oozyte konkurrieren. In polyandrischen Arten wären Männchen, welche keine oder nicht-funktionelle Gameten produzieren, vermutlich wenig kompetitiv und somit ineffizient zur Populationskontrolle.

Ein zweites Szenario verlagert daher die Sterilität auf postzygotische Entwicklungsstadien: Insekten produzieren hinsichtlich des Fertilisationsvorgangs funktionelle Gameten, sind aber dennoch steril, da der Embryo in seiner Entwicklung arretiert. Hierbei bezeichnet der Begriff der Sterilität den Verlust der Fortpflanzungsfähigkeit und bezieht sich *per definitionem* sowohl auf das weibliche als auch auf das männliche Geschlecht. Abortive Embryonalentwicklung liegt auch dem konventionellen SIT-Ansatz zugrunde:  $\gamma$ -Strahlen werden in einer Dosis appliziert, die in Gameten dominante Letalmutationen induziert, welche sich erst nach der Befruchtung manifestieren (Robinson, 2002). Hingegen resultiert der Entwicklungsarrest im transgenbasierten Ansatz aus der Expression eines paternal oder maternal vererbten dominant letal wirkenden Effektortransgens. Mit *hid*<sup>Ala5</sup> steht ein potentes cytotoxisches Allel für diese Aufgabe zur Verfügung (siehe Kap. 3.3.2). Um im Embryo Letalität zu erzeugen, müßte dieses Allel unter Kontrolle einer genregulatorischen Region mit zygotischer Aktivität stehen. Die Expression der Transgene sollte zudem auf frühe Entwicklungsphasen beschränkt sein und somit die Fitness insbesondere des adulten Insekts möglichst geringfügig beeinträchtigen. Ferner sollte die Transgenkombination im Embryo letal wirken, da in vielen Schadspezies Larven den Hauptteil des Schadens verursachen. Für diesen Zweck optimal wäre die regulatorische Region eines exklusiv und transient frühembryonal transkribierten Gens.

Zur Identifizierung einer adäquaten genregulatorischen Region bietet sich die Analyse singulärer Prozesse der frühen Embryonalentwicklung an, welche durch zygotisch exprimierte Gene gesteuert werden. Die Zellularisierung des Embryos markiert bei der superfiziellen Furchung, die für die meisten Insekten typisch ist, den Übergang zwischen synzytalem und zellulärem Blastodermstadium (Anderson, 1972). In *Drosophila melanogaster* kodieren die Zellularisierungsgene *serendipity alpha* (*sry*  $\alpha$ ) und *nullo* für strukturelle Komponenten des Mikrofilament-Netzwerkes (Ibnsouda et al., 1993; Postner & Wieschaus, 1994). Da Strukturproteine i.d.R. abundant sind, ist eine starke Aktivität des Genpromotors wahrscheinlich. Beide Gene werden zygotisch exprimiert und besitzen ein blastodermspezifisches Transkriptprofil, das nahezu ubiquitär im Embryo verteilt ist (Vincent et al., 1986; Rose & Wieschaus, 1992). Zur Reproduktion dieses blastodermspezifischen Transkriptionspulses sind 5' regulatorische Regionen dieser Gene, welche weniger als 500 bp umfassen, notwendig und hinreichend (Schweisguth et al., 1989; Ibnsouda et al., 1995; Hunter et al., 2002). Die *sry*  $\alpha$ - und *nullo*-Regulatorregionen erschienen daher als gute Kandidaten zur Konstruktion eines im Embryo wirkenden Letalitätssystems (Abb. 5.4).



**Abb. 5.4: Entwurf eines Systems suppressierbarer embryonaler Letalität zur Sterilisierung von Insekten.** A) Das Transaktivatorgen *tTA* wird unter Kontrolle von ausschließlich frühembryonal aktiven Zellularisierungsgen-(ZG)-Enhancersequenzen exprimiert. Unter permissiven Bedingungen, Tetracyclin-(Tc)-gabe, ist die Bindung des Transaktivatorproteins an das tTA-responsive Element (*TRE*) inhibiert. Da keine Expression des *hid*<sup>Ala5</sup>-Effektorgens stattfindet, sollte sich in den Entwicklungsphasen des Insekts (modellhaft gezeigt für die Taefliege) kein Phänotyp ausprägen. B) Bei Tc-Abwesenheit stimuliert tTA die Expression des *hid*<sup>Ala5</sup>-Gens. Während der Embryogenese akkumuliertes *HID*<sup>Ala5</sup>-Protein sollte aufgrund seiner Cytotoxizität einen embryonal letalen Phänotyp hervorrufen.

Da zumindest der *sry*  $\alpha$ -Promotor in Urkeimzellen (Polzellen) nicht aktiv ist (Ibnsouda et al., 1993), ist zudem eine Beeinflussung der Gametogenese durch Transgene unter Kontrolle dieses Promotors unwahrscheinlich. Wenn diese Regulatoren und das *hid*<sup>Ala5</sup>-Effektorgen in das Tet-System (siehe Kap. 3.3.4) eingebunden sind, sollte sich der Phänotyp nur unter restriktiven Bedingungen manifestieren: Die Abwesenheit von Tetracyclin (Tc) führte dann zur Letalität, während die Anwesenheit des Antibiotikums den Phänotyp supprimierte. Die nachfolgenden Abschnitte legen dar, daß sich dieser Konstruktionsentwurf im Modellorganismus *D. melanogaster* in die Realität umsetzen ließ.

## 5.2.2 Konstruktion eines transgenbasierten Systems für suppressierbare embryospezifische Letalität

### 5.2.2.1 Transaktivatorstrukturen für embryospezifische Genexpression

Eine Grundvoraussetzung für das skizzierte Sterilisierungssystem (Abb. 5.4) ist, daß *sry*  $\alpha$ - bzw. *nullo*-Transaktivator- und *hid*<sup>Ala5</sup>-Effektorlinien zwar separat stabil propagiert werden können, aber synthetisch letal sind. Fragmente der *sry*  $\alpha$ -5' genregulatorischen Region vermitteln unterschiedliche Expressionsstärke eines Reportergens. Der minimal zur blastodermspezifischen Expression hinreichende Bereich konnte auf -129 bis -43 (Nukleotidposition relativ zur Transkriptionsstartstelle) eingegrenzt werden (Ibnsouda et al., 1995). Innerhalb dieses *sry*  $\alpha$ -„Minimalenhancers“ wiederum weist ein Bereich von 33 bp hohe Übereinstimmung zur Nukleotidsequenz des *nullo*-Regulatorbereichs auf (Ibnsouda et al., 1993, Abb. 5.5).

	-126		-33
<i>sry</i> $\alpha$		GGATTCGCGAATTTT-CGCGGGTATGGCAATAA	... TATATAAA
		***** * * ***** * *****	
<i>nullo</i>	-132	GGATTTTATGAAGGTCGCGGGTAGCG-AATAA	... TATATA
			-31

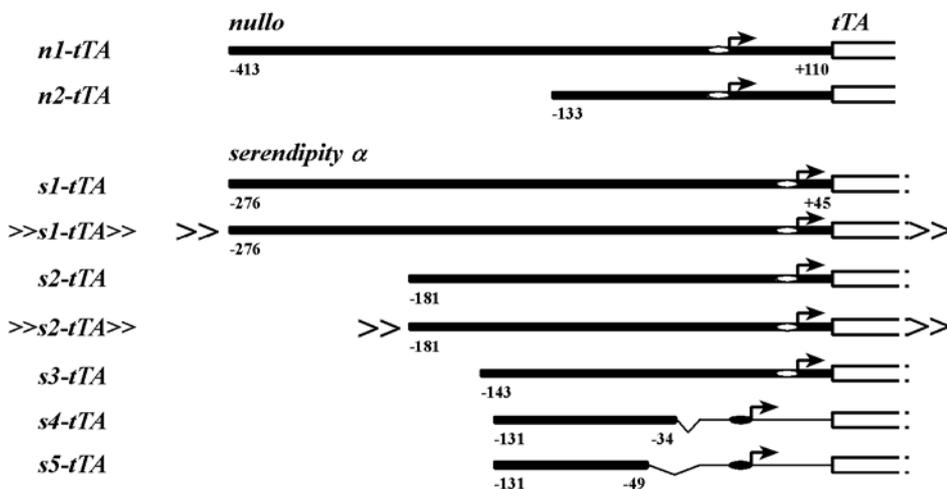
**Abb. 5.5: Sequenzähnlichkeiten innerhalb der *sry*  $\alpha$ - bzw. *nullo*-5' genregulatorischen Regionen.** Identische Nukleotidpositionen (\*) liegen in einem Bereich von weniger als 100 bp stromaufwärts der TATA-Box. Modifiziert nach Ibnsouda et al., 1993.

Da nicht bekannt war, welche Fragmente ausreichende tTA-Expression für die HID<sup>Ala5</sup>-induzierte Letalität vermitteln können, wurde eine Serie an Transaktivatorstrukturen hergestellt (Abb. 5.6; siehe Kap. 4.1.2.2.1.1). *nullo-tTA*-Transaktivatorstrukturen beinhalten Fusionen einer zur Komplementation des *nullo*-mutanten Phänotyps hinreichenden (Hunter et al., 2002) Regulatorregion (*n1-tTA*) sowie einer Verkürzung dieser Region unter Berücksichtigung zwischen *sry*  $\alpha$  und *nullo* konservierter Sequenzen (Abb. 5.5; *n2-tTA*). *sry*  $\alpha$ -*tTA*-Transaktivatorstrukturen umfassen Fusionen mit unterschiedlichen *sry*  $\alpha$ -Regulatorbereichen (Konstrukte *s1-tTA* bis *s5-tTA* in Abb. 5.6).

Das Expressionsprofil eines Transgens ist auch von der chromosomalen Umgebung der genomischen Integrationsstelle abhängig: Positionelle Effekte beeinflussen sowohl Expressionsstärke

als auch das Expressionsprofil. Im Hinblick auf das Ziel der embryospezifischen Letalität sollte das Expressionsprofil des Transaktivatorgens ausschließlich von den Zellularisierungsenhancern abhängig sein. Um Transgene gegenüber genomischer Enhanceraktivierung abzuschirmen, wurden *s1-tTA* und *s2-tTA* zusätzlich in einen 5'*HS4*-isolatorflankierten *piggyBac*-Transformationsvektor eingebettet (>>*s1-tTA*>> und >>*s2-tTA*>>). Mindestens drei unabhängige *Drosophila*-Linien konnten für jedes Transaktivatorkonstrukt etabliert werden.

## Transaktivatorkonstrukte



## Effektorkonstrukte



**Abb. 5.6: Nomenklatur und Aufbau der Transaktivator- und Effektorkonstrukte.**

Transaktivatorkonstrukte tragen Fusionen von *sry α*- und *nullo*-Regulatorbereichen am ATG Startkodon des *tTA*-ORF, mit Ausnahme von *s4-tTA* und *s5-tTA*, welche Fusionen eines *sry α*-Enhancers mit dem *hsp70*-Basalpromotor und dem *tTA*-ORF beinhalten. Die Nukleotidpositionen relativ zur transkriptionellen Initiationsstelle sind angegeben. „>>“ bezeichnet eine Tandemwiederholung der Sequenz des 5'*HS4*-Isolatorelements. Effektorkonstrukte tragen Fusionen des tTA-responsiven Elements (*TRE*; entspricht heptamerisierter Tet-Operatorsequenz) mit dem *P*-Transposase-Basalpromotor und dem *hid<sup>Ala5</sup>*-ORF.

### 5.2.2.2 Effektorkonstrukte mit *hid<sup>Ala5</sup>*

Die Toxizität von *HID<sup>Ala5</sup>* ist beschrieben (Bergmann et al., 1998). Daher ist es äußerst bedeutsam, daß der Basalpromotor eines *hid<sup>Ala5</sup>*-Effektorkonstruktes stumm ist. Um ein im nicht induzierten Zustand stummes Effektortransgen zu generieren, wurde die *TRE*-Sequenz an verschiedene Basalpromotoren fusioniert, die den *Drosophila*-Genen *hsp70*, *P* und dem humanen Cytomegalovirus (*hCMV*) entstammen (siehe Kap. 4.1.2.2.2). Nach Keimbahntransformation wurden Transgeninsertionen nur mit Effektorkonstrukten erhalten, die den *P*-Basalpromotor tragen (eine

einzigste Transgeninsertion von *TREhs43-hid<sup>Ala5</sup>* erwies sich im späteren Verlauf als nicht funktional). Daß Injektionsexperimente mit *hsp70*- und *hCMV*-tragenden Effektorstrukturen wiederholt keine transgenen Taufliegen hervorbrachten, weist auf die Toxizität der injizierten Konstrukte hin. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür ist nicht tolerierbare Basalaktivität der *hsp70*- und *hCMV*-Promotoren.

Analog zu den *s1-tTA* und *s2-tTA* Konstrukten wurde eine Version des *TREp-hid<sup>Ala5</sup>*-Konstruktes in einen 5'*HS4*-isolatorflankierten *piggyBac*-Transformationsvektor eingebettet (Abb. 5.6). Mit *TREp-hid<sup>Ala5</sup>* wurden drei, mit  $\gg$ *TREp-hid<sup>Ala5</sup>* $\gg$  sechs unabhängige *Drosophila*-Linien etabliert, von denen drei (*TREp-hid<sup>Ala5</sup>*) bzw. zwei ( $\gg$ *TREp-hid<sup>Ala5</sup>* $\gg$ ) das Effektortransgen im homozygoten Zustand tragen können.

### 5.2.2.3 Die Kombination aus Transaktivator- und Effektorlinien vermittelt Sterilität

Zur leichten Unterscheidbarkeit wurden Transaktivatorlinien generell mit dem Transformationsmarker *3xP3-EYFP* und Effektorlinien generell mit *3xP3-ECFP* markiert. Um zu untersuchen, ob die Kombination aus Transaktivator- und Effektorlinien synthetische Letalität erzeugen kann, wurden für jeden Transaktivatorkonstrukttyp drei unabhängige Transgeninsertionen gegen die Effektorlinie  $\gg$ *TREp-hid<sup>Ala5</sup>* $\gg$  M1.II gekreuzt. Der Genotyp der Nachkommenschaft ist aufgrund des diskriminierbaren ECFP- und EYFP-Augenfluoreszenzphänotyps (siehe Abb. 5.2) eindeutig bestimmbar. Die Ergebnisse der Tab. 5.1 zeigen, daß Nachkommen mit ECFP- und EYFP-Doppelfluoreszenz durchgehend bei Kreuzungen fehlten, sofern die Transaktivatorkonstrukte *n1-tTA*, *s1-tTA*,  $\gg$ *s1-tTA* $\gg$ , *s2-tTA*,  $\gg$ *s2-tTA* $\gg$  und *s3-tTA* vererbt wurden. Kreuzungen unabhängiger Transaktivatorinsertionen des Typs  $\gg$ *s1-tTA* $\gg$  und *n1-tTA* gegen fünf weitere isolatorflankierte

Transaktivator	-Tc		+Tc	
	n	ECFP <sup>+</sup> /EYFP <sup>+</sup> - Nachkommen	n	ECFP <sup>+</sup> /EYFP <sup>+</sup> - Nachkommen
<i>n1-tTA</i>	94	0	184	47
<i>n2-tTA</i>	139	23	195	36
<i>s1-tTA</i>	65	0	72	19
$\gg$ <i>s1-tTA</i> $\gg$	144	0	123	26
<i>s2-tTA</i>	117	0	59	17
$\gg$ <i>s2-tTA</i> $\gg$	98	0	165	43
<i>s3-tTA</i>	102	0	171	33
<i>s4-tTA</i>	194	31	106	20
<i>s5-tTA</i>	186	45	107	21

**Tab. 5.1: Synthetische Letalität von Transaktivator- und Effektortransgenen.**

Die Werte bezeichnen die Nachkommenschaftszahl (n) und die Zahl ECFP- und EYFP-positiver Nachkommen aus der Kreuzung dreier unabhängiger Insertionen eines Transaktivatorkonstrukttyps gegen die Effektorlinie  $\gg$ *TREp-hid<sup>Ala5</sup>* $\gg$  M1.II sowohl auf Tc-freiem (-Tc) als auch auf Tc-haltigem (+Tc) Medium. Bei den Kreuzungen wurden bzgl. der jeweiligen Transgeninsertion heterozygote Eltern eingesetzt.

sowie gegen drei nicht isolierte Effektorlinien bestätigten das Fehlen ECFP/EYFP-fluoreszierender Nachkommen (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen dieses Phänotyps indiziert synthetische Letalität beider funktioneller Komponenten.

Um zu untersuchen, ob der tTA-Inhibitor Tc den letalen Phänotyp supprimieren kann, wurden Transaktivator/Effektor-Kreuzungen auf Tc-haltigem (100 µg/ml) Medium inkubiert. Unter der Nachkommenschaft traten nun ECFP/EYFP-fluoreszierende Fliegen in einem mendelschen Verhältnis auf (Erwartung: Streuung um 25% bei Kreuzung heterozygoter Elternfliegen). Somit kann die Suppression des synthetisch letalen Phänotyps durch Tetracyclin konstatiert werden.

### 5.2.3 Etablierung homozygoter, supprimierbar embryonal letaler *Drosophila*-Stämme

In einer SIT-Anwendung müssen alle Nachkommen aus Paarungsereignissen transgener und wildtypischer Insekten sowohl das Transaktivator- als auch das Effektortransgen erben, da einzelne Komponenten wirkungslos sind. Dieser Vererbungsmodus erfordert einen SIT-Stamm, der beide Transgene im homozygoten Zustand trägt.

Der nächste Schritt bestand folglich darin, bzgl. beider Konstrukte homozygote Linien herzustellen und diese hinsichtlich ihrer Sterilität zu charakterisieren. Dazu wurden unabhängige Insertionen sowohl isolierter als auch nicht isolierter Transaktivator- und Effektorlinien über Kreuzung und zum Teil durch Rekombination auf Tc-haltigem (100 µg/ml) Medium kombiniert. Aus insgesamt 48 dieser Kombinationen konnten in zehn Fällen Stämme konstruiert werden, die sowohl das Transaktivator- als auch das Effektortransgen im homozygoten Zustand tragen (Tab. 5.2).

<i>tTA</i>	<i>TREp-hid<sup>Ala5</sup></i>	FI #	Nachkommen	
			homozygot	heterozygot
Konstrukt, Linie	Linie			
<i>n1-tTA</i> , M4.II	>>F1.II>>	45	-	-
>> <i>s1-tTA</i> >>, M3.II	M3.III	29	-	-
>> <i>s1-tTA</i> >>, M3.II	>>F1.II>>	43	-	-
>> <i>s2-tTA</i> >>, M7.III	>>F1.II>>	13	-	-
>> <i>s2-tTA</i> >>, M5.II	>>M5.II>>	41	-	-
>> <i>s2-tTA</i> >>, M8.II	>>M5.II>>	42	-	-
>> <i>s2-tTA</i> >>, M7.III	M2.II	20	-	+
>> <i>s2-tTA</i> >>, M6.III	M3.III	46	-	+
>> <i>s2-tTA</i> >>, M7.III	M3.III	47	-	+
<i>s2-tTA</i> , M3.II	M3.III	31	-	+

**Tab. 5.2: Charakterisierung homozygoter, embryonal letaler (EL) Stämme hinsichtlich Sterilität.**

Zehn EL-Stämme, die sowohl das Transaktivator- als auch das Effektortransgen im homozygoten Zustand tragen, wurden daraufhin analysiert, ob in der Nachkommenschaft die Transgenkombination im homozygoten bzw. im heterozygoten Zustand letal wirkt. -: keine Nachkommen, +: Nachkommen (siehe auch Kap. 4.2.1.2).

Um zu untersuchen, ob diese zehn EL-(embryonal letalen)-Stämme bei Tc-Abwesenheit steril sind, wurden Fliegen dieser Stämme auf Tc-freies Medium transferiert. Nach einer Präinkubationszeit von vier Tagen konnten in einem sich anschließenden 20-tägigem Ablagezeitraum für keinen der zehn EL-Stämme Nachkommen im pupalen oder adulten Stadium nachgewiesen werden (Spalte 4 in Tab. 5.2).

In einem SIT-Stamm sollte darüber hinaus bereits eine Kopie beider Transgene einen letalen Phänotyp erzeugen. Zur Untersuchung dominanter Letalität wurden EL-Männchen vereinzelt in 20 unabhängigen Ansätzen gegen wildtypische Jungfrauen gekreuzt, so daß nur eine Kopie sowohl des Transaktivator- als auch des Effektortransgens an die Nachkommenschaft vererbt wird. Nach einer 20-tägigen Inkubationszeit auf Tc-freiem Medium produzierten Männchen aus vier der zehn EL-Stämme larvale, pupale oder adulte Nachkommen (Spalte 5 in Tab. 5.2). Adulte Nachkommen zeigten überdies ECFP/EYFP-Doppelfluoreszenz im Auge. Alle vier dieser EL-Stämme tragen die nicht-isolierte Version des Effektortransgens sowie das kürzere *s2-tTA*-Transgen. Offenbar produzieren untersuchte nicht-isolierte *hid<sup>Ala5</sup>*-Linien in Kombination mit schwächer *tTA*-exprimierenden *s2-tTA*-Linien keine zur dominanten Letalität hinreichende Menge des Apoptoseinduktors *HID<sup>Ala5</sup>*.

Sechs EL-Kombinationen hingegen zeigten dominante Sterilität. Dies demonstriert, daß Letalität in Nachkommen resultieren kann, wenn bereits eine Kopie der Transaktivator- und Effektortransgene an die Nachkommen vererbt wird. Damit ist ein wesentliches Kriterium für einen SIT-Stamm erfüllt.

#### **5.2.4 Charakterisierung homozygoter, supprimierbar embryonal letaler *Drosophila*-Stämme hinsichtlich tTA-Inhibitorbedarf**

EL-Stämme wurden hinsichtlich der minimal zum Überleben notwendigen Tc-Futterkonzentration charakterisiert (Tab. 5.3). Dazu wurde eine vier Größenordnungen umspannende Konzentrationsreihe an Tc-haltigen Medien als Nahrungsquelle verwendet (0,1; 1; 3; 10; 100; 1000 µg/ml). Die zur Suppression des letalen Phänotyps notwendige Tc-Konzentration variierte in den Kombinationen in einem Bereich von 3 bis 100 µg/ml. Kombinationen, die das *s1-tTA*- oder das *n1-tTA*-Transaktivatortransgen tragen, benötigten höhere (>30 µg/ml) Tc-Konzentrationen. Hingegen konnten zwei der dominant letalen EL-Stämme mit *s2-tTA*, EL#41 und EL#42, reproduzierbar und über mehrere Generationen hinweg auf Medium mit 3 µg/ml Tc propagiert werden.

Aus der Konstruktionsweise des hier vorgestellten Sterilisierungssystems ergibt sich die Möglichkeit der Kompatibilität zu transgenbasierten Systemen weiblich-spezifischer Letalität (Heinrich & Scott, 2000; Thomas et al., 2000; siehe Kap. 3.4.1). Die Kombination setzt allerdings voraus, daß beide Systeme zeitlich voneinander getrennt wirken. Da weiblich-spezifische Letalität im späten larvalen oder im pupalen Entwicklungsstadium eintritt (Heinrich & Scott, 2000), sollte Tc, das zur Suppression der embryonalen Letalität benötigt wird, in Larven weitestmöglich entfernt sein. Um eine Eiablage auf Tc-freiem Medium zur Zucht der (sterilen) Insektenmännchen und Abtötung der

Insektenweibchen verwenden zu können, sollte bereits parental verfüttertes Tc in möglichst niedriger Konzentration zur Suppression embryonaler Letalität ausreichen.

Bereits veröffentlichte Daten weisen darauf hin, daß zur Suppression eines tTA-induzierten embryonalen Phänotyps relativ hohe Konzentrationen an parental verfüttertem Tc benötigt werden (100-1000 µg/ml, Bello et al., 1998). Hingegen kann weiblich-spezifische Letalität durch Tc-Mediumkonzentrationen supprimiert werden, die um Größenordnungen niedriger sind (10 µg/ml (Heinrich & Scott, 2000) bzw. 0,1 µg/ml (Thomas et al., 2000)).

Um zu untersuchen, ob alleine den Elternfliegen verfüttertes Tc hinreichend zur Suppression der Letalität sein kann, wurden Elternfliegen, die mit einer bestimmten Tc-Konzentration gefüttert worden waren (0,1-1000 µg/ml), auf Tc-freies Futter überführt. Die minimal zur Suppression der Sterilität im parentalen Futter nötige Tc-Konzentration wurde ermittelt (+Tc → -Tc in Tab. 5.3). Für alle analysierten EL-Stämme liegen diese Werte maximal eine Größenordnung über den zur stabilen Propagierung benötigten Tc-Konzentrationen. Larvale Tc-Aufnahme ist demnach nicht essentiell, wobei die Daten nicht ausschließen, daß Restaktivität des parental im Embryo deponierten Tc auch in postembryonalen Stadien zur Inhibition des Transaktivators benötigt wird.

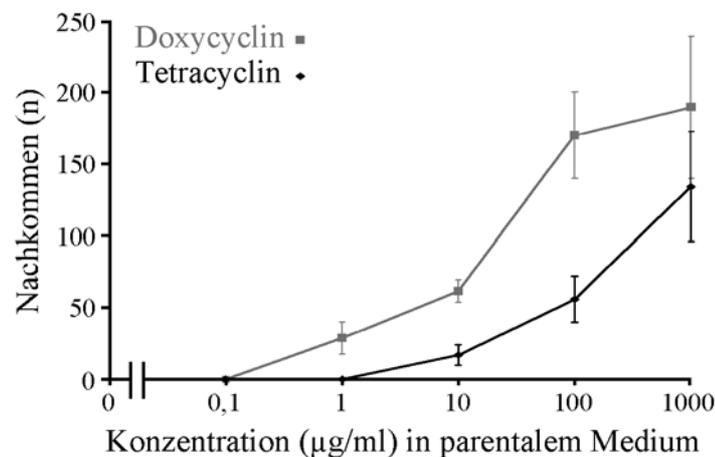
EL#	Suppression der Sterilität	
	+Tc (µg/ml)	+Tc → -Tc (µg/ml)
45	100	100
29	100	100
43	100	100
13	10	30-100
41	3	10-30
<b>42</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
20	100	100
46	1-3	3-10
47	3	10
31	3	30

**Tab. 5.3: Charakterisierung homozygoter EL-Stämme hinsichtlich Suppression der Sterilität.** Die minimal erforderliche Tc-Konzentrationen zur Suppression der Sterilität bei kontinuierlicher Inkubation des EL-Stammes auf Tc-haltigem Medium (+Tc) oder nach Transfer des EL-Stammes von Tc-haltigem auf Tc-freies Medium (+Tc → -Tc) sind angegeben (siehe Kap. 4.2.1.2). Die in den folgenden Experimenten genauer charakterisierte Kombination EL#42 ist fettgedruckt.

Der Stamm EL#42 produzierte Nachkommen oberhalb von mindestens 10 µg/ml an parental verfüttertem Tc. Da sich dieser Stamm somit möglicherweise zur Kombination mit weiblich-spezifisch letalen Transaktivatorstämmen eignet, wurde die Suppression der EL#42-Sterilität durch verschiedene tTA-Inhibitorsubstanzen eingehender analysiert. Das hervorragend membrangängige Tetracyclin-Analogon Doxycyclin (Dox) bindet mit hoher Affinität an den Tet-Repressor (Degenkolb et al., 1991) und wird daher standardmäßig zur Kontrolle von Transaktivatoren des Tet-Systems eingesetzt (Baron & Bujard, 2000). Zu den Effektorsubstanzen mit gegenüber *E. coli* nur geringfügiger antibiotischer

Aktivität aber dennoch hoher Tet-Repressor-Affinität zählt Anhydrotetracyclin (ATc; Degenkolb et al., 1991; Gossen & Bujard, 1993).

Die beiden Effektorsubstanzen Tc und Dox wurden dem EL#42-Stamm in verschiedenen Konzentrationen angeboten und behandelte Fliegen anschließend auf inhibitorfreies Medium transferiert und hinsichtlich ihrer Nachkommenzahl analysiert (Abb. 5.7). Dabei zeigte sich, daß bereits 1 µg/ml an Dox-Fütterung EL#42-Weibchen Nachkommen auf Normalmedium produzieren ließ. Insgesamt ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von Dox gegenüber der von Tc um etwa eine Größenordnung nach unten verschoben. Dies weist auf eine höhere Wirksamkeit von Dox im Vergleich zu Tc hin. Mit ATc konnte dieser Versuch nicht durchgeführt werden, denn auf ATc-haltigem Futter entstanden unterhalb von 1000 µg/ml keine und bei 1000 µg/ml nur vereinzelt Nachkommen.



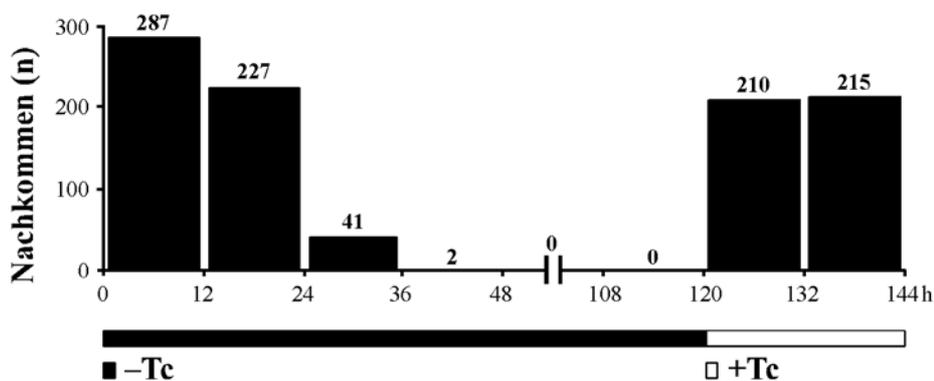
**Abb. 5.7: Suppression der EL#42-Sterilität durch die parental verfütterten tTA-Inhibitoren Dox und Tc.** Die Dosis-Wirkungs-Kurven (Zahl auf inhibitorfreiem Medium produzierter Nachkommen in Abhängigkeit von der parental verfütterten InhibitorKonzentration) für Doxycyclin (grau) und Tetracyclin (schwarz) sind gezeigt (siehe Kap. 4.2.1.2).

### 5.2.5 Reversibilität und Zeitabhängigkeit supprimierbarer Letalität

Eine SIT-Anwendungskampagne erfordert die kontinuierliche Herstellung steriler Insekten im großen Maßstab. Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Abb. 5.7 zeigen jedoch, daß selbst bei Verwendung von Dox eine Sättigung der auf Dox-freiem Futter entstandenen Nachkommenzahl erst im Konzentrationsbereich von 100 - 1000 µg/ml Dox eintritt. Eine plausible Erklärung dafür ist, daß nach Entzug des Inhibitors bei kontinuierlicher Produktion und Fertilisierung von Oocyten die Menge maternal im Embryo deponierten Inhibitors rasch unter den Schwellenwert sinkt, der zur Suppression der embryonalen Letalität notwendig ist. In diesem Abschnitt wird der Fragestellung nachgegangen, ob mit EL#42 dennoch eine kontinuierliche Produktion vitaler Embryonen auf inhibitorfreiem Futter möglich ist.

Der zeitliche Verlauf des Eintritts der Sterilisierung wurde untersucht, indem EL#42-Fliegen zunächst mit 100 µg/ml Tc gefüttert wurden und anschließend in sukzessiven 12 h Intervallen

Eiablagen auf Tc-freiem Medium ausführten (Abb. 5.8). Eine deutliche Abnahme der Nachkommenzahl wurde bereits im dritten Intervall beobachtet (24-36 h nach Tc-Entzug; Abb. 5.8). Folgten mehr als 48 h auf die Tc-Inkubation, dann brachten EL#42-Fliegen keine lebensfähigen Nachkommen mehr hervor. Der Sterilitätsphänotyp ließ sich interessanterweise revertieren, indem erneut Tc-haltige Nahrung angeboten wurde. Auch in der F<sub>1</sub>-Generation ist die Sterilität wieder revertierbar: Auf Tc-freiem Futter erhaltene adulte Nachkommen erlangten ihre Fertilität wieder, wenn sie mit Tc inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Die Reversibilität der Sterilität demonstriert, daß die EL#42-Transgenkombination im adulten *Drosophila*-Männchen oder Weibchen keine irreversiblen Schäden der Gametogenese hervorruft, wenn Tetracyclin entzogen wird.

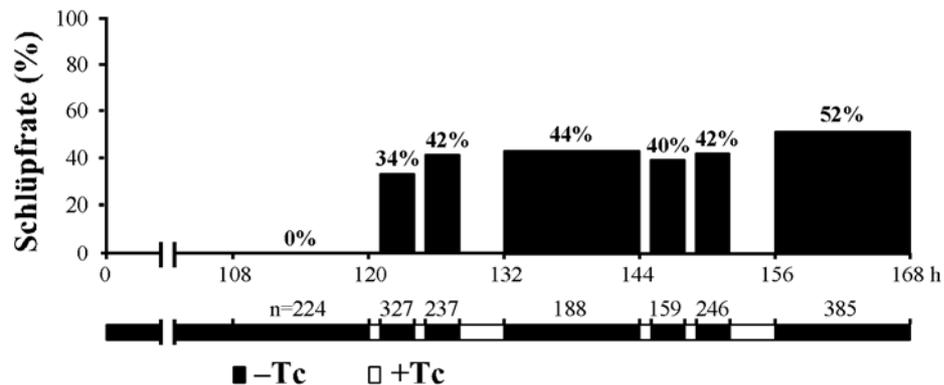


**Abb. 5.8: Reversibilität der EL#42-Sterilität.**

Fliegen des Stammes EL#42 wurden von Tc-haltigem (100 µg/ml) auf Tc-freies Futter (-Tc; schwarz gefüllter Balken) transferiert. Nach 120 h wurde Tc-haltige (100 µg/ml) Hefesuspension dem Medium zugefügt (+Tc; offener Balken). Die absolute Zahl adulter Nachkommen, welche aus sukzessiven 12 h Eiablagen entstanden, ist oberhalb der Balken angegeben (siehe Kap. 4.2.1.3).

In Abb. 5.8 dokumentierte Daten zur Reversibilität schließen jedoch die Möglichkeit nicht aus, daß der niedermolekulare Inhibitor Tc per Diffusion aus dem Medium in den Embryo gelangt und bei entsprechend hoher Konzentration im Medium den Transaktivator intraembryonal inaktiviert. Um zu untersuchen, ob alleine die maternal im Embryo deponierte Tc-Menge hinreichend ist zur Reversion manifestierter Sterilität, wurden Tc-Quelle und Eiablagefläche zeitlich getrennt. Nachdem EL#42-Fliegen über Tc-Entzug sterilisiert worden waren, wurde ihnen für 1 h Tc-haltiges Hefefutter (100 µg/ml) angeboten. In einem sich anschließenden 3 h Zeitintervall abgelegte Eier wurden auf das Schlüpfen von Larven hin untersucht. Etwa ein Drittel der Embryonen entwickelte sich zu Larven (Abb. 5.9). Durch Wiederholung der Tc-Fütterung/Eiablage-Alternierung konnte eine Schlüpfrate von 40-50% reproduzierbar erreicht werden. Auch bei räumlicher Trennung der Tc-Quelle (100 µg Tc/ml Hefesuspension) von der Tc-freien Eiablagefläche produzierten zuvor sterilisierte EL#42-Fliegen wieder adulte Nachkommen (Daten nicht gezeigt). Dies demonstriert, daß physikalischer Kontakt des Embryos zu Tc-haltigem Medium zur Reversion der Letalität nicht notwendig ist.

Die Rahmenbedingungen zur kontinuierlichen Herstellung steriler Insekten auf inhibitorfreiem Medium sind daher gegeben: Zeitliche oder räumliche Separation von Tc-Quelle und Eiablagemedium ermöglichen die kontinuierliche parentale Suppression transgenvermittelter embryonaler Letalität im Stamm EL#42.



**Abb. 5.9: Reversibilität der EL#42-Sterilität nach zeitlicher Trennung von Tc und Eiablagefläche.**

EL#42-Fliegen wurden durch 5-tägige Inkubation auf Tc-freiem Medium (-Tc, schwarz gefüllter Balken) sterilisiert. Die Sterilität wurde für das Zeitintervall 108-120 h bestätigt (aus 224 abgelegten Eiern schlüpften keine Larven). Danach wurde das im Balken unter dem Diagramm dargestellte Fütterungsschema (schwarz ausgefüllt: Tc-freies Medium; nicht ausgefüllt: Tc-haltige Hefesuspension) angewendet und für Tc-freie Perioden die larvale Schlüpftrate ermittelt (siehe Kap. 4.2.1.3).

## 5.2.6 Charakterisierung supprimierbar embryonal letaler *Drosophila*-Männchen

Die bislang dargestellten Ergebnisse bezogen sich auf die Charakterisierung supprimierbar letaler *Drosophila*-Stämme. In diesem Abschnitt werden die Eigenschaften von EL#42-Männchen im Detail beschrieben. Von Interesse sind dabei insbesondere die Fragen, ob transgenvermittelte Letalität strikt embryospezifisch ist und ob EL#42-Männchen im Vergleich zu nicht transgenen *Drosophila*-Männchen kompetitiv sind.

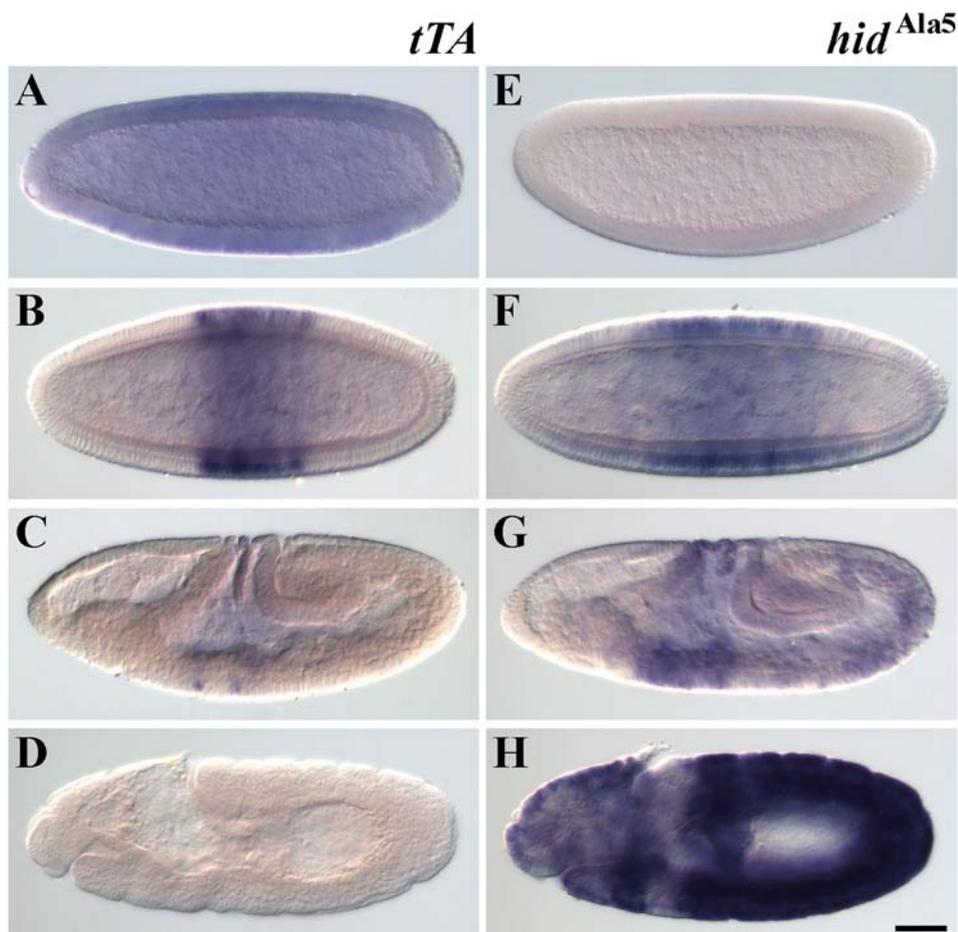
### 5.2.6.1 Untersuchungen zum Mechanismus transgenvermittelter Letalität

#### 5.2.6.1.1 Visualisierung der EL#42-Transgenexpression in Embryonen

Insektenspezies, welche im Larvenstadium wirtschaftlichen Schaden verursachen, können durch bestrahlte Artgenossen wirksam kontrolliert werden, sofern diese das Schlüpfen der Larven effektiv verhindern. Für ein transgenbasiertes SIT-System resultiert daraus die Bedingung dominanter embryospezifischer Letalität der Transgenkombination. Daß EL#42-Transgene im homozygoten Zustand zu embryospezifischer Letalität führen, zeigte bereits die Untersuchung der larvalen Schlüpftrate (Abb. 5.9): Im Zeitintervall 108-120 h nach Tc-Entzug schlüpften aus 224 Embryonen keine Larven. Im folgenden werden Embryonen analysiert, welche aus der Kreuzung von EL#42-Männchen gegen wildtypische Weibchen entstanden und infolgedessen nur eine Kopie beider Transgene tragen.

Die Stadien- und Gewebsverteilung im Embryo akkumulierter *tTA*- und *hid<sup>Ala5</sup>*-Transkripte wurde mittels RNA-*in-situ*-Hybridisierung visualisiert (Abb. 5.10). Eine zur *tTA*-mRNA

komplementäre Sonde hybridisierte uniform verteilt im embryonalen Blastodermstadium (Abb. 5.10A). Nach Beginn der Zellularisierung war *tTA* Expression an den Polen nicht mehr nachweisbar und zeigte im Verlauf der Zellularisierung ein Muster aus vier schmalbandigen Streifen (Abb. 5.10B). Spuren an *tTA* mRNA konnten bis in das Gastrulationsstadium nachgewiesen werden (Abb. 5.10C). Embryonen in späteren Stadien, z.B. im Stadium der vollständigen Keimstreifenausstreckung (Abb. 5.10D), zeigten keinerlei Hybridisierungssignal. Die Expression des *tTA*-Gens unter *sry*  $\alpha$ -Kontrolle ist also weitgehend auf das Blastodermstadium beschränkt. Das blastodermstadiumspezifische Expressionsprofil wurde auch in Embryonen des homozygoten Stammes EL#42, der homozygoten Transaktivatorlinie  $\gg s2-tTA \gg$  M8.II, sowie in drei weiteren unabhängigen homozygoten  $\gg s2-tTA \gg$ -Linien (M5.II, M6.III, M7.III) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Diese Transaktivatorlinien sind Bestandteil von sechs der zehn EL-Stämme (Tab. 5.2). Diese Daten zeigen, daß die verwendete *sry*  $\alpha$ -Regulatorregion die Blastodermstadiumspezifität reproduziert, welche für die Transkription des *Drosophila*-endogenen *sry*  $\alpha$ -Gens dokumentiert ist (Ibnsouda et al., 1993).



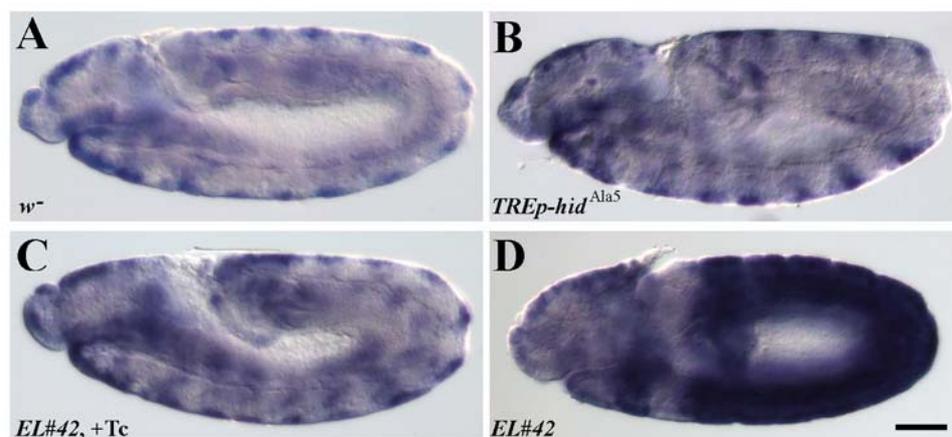
**Abb. 5.10: Nachweis der *tTA* und *hid*<sup>Ala5</sup>-Transkripte in heterozygoten EL#42-Embryonen.**

Alle Embryonen entstammen der Kreuzung von EL#42-Männchen und wildtypischen Jungfrauen. Gezeigt sind in A-D *tTA*- und in E-H *hid*<sup>Ala5</sup>-Transkriptprofile in folgenden embryonalen Entwicklungsstadien: Frühes (A,E) und spätes (B,F) Blastodermstadium, Gastrulationsstadium (C,G) und Stadium der Keimstreifenausstreckung (D,H). Die dorsale Seite der Embryonen ist oben, die anteriore links. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

Mittels einer zur *hid*<sup>Ala5</sup>-mRNA komplementären Sonde wurde das Expressionsprofil des Effektortransgens visualisiert. Embryonen im Blastodermstadium zeigten kein Hybridisierungssignal (Abb. 5.10E) und der früheste Nachweis des *hid*<sup>Ala5</sup>-Transkriptes erfolgte zu Beginn der Gastrulation (Abb. 5.10F). Das erste Auftreten der *hid*<sup>Ala5</sup>-mRNA ist somit gegenüber dem frühesten Nachweis der *tTA*-mRNA (Abb. 5.10A) um ungefähr eine Stunde verzögert (*Drosophila*-Embryogenese bei 25°C). Das in frühen Stadien der Keimstreifausstreckung schwache Hybridisierungssignal (Abb. 5.10G) intensivierte sich im Verlauf dieses Prozesses und erreichte maximale Ausprägung in Embryonen mit vollständig ausgestrecktem Keimstreif (Abb. 5.10H). Im Vergleich zu dem kurzzeitigen (< 1,5 h) transienten *tTA*-Transkriptionspuls akkumulierte *hid*<sup>Ala5</sup>-mRNA über einen längeren Entwicklungszeitraum, was möglicherweise auf die Stabilität des Transaktivators tTA zurückgeht.

#### 5.2.6.1.2 Kontrollen zur *hid*<sup>Ala5</sup>-Transgenexpression

Im Stamm EL#42 sind sowohl das Transaktivatortransgen (>>*s2-tTA*>> M8.II) als auch das Effektortransgen (>>*TREp-hid*<sup>Ala5</sup>>> M5.II) von Isolatorsequenzen flankiert. Wenn diese Isolatoren die Transgeninsertionsloci von der Wirkung *cis*-aktivierender genomischer Enhancersequenzen abschirmen, dann sollte die *hid*<sup>Ala5</sup>-Expression nur von tTA abhängig sein. Da tTA durch Tc inhibierbar ist, sollte die *hid*<sup>Ala5</sup>-Expression zudem durch Tc-Gabe suppressierbar sein. Um zu untersuchen, ob die *hid*<sup>Ala5</sup>-Expression tatsächlich von tTA abhängig ist, wurde versucht, das *hid*<sup>Ala5</sup>-Transkript in der Effektorlinie zu visualisieren, die bzgl. >>*TREp-hid*<sup>Ala5</sup>>> M5.II homozygot ist. Da die zur *hid*<sup>Ala5</sup>-mRNA komplementäre Sonde auch mit endogener *hid* mRNA hybridisieren kann, wurde das Hybridisierungsmuster mit einer nicht transgenen Linie verglichen (vergleiche Abb. 5.11A und 5.11B). Zudem wurde das Muster in Embryonen, die von Tc-gefütterten (100 µg/ml) EL#42-Elternfliegen stammen, mit dem Muster in Embryonen verglichen, die aus der Kreuzung von normal gefütterten EL#42-Vätern und wildtypischen Jungfrauen stammen (vergleiche Abb. 5.11C und 5.11D).



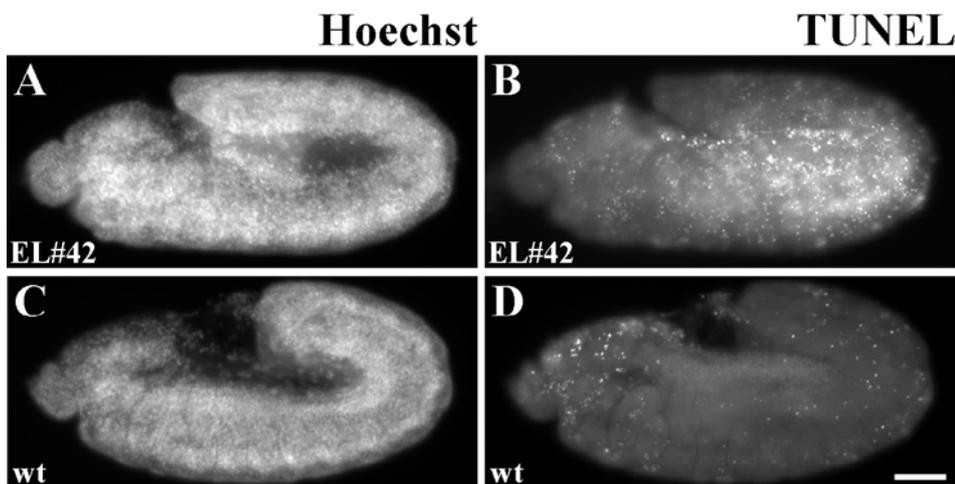
**Abb. 5.11: *hid*-Expression in der separaten Effektorlinie und im Tc-supprimierten EL#42-Stamm.**

Gezeigt ist das *in situ* Hybridisierungsmuster der zur *hid*<sup>Ala5</sup>-mRNA-komplementären Sonde im Stadium der Keimstreifausstreckung in folgenden Embryonen: *white* (A), >>*TREp-hid*<sup>Ala5</sup>>> M5.II (B) und EL#42 (Eltern gefütterte mit Tc; C). Zur besseren Vergleichbarkeit ist das *hid*<sup>Ala5</sup>-Hybridisierungsmuster im Embryo der Kreuzung von EL#42-Männchen gegen normal gefütterte, wildtypische Jungfrauen nochmals gezeigt (D). Die dorsale Seite der Embryonen ist oben, die anteriore links. Der Maßstabsbalken entspricht 50 µm.

Die Hybridisierungsmuster der nicht transgenen Linie, der Effektorlinie und des Tc-gefütterten EL#42-Stammes zeigten im Stadium der Keimstreifausstreckung das Expressionsmuster, das für endogenes *hid* beschrieben ist (Grether et al., 1995). Aufgrund der Komplexität dieses Musters wären geringfügige Abweichungen jedoch nicht erkannt worden. Ferner zeigt das Ergebnis zum Tc-gefütterten EL#42-Stamm, daß durch Tc-Gabe das *hid*<sup>Ala5</sup>-Hybridisierungssignal supprimiert werden kann (man beachte, daß der Embryo in Abb. 5.11C zwei Kopien, der in Abb. 5.11D aber nur eine Kopie der Transaktivator- und Effektortransgene trägt). Die Übereinstimmung ist ein starkes Indiz für die tTA-Abhängigkeit der *hid*<sup>Ala5</sup>-Expression im Stamm EL#42.

#### 5.2.6.1.3 Phänotypische Konsequenzen der EL#42-Transgenexpression in Embryonen

Die dokumentierten *tTA* und *hid*<sup>Ala5</sup>-Transkriptmuster sind konsistent mit dem Konstruktionsziel, einen transienten frühembryonalen Puls an Transaktivatorexpression in eine starke Expression des proapoptotischen Allels zu übersetzen. Worin äußern sich die phänotypischen Konsequenzen der *HID*<sup>Ala5</sup>-Produktion? In heterozygoten EL#42-Embryonen manifestierten sich ab dem Stadium der Keimstreifverkürzung morphologische Defekte (Abb. 5.12A) und die Keimstreifverkürzung scheint verzögert zu sein (vergleiche die gleichaltrigen EL#42- und Wildtyp-Embryonen der Abb. 5.12A und Abb. 5.12C). Eine stadienspezifische Zuordnung älterer EL#42-Embryonen konnte aufgrund massiver Mißbildungen in der embryonalen Anatomie nicht vorgenommen werden.



**Abb. 5.12: Morphologische Defekte und apoptotische Zelldegeneration in EL#42-Embryonen.**

Die Embryonen entstammen der Kreuzung von EL#42-Männchen und wildtypischen Jungfrauen (A,B) bzw. dem Wildtypstamm *OreR* (C,D). Zur Demonstration phänotypischer Konsequenzen tTA-induzierter *hid*<sup>Ala5</sup>-Expression in EL#42-Embryonen (A,B) vergleichend zu wildtypischen Embryonen (wt; C,D) sind DNA-(Hoechst; A,C) und TUNEL-(B,D)-Färbungen gezeigt. Die dorsale Seite der Embryonen ist oben, die anteriore links. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

Um zu überprüfen, ob eine Korrelation dieser morphologischen Defekte mit der *hid*<sup>Ala5</sup>-Expression besteht, wurde in heterozygoten EL#42-Embryonen apoptotische Zelldegeneration mittels

TUNEL-Reaktion (siehe Kap. 4.4.3) visualisiert. Verglichen mit wildtypischen Kontrollembryonen (Abb. 5.12D) trat in EL#42-Embryonen (Abb. 5.12B) verstärkte TUNEL-Fluoreszenz in Stadien auf, in denen sich auch morphologische Defekte zu manifestieren beginnen (Stadienzuordnung aufgrund der DNA-Färbung in Abb. 5.12A,C). Massive morphologische Defekte wurden durchgehend in Embryonen dieser Stadien mit einer Kopie der EL#42-Transgene beobachtet. Dies weist auf eine wenig variable Expressivität des transgenverursachten Phänotyps hin.

### 5.2.6.2 Effizienz der embryospezifischen Letalität

Die Praktikabilität eines in der embryonalen Phase wirkenden Sterilisierungssystems ist abhängig von der Effizienz embryonaler Letalität. Daher wurde bei drei für *Drosophila*-Kulturen typischen Temperaturwerten (18°C, 25°C, 29°C) die Penetranz untersucht, mit der sich eine Kopie beider EL#42-Transgene in einem embryospezifisch letalen Phänotyp manifestiert. Sowohl bei 18°C, als auch bei 25°C und 29°C schlüpften Larven aus weniger als 0,1% der Embryonen (Tab. 5.4). Selbst bei 18°C war, verglichen mit den höheren Temperaturwerten, nur eine geringfügig niedrigere Penetranz zu beobachten. Dies deutet auf eine geringe Temperaturabhängigkeit der tTA-Transaktivierung im Bereich von 18°C bis 29°C hin (im Gegensatz dazu ist für GAL4 eine starke Abhängigkeit der Transaktivierung von der Temperatur innerhalb dieser Spanne beschrieben (Übersichtsartikel: Duffy, 2002)). Mit der hohen Effizienz der embryospezifischen Letalität ist ein weiteres wichtiges Kriterium für die Anwendbarkeit eines Sterilisierungssystems erfüllt, das auf der beschriebenen Transgenkombination beruht.

Temperatur	Larvale Schlüpftrate
18°C	0,07% (n=18000 Eier <sup>1</sup> )
25°C	0,01% (n=23000 Eier <sup>1</sup> )
29°C	0% (n=21000 Eier <sup>1</sup> )

**Tab. 5.4: Effizienz embryonaler Letalität in Kreuzungen von EL#42-Männchen gegen wildtypische Jungfrauen.**

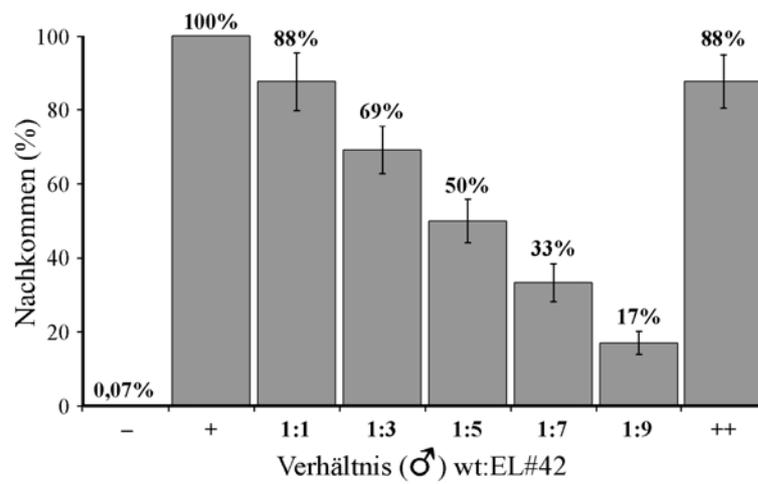
<sup>1</sup> Von 30 Einzelkreuzungsansätzen pro Temperaturwert wurden drei repräsentative ausgezählt und die Zahlen extrapoliert.

### 5.2.6.3 Simulation einer SIT-Situation und Analyse des Paarungserfolges steriler EL#42-Männchen

Zur Untersuchung der Kompetitivität steriler EL#42-Männchen wurde eine SIT-Situation im kleinen Labormaßstab simuliert. Dabei wurde analysiert, ob EL#42-Männchen mit nicht transgenen, wildtypischen Männchen um den Paarungspartner konkurrieren können und mit welcher Effizienz sie die Nachkommenzahl erniedrigen.

Zunächst wurde eine Konkurrenzsituation zwischen fertilen und sterilen Männchen um jungfräuliche wildtypische Weibchen simuliert: In mehreren statistisch unabhängigen Ansätzen konkurrierte ein bestimmtes Verhältnis fertiler zu steriler Männchen um eine bestimmte Menge an

wildtypischen Weibchen (Abb. 5.13; siehe auch Kap. 4.2.1.4). Die Negativkontrolle (ausschließlich sterile Männchen im Ansatz) brachte 0,07% der Nachkommenzahl der Positivkontrolle (ausschließlich fertile Männchen im Ansatz) hervor. Dies demonstriert erneut die Effizienz der transgenvermittelten Sterilisierung. Relativ zur Positivkontrolle konnte mit ansteigendem Überschuß an sterilen Männchen eine zunehmende Reduktion der Nachkommenzahl festgestellt werden. Bei 9fachem Überschuß an sterilen Männchen sank die Nachkommenschaft auf durchschnittlich 17% des Kontrollwertes. Dies indiziert, daß EL#42-Männchen in Konkurrenz zu wildtypischen Männchen die Nachkommenzahl effizient reduzieren können.



**Abb. 5.13: Konkurrenz wildtypischer Männchen und steriler EL#42-Männchen um jungfräuliche wildtypische Weibchen.**

Gezeigt ist die Abhängigkeit der Nachkommenzahl wildtypischer Weibchen von verschiedenen Verhältnissen (1:1 bis 1:9) fertiler wildtypischer zu steriler EL#42-Männchen. Kontrollansätze mit der gleichen Anzahl an fertilen Weibchen enthalten entweder nur sterile Männchen (-), nur fertile Männchen (+) oder die 10fache Menge an fertilen Männchen (++). Die Anzahl an Nachkommen aus einer Zweitagesablage auf Tc-freiem Futter wurde prozentual auf den Wert der Positivkontrolle normiert. Pro Verhältnis wurden 14 unabhängige Ansätze ausgewertet, Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes sind angegeben.

Ein Vergleich der experimentellen Werte zur theoretisch maximal möglichen Reduktion der Nachkommenzahl zeigt jedoch auch, daß wildtypische Männchen hinsichtlich des Paarungserfolges sterilen EL#42-Männchen überlegen sind: Ein 5facher Überschuß an sterilen Männchen ist erforderlich, um die Nachkommenzahl auf einen halbmaximalen Wert zu erniedrigen (Abb. 5.13). Als Parameter für den Paarungserfolg gibt der „Index des Paarungserfolges“ das Verhältnis der gemessenen zur erwarteten Reduktion der Nachkommenzahl an (Conforti et al., 1999). Wie in Tab. 5.5 gezeigt, hängt der Paarungserfolg steriler EL#42-Männchen von der Populationsdichte ab: Mit zunehmendem Überschuß steriler Männchen nimmt der Index zu und erreicht bei 9fachem Überschuß mit 0,92 nahezu den Wert zu wildtypischen Männchen äquivalenten Paarungserfolges (1,0). Als mögliche Ursache für dieses Phänomen wurde der Einfluß streßbedingter Faktoren bei hoher Populationsdichte auf die Anzahl produzierter Nachkommen untersucht. Eine zusätzliche Positivkontrolle (++ in Abb. 5.13), welche einen gegenüber wildtypischen Weibchen 10fachen

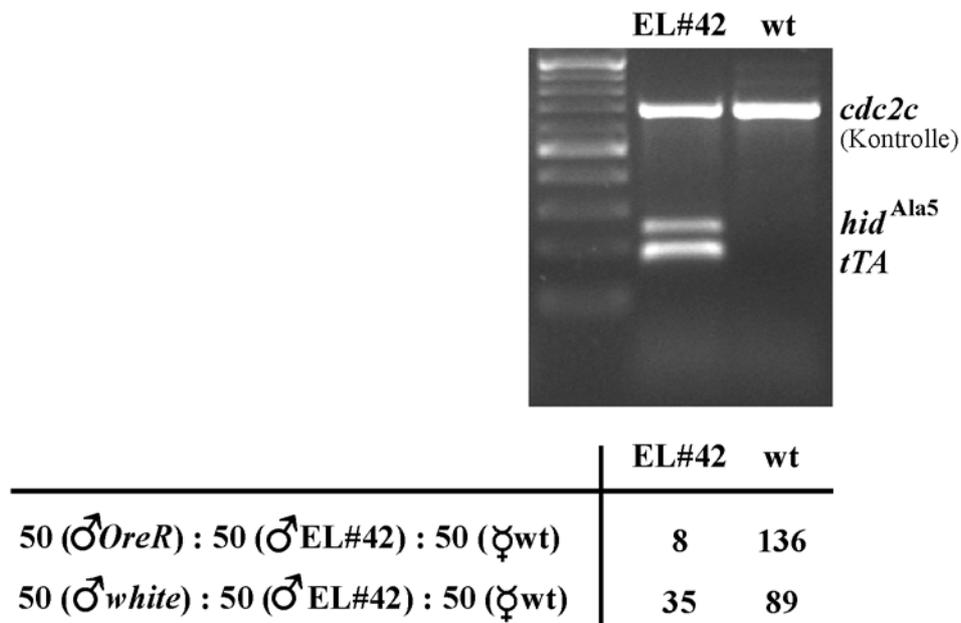
Überschuß wildtypischer Männchen enthielt, zeigte jedoch nur eine geringfügige Reduktion der Nachkommenzahl, die statistisch nicht signifikant ist ( $P = 0,11$  im  $t$ -test).

Verhältnis wt ♂:EL#42 ♂	Reduktion, gemessen (%)	Reduktion, erwartet (%)	Index des Paarungserfolges
1:1	12	50	0,24
1:3	31	75	0,41
1:5	50	83	0,60
1:7	67	88	0,77
1:9	83	90	0,92

**Tab. 5.5: Paarungserfolg von EL#42-Männchen in Konkurrenz zu wildtypischen (wt) Männchen.**

Der Index des Paarungserfolges bezeichnet das Verhältnis gemessener zu erwarteter Reduktion der Nachkommenzahl.

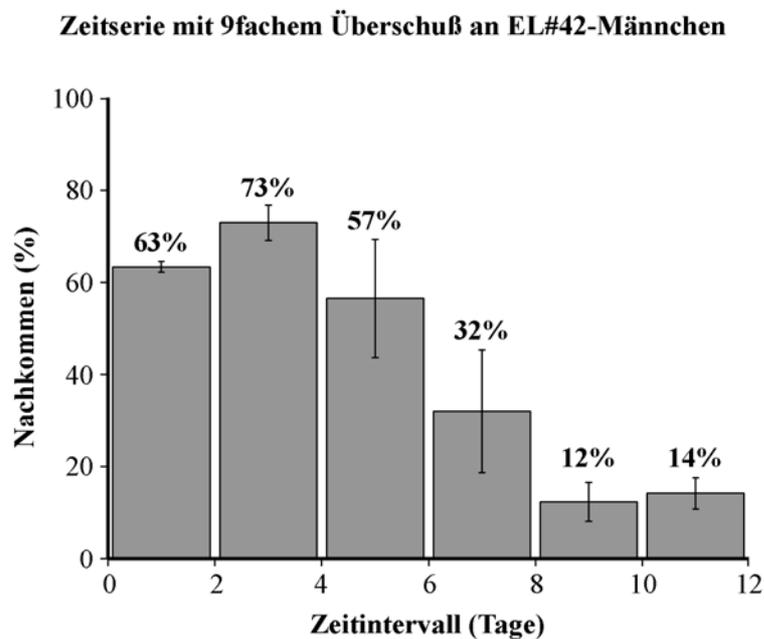
Die Ursache des geringeren Paarungserfolges könnte darin liegen, daß der EL#42-Stamm in einem nicht augenpigmentierten genetischen Hintergrund (*Drosophila*-Stamm *white*) konstruiert wurde. Die Augen wildtypischer Taufliegen (*Drosophila*-Stamm *OreR*) hingegen sind intensiv pigmentiert. Möglicherweise wirken sich visuelle Einflüsse auf den Paarungserfolg aus. Um dies zu untersuchen, wurde der Genotyp von Embryonen bestimmt, welche aus Kreuzungsansätzen mit wildtypischen Jungfrauen und einer gleichen Anzahl an (i) wildtypischen und EL#42-Männchen oder (ii) *white* und EL#42-Männchen entstanden (Abb. 5.14). Die Präsenz der *hid*<sup>Ala5</sup>- und *tTA*-Transgene wurde dabei in Einzelembryonen-Multiplex-PCR-Experimenten nachgewiesen, positiv kontrolliert durch die Präsenz eines genomischen Amplifikats (siehe Kap. 4.1.4.1).



**Abb. 5.14: Einzelembryonen-Multiplex-PCR zur Bestimmung des Genotyps.**

Linke Spur: 100 bp DNA-Längenmarker (New England Biolabs). Mittlere Spur: Für *tTA* (191 bp) und *hid*<sup>Ala5</sup> cDNA (253 bp) spezifische Amplifikate indizieren Fertilisation des Embryos durch ein EL#42-Spermium. Rechte Spur: Das Fehlen der Amplifikate indiziert wildtypische Vaterschaft. Ein 0,7 kb genomisches *cdc2c*-Amplifikat kontrolliert den Erfolg der DNA-Präparation und der PCR.

Standen wildtypische und EL#42-Männchen im 1:1 Verhältnis in Konkurrenz, dann konnte für 5,6% der Embryonen (n=144) die EL#42-Vaterschaft ermittelt werden. Dies entspricht einem Index des Paarungserfolges von 0,11. Eine Untersuchung des Paarungserfolges in der Mittelmeerfruchtfliege zeigte, daß *white*-Männchen, welche im 1:1-Verhältnis mit wildtypischen Männchen um wildtypische Weibchen konkurrierten, einen vergleichbaren Index des Paarungserfolges von 0,125 aufweisen (Conforti et al., 1999). Standen hingegen nicht pigmentierte *white* und EL#42-Männchen in Konkurrenz, besaßen EL#42-Männchen in 28,2% (n=124) die Vaterschaft. Dies entspricht einem Index des Paarungserfolges von 0,56. Das Fehlen der Augenpigmentierung erniedrigte demnach den Paarungserfolg der EL#42-Männchen um einen Faktor 5.



**Abb. 5.15: Zeitverlauf der Konkurrenz von EL#42-Männchen um bereits befruchtete Weibchen.**

Zu Beginn der Zeitreihe (Tag 0) wurde zu *white*-Frauen und *white*-Männchen, die bereits für vier Tage die Gelegenheit zur Befruchtung hatten, ein 9facher Überschuß an sterilen EL#42-Männchen hinzugefügt. Die Anzahl an adulten Nachkommen wurde ermittelt, die aus sechs aufeinanderfolgenden Zweitagesablagen dieses Ansatzes entstanden. Prozentuale Werte sind normalisiert auf den Wert der Positivkontrolle (Ansatz ohne EL#42-Männchen) und stellen den Mittelwert (Standardfehlerbalken sind angegeben) dreier unabhängiger Zeitreihen dar (siehe Kap. 4.2.1.4).

In einer zweiten Serie an Konkurrenzexperimenten wurden bereits befruchtete *white*-Frauen verwendet. Hierbei wurde untersucht, ob und in welchem Zeitraum EL#42-Männchen die Nachkommenzahl polyandrischer Taufiegen-Weibchen erniedrigen können (Abb. 5.15). Ein 9facher Überschuß an sterilen EL#42-Männchen stand dabei in Konkurrenz zu einer einfachen Menge an *white*-Männchen um eine einfache Menge an *white*-Frauen (siehe Kap. 4.2.1.4). Die Nachkommenzahl, welche für sukzessive Zweitagesablagen aufgezeichnet wurde, sank bereits in den ersten drei Ablagen signifikant auf ein Plateau von 60-70% ab. In den beiden Zweitagesintervallen 8-10 und 10-12 Tage nach Hinzufügen steriler EL#42-Männchen erniedrigte sich die Nachkommenzahl auf nur 12-14% des Wertes der Positivkontrolle. Dies indiziert den Paarungserfolg steriler EL#42-Männchen

in einer Konkurrenzsituation mit fertilen Männchen um bereits fertilisierte Weibchen des gleichen genetischen Hintergrunds (*white*).

Die Konkurrenzexperimente wurden mit einer *Drosophila*-Laborkultur und, damit verbunden, unter artifiziellen Bedingungen durchgeführt. Dennoch demonstrieren sie die Praktikabilität der Grundidee, mittels transgenvermittelt sterilisierter SIT-Männchen die Nachkommenzahl sogar bereits befruchteter polyandrischer Weibchen zu reduzieren.

### 5.2.7 Kompatibilität des Systems embryonaler Letalität mit einem transgenbasierten System weiblicher Letalität

Die Wirksamkeit der SIT ist für viele Schadspezies am höchsten, wenn ausschließlich sterilisierte Männchen freigesetzt werden. Ein vollständig transgenbasiertes SIT-System sollte daher sowohl die Sterilisierung der Insektenmännchen als auch das Abtöten der Insektenweibchen leisten.

Infolgedessen stellte sich die Frage, ob das in dieser Arbeit etablierte System supprimierbarer embryonaler Letalität kompatibel ist zu dem bereits beschriebenen System supprimierbarer weiblich-spezifischer Letalität (siehe Abb. 3.4; Heinrich & Scott, 2000). Um dies zu untersuchen, wurden transgene *Drosophila*-Stämme konstruiert, die zusätzlich zu dem letalitätsvermittelnden Effektortransgen ein embryospezifisches und ein weiblich-spezifisches Transaktivatortransgen tragen (Tab 5.6). Diese „FSLEL“-Stämme wurden zunächst hinsichtlich ihrer Sterilität charakterisiert. Aus Embryonen, die eine Kopie der Transgene von FSLEL-Männchen erbten, entstanden keine adulten Nachkommen. Danach wurde die minimale Tc-Konzentration bestimmt, mit der sich die Sterilität supprimieren lässt. Die Stämme konnten reproduzierbar auf Futter mit einer Tc-Konzentration von 10 µg/ml (FSLEL4 und FSLEL8) bzw. von 30 µg/ml (FSLEL2 und FSLEL3) propagiert werden.

Stamm	Transaktivatorlinien		Effektorlinie	Nachkommen (heterozygot)	Suppression der Sterilität	
	embryonal-spezifisch	weiblich-spezifisch			+Tc (µg/ml)	+Tc → -Tc (µg/ml)
FSLEL2	>> <i>s1-tTA</i> >>, M1.II	<i>yp1-tTA</i> Linie 19	<i>tetO-hid</i> Linie 53	-	30	>100
FSLEL3	>> <i>s1-tTA</i> >>, M3.II	<i>yp1-tTA</i> Linie 19	<i>tetO-hid</i> Linie 53	-	30	100
FSLEL4	>> <i>s2-tTA</i> >>, M5.II	<i>yp1-tTA</i> Linie 19	<i>tetO-hid</i> Linie 53	-	10	>100
FSLEL8	>> <i>s2-tTA</i> >>, M7.II	<i>yp1-tTA</i> Linie 19	>> <i>TREp-hid<sup>Ala5</sup></i> >> M5.II	-	10	>100

**Tab. 5.6: Charakterisierung von FSLEL-Stämmen.**

FSLEL-Stämme sind bzgl. der angegebenen Transaktivator- und Effektortransgene homozygot.

-: keine Nachkommen auf Tc-freiem Futter, wenn die Transgenkombination im heterozygoten Zustand vorliegt. Die minimal erforderliche Tc-Konzentrationen zur Suppression der Sterilität bei Inkubation auf Tc-haltigem Medium (+Tc) oder nach Transfer des FSLEL-Stammes von Tc-haltigem auf Tc-freies Medium (+Tc → -Tc) sind angegeben (siehe Kap. 4.2.1.5).

Um zu untersuchen, ob alleine den Elternfliegen verfüttertes Tc hinreichend zur Suppression der Sterilität sein kann, wurden FSLEL-Elternfliegen, die mit einer bestimmten Tc-Konzentration (3; 10; 30; 100) inkubiert worden waren, auf Tc-freies Futter überführt. Hierbei zeigte sich, daß nur vereinzelt adulte Nachkommen entstanden. Bei höheren parentalen Tc-Konzentrationen wurde pupale Letalität beobachtet. Einzig der Stamm FSLEL3 produzierte wenige Nachkommen, nachdem er von Tc-(100 µg/ml)-haltigem auf normales Futter überführt worden war. Unter diesen Nachkommen befanden sich aber sowohl Männchen als auch Weibchen. Diese Ergebnisse indizieren, daß mit den vier untersuchten FSLEL-Kombinationen das spezifische Abtöten der Weibchen nicht möglich ist.

In den FSLEL-Kombinationen wurde auf transgene Linien zurückgegriffen, für die supprimierbare weiblich-spezifische Letalität publiziert ist („*yp1-tTA* Linie 19“ und „*tetO-hid* Linie 53“ aus Heinrich & Scott, 2000). Um die Funktionalität dieser Transgenkombination zu prüfen, wurde der (bzgl. *yp1-tTA* und *tetO-hid*) homozygote Stamm von Tc-(10 µg/ml)-haltigem auf Tc-freies Futter überführt (siehe Kap. 4.2.1.5). Dabei zeigte sich, daß innerhalb der ersten beiden Tage auf Tc-freiem Futter sowohl weibliche (n=39) als auch männliche (n=54) Nachkommen entstanden. Wurden die Fliegen jedoch länger als 2 Tage von dem Tc-haltigen Futter getrennt, brachten sie ausschließlich männliche Nachkommen (n=146) hervor. Somit konnte die veröffentlichte weiblich-spezifische Letalität, zumindest nach einer Latenz von 2 Tagen, bestätigt werden.

Die weiblich-spezifische Transaktivatorlinie (*yp1-tTA* Linie 19) ist nicht von Isolatorsequenzen flankiert. Um zu prüfen, ob durch Isolatorflankierung zum EL-System kompatible Linien generierbar sind, wurde das veröffentlichte (Heinrich & Scott, 2000) Transgenkonstrukt nachgebaut und in einen *gypsy*-isolatorflankierten Transformationsvektor eingebettet (siehe Kap. 4.1.2.2.1.2, N. Horstmann, pers. Mitteilung). 14 unabhängige *Dm*[*pBac*{*3xP3-DsRed*; >*FBE-tTA*>}]-Linien wurden gegen die Effektorlinie >>*TREp-hid*<sup>Ala5</sup>>> F1.II gekreuzt, und Nachkommen wurden analysiert, welche eine Kopie beider Transgene tragen. Nur drei der 14 Kreuzungen brachten reproduzierbar selektiv (jedoch nicht ausschließlich) Männchen hervor. Mit der vermeintlich wirksamsten Linie (*Dm*[*pBac*{*3xP3-DsRed*; >*FBE-tTA*>}] M1.II) und der Effektorlinie wurde ein Stamm hergestellt, der beide Transgene im homozygoten Zustand trägt. Überführt man diesen Stamm von Tc-(10 µg/ml)-haltigem auf Tc-freies Futter, so entstanden nur vereinzelt Nachkommen, und ein vermehrtes Auftreten pupaler Letalität, ähnlich den Ergebnissen der FSLEL-Kombinationen, wurde beobachtet. Unter den wenigen Nachkommen befanden sich aber Männchen und Weibchen in nahezu gleichem Verhältnis.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß das System supprimierbarer embryospezifischer Letalität dieser Arbeit nicht mit dem System supprimierbarer weiblich-spezifischer Letalität (Heinrich & Scott, 2000) kombinierbar zu sein scheint. Diese Aussage trifft zumindest für die untersuchten Kombinationen aus weiblich-spezifischen und embryospezifischen Transaktivatorlinien mit *hid*- bzw. *hid*<sup>Ala5</sup>-Effektorlinien zu.

### 5.3 Ein Transposon-Mutagenese-System zum Nachweis von Enhanceraktivität

Für die Modellspezies *Drosophila melanogaster* konnte ein System supprimierbarer embryospezifischer Letalität etabliert werden, indem auf bereits charakterisierte genregulatorische Bereiche zurückgegriffen wurde. Für eine Schadspezies hingegen steht dieses Wissen gegenwärtig nicht zur Verfügung. Sollten *cis*-regulatorische Sequenzen aus *Drosophila* in einer Schadspezies in ihrer Funktion nicht konserviert sein, ist eine Methode zur Identifizierung geeigneter Enhancer erforderlich. Ein System, das den Nachweis von Enhanceraktivität ermöglicht, ist Gegenstand der folgenden Abschnitte.

#### 5.3.1 Architektur des Enhancernachweissystems

Die einzelnen Komponenten des Systems wurden unter Berücksichtigung folgender Konstruktionsziele entworfen: Sie basieren auf Breitband-Transposons und verwenden die Transformationsmarker *3xP3-ECFP*, *3xP3-EYFP* und *3xP3-DsRed* zur Differenzierung verschiedener Transgene. Da diese Transposons und Markergene von *Drosophila* unabhängig funktionieren (siehe Kap. 3.3.1), besitzt ein solches System Anwendungspotential in nichtdrosophiliden Insektenspezies.

##### 5.3.1.1 Jumpstarter als Transposasequelle

Jumpstarter fungieren als Transposasequelle zur Mobilisierung nichtautonomer Mutatortransgene. Um eine Automobilisierung des Jumpstarters zu verhindern, sind Transposasagen und Transposonrückgrat unterschiedlichen und inkompatiblen Transposonfamilien zugehörig zu wählen: *Hermes*-exprimierende Jumpstarter wurden in einem *piggyBac*-Transformationsvektor und *piggyBac*-exprimierende Jumpstarter in einem *Hermes*-, *mariner*- oder *Minos*-Transformationsvektor konstruiert. Das Transposasagen wurde entweder unter Kontrolle des konstitutiv aktiven  *$\alpha$ 1-tubulin*-Promotors ( *$\alpha$ tub*; Theurkauf et al., 1986) oder des temperaturregulierbar aktiven *heat-shock-protein70*-Promotors (*hsp70*; Lis et al., 1983) gestellt. Da die Funktionalität *Drosophila*-endogener Promotoren in anderen Insektenspezies *a priori* nicht bekannt ist, wurden einige Promotoren konstrukterterminal lokalisiert, so daß sie potentiell genomische Enhancer aufgreifen können.

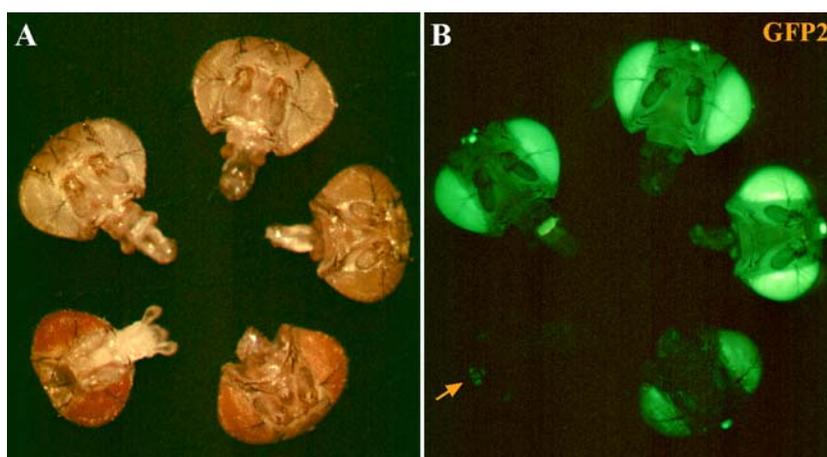
Die Jumpstarterkonstrukte *pBac{3xP3-ECFP, hsp70-Hermes}*, *pMi{3xP3-DsRed, hsp70-piggyBac}*, *pHer{3xP3-ECFP,  $\alpha$ tub-piggyBacK10}* und *pMos{3xP3-ECFP,  $\alpha$ tub-piggyBacK10}* wurden zur Keimbahntransformation von *D. melanogaster* verwendet. Linien, die bzgl. dieser Jumpstarter transgen sind, mobilisierten in einem Testsystem (siehe Kap. 4.2.2) entsprechende *Hermes*- bzw. *piggyBac*-Konstrukte.

### 5.3.1.2 Mutatoren zum Enhancernachweis

Mutatoren stellen die mobile Komponente eines Transposon-Mutagenese-Systems dar. Sie wurden nach folgenden Gesichtspunkten konstruiert: Ihre Funktionsweise sollte (i) neue Insertionen visuell identifizierbar machen, (ii) den Insertionslocus molekular markieren, (iii) an einem Locus aktive Enhancer aufspüren und (iv) das Enhanceraktivitätsmuster verfügbar machen zur Kontrolle der Expression eines frei wählbaren Zielgens.

#### 5.3.1.2.1 3xP3-EYFP zur sensitiven Identifizierung von Mutatorinsertionen

Um eine möglichst effiziente visuelle Identifizierung neuer Mutatorinsertionen zu ermöglichen, sollten Mutatortransgene mit dem sensitivsten verfügbaren Transformationsmarker versehen werden. In der *Drosophila*-Genetik wird standardmäßig der „mini“-*white* Augenpigmentierungsmarker verwendet. Um die Sensitivität 3xP3-basierter Augenfluoreszenzmarker (siehe Kap. 5.1.1) vergleichend zu „mini“-*white* zu untersuchen, wurde ein Transgen, das sowohl den „mini“-*white* als auch den 3xP3-EGFP-Marker exprimieren kann ( $P\{w^{+mC}, 3xP3-EGFP\}$ ; Horn et al., 2000), zu neuen genomischen Loci remobilisiert (siehe Kap. 4.2.4.1). Da Remobilisierungsereignisse prinzipiell anhand beider Marker identifiziert werden können, ist ein Vergleich der Markersensitivitäten möglich (Abb. 5.16). Dabei zeigte sich, daß alle Remobilisierungsereignisse, die anhand der Pigmentierung erkannt wurden, auch anhand der Fluoreszenz identifiziert werden konnten. Umgekehrt konnten jedoch einige Remobilisierungsereignisse nicht anhand der Pigmentierung (Abb. 5.16A), aber anhand der Fluoreszenz (Abb. 5.16B) nachgewiesen werden. Dieses qualitative Ergebnis deutet auf eine verglichen mit „mini“-*white* höhere Sensitivität von 3xP3-EGFP hin. Da die



**Abb. 5.16: Vergleich der Sensitivitäten der Transformationsmarker 3xP3-EGFP und „mini“-*white*.**

Fünf Fliegenköpfe, welche bzgl. verschiedener Insertionen des  $P\{w^{+mC}, 3xP3-EGFP\}$ -Konstruktes transgen sind, wurden sowohl ohne Anregungslicht (A) als auch mit Anregungslicht und dem GFP2-Filter (B) exemplarisch dokumentiert. Alle fünf Fliegenköpfe können aufgrund 3xP3-vermittelter Fluoreszenz, jedoch nur drei der fünf Köpfe aufgrund der „mini“-*white*-vermittelten Pigmentierung als transgen identifiziert werden. Bei starker Pigmentierung ist das Fluoreszenzsignal in den Ocellen (Pfeil) erkennbar.

Spektralvariante EYFP hinsichtlich ihrer Leuchtstärke EGFP noch übertrifft (siehe Tab. 4.2; Patterson et al., 2001) und zudem von ECFP und DsRed separierbar ist (siehe Abb. 5.2), wurde *3xP3-EYFP* als Transformationsmarker für Mutatortransgene gewählt.

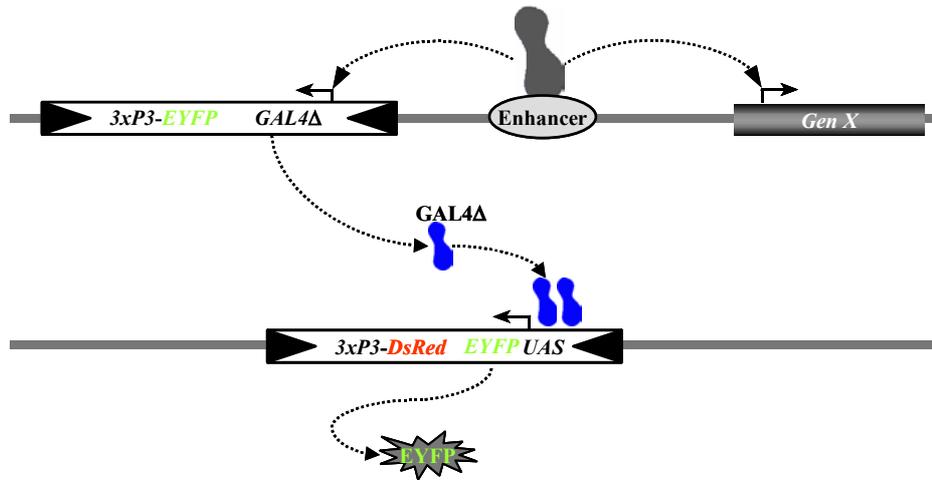
#### 5.3.1.2.2 Mutatoren mit Reporterfunktion für Enhanceraktivität und Transaktivatorfunktion

In dieser Arbeit konstruierte Mutatoren sollen als Sensoren für Enhanceraktivität an einem Locus fungieren (Abb. 5.17). Die Sensorfunktion wird dabei von einem Reporter gen übernommen, welches unter Kontrolle eines enhancersensitiven Basalpromotors steht. Der Basalpromotor beinhaltet die minimal zur Transkriptionsinitiation notwendige DNA-Sequenz und sollte drei Kriterien erfüllen (O’Kane & Gehring, 1987): Erstens sollte er konstitutiv relativ schwach, im optimalen Falle transkriptionell stumm sein. Zweitens sollte er sowohl in somatischen als auch in Keimbahnzellen transkriptionell aktivierbar sein. Drittens sollte er genomischem Enhancereinfluß maximal exponiert sein. Wir wählten den *P*-Basalpromotor, der bereits in binären Genexpressionssystemen in einer Vielzahl von *Drosophila*-Gewebe und Entwicklungsstadien erfolgreich angewendet wurde (Rørth, 1998; Bello et al., 1998). Der *P*-Promotor wurde in den Mutatorkonstrukten terminal positioniert, so daß er für genomische Enhancer leichter zugänglich ist.

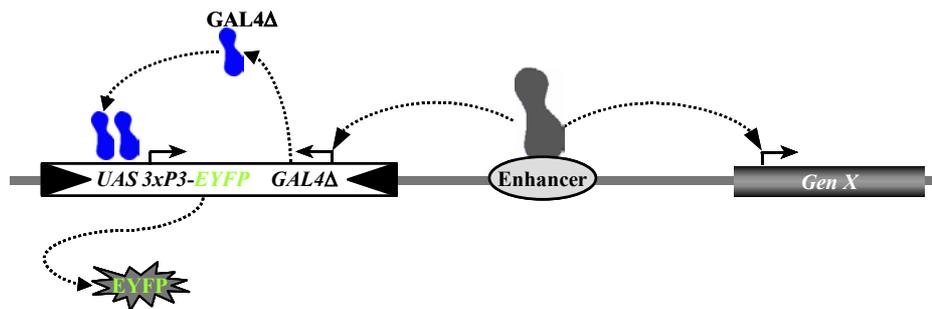
Um ein aufgespürtes Enhanceraktivitätsmuster zur Kontrolle einer Zielgenexpression verfügbar zu machen, wurde ein Transaktivator gen als primäres Reporter gen unter Kontrolle des *P*-Promotors gestellt: *GAL4* wurde in das Mutatorkonstrukt *pBac{3xP3-EYFP, p-GAL4A-K10}* (abgekürzt: *{GAL4A}*) und *tTA* in das Mutatorkonstrukt *pBac{3xP3-EYFP, p-tTA-K10}* (abgekürzt: *{tTA}*) integriert. Im Gegensatz zum klassischen GAL4/UAS-System (Brand & Perrimon, 1993) wurde auf eine GAL4-Deletionsvariante, GAL4 $\Delta$  (Ma & Ptashne, 1987), zurückgegriffen, welche im Vergleich zum Vollängenprotein möglicherweise erhöhte Stabilität aufweist (G. Struhl, pers. Mitteilung).

Eine Mutatorlinie mit primärem Reporter gen (*{GAL4A}* bzw. *{tTA}*) kann als Transaktivatorlinie fungieren und das gewebs- oder stadienspezifische Enhanceraktivitätsmuster auf flexibel wählbare *UAS*- bzw. *TRE*-kontrollierte Zielgene übersetzen. Um die Aktivität eines aufgenommenen Enhancers zu visualisieren, läßt man den Transaktivator die Expression eines *UAS*- bzw. *TRE*-kontrollierten sekundären Reporter gens stimulieren (Abb. 5.17A). Als sekundärer Reporter ist EYFP-Fluoreszenz nicht invasiv und *in vivo* erkennbar. Auch das  $\beta$ Gal-Protein, das Produkt des *E. coli lacZ*-Gens, bietet sich als sekundärer Reporter an, da es *in situ* immunohistochemisch äußerst sensitiv bzw. histochemisch sehr einfach nachweisbar ist. Sekundäre Reporterkonstrukte, die *EYFP* bzw. *lacZ* unter Kontrolle von *UAS* bzw. *TRE* exprimieren, wurden zur Keimbahntransformation von *D. melanogaster* verwendet und deren prinzipielle Funktionalität durch Testkreuzungen bestätigt (siehe Kap. 4.2.2).

### A) Mutator und separater Reporter



### B) Mutator mit integrierter Reporterfunktion



**Abb. 5.17: Aufbau und Funktionsweise von Mutator- und Reportertransgenen.**

A) Mutatortransgene tragen als primären Reporter ein Transaktivatorgen (z.B. *GAL4Δ*), welches unter Kontrolle eines genomischen Enhancers exprimiert werden kann. Das Transaktivatorprotein stimuliert dann die Expression eines sekundären Reportergens, das von einem separaten Konstrukt kodiert wird.

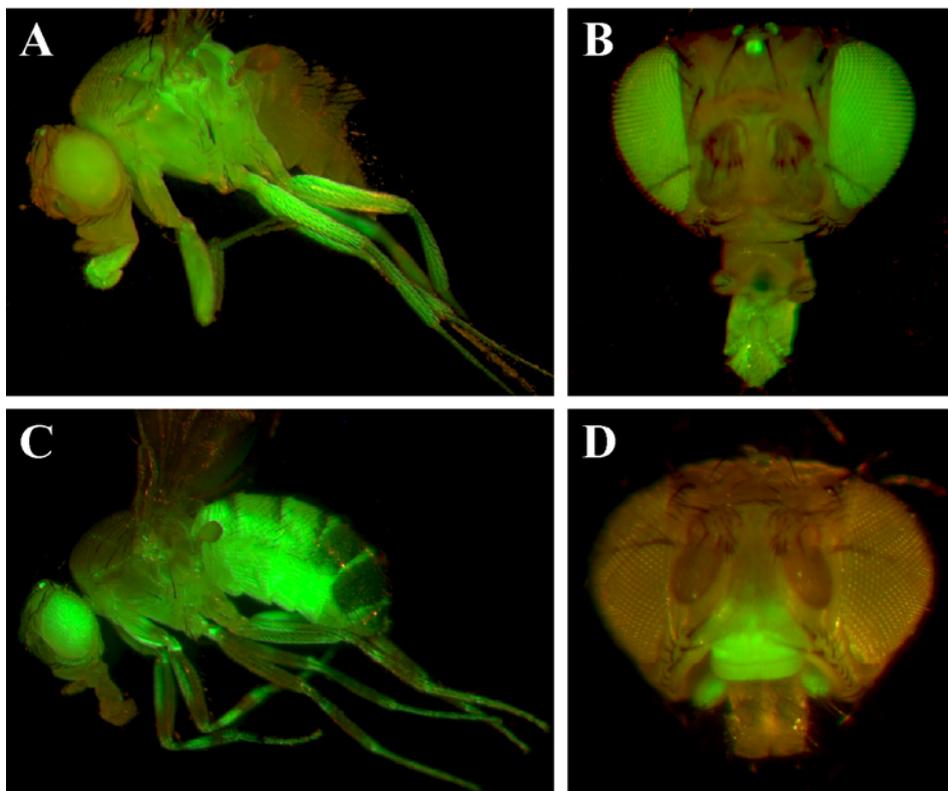
B) Der Mutator mit integrierter Reporterfunktion trägt *EYFP* unter Kontrolle des *UASp*- und des *3xP3*-Promotors, so daß *EYFP* sowohl als Transformationsmarker als auch als sekundärer Reporter fungieren kann. Analoge Transgenkonstrukte wurden auch mit *tTA* als Transaktivatorgen erstellt.

Neben dieser Zwei-Komponenten-Bauweise aus separaten Mutator- und Reporterkonstrukten wurden Mutatoren konstruiert, die primäre und sekundäre Reporter in einem Konstrukt kombinieren (Abb. 5.17B): In den Mutatorkonstrukten *pBac{UASp-3xP3-EYFP, p-GAL4Δ-K10}* (abgekürzt: *{GAL4Δ+UAS}*) und *pBac{TRE-3xP3-EYFP, p-tTA-K10}* (abgekürzt: *{tTA+TRE}*) steht *EYFP* sowohl unter Kontrolle des *UASp*- bzw. *TRE*- als auch unter Kontrolle des *3xP3*-Promotors. In diesen „Mutatoren mit integrierter Reporterfunktion“ fungiert *EYFP* somit als sekundärer Reporter und als Transformationsmarker.

### 5.3.1.2.3 Enhancernachweis mit dem $\{GAL4\Delta+UAS\}$ -Mutator

Die Enhancernachweisfunktion der Mutatoren  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  und  $\{tTA+TRE\}$  wurde in *D. melanogaster* durch Keimbahntransformationsexperimente untersucht (siehe Kap. 4.2.2). Bzgl.  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  transgene *Drosophila*-Linien zeigten Fluoreszenzmuster, die nicht auf die beschriebene  $3xP3$ -abhängige Markergenexpression (Horn, 1999; Horn et al., 2000) zurückführbar sind. EYFP-Fluoreszenz wurde in verschiedenen Geweben im Kopf, Thorax oder Abdomen beobachtet (Abb. 5.18). Dies demonstriert die Praktikabilität der Kombination eines primären (GAL4 $\Delta$ ) und eines sekundären (EYFP) Reporters zum Nachweis adulter Enhanceraktivität. In einer Dm[ $\{GAL4\Delta+UAS\}$ ]-Linie, die keine Augenfluoreszenz zeigte, konnte das Mutatortransgen alleine aufgrund des reportervermittelten Fluoreszenzmusters identifiziert werden (Abb. 5.18D).

Nach Keimbahntransformation mit  $\{tTA+TRE\}$  wurden ausschließlich  $3xP3$ -abhängige Fluoreszenzmuster beobachtet (10 unabhängige Linien). Zudem wies die Funktionsanalyse von  $\{tTA+TRE\}$  auf eine, verglichen mit  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ , weniger sensitive Enhancernachweisfunktion hin (siehe Kap. 4.2.2). Daher wurde der  $\{tTA+TRE\}$ -Mutator in die Pilot-Mutagenese (siehe Kap. 5.3.2) nicht miteinbezogen.

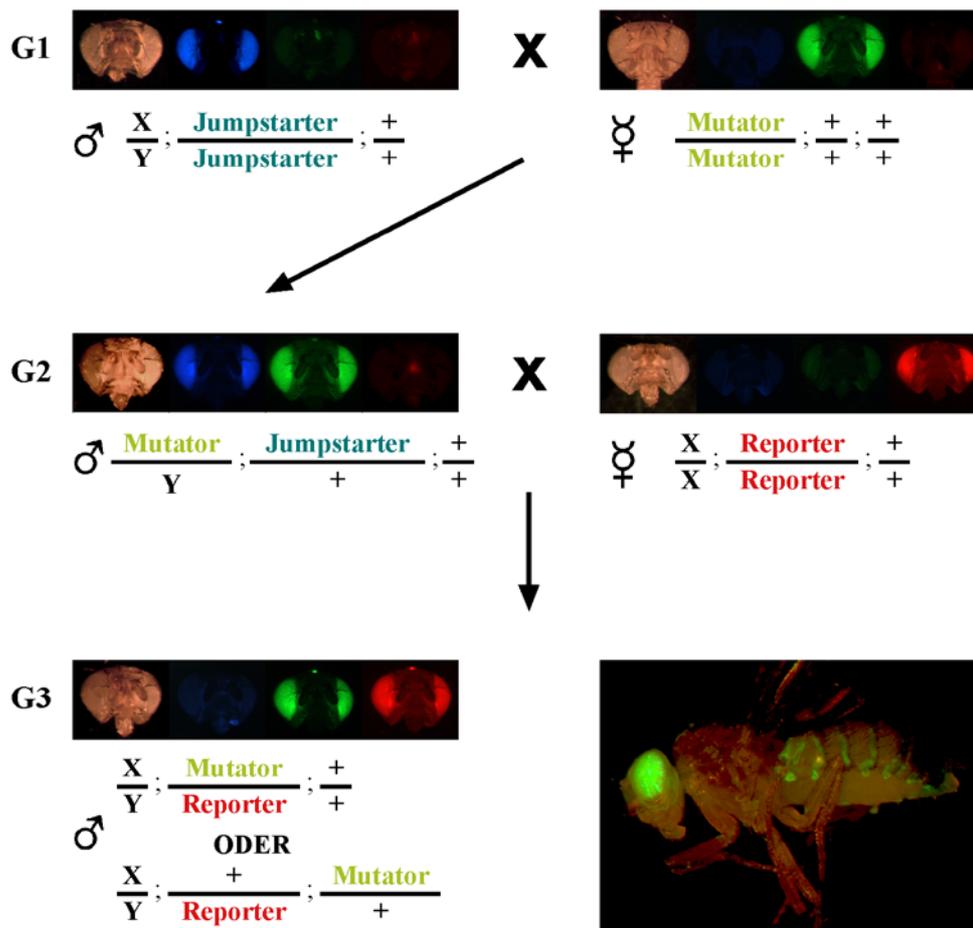


**Abb. 5.18: Mit dem  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ -Mutator nachgewiesene adulte Enhanceraktivitäten.**

Die Linie Dm[ $\{GAL4\Delta+UAS\}$ ] MM12.III visualisiert Enhanceraktivität im Thorax und in den Beinen (A) sowie in distalen und medialen Proboszisabschnitten (B). Die Linie Dm[ $\{GAL4\Delta+UAS\}$ ] MM12.II visualisiert Enhanceraktivität im Abdomen sowie in Beinregionen (C). Die Linie Dm[ $\{GAL4\Delta+UAS\}$ ] MM12.II\_2 visualisiert Enhanceraktivität im basalen Proboszisabschnitt und dem maxillaren Palpus (D).

### 5.3.1.3 Prinzip der insertionellen Mutagenese mit differenzierbaren Fluoreszenzmarkern

Um die zuvor beschriebenen Jumpstarter, Mutatoren und Reporter in einer Insektenart direkt einsetzen zu können, sollte die Präsenz jeder einzelnen Komponente in jedem Kreuzungsschritt phänotypisch eindeutig nachweisbar sein. Das differenzierbare Transformationsmarkertrio *3xP3-ECFP*, *3xP3-EYFP* und *3xP3-DsRed* (siehe Abb. 5.2) bietet sich zur unabhängigen Markierung der drei Komponenten an. Das in Abb. 5.19 dargestellte Mutagenese-Prinzip mit dem Ziel des Enhancernachweises sollte dann anwendbar sein.



**Abb. 5.19:** Kreuzungsschema zur Identifizierung neuer autosomaler Mutatorinsertionen und zum gleichzeitigen Nachweis von Enhanceraktivität.

Für jede der drei Generationen G<sub>1</sub>-G<sub>3</sub> sind der Augenfluoreszenzphänotyp sowie der Genotyp der Männchen bzw. Weibchen dargestellt. Zur Demonstration des Differenzierungsprinzips der Jumpstarter-, Mutator- und Reportertransgene wurde in jeder Generation ein repräsentativer männlicher und ein repräsentativer weiblicher Fliegenkopf mit Kaltlichtquelle bzw. mit Anregungslicht und den Filtersystemen CyanGFP, YellowGFP und Cy3.5/DsRed (von links nach rechts) dokumentiert. Zudem ist exemplarisch ein G<sub>3</sub>-Männchen mit einer Mutatorinsertion (*GAL4*) gezeigt, die die Enhanceraktivität in Abdominalsegmenten sichtbar macht.

In Ausgangslinien ist das Mutatortransgen mit *3xP3-EYFP* markiert und auf dem X-Chromosom lokalisiert. Jumpstarterlinien sind mit *3xP3-ECFP* und Reporterlinien mit *3xP3-DsRed* markiert. Die Jumpstarter- und Reportertransgene befinden sich auf einem der Autosomen. Nach

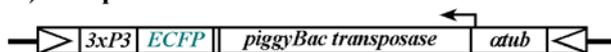
Kreuzung der Jumpstarter- und Mutatorlinien ( $G_1$ -Generation) sind in der folgenden  $G_2$ -Generation männliche Individuen mit beiden Transgenen anhand der augenspezifischen ECFP- und EYFP-Doppelfluoreszenz identifizierbar und werden gegen eine DsRed-markierte Reporterlinie gekreuzt. Sofern ein Mutator mit integrierter Reporterfunktion zum Einsatz kommt, erfolgt dieser Kreuzungsschritt gegen nicht augenpigmentierte Weibchen des Stammes *white* (nicht gezeigt in Abb. 5.19). Die X-chromosomale Insertion des Mutators kann nicht an männliche Individuen der folgenden  $G_3$ -Generation vererbt werden. Infolgedessen indiziert ein EYFP-Augenfluoreszenzphänotyp in männlichen  $G_3$ -Taufliegen den dysgenen Zustand, in dem ein Transpositionereignis des Mutators zu einem autosomalen Locus stattgefunden hat.

Enhancer mit *cis*-Aktivität an dem Neuinsertionslocus können von dem Mutatortransgen aufgespürt und von dem Reportertransgen visualisiert werden (Abb. 5.19). Diese Vorgehensweise ermöglicht in der  $G_3$ -Generation simultan die Identifizierung neuer Mutatorinsertionen und die Charakterisierung dieser Insertionen hinsichtlich Enhanceraktivität. Taufliegen, die eine interessante Mutatorinsertion tragen, können anschließend als Linie etabliert werden. Schließlich können Linien z.B. hinsichtlich rezessiver Phänotypen untersucht werden.

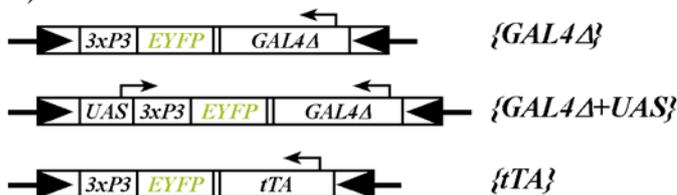
### 5.3.2 Pilot-Mutagenese und Enhancernachweis in *Drosophila melanogaster*

Um das Zusammenspiel hergestellter Jumpstarter-, Mutator- und Reporterlinien zu evaluieren, wurde eine Pilot-Mutagenese in der Modellspezies *D. melanogaster* durchgeführt. Zur Pilot-Mutagenese wurde eine Auswahl an *3xP3-ECFP*-markierten Jumpstarterlinien, *3xP3-EYFP*-markierten Mutatorlinien und *3xP3-DsRed*-markierten Reporterlinien getroffen (Abb. 5.20, siehe auch Kap. 4.2.3.1).

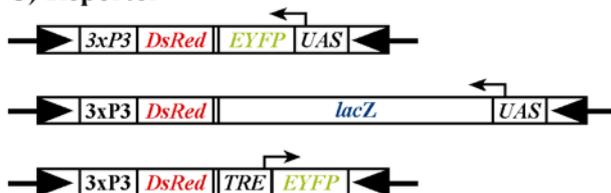
#### A) Jumpstarter



#### B) Mutatoren



#### C) Reporter



**Abb. 5.20: Transgene zur *Drosophila*-Pilot-Mutagenese und zum Enhancernachweis.**

Das Transposonrückgrat (nicht ausgefülltes Dreieck symbolisiert *Hermes*; ausgefülltes Dreieck symbolisiert *piggyBac*), das Transformationsmarkergen sowie die funktionelle Komponente der Jumpstarter-, Mutator- und Reportertransgene sind schematisiert dargestellt. Im Text verwendete Abkürzungen der Mutatoren sind angegeben.

### 5.3.2.1 Statistische Daten der Pilot-Mutagenese

Um *Drosophila*-Autosomen auf Mutatorneuinsertionen durchzumustern, wurden für  $\{GAL4\Delta\}$  und  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  je drei und für  $\{tTA\}$  vier unabhängige Linien mit jeweils drei unabhängigen Jumpstarterlinien nach dem Schema der Abb. 5.19 kombiniert (siehe Kap. 4.2.3.2). Abgesehen von einer  $\{tTA\}$ -Mutatorlinie (x.1), welche sich als nicht effizient mobilisierbar herausstellte und nicht in die statistische Auswertung miteinbezogen wurde, produzierten alle Mutator+Jumpstarter-Kombinationen dysgene  $G_3$ -Männchen mit EYFP-Augenfluoreszenz.

Die statistischen Ergebnisse der Pilot-Mutagenese sind in Tab. 5.7 nach den drei Mutatortypen aufgeschlüsselt. Die Spanne, die aus den Meßdaten der individuellen Mutator+Jumpstarter-Kombinationen resultierte, ist für einige Kenngrößen angegeben. Betrachtet man Weibchen der  $G_3$ -Generation, so prägt sich eine Exzision des Mutatortransgens in einem Verlust der EYFP-Augenfluoreszenz aus. In 48-100% der  $G_2$ -Ansätze entstanden EYFP-negative Weibchen. Diese hohe Exzisionsrate indiziert eine effiziente Mobilisierung der untersuchten Mutatortransgene. Die weiteren Kenngrößen in Tab. 5.7 beziehen sich auf dysgene Männchen: Durchschnittlich 80% der  $G_2$ -Kreuzungsansätze brachten mindestens einen EYFP-fluoreszierenden Sohn hervor (Sprungrate). In der Praxis werden jedoch dysgene Männchen i.d.R. nur dann weiterverwendet, wenn sie eine stabile (Abwesenheit des Jumpstartertransgens) und unabhängige Neuinsertion tragen (maximal ein  $G_3$ -Männchen mit distinktem EYFP-Fluoreszenzphänotyp pro Ansatz). Der Anteil der  $G_2$ -Ansätze, aus

Mutatortransgen	$G_2$ Ansätze <sup>a</sup>	Exzisionsrate <sup>b</sup>	Sprungrate <sup>c</sup>	stabile Neuinsertionen <sup>d</sup>	$\Sigma$ Männchen <sup>e</sup>	Transpositionsfrequenz <sup>f</sup>	Enhancernachweis <sup>g</sup>
$\{GAL4\Delta\}$	237	96%-100%	92% (81%-100%)	67%	11405	0.123 ± 0,031	47%
$\{GAL4\Delta+UAS\}$	225	48%-100%	72% (36%-96%)	45%	9153	0.084 ± 0,048	51%
$\{tTA\}$	227	56%-100%	80% (60%-96%)	41%	9500	0.130 ± 0,055	2%

**Tab. 5.7: Statistische Ergebnisse zur Mobilisierbarkeit und zum Enhancernachweis mit den Mutatoren  $\{GAL4\Delta\}$ ,  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  und  $\{tTA\}$ .**

<sup>a</sup> Gesamtzahl an fertilen, männlichen  $G_2$ -Einzelkreuzungsansätzen (siehe auch Kap. 4.2.3.2).

<sup>b</sup> Exzisionsrate bezeichnet den prozentualen Anteil von ( $G_2$ -Kreuzungen mit mindestens einer  $3xP3-EYFP$  Tochter) / (fertile  $G_2$ -Kreuzungen). Die Spanne von 9 unabhängigen Kombinationen ist angegeben.

<sup>c</sup> Sprungrate (nach Berg & Spradling, 1991) bezeichnet den prozentualen Anteil von ( $G_2$ -Kreuzungen mit mindestens einem  $3xP3-EYFP^+$  Sohn) / (fertile  $G_2$ -Kreuzungen). Der Mittelwert und die Spanne von 9 unabhängigen Kombinationen sind angegeben.

<sup>d</sup> Prozentualer Anteil von ( $G_2$ -Kreuzungen mit mindestens einem  $3xP3-EYFP^+$  und  $3xP3-ECFP$  [ohne Jumpstarter] Sohn) / (fertile  $G_2$ -Kreuzungen), siehe auch Kap. 4.2.3.2.

<sup>e</sup> Gesamtzahl untersuchter  $G_3$ -Männchen.

<sup>f</sup> Transpositionsfrequenz (nach Berg & Spradling, 1991) ist definiert als ( $[\Sigma 3xP3-EYFP^+$  Männchen] /  $[\Sigma$  Männchen<sup>e</sup>]  $\times 9/4$ , da nur 4 von 9 mutierbaren Chromosomenarmen analysiert wurden. Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes sind angegeben.

<sup>g</sup> Prozentualer Anteil von ( $G_2$ -Kreuzungen mit mindestens einem  $3xP3-EYFP^+$  Sohn mit sichtbarer adulter  $3xP3$ -unabhängiger Fluoreszenz) / (fertile  $G_2$ -Kreuzungen).

denen stabile und unabhängige Neuinsertionen isoliert werden konnten, lag mit 41-67% niedriger als die Sprungrate. Bezogen auf die Gesamtzahl durchgemusterter Männchen und extrapoliert auf alle Chromosomen wurden Transpositionereignisse mit einer Frequenz von durchschnittlich 12,3% (*{GAL4Δ}*), 8,4% (*{GAL4Δ+UAS}*) bzw. 13,0% (*{tTA}*) erhalten.

Zur Analyse der Enhancernachweisfunktion wurden Neuinsertionen auf ein *3xP3*-unabhängiges Fluoreszenzmuster hin untersucht. Aus ungefähr der Hälfte der  $G_2$ -Kreuzungsansätze mit *{GAL4Δ}* und *{GAL4Δ+UAS}* entstanden dysgene Männchen mit einem *3xP3*-unabhängigen Fluoreszenzmuster im adulten Entwicklungsstadium. Mit dem *{tTA}*-Mutator hingegen wurden Enhanceraktivitäten nur selten nachgewiesen (Tab. 5.7). Da alle drei Mutatoren den gleichen enhancersensitiven *P*-Basalpromotor enthalten, weist dieses Ergebnis auf eine niedrigere Sensitivität der *tTA/EYFP*-Reporterkombination hin (verglichen mit *GAL4Δ/EYFP*).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß alle drei Mutortypen in ungefähr 50% der angesetzten  $G_2$ -Einzelkreuzungen stabile und unabhängige Neuinsertionen hervorbrachten. Somit erwiesen sich in dieser Arbeit konstruierte *piggyBac*-Mutatoren als effizient einsetzbar zur insertionellen Mutagenese.

#### 5.3.2.2 Analyse von *{GAL4Δ}*- und *{tTA}*-Neuinsertionen hinsichtlich rezessiver Letalität

Eine wichtige Kenngröße für insertionelle Mutageneseprojekte in größerem Maßstab ist die Frequenz, mit der essentielle Genfunktionen durch Transposoninsertionen ausgeschaltet werden können. Um zu untersuchen, ob *{GAL4Δ}*- und *{tTA}*-Neuinsertionen *Drosophila*-Gene zur Letalität mutierten, wurden die Neuinsertionen stabil als Linien etabliert und auf rezessive Letalität hin analysiert (siehe Kap. 4.2.3.2). Von 236 etablierten Linien zeigten 14 einen rezessiv letalen und 4 einen rezessiv semiletalen Phänotyp (Definition semiletal: weniger als 10% homozygote Nachkommen). Dies entspricht einer *piggyBac*-Letalitätsfrequenz von 7,6%. Dieser Wert ist vergleichbar zur *P*-Letalitätsfrequenz, die mit 9% angegeben wird (Bellen, 1999; Peter et al., 2002).

Zur molekularen Lokalisierung dieser 18 Insertionen im *Drosophila*-Genom wurden flankierende Sequenzen mittels inverser PCR bestimmt (siehe Kap. 4.1.4.2). In Tab. 5.8 sind die molekularen Charakteristika der mutierten Loci zusammengestellt: 9 von 18 letalen oder semiletalen Neuinsertionen liegen in bereits eingehend charakterisierten Genen. Die anderen 9 Neuinsertionen verteilen sich auf nicht funktionell charakterisierte, vom *Drosophila*-Genomprojekt vorhergesagte Gene (4 Insertionen; erkennbar an der CG-(computer gene)-Nummer), auf intergenische Regionen (4 Insertionen) und eine *{GAL4Δ}*-Insertion befindet sich in einer bislang nicht annotierten EST-(expressed sequence tag)-Kollektion. Innerhalb der Genregionen konnten die Insertionen funktionellen Abschnitten (5'UTR [5' untranslatierte Region], Exon, Intron oder stromabwärts der transkribierten Region) zugeordnet werden.

STAMM		LOKALISIERUNG DER INSERTION <sup>a</sup>				GEN		
Linie#	Mutator	genetisch		molekular <sup>a</sup>	Name		funktioneller Abschnitt	
<b>A. LETAL:</b>								
29	{ <i>GAL4Δ</i> }	II	2L	AE003628.1	118436	<i>CG5367</i>		Intron
43	{ <i>GAL4Δ</i> }	III	3R	AE003764.2	225029	<i>CG14066</i>	<i>larp</i>	Exon
51	{ <i>GAL4Δ</i> }	III	3L	AE003532.2	126258	<i>CG13462</i>		stromabwärts
52	{ <i>GAL4Δ</i> }	III	3L	AE003515.2	16226	<i>CG8522</i>	<i>HLH106</i>	Exon
80	{ <i>GAL4Δ</i> }	II	2L	AE003669.2	232068	<i>CG8676</i>	<i>Hr39</i>	Intron
127	{ <i>GAL4Δ</i> }	II	2R	AE003795.2	3979	<i>CG9277</i>	<i>betaTub56D</i>	Intron
128	{ <i>GAL4Δ</i> }	III	U	AE003072.2	6877	nicht annotiert <sup>b</sup>		EST
139	{ <i>GAL4Δ</i> }	II	2R	AE003462.1	161661	<i>CG3735</i>		Exon
150	{ <i>GAL4Δ</i> }	III	3R	AE003779.1	136330	<i>CG1856</i>	<i>ttk</i>	Intron
151	{ <i>GAL4Δ</i> }	II	2L	AE003623.1	248959	---		Intergenisch
155	{ <i>GAL4Δ</i> }	II	2L	AE003647.1	129102	<i>CG18482</i>		Intron
166	{ <i>GAL4Δ</i> }	II	2R	AE003826.2	25487	<i>CG7734</i>	<i>shn</i>	Intron
189	{ <i>tTA</i> }	II	2R	DMU04853.3	11602	---		Intergenisch
233	{ <i>tTA</i> }	III	3R	AE003770.1	165475	<i>CG7581</i>	<i>Bub3</i>	5' UTR
<b>B. SEMILETAL:</b>								
185	{ <i>tTA</i> }	II	2R	AE003799.2	60718	<i>CG5170</i>	<i>Dp1</i>	Intron
199	{ <i>tTA</i> }	II	2L	AE003611.2	193888	---		Intergenisch
214	{ <i>tTA</i> }	II	2R	AE003785.2	3663	---		Intergenisch
236	{ <i>tTA</i> }	III	3R	AE003749.2	46443	<i>CG6875</i>	<i>asp</i>	Exon

**Tab. 5.8: Lokalisierung rezessiv letaler und semiletaler {*GAL4Δ*}- und {*tTA*}-Neuinsertionen.**

Für jede Insertion, bezeichnet über eine Liniennummer, sind der zugrundeliegende Mutator, die genetisch bestimmte zweit- oder drittrchromosomale und die über inverse PCR bestimmte molekulare Lokalisierung angegeben. Für intragenische Insertionen sind darüber hinaus Name und funktioneller Abschnitt des betroffenen Gens aufgeführt.

<sup>a</sup> Zur molekularen Lokalisierung sind der Chromosomenarm (R = rechter, L = linker Arm), die Bezeichnung des genomischen *Drosophila*-Gerüsts sowie die Nukleotidposition der *piggyBac*-spezifischen *TTAA*-Zielstelle (fettgedrucktes Nukleotid) angegeben (Referenz-Datenbank: <http://www.fruitfly.org/annot/release2.html>).

<sup>b</sup> Für den Insertionslocus der Linie {*GAL4Δ*}#128 ist eine Kollektion von 21 ESTs aber kein Computergen annotiert.

### 5.3.2.3 Validierung rezessiv letaler Mutatorlinien

Eine Transposoninsertion und die rezessive Letalität müssen nicht notwendigerweise zusammenhängen, denn der chromosomale Hintergrund kann ebenfalls Mutationen tragen. Um eine Korrelation der Mutatorinsertion mit dem rezessiv letalen Phänotyp herzustellen, wurden Reversionsexperimente durchgeführt. Wird nach Remobilisierung, Exzision und Auskreuzung des Mutatortransgens (siehe Kap. 4.2.4.2) der ursprünglich letale Phänotyp zur homozygoten Vitalität revertiert, kann die Mutatorinsertion als kausal für die Letalität betrachtet werden.

9 der 14 rezessiv letalen Linien zeigten Reversion zur Vitalität. Für diese Linien konnten die Mutatorinsertionen als Letalinsertionen validiert werden (Tab. 5.9). 4 rezessiv letale Linien produzierten auch nach Exzision des Mutators keine homozygoten Nachkommen und zeigten damit keine Korrelation zwischen Mutatorinsertion und letalem Phänotyp. Für eine Linie ({*tTA*}#233) konnten keine Exzisionsereignisse des Mutatortransgens festgestellt werden.

*piggyBac* besitzt die unter eukaryontischen Klasse II Transposontypen einzigartige Eigenschaft, daß die DNA-Zielstellensequenz nach einer Exzisionsreaktion molekular unverändert

vorliegt (Elick et al., 1996). Um zu untersuchen, ob nach *piggyBac*-Remobilisierung die ursprüngliche genomische Sequenz wiederhergestellt wird, wurde in exemplarisch drei revertierten *{GAL4Δ}*-Linien die Sequenz der ursprünglichen *piggyBac*-Insertionsstelle bestimmt (siehe Kap. 4.1.4.3). Dabei konnte die Präsenz einer verglichen mit der *Drosophila*-Genomsequenz molekular unveränderten *piggyBac*-spezifischen DNA-Zielstelle (*TTAA*) bestätigt werden.

STAMM	REVERSION	BEZUG ZU <i>P</i> -ELEMENTEN	
		<i>P</i> -Allel des Gens ?	Distanz zur nächsten <i>P</i> -Insertion
Linie#			
<b>A. LETAL:</b>			
29	JA	NEIN	27,7 kb <i>l(2)k06709</i>
43	JA	NEIN	3,2 kb <i>l(3)06487</i>
51	JA	NEIN	13,9 kb <i>l(3)rO220</i>
52	JA	NEIN	0,9 kb <i>P{SUPor-P}KG03723</i>
80	JA	JA	5,4 kb <i>P{EP}Hr39[EP2490]</i>
127	JA	JA	0,05 kb <i>P{EP}betaTub56D[EP2640]</i>
128	JA	NEIN	n.d. <sup>b</sup>
139	JA	NEIN	0,5 kb <i>P{EP}EP2311</i>
150	JA	JA	0,9 kb <i>P{EP}tk[EP621]</i>
151	NEIN	---	5,3 kb <i>P{GT1}BG02711</i>
155	NEIN	NEIN	31,9 kb <i>P{GT1}BG00946</i>
166	NEIN	JA	1,3 kb <i>P{EP}shn[EP2139]</i>
189	NEIN	---	11,3 kb <i>P{EP}EP2427</i>
233	--- <sup>a</sup>	NEIN	6,7 kb <i>P{SUPor-P}KG01353</i>
<b>B. SEMILETAL:</b>			
185	n.d.	JA	0,4 kb <i>P{EP}Dp1[EP2249]</i>
199	n.d.	---	17,2 kb <i>P{EP}Beach1[EP2299]</i>
214	n.d.	---	1,7 kb <i>P{EP}BcDNA[EP2646]</i>
236	n.d.	JA	11,3 kb <i>P{GT1}BG02218</i>

**Tab. 5.9: Reversionsanalyse letaler Insertionen und Bezug letaler und semiletaler Insertionen zu *P*-Element-Insertionen.**

Für Letalinsertionen ist die genetische Revertierbarkeit des Phänotyps zur Vitalität im homozygoten Zustand angegeben. Der Bezug zu *P*-Element-Insertionen wird, sofern vorhanden, durch ein in der Genomannotationsdatenbank (<http://www.fruitfly.org/annot/>) bereits aufgeführtes *P*-Allel des betroffenen Gens hergestellt. Darüber hinaus ist die räumliche Distanz zur nächstgelegenen *P*-Insertion aufgeführt.

<sup>a</sup> Exzisionsereignisse wurden nicht gefunden unter 600 auf Abwesenheit von EYFP-Fluoreszenz untersuchten Fliegen.

<sup>b</sup> n.d.: nicht bestimmt

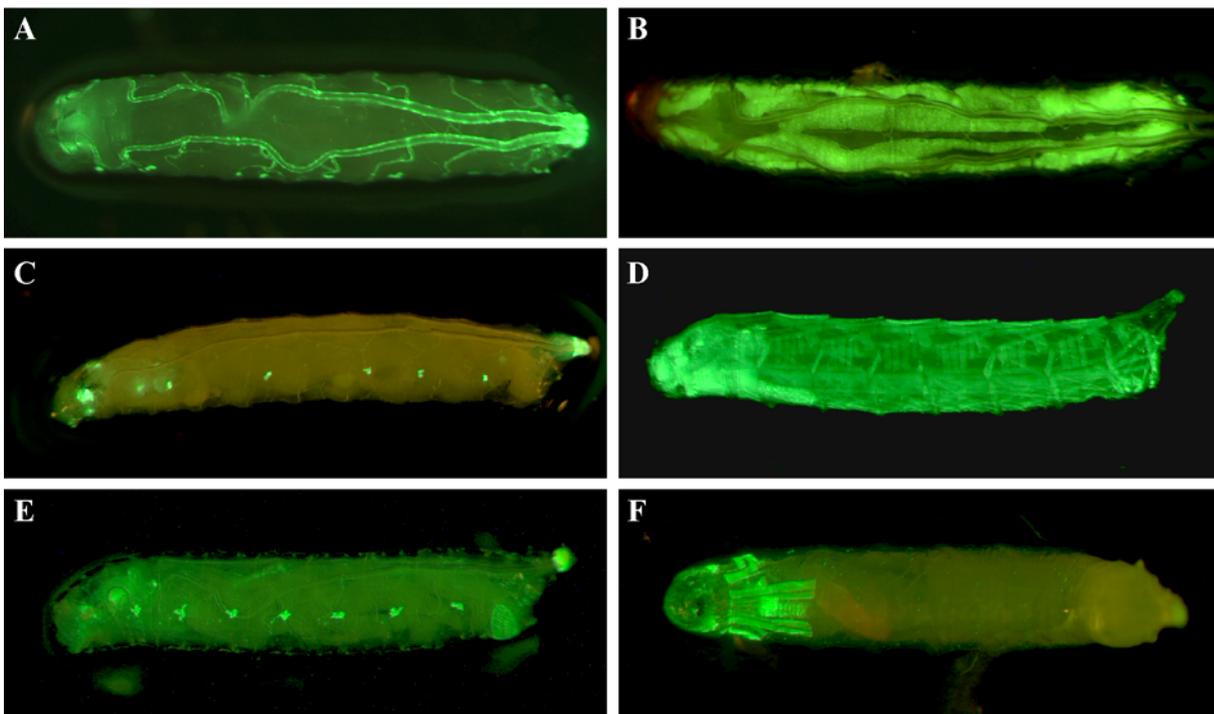
Zur funktionellen Genanalyse sind insbesondere validierte Letalinsertionen von Interesse, welche in Loci liegen, die bislang nicht durch *P*-Elemente adressiert wurden. 6 der 9 validierten Mutatorinsertionen betreffen Gene, für die kein letales *P*-Allel verfügbar ist (Tab. 5.9). Der Abstand der *piggyBac*-Insertion zur nächstgelegenen dokumentierten *P*-Element-Insertion betrug in mehreren Fällen ungefähr 30 kb.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß in dieser Arbeit vorgestellte *piggyBac*-basierte Mutatoren Charakteristika besitzen, die ihre Anwendung zur insertionellen Mutagenese auch im größeren Maßstab ermöglichen: Sie erwiesen sich als effizient mobilisierbar und mutierten essentielle Genfunktionen mit hoher Frequenz und validierbar zur Letalität.

#### 5.3.2.4 *In vivo* Enhancernachweis in larvalen Entwicklungsstadien

Mit  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  ist Enhanceraktivität unabhängig von einem separaten Reportertransgen nachweisbar (siehe Abb. 5.17). Dies bringt den Vorzug mit sich, daß Mutatorlinien in jeder Generation auf ein Enhancermuster hin analysiert werden können.

Um die Anwendbarkeit von EYFP als nicht invasiver *in vivo* Reporter in larvalen Stadien zu prüfen, wurden  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ -Neuinsertionen in diesen Stadien auf ein Fluoreszenzmuster hin analysiert. In (Abb. 5.21A-F) dokumentierte Fluoreszenzmuster sind aufgrund ihrer Gewebs- oder Zelltypspezifität vom larvalen *3xP3*-vermittelten Markerfluoreszenzmuster abgrenzbar, das im larvalen Lichtsinnesorgan, in Teilen des Nervensystems, im Hinterdarm sowie in den Analplatten auftritt (Horn, 1999; Horn et al., 2000).

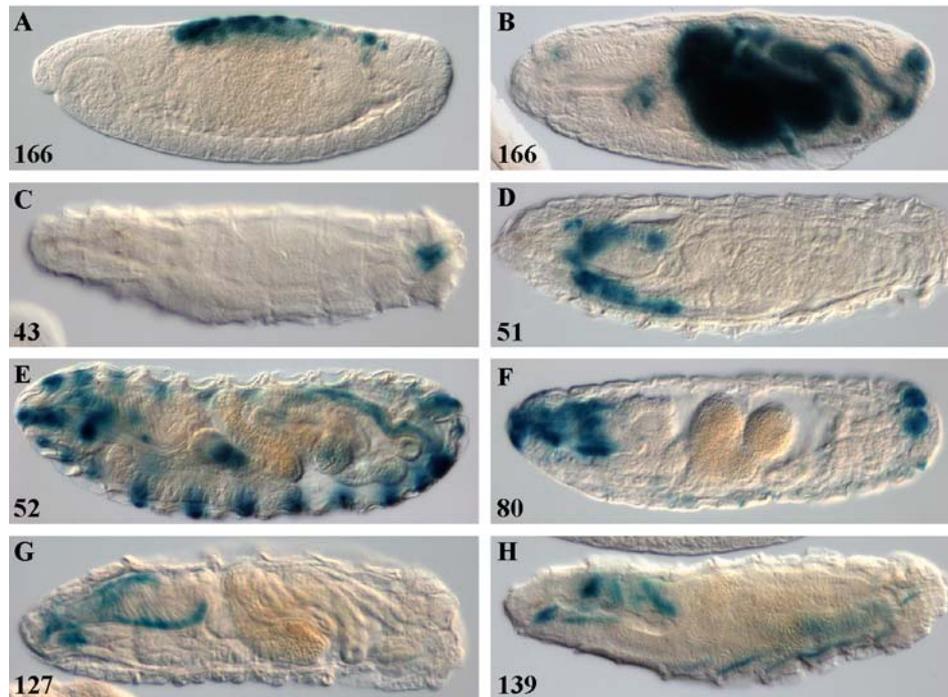


**Abb. 5.21: Beispiele larvaler Enhanceraktivitäten in  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ -Neuinsertionen.**

$\{GAL4\Delta+UAS\}$ -Neuinsertionen visualisieren Enhanceraktivität im Tracheensystem (A; Linie#258), im Fettkörper (B, Linie#254), in den posterioren Spirakeln und nicht identifizierten lateralen Zellen (C; Linie#249), im Muskelgewebe (D; Linie#251), in den posterioren Spirakeln und in den Oenozysten (E; Linie#252) bzw. in einigen thorakalen Muskeln (F; Linie#257).

#### 5.3.2.5 *In situ* Enhancernachweis in embryonalen Entwicklungsstadien

Um zu untersuchen, ob das  $\{GAL4\Delta\}$ -Mutatortransgen Enhanceraktivität auch in embryonalen Stadien aufspürte, wurden  $Dm[\{GAL4\Delta\}]$ -Linien gegen eine *lacZ* unter *UAS*-Kontrolle exprimierende Reporterlinie gekreuzt. Embryonen dieser Kreuzung wurden dann *in situ* mittels histochemischer Färbung analysiert (siehe Kap. 4.4.4). Ein spezifisches Färbemuster trat in 7 von 12  $Dm[\{GAL4\Delta\}]$ -Linien in verschiedenen Geweben auf (Abb. 5.22A-H).



**Abb. 5.22: Histochemischer *in situ* Nachweis von Enhanceraktivitäten in Stadien der Embryogenese.**

Die Embryonen entstammen der Kreuzung rezessiv letaler  $Dm\{GAL4\}$ -Linien gegen eine  $UASp-lacZ$ -Reporterlinie. Linie#166 zeigt Färbung dorsal im Stadium der Keimstreifverkürzung (A) und endodermal im Stadium des Dorsalschlusses (B). Linie#43 zeigt Färbung in den posterioren Spirakeln (C), Linie#51 in den Speicheldrüsen (D), Linie#52 in einem Segmentpolaritätsmuster (E), Linie#80 im Kopf und in den posterioren Spirakeln (F), Linie#127 im Pharynx (G) sowie Linie#139 in einzelnen Muskeln (H). Die dorsale Seite der Embryonen ist oben, die anteriore links.

Als Ergebnis der Pilot-Mutagenese wurden letale Insertionen in bereits charakterisierten Genloci erhalten (Tab. 5.8). Zwei Mutatorinsertionen,  $\{GAL4\}\#150$  und  $\{GAL4\}\#166$ , liegen in Genen, deren embryonale Expressionsmuster bereits publiziert sind.

Im Falle von *ttk* reproduzierte die Mutator/Reporter-Kombination das Muster maternaler oder zygotischer *ttk*-Expression nicht (Daten nicht gezeigt und Brown & Wu, 1993). Dennoch mutiert die Insertion den *ttk*-Locus zur Letalität, denn der Phänotyp erwies sich als revertierbar und zudem erfolgte keine Komplementation der Insertion mit zwei als letal beschriebenen *ttk*-Allelen (siehe Kap. 4.2.4.3).  $\{GAL4\}\#150$  dient somit als Fallbeispiel für eine im Intronbereich lokalisierte und dennoch eindeutig validierte Letalinsertion, welche die genspezifischen Enhancer jedoch nicht aufspürt.

$\{GAL4\}\#166$  hingegen visualisiert *shn*-spezifische Enhancer (vgl. Abb. 5.22A,B und Staehling-Hampton et al., 1995): In der Amnioserosa (Abb. 5.22A) sowie im Mitteldarm (Abb. 5.22B) nachgewiesene *lacZ*-Reportermuster sind remineszent für das publizierte *shn*-Transkriptmuster. Allerdings ist eine erhebliche zeitliche Verzögerung gegenüber der endogenen *shn*-Expression zu beobachten. Das dorsale *shn*-Transkriptmuster tritt im Blastodermstadium auf, wurde in Embryonen mit der Mutator/Reporter-Kombination jedoch erst im Stadium der Keimstreifverkürzung beobachtet. Für dieses keimstreifverkürzte Stadium ist das endodermale *shn*-Transkriptmuster beschrieben, eine endodermale  $\beta$ Gal-Aktivität des Reporters wurde jedoch erst nach Vollendung des Dorsalschluß-

stadiums nachgewiesen. Die zeitliche Latenz beruht vermutlich auf der indirekten Nachweismethode eines Enhancers über den sekundären *lacZ*-Reporter. Interessanterweise konnte die Letalität von *{GAL4Δ}#166* nicht durch Exzision des Mutatortransgens revertiert werden und es erfolgte Komplementation mit zwei letalen *shn*-Allelen (siehe Kap. 4.2.4.3). Eine Korrelation des rezessiv letalen Phänotyps mit der Mutatorinsertion besteht folglich nicht. *{GAL4Δ}#166* dient somit als Musterbeispiel für eine intronlokalisierte Insertion, welche zwar die Enhanceraktivität des korrespondierenden Gens visualisiert aber nicht kausal für den beobachteten Letalitätsphänotyp ist.

#### 5.3.2.6 Hinweise auf signalverstärkten Enhancernachweis mit *{GAL4Δ+UAS}*

Der *{GAL4Δ+UAS}*-Mutator verwendet das Transformationsmarkergen *EYFP* auch als Reporter (siehe Kap. 5.3.1.2.2). Folgende Ergebnisse geben Hinweise darauf, daß mit diesem Mutator eine autostimulatorische Signalverstärkung stattfinden kann: Erstens wiesen viele der *{GAL4Δ+UAS}*-Neuinsertionen verglichen mit *{GAL4Δ}*-Neuinsertionen ein sehr intensives Fluoreszenzsignal in adulten und auch in larvalen Geweben auf. Zweitens zeigten einige *{GAL4Δ}*-Neuinsertionen in Kombination mit einer *Dm[Bac{3xP3-DsRed; UASp-EYFP-K10}]*-Reporterlinie sowohl *EYFP* als auch *DsRed*-Fluoreszenz (N. Offen, pers. Mitteilung). Dies legt nahe, daß *UAS*-gebundenes *GAL4* auch am weiter entfernt liegenden *3xP3*-Promotor transaktivierend wirken kann. Einen dritten Hinweis ergab die Funktionsanalyse eines Reportertransgens (siehe Kap. 4.2.2, R. Ackermann, pers. Mitteilung): Nachkommen der Kreuzung von *Dm[Her{3xP3-ECFP; UASp-EYFP-K10}]*-Linien gegen eine *en-(engrailed)-GAL4*-Transaktivatorlinie zeigten das *en-GAL4*-vermittelte Expressionsmuster sowohl im *EYFP* als auch im *ECFP*-Kanal (Daten nicht gezeigt). Diese Hinweise deuten auf das Vorhandensein einer autostimulatorischen Schleife zumindest in einigen *{GAL4Δ+UAS}*-Neuinsertionen hin. Dies würde die Sensitivität des Enhancernachweises erhöhen.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß für *GAL4Δ*-basierte Mutatoren Enhanceraktivität in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien sowie mit verschiedenen Methoden (*in vivo* und *in situ*) nachweisbar ist. Der Enhancernachweis stellt einen Ausgangspunkt dar zur Identifizierung, Klonierung und zur detaillierten Analyse gewebs-, zelltyp-, stadien- oder geschlechtsspezifischer Enhancermodule mit dem finalen Ziel, diese in ein transgenbasiertes SIT-System einzubinden.

## 6 Diskussion

Mit der erfolgreichen Keimbahntransformation von ökonomisch und medizinisch bedeutsamen Insekten wurde die Grundlage zur gentechnischen Modifikation dieser Spezies gelegt. Bevor das Potential des in dieser Arbeit vorgestellten transgenbasierten Sterilisierungssystems diskutiert wird, soll auf eine naheliegende Anwendung der Transformationstechnologie eingegangen werden: Insekten mit einem fluoreszierenden Transformationsmarker können zur Erfolgskontrolle von SIT-Programmen eingesetzt werden.

### 6.1 Anwendungspotential fluoreszenzmarkierter Insekten zur SIT-Erfolgskontrolle

Zur Erfolgskontrolle einer SIT-Kampagne wird das Verhältnis von freigesetzten sterilisierten Schadinsekten zur Wildpopulation kontinuierlich bestimmt, indem Insekten in Lockstofffallen gefangen und ausgewertet werden. Dazu müssen sterilisierte und fertile Insekten unterscheidbar sein. Daher werden Puppen nach dem Sterilisierungsvorgang mit einem Fluoreszenzfarbstoff gemischt, so daß schlüpfende Insekten fluoreszierende Partikel adsorbieren (Übersichtsartikel: Hagler & Jackson, 2001). Unter Schwarzlicht können die Lockstofffallen dann hinsichtlich des Verhältnisses steriler zu fertiler Insekten ausgezählt werden. Diese Prozedur ist jedoch arbeitsintensiv, somit kostenintensiv und zudem anfällig für Interpretationsfehler.

Eine Verbesserungsmöglichkeit könnten transgene Stämme des Schadinsekts bieten, die ein Fluoreszenzmarkergen exprimieren (Robinson & Franz, 2000): Der Fluoreszenzphänotyp sollte dazu leicht erkennbar sein (intensives Signal) und sich mit hoher Penetranz ausprägen. Diese Kriterien können durch Auswahl einer hinsichtlich Expressivität und Penetranz geeigneten Transgeninsertion erfüllt werden. Als Fluoreszenzprotein bietet sich DsRed an, das gegenüber EGFP (und seinen Spektralvarianten) das günstigere Signal-zu-Rausch-Verhältnis besitzt (siehe Kap. 4.3.1; Patterson et al., 2001) und zudem eine höhere Proteinstabilität aufweist (Matz et al., 1999). DsRed-Fluoreszenz kann in toten Mittelmeerfruchtfliegen selbst nach einigen Wochen noch eindeutig nachgewiesen werden (A. Handler, G. Franz, pers. Mitteilung).

Bevor transgene, fluoreszenzmarkierte Stämme zur Anwendung kommen, sollte der Einfluß des Fluoreszenzproteins auf die Fitness, die Sinneswahrnehmung bzw. verhaltensbiologische Aspekte des Insekts evaluiert werden. Bisher ist nicht bekannt, ob z.B. die Expression fluoreszierender Proteine im Komplexauge eines Insekts die Lichtsinneswahrnehmung stört und damit die Kompetitivität des Insekts erniedrigt. Neben dem in dieser Arbeit vorgestellten, augenspezifischen (3xP3-basierten) Markersystem (siehe Kap. 5.1.1) wurden Fluoreszenzproteingene auch unter Kontrolle in allen Geweben aktiver Promotoren (z.B. der *Drosophila*-Promotoren *polyubiquitin* oder *actin5C*; Übersichtsartikel: Horn et al., 2002) zur Insekten-Keimbahntransformation erfolgreich angewendet. Möglicherweise ist *DsRed*, das unter Kontrolle eines ubiquitär aktiven Promotors eindeutig nachweisbar exprimiert wird, für dieses Anwendungsziel am besten geeignet (Handler & Harrell, 2001).

## 6.2 Anwendungspotential des transgenbasierten Sterilisierungssystems

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit lag in der Konstruktion und Analyse einer alternativen Methode zur konventionellen physikalischen Sterilisierung von Schadinsekten. Dazu wurde ein transgenbasierter Ansatz, der suppressierbare embryospezifische Letalität vermittelt, im Modellinsekt *Drosophila* realisiert. In diesem Abschnitt soll das Anwendungspotential dieser neuartigen Sterilisierungsmethode diskutiert werden.

### 6.2.1 Schadinsekten von Bedeutung für SIT-Anwendungen

Obwohl sich die SIT als ökologisch verträgliche und wirtschaftlich sinnvolle (Enkerlin & Mumford, 1997; Mumford, 2000) genetische Kontrollmaßnahme erwiesen hat, ist ihre Anwendung gegenwärtig auf wenige Schädlinge beschränkt (Übersicht in: IAEA, 2003; Tab. 6.1).

Schadspezies		Produktionskapazität (Millionen Puppen pro Woche)
Diptera: Tephritidae	<i>Ceratitis capitata</i>	2300
	<i>Bactrocera spp.</i>	440
	<i>Anastrepha spp.</i>	340
Diptera: Calliphoridae	<i>Cochliomyia hominivorax</i>	500
Diptera: Anthomyiidae	<i>Delia antiqua</i>	7,5
Diptera: Culicidae	<i>Anopheles albimanus</i>	7
Diptera: Glossinidae	<i>Glossina spp.</i>	0,13
Lepidoptera: Gelechiidae	<i>Pectinophora gossypiella</i>	84
Lepidoptera: Tortricidae	<i>Cydia pomonella</i>	15

**Tab. 6.1: Weltweite Produktionskapazitäten zur Erzeugung von sterilen Insekten für SIT-Kampagnen.**  
(Quelle: World-Wide Directory of SIT Facilities: <http://www-ididas.iaea.org/ididas/start.htm>)

Mit durchschlagendem Erfolg wird die SIT zur Bekämpfung der Mittelmeerfruchtfliege *Ceratitis capitata* eingesetzt. Dieser Erfolg geht zum einen auf die Anwendung eines klassisch-genetischen Systems zur Abtötung der Weibchen zurück (siehe Kap. 6.5.1; Franz et al., 1994; Hendrichs et al., 1995; Robinson, 2002a). Zum anderen konnte für die Mittelmeerfruchtfliege ein Bestrahlungsprotokoll etabliert werden, das eine irreversible Sterilisierung ermöglicht, ohne dabei die Fitness übermäßig zu beeinträchtigen (siehe Kap. 6.3.1; Calcagno et al., 2002; Lux et al., 2002). Für Dipterenpezies, insbesondere für die Mittelmeerfruchtfliege, wird ein Wechsel zur transgenbasierten Sterilisierungstechnologie nur dann in Frage kommen, wenn diese hinsichtlich Fitnesserhaltung dem strahlungs-basierten Ansatz überlegen sein sollte.

Eine andere Situation liegt bei Insekten der Ordnung *Lepidoptera* vor, zu denen einige der ärgsten Schädlinge agrarwirtschaftlicher Produkte zählen (Pedigo, 2002). Die SIT als Kontrollmaßnahme spielt hier bislang eine untergeordnete Rolle, abgesehen von wenigen Spezies wie

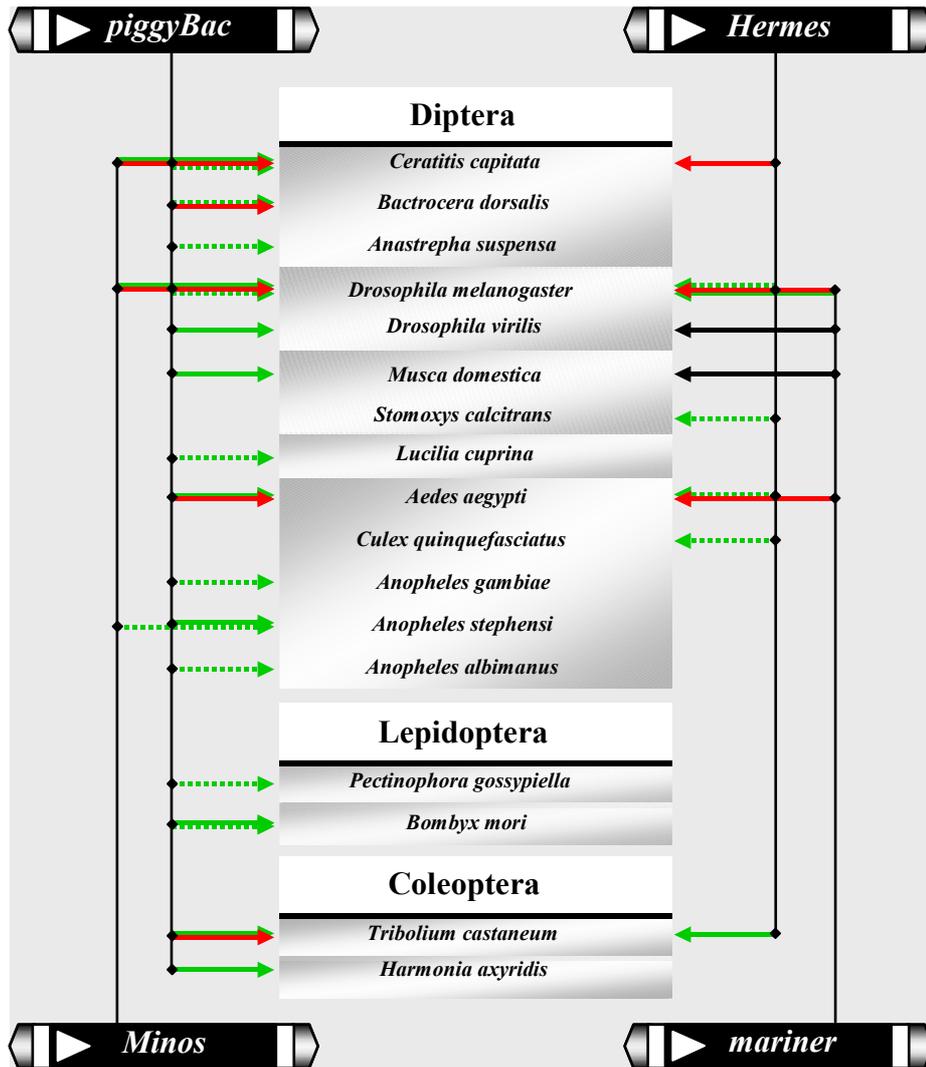
dem Roten Kapselwurm (*Pectinophora gossypiella*) oder dem Apfelwickler (*Cydia pomonella*) (Tab. 6.1; Walters et al., 2000; Robinson, 2002b). Zur irreversiblen Sterilisierung von Lepidopteren mit holozentrischen Chromosomen sind hohe Strahlungsdosen erforderlich (siehe Kap. 3.4.2; LaChance et al., 1967), die die Kompetitivität massiv erniedrigen. Als Alternative zur Sterilisierung der freizusetzenden Generation ist das Konzept der Induktion von F<sub>1</sub>-Sterilität vorgeschlagen worden (Proverbs & Newton, 1962): Dabei wird die Spezies mit einer substerilisierenden Dosis an  $\gamma$ -Strahlen behandelt, so daß die F<sub>1</sub>-Generation überlebt, aber aufgrund akkumulierter Mutationen steril ist. F<sub>1</sub>-sterilisierte Lepidopteren erwiesen sich als hinreichend kompetitiv (Studie zur F<sub>1</sub>-Sterilität des Apfelwicklers: Bloem et al., 1999). Dennoch fand dieses Konzept bislang keine über Pilotversuche hinausgehende Anwendung (Carpenter & Gross, 1993; Robinson, 2002b), da nach der Freisetzung die entstehende F<sub>1</sub>-Generation den agrarwirtschaftlichen Schaden zunächst verstärken würde. Bei Lepidopteren besteht demnach ein erhebliches Optimierungspotential hinsichtlich einer wirksamen Sterilisierungstechnologie.

## 6.2.2 Übertragbarkeit des transgenbasierten Sterilisierungssystems auf Schadinsekten

Das transgenbasierte Sterilisierungssystem könnte direkt auf eine Schadspezies übertragen werden, sofern die Funktionen aller Einzelkomponenten von *Drosophila* zur Schadspezies hin phylogenetisch konserviert sind. In diesem Abschnitt wird die Datenlage zur Übertragbarkeit des Transformationssystems, des Tet-Systems, des *hid*-Gens sowie der regulatorischen Sequenzen von Zellularisierungsgenen dargestellt.

### 6.2.2.1 Übertragbarkeit des Transformationssystems

Transgene wurden mittels eines Keimbahntransformationssystems im *Drosophila*-Genom verankert, das auf dem Breitband-Transposon *piggyBac* und den Transformationsmarkergenen *3xP3-ECFP* und *3xP3-EYFP* beruht (Horn, 1999; Horn & Wimmer, 2000). In Abb. 6.1 ist der gegenwärtige Stand der Insekten-Transformationstechnologie zusammengefaßt. Keimbahntransformation konnte bereits für einige der SIT-relevanten Spezies (Tab. 6.1) etabliert werden. Im Vergleich zu den Transposons *Hermes*-, *mariner*- und *Minos*- wurden insbesondere *piggyBac*-Transformationsvektoren mit Fluoreszenzmarkern, zu denen auch 3xP3-basierte Marker zählen, mit großem Erfolg eingesetzt (Übersichtsartikel: Horn et al., 2002). Es sei an dieser Stelle angemerkt, daß das transgenbasierte Sterilisierungssystem dieser Arbeit nicht vom 3xP3-Marker abhängig ist. Sollte sich ein anderes Transformationssystem in einer Schadspezies bewährt haben, können beschriebene Transgenkonstrukte auch mit diesem im Genom integriert werden.



**Abb. 6.1: Transformationstechnologie für Insektenarten.**

Auf *piggyBac*, *Hermes*, *Minos* und *mariner* basierte Keimbahntransformationen sind durch Pfeile dargestellt. Die Verwendung speziesspezifischer Augenpigmentierungsmarker (rot), einer PCR-basierten Strategie (schwarz) oder fluoreszierender Proteine (grün) zum Transformationsnachweis ist angegeben. Innerhalb der Fluoreszenzmarker werden 3xP3-basierte (durchgezogene Linie) von auf anderen Promotoren basierten (gepunktete Linie) Transformationsmarkern unterschieden. Die Zugehörigkeit der Spezies zu den Familien oder Superfamilien der *Tephritidae*, *Drosophilidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae*, *Culicidae*, *Gelechiidae*, *Bombycidae*, *Tenebrionidae* und *Coccinellidae* (von oben nach unten) ist durch Grauschattierung hervorgehoben. Referenzen zu den einzelnen Transformationsexperimenten finden sich in Handler (2002), Atkinson & James (2002) und Horn et al. (2002).

#### 6.2.2.2 Übertragbarkeit des Tet-Systems

Die Funktionalität des Tet-Systems konnte in einem breiten Organismenspektrum demonstriert werden, das Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*; *Candida spp.*), eine kollektive Amöbe (*Dictyostelium discoideum*), Taufliegen (*Drosophila melanogaster*), Mäuse, Ratten sowie Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) umfaßt (Übersichtsartikel: Baron & Bujard, 2000; Gossen & Bujard, 2002). Da das Tet-System in verschiedenen Phyla des Tierreichs funktioniert, sollte es grundsätzlich von *Drosophila* auf eine Schadinsektenart übertragbar sein (unter der Voraussetzung, daß die Spezies keine obligaten bakteriellen Endosymbionten trägt, siehe Kap. 6.3.3).

Neben dem klassischen tTA sind Derivate des Transaktivators entwickelt worden (Knott et al., 2002), von denen tTA2 eine minimalisierte VP16-Transaktivierungsdomäne besitzt (Baron et al., 1997). tTA2 wird in Säugerzellkultur in höheren intrazellulären Konzentrationen als tTA toleriert (Baron et al., 1997). Somit könnte tTA2 zum Einsatz kommen, falls die Insektenpezies sensitiv auf eine transiente frühembryonale tTA-Expression reagiert.

#### 6.2.2.3 Übertragbarkeit von HID als letalitätsvermittelndem Effektor

Das HID-Protein übt proapoptotische Funktion in Zelllinien aus, die von *Drosophila* (SL2), von der Lepidopteren *Spodoptera frugiperda* (SF9; SF21) oder vom Menschen (HeLa; T-Zelllinien) abgeleitet sind (Bergmann et al., 1998; Vucic et al., 1998; Haining et al., 1999; Varghese et al., 2002). Zumindest auf Ebene der Zellkultur kann konstatiert werden, daß HID über den Arthropodenstamm hinausreichend funktionell ist. Dies läßt vermuten, daß *hid*- oder *hid*<sup>Ala5</sup>-basierte Transgene in weiteren Insektenpezies Zelltod auslösen können und somit als letalitätsverursachende Effektorgene einsetzbar sind.

#### 6.2.2.4 Übertragbarkeit von regulatorischen Sequenzen der Zellularisierungsgene

Als zentrale Komponente zur Erzeugung des frühembryonalen Transkriptionspulses fungieren in dem vorgestellten System 5' genregulatorische Sequenzen der Zellularisierungsgene *sry α* und *nullo* (siehe Kap. 5.2.1). In *Drosophila* wurden bislang vier Gene genauer charakterisiert, deren Produkte am Zellularisierungsprozeß beteiligt sind und die zygotisch exprimiert werden: Neben den bereits erwähnten Genen *sry α* (Schweisguth et al., 1989) und *nullo* (Simpson & Wieschaus, 1990) sind dies *bottleneck* (*bnk*; Schejter & Wieschaus, 1993) und *slow-as-molasses* (*slam*; Lecuit et al., 2002). Diesen vier Genen ist ein blastodermspezifisches Transkriptprofil gemeinsam (Vincent et al., 1986; Rose & Wieschaus, 1992; Schejter & Wieschaus, 1993; Lecuit et al., 2002; Stein et al., 2002). Zudem wurden Sequenzähnlichkeiten innerhalb der *sry α*- und *nullo*- 5' genregulatorischen Regionen festgestellt (siehe Abb. 5.5; Ibsouda et al., 1993). Diese Daten weisen auf eine gemeinsame transkriptionelle Regulation hin.

Die Spezies *D. melanogaster* und *D. virilis* sind phylogenetisch mindestens 60 Millionen Jahre voneinander getrennt (Beverley & Wilson, 1984). In *D. virilis* werden sowohl das *sry α*- als auch das *nullo*-Genhomologe blastodermspezifisch exprimiert (Ibsouda et al., 1995; Hunter et al., 2002). *Cis*-regulatorische Motive, die in *D. melanogaster* als notwendig für die Blastodermspezifität der Expression identifiziert wurden, sind in *D. virilis* konserviert (Ibsouda et al., 1995). Darüber hinaus komplementiert ein genomisches *D. virilis nullo*-Konstrukt, wenn in *D. melanogaster* Embryonen exprimiert, den Phänotyp einer *nullo* Mutante (Hunter et al., 2002). Die Interspezieskomplementation ist konsistent mit der Vorstellung, daß sowohl die Funktion *cis*-regulatorischer Kontrollelemente als auch die Proteinfunktion dieses Zellularisierungsgens innerhalb der Familie *Drosophilidae* konserviert sind.

Ob *cis*-regulatorische Sequenzen der Zellularisierungsgene aus *D. melanogaster* außerhalb der *Drosophilidae* blastodermspezifische Expression vermitteln können, ist bislang nicht untersucht. Bedeutsame Dipterenschädlinge der Familie *Tephritidae* (siehe Tab. 6.1) sind phylogenetisch von *Drosophila melanogaster* etwa doppelt so weit entfernt wie *Drosophila virilis* (z.B. sind Mittelmeerfruchtfliege und Taufliege ungefähr 120 Millionen Jahre voneinander getrennt (Beverley & Wilson, 1984)). Aufschluß über die phylogenetische Konservierung der *sry*  $\alpha$ - und *nullo*-Transaktivatorstrukturen könnte über ein Keimbahntransformationsexperiment und nachfolgend über die *in situ* Analyse des embryonalen Expressionsmusters in transgenen Linien erhalten werden.

Eine Alternativstrategie zur direkten Übertragung der Transaktivatorstrukturen besteht in der Klonierung der Gene aus dem Schadinsekt, die zu *sry*  $\alpha$ , *nullo*, *bnk* oder *slam* ortholog sind. Bei den meisten Insektenpezies wird zu Beginn der Embryogenese superfizielle Furchung durchlaufen (Anderson, 1972; Mazumdar & Mazumdar, 2002), so daß Zellularisierungsgene mit zu *sry*  $\alpha$ , *nullo*, *bnk* oder *slam* homologen Funktionen vermutet werden können. Zur Klonierung der *sry*  $\alpha$  und *nullo*-Orthologen könnten bereits vorhandene Sequenzinformationen aus *Drosophila*-Spezies Hilfestellung geben: SRY  $\alpha$  aus *D. melanogaster* zeigt zu seinem Homologen aus *D. virilis* 42% Identität der Aminosäuresequenz (Ibnsouda et al., 1998). *Nullo* aus *D. melanogaster* zeigt zu seinem Homologen aus *D. virilis* 47% Identität der Aminosäuresequenz, wobei die C-terminale Hälfte hochkonservierte Blöcke aufweist (Hunter et al., 2002). Mittels geeigneter Sonden läßt sich möglicherweise die Sequenz des zu *sry*  $\alpha$ , *nullo*, *bnk* oder *slam* orthologen Gens aus der Schadspezies identifizieren. Nachfolgend müßte die regulatorische Region des Gens isoliert und daraufhin analysiert werden, ob sie blastodermspezifische Expression vermitteln kann.

Datenbankanalysen des sequenzierten Genoms des Malariamuskitos *Anopheles gambiae* (Holt et al., 2002) ergaben jedoch, daß von den vier genannten Zellularisierungsgenen lediglich *sry*  $\alpha$  aus *D. melanogaster* ein Orthologes in *A. gambiae* zu haben scheint (E. Wimmer, pers. Mitteilung). Es ist daher fraglich, ob die Klonierung von Zellularisierungsgenen aus phylogenetisch von *Drosophila* weiter entfernten Schadspezies mittels einer Strategie möglich ist, die Sequenzähnlichkeiten voraussetzt. Geeignete *cis*-regulatorische Sequenzen könnten in einer Schadspezies auch unabhängig von Sequenzähnlichkeiten der Gene bzw. Proteine identifiziert werden: Ein zu diesem Zweck konstruiertes Enhancernachweissystem wurde in der vorliegenden Arbeit beschrieben (siehe Kap. 5.3) und wird in Kap. 6.6 diskutiert.

## **6.3 Potentielle technische Probleme des transgenbasierten Sterilisierungssystems**

### **6.3.1 Sind transgenvermittelt sterilisierte Insekten ausreichend kompetitiv ?**

Der Begriff der Kompetitivität eines Insektenorganismus' umfaßt alle Parameter, die die Fitness beeinflussen. Dazu zählen die Fertilität, die Fekundität, der Paarungserfolg, die durchschnittliche Lebensspanne sowie die Fähigkeit zur Verbreitung im Ökosystem. Als mögliche

Ursachen für einen Verlust an Kompetitivität in transgenvermittelt sterilisierten Insekten kommen grundsätzlich in Betracht: die spezifische Transgeninsertion, durchlässige Expression des Transaktivator- bzw. Effektortransgens, die Produktion des Fluoreszenzmarkerproteins sowie der Gründereffekt, der eine genetische Flaschenhalssituation bezeichnet, die bei der Etablierung transgener Stämme, von einem einzigen transgenen Individuum ausgehend, durchlaufen wird.

Daß Transgene, die nur ein Transformationsmarkergen exprimieren, bereits einen massiven negativen Einfluß auf die Fitness haben können, wurde kürzlich an Malariamuskitos (*Anopheles stephensi*) demonstriert (Catteruccia et al., 2003). In Käfigexperimenten mit sowohl wildtypischen als auch bzgl. einer Transgeninsertion homozygoten Muskitos wurde die Frequenz des transgenen Allels im Verlauf der Generationen verfolgt. Bei vier unabhängigen transgenen Linien wurde ein starker Selektionsdruck gegen das transgene Allel festgestellt, so daß transgene Individuen aus der Population binnen 4 bis 16 Generationen verschwanden.

In dieser Arbeit generierte EL#42-Männchen wurden hinsichtlich ihres Paarungserfolges charakterisiert. Dabei wurde ein wesentlicher Einfluß der Augenpigmentierung nachgewiesen (Faktor 5; siehe Abb. 5.14). Das Ergebnis ist konsistent mit früheren Studien an *D. melanogaster*, die bereits auf einen erniedrigten Paarungserfolg in Augenpigmentierungsmutanten hinwiesen (Geer & Green, 1962; Petit, 1958). Der Einfluß der Augenpigmentierung wurde experimentell eliminiert, indem EL#42- gegen *white*-Männchen, beide ohne Augenpigmentierung, um wildtypische Frauen konkurrierten. In dieser Situation besaßen EL#42-Männchen 56% Paarungserfolg. Eine Reduktion des Paarungserfolges von rund 50% wurde in Mittelmeerfruchtfliegen gefunden, die zum Einsatz in einem SIT-Programm bestrahlt worden waren (Calcagno et al., 2002; Lux et al., 2002). Dieser Verlust wird in SIT-Programmen zur Bekämpfung der Mittelmeerfruchtfliege toleriert. Allerdings können beide Werte nicht miteinander verglichen werden, denn die Experimente dieser Arbeit beziehen sich auf eine artifizielle Laborsituation, während der Paarungserfolg bestrahlter Mittelmeerfruchtfliegen gegenüber wildtypischen Artgenossen in Feldkäfigexperimenten gemessen wurde. Ob das Ausmaß des transgenbedingten Fitnessverlustes für eine SIT-Anwendung toleriert werden kann, wird erst die Analyse der Fitness transformierter Schadinsekten zeigen.

Bei der Konkurrenz zu wildtypischen Männchen wurde eine dichteabhängige Zunahme des Paarungserfolges steriler EL#42-Männchen festgestellt (siehe Tab. 5.5). Mehrere Ursachen für diese Dichteabhängigkeit sind vorstellbar: Erstens könnte die Polyandrie der *Drosophila*-Weibchen eine Rolle spielen: *Drosophila*-Weibchen verpaaren sich mehrere Male vor Beginn der Oviposition. Je mehr sterile EL#42-Männchen in der Population vorhanden sind, desto unwahrscheinlicher ist es, daß sich unter den Paarungspartnern eines Weibchens ein fertiles Männchen befindet und dieses Weibchen Eier legt, aus denen Larven schlüpfen. Dies würde bedeuten, daß transgene Spermien weniger erfolgreich sind als wildtypische Spermien. Zweitens könnte die Ursache darin liegen, daß bei *Drosophila* das Weibchen den Paarungspartner auswählt und dabei aktiv wildtypische, augenpigmentierte Männchen bevorzugt. Mit zunehmendem Überschuß steriler EL#42-Männchen sind wildtypische

Männchen jedoch unterrepräsentiert und die Wahrscheinlichkeit nimmt zu, daß ein Weibchen mit einem sterilen Männchen den Paarungsvorgang einleitet, bevor es einem bevorzugten wildtypischen Männchen begegnet.

Eine detailliertere Analyse der Kompetitivität ist in der Schadspezies sinnvoll, nachdem das System übertragen worden ist: In Feldkäfigexperimenten könnten die Ursachen für den Verlust an Kompetitivität aufgeschlüsselt werden. Um den in dieser Arbeit festgestellten negativen Einfluß der Augenpigmentierung *a priori* zu eliminieren, sollte ein wildtypischer Stamm der Schadspezies mit den Transgenen transformiert werden. Anschließend könnten die Kompetitivitätsfaktoren (Fertilität, Fekundität, Paarungserfolg, durchschnittliche Lebensspanne) in Referenz zu konventionell bestrahlten Schadinsekten und kontrolliert zu mehreren nicht transgenen wildtypischen Stämmen analysiert werden.

### 6.3.2 Stabilität der Transgene im industriellen Produktionsmaßstab

Eine SIT-Anwendung bedingt die Züchtung zur Sterilisierung bestimmter Insekten im Maßstab von Millionen Insekten pro Woche (siehe Tab. 6.1). In diesem Maßstab werden auch äußerst unwahrscheinliche Ereignisse eintreten. Sofern die Transgene zum Kompetitivitätsverlust beitragen, bedeutet die Entfernung der Transgene einen Selektionsvorteil für das Individuum. Ein solches Individuum würde sich im Stamm rasant durchsetzen und diesen zusammenbrechen lassen. Deswegen kann ein Selektionsdruck gegen die Transgenpräsenz angenommen werden.

In dieser Arbeit konstruierte Transgeninsertionen tragen flankierende Transposonsequenzen. Die Transgene können somit prinzipiell zu neuen genomischen Loci mobilisiert und schließlich über chromosomale Segregation aus dem Genom entfernt werden. Diese Mobilisierungsreaktion erfordert jedoch die Aktivität einer zu den Zielstellen korrespondierenden Transposase. In dieser Arbeit verwendete *piggyBac*-Transformationsvektoren sind nicht autonom, denn das offene Leseraster des *piggyBac*-Gens ist deletiert (siehe Kap. 5.1.2). Transposaseaktivität kann daher nicht von den Transposonbereichen der Transgenkonstrukte stammen. Eine mögliche Transposasequelle könnte jedoch der Organismus selbst sein: *piggyBac*-Elemente konnten im Genom von drei Insektenspezies (von 50 über Southern-Hybridisierung untersuchten) nachgewiesen werden (Handler & McCombs, 2000; Handler, 2002). Während der Nachschmetterling *Trichoplusia ni* ein intaktes *piggyBac*-Transposon enthält, wurden im Eulerfalter *Spodoptera frugiperda* und in der Orientalischen Fruchtfliege *Bactrocera dorsalis* nichtfunktionale *piggyBac*-Elemente gefunden. Ob *piggyBac*-Transposaseaktivität im Organismus genomisch kodiert ist, kann durch die Methode des Exzisionsassays (Coates et al., 1997) untersucht werden. Im Exzisionsassay wird gemessen, ob endogene Transposaseaktivität die plasmidale Exzision eines Transgenkonstruktes im Insektenembryo induzieren kann.

Selbst bei Abwesenheit des Transposontyps im Genom des Schadinsekts könnten Kreuzreaktionen mit verwandten, möglicherweise bislang nicht identifizierten Transposasen zur

Mobilisierung der Transgenkonstrukte führen. Zum Beispiel wurden Kreuzmobilisierungen von *Hermes* durch *hobo*, das ebenso wie *Hermes* zur *hAT*-Transposonfamilie zählt, nachgewiesen (Sundararajan et al., 1999). Diese Kreuzmobilisierungsereignisse können eine Destabilisierung von *Hermes*-Transgeninsertionen in *hobo*-haltigen *Drosophila*-Stämmen zur Folge haben (D. O'Brochta, pers. Mitteilung). Familien transposabler Elemente, insbesondere die *Tc1/mariner*-Superfamilie, zählen viele Mitglieder (Übersichtsartikel: O'Brochta & Atkinson, 1996; Atkinson et al., 2001; Atkinson & James, 2002), deren Kreuzmobilisierungspotential weitgehend unbekannt ist.

Zur Erhöhung der Transgenstabilität könnten Transformationsvektoren konstruiert werden, die eine Entfernung mindestens eines der Transposonenden ermöglichen, nachdem das Transgen im Genom integriert ist. Die Abwesenheit von Zielstellen sollte transposasevermittelte (Kreuz-)Mobilisierungsereignisse unterbinden.

### **6.3.3 Mit dem Tet-System verbundene mögliche Anwendungshindernisse**

Die Verwendung eines Antibiotikums zur Aufrechterhaltung permissiver Zuchtbedingungen setzt voraus, daß das Schadinsekt keine essentiellen bakteriellen Symbionten besitzt. Der Anteil an Insektenpezies, der neben transienten und parasitischen auch symbiontische Bakterien enthält, wird auf mehr als 10% geschätzt (Hurst, 1997). Auf diese Spezies könnte das Sterilisierungssystem in der beschriebenen Ausführung wahrscheinlich nicht übertragen werden.

Selbst wenn die Insektenpezies die Tetracyclingabe toleriert, stellt sich bei der großtechnischen Anwendung die Entsorgungsfrage Tc-haltigen Futters. Da Tc (und Dox) in der Humanmedizin gängige Breitband-Antibiotika sind, ist ihr Einsatz zum Zwecke der industriellen Insektenzucht (auch im Konzentrationsbereich von 10-100 mg/l Futter) als problematisch zu betrachten. Als Lösungsansatz dieser Problematik bieten sich Tc-Derivate an, die nur geringe oder keine antibiotische Aktivität besitzen (Schnappinger & Hillen, 1996). Diese müßten hinsichtlich ihrer Effizienz der tTA-Inaktivierung im Schadinsekt charakterisiert werden.

## **6.4 Gefahrenpotential der Freisetzung gentechnisch sterilisierter Insekten**

Die Anwendung des Sterilisierungssystems im Rahmen eines SIT-Programmes würde die Freisetzung gentechnisch modifizierter Insekten bedeuten. In diesem Abschnitt werden mögliche Risikofaktoren der Freisetzung beleuchtet.

### **6.4.1 Gefahrenpotential durch Interspezietransfer der Transgenkonstrukte des Sterilisierungssystems**

Horizontaler Gentransfer (HGT) bezeichnet den Austausch genetischen Materials zwischen Genomen von zwei Organismen, die i.d.R. zu unterschiedlichen Spezies gehören (Übersichtsartikel: Bushman, 2002; Brown, 2003a). Welche Konsequenzen könnten aus einem HGT-Ereignis der Transgene dieser Arbeit resultieren?

Zur allgemeinen Risikoevaluierung des HGT konstatierten Dröge et al. (1998): „*even very rare events may have an ecological impact if the transferred gene increased the ecological fitness of the recipient organism. Hence, the genes encoded by the recombinant DNA pose a potential risk which should be the focus of biosafety considerations, rather than a natural phenomenon - horizontal gene transfer - itself.*“ Transgene werden sich dauerhaft in einem Ökosystem also nur dann etablieren, wenn sie der Empfängerspezies einen Selektionsvorteil verleihen. Diese grundsätzliche Ansicht wird auch von einem US-amerikanischen Komitee zur Risikoevaluierung der Biotechnologie transgener Tiere vertreten (National Research Council, 2002).

In dieser Arbeit untersuchte Transaktivator- und Effektortransgene führen jedoch zu einem Kompetitivitätsverlust, gemessen als Reduktion des Paarungserfolges transgener Taufliiegenmännchen (siehe Kap. 5.2.6.3). Darüber hinaus beinhaltet die Transformationstechnologie (Horn & Wimmer, 2000) keine positiv selektionierbaren, für andere Spezies potentiell vorteilhaften Markergene für Antibiotika- oder Insektizidresistenzen.

Mit welcher Frequenz treten HGT-Ereignisse auf? Zur Beantwortung dieser Frage sollen einige gutuntersuchte HGT-Beispiele beschrieben werden.

Eines der Musterbeispiele für HGT ist die Akquirierung zellulärer Protoonkogene durch transduzierende Retroviren (Übersichtsartikel: Coffin et al., 1997). Auch Insektenviren, im speziellen Baculoviren, können DNA aus einem Wirtsgenom aufnehmen und in ein anderes Genom übertragen: So wurde *piggyBac* aus einem baculoviralen Genom isoliert (Cary et al., 1989; Fraser, 2000) und HGT wird als Mechanismus zur Erklärung der phylogenetisch ungewöhnlichen Verbreitung dieses Transposons diskutiert (Fraser, 2000; Handler, 2002). Darüber hinaus wird HGT als ursächlich für die Invasion der *P*-Elemente in *D. melanogaster* Stämme angesehen, wobei semiparasitische Milben als übertragende Spezies wahrscheinlich sind (Houck et al., 1991). Dieses Ereignis fand erst vor ungefähr 60 Jahren statt. Auch *hobo* scheint erst in jüngerer Zeit *D. melanogaster* Populationen infiltriert zu haben (Bonnivard et al., 2000; Simmons et al., 1998).

HGT findet auch zwischen Bakterien *in insecta* statt: Im Darm der Seidenspinnerraupe *Bombyx mori* konnten Transkonjugationsereignisse von Plasmiden zwischen einem insektenassoziierten Bakterium (*Enterobakter cloacae*) und einem pflanzenassoziierten Bakterium (*Erwinia herbicola*) nachgewiesen werden (Watanabe & Sato, 1998).

Über diese qualitative Evidenz hinausgehend, sind quantitative Modellrechnungen zur Frequenz des HGT durchgeführt worden: Eine Szenarioanalyse zum HGT eines Antibiotikaresistenzgens von der FLAVR SAVR™ Tomate auf terrestrische Bakterien prognostiziert zwei Transformanten pro 4000 m<sup>2</sup> (Annahmen: (i) 10% aller Bodenbakterien sind transformierbar, (ii) das Resistenzgen entspricht 0,001% des Pflanzengenoms; Dröge et al., 1998). Tatsächlich wurden von transgenen Pflanzen stammende Resistenzgene in Bodenbakterien bereits nachgewiesen (Übersichtsartikel: Nielsen et al., 1998).

Die Frequenz des HGT mag niedrig sein, vernachlässigbar ist sie nicht. Transgenkonstrukte zur gentechnischen Modifikation von Insekten sollten daher keine positiv selektionierbaren Markergene tragen, die mikrobiellen Organismen einen Selektionsvorteil verleihen könnten. Darüber hinaus könnte der Sicherheitsstandard der Insekten-Transgentechnologie durch Transformationsvektoren erhöht werden, die eine Deletion der Transposasezielstellen nach dem Keimbahntransformationsprozeß ermöglichen. Ein solches Transformationssystem sollte die Wahrscheinlichkeit des transposonvermittelten HGTs reduzieren.

#### 6.4.2 Gefahrenpotential letalitätsverursachender Effektorgene

Zur Erzeugung von Letalität können grundsätzlich Effektorgene eingesetzt werden, die mit zellulären Signaltransduktionskaskaden interferieren oder für intrazellulär toxisch wirkende Proteine kodieren. In dieser Arbeit wurde als letalitätsverursachendes Effektorgen bewußt auf *ras* verzichtet, obwohl die dominant letale Wirkung des konstitutiv aktiven *ras*<sup>V12</sup> Allels in *Drosophila* bekannt war (Thomas et al., 2000). Dieser Ansatz wurde nicht verfolgt, da sich nach Meinung des Autors die Verwendung eines der potentesten Onkogene (Bishop, 1991) aufgrund des damit verbundenen offensichtlichen Gefahrenpotentials ausschließt. Dies trifft gleichermaßen auf den Einsatz von eukaryontenuniversell aktiven bakteriellen Toxingenen, z.B. dem Gen für das Diphtherie Toxin A, zu.

Im Sterilisierungssystem resultiert systemische Letalität aus der Expression eines *hid*-Allels (siehe Kap. 3.3.2). Das HID<sup>Ala5</sup>-Protein wirkt intrazellulär und löst Zelltod aus (im Gegensatz zu Ras<sup>V12</sup>, das als Mitogen Zellproliferation induziert). Bei der Freisetzung gentechnisch sterilisierter Insekten entstünden Embryonen, die HID<sup>Ala5</sup> ektopisch exprimieren. Diese Embryonen könnten Nahrungsmittel des Menschen „verunreinigen“ (z.B. indem Fruchtfliegenweibchen nach Befruchtung durch transgene Männchen Eier in reifenden Früchten deponieren). Obwohl das HID-Protein aus *Drosophila* auch in humaner Zellkultur apoptoseinduzierende Funktion ausübt (Haining et al., 1999; Varghese et al., 2002), bedarf es einiger Annahmen, um daraus eine Gefährdung abzuleiten (u.a. äußerst hohe Degradationsstabilität von HID<sup>Ala5</sup>, Wege der Magen- und Darmpassage und der intrazellulären Aufnahme). Nichtsdestotrotz sollten Schadinsektenembryonen, die Transaktivator- und Effektortransgene tragen, umfassend toxikologisch charakterisiert werden.

Um die Toxizitätsproblematik zu umgehen, sind alternative Effektorgene mit weniger konservierter Funktion vorstellbar und nach Meinung des Autors einem konservierten proapoptotischen Gen vorzuziehen. Dies könnten Gene sein, deren Produkte mit insektenspezifischen Prozessen interferieren. Zum Beispiel könnten Effektortransgene für ds-(doppelsträngige)-RNA eines essentiellen Gens mit für die Schadspezies möglichst spezifischer Funktion kodieren und über den Mechanismus der RNA-Interferenz (Hannon, 2002) diese Genfunktion inaktivieren.

## 6.5 Kombination des Sterilisierungssystems mit Geschlechterseparationssystemen

Das Sterilisierungssystem stellt einen wichtigen Baustein zur Etablierung einer transgenbasierten SIT dar. Die Wirksamkeit der SIT steigt für viele Schadspezies, wenn weibliche Insekten abgetrennt und ausschließlich männliche Insekten freigesetzt werden. Daher wurde in dieser Arbeit die Kompatibilität des Sterilisierungssystems zu einem bereits beschriebenen System supprimierbarer weiblich-spezifischer Letalität untersucht (siehe Kap. 5.2.7 und Abb. 3.4; Heinrich & Scott, 2000). Diese Kombination erwies sich bei vier untersuchten FSLEL-Stämmen als nicht möglich. Eine offensichtliche Ursache dafür ist, daß FSLEL-Stämme selbst bei einer Tc-Konzentration von 100 µg/ml im parentalen Futter nach Übertragung auf Tc-freies Futter keine bzw. kaum Nachkommen hervorbrachten (siehe Tab. 5.6). Gerade niedrige parentale Tc-Konzentrationen sind aber vermutlich notwendig, damit das weiblich-spezifisch in larvalen Stadien (Heinrich & Scott, 2000) exprimierte tTA-Protein nicht inhibiert wird. In diesem Kapitel sollen zwei weitere Ansätze zur Abtötung von Insektenweibchen im Hinblick auf deren Kombinationsmöglichkeit mit dem Sterilisierungssystem dieser Arbeit diskutiert werden.

### 6.5.1 Kombination des Sterilisierungssystems mit einem klassisch genetischen Geschlechterseparationssystem

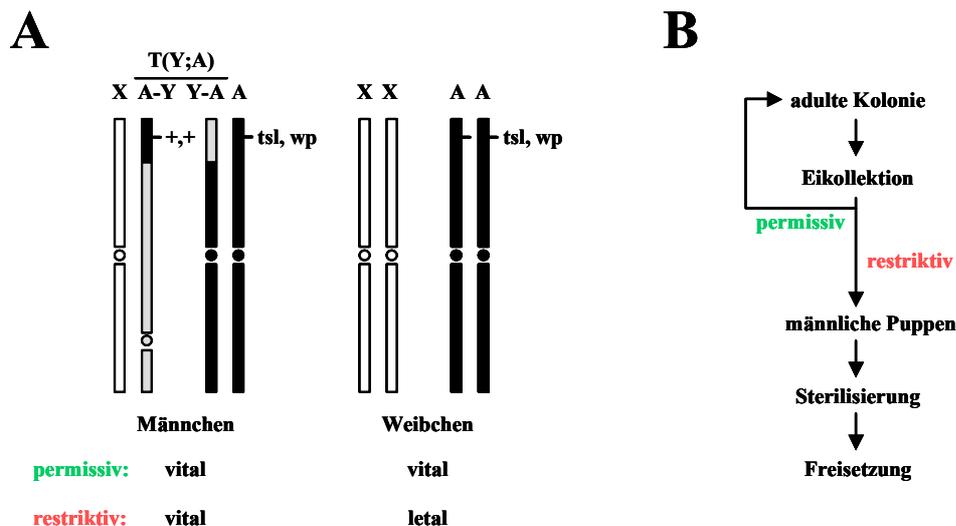
Für die Mittelmeerfruchtfliege konnte ein Separationssystem konstruiert werden, das weibliche Embryonen abtötet und somit ausschließlich männliche Fruchtfliegen entstehen läßt (Franz et al., 1994; Hendrichs et al., 1995; Robinson, 2002a). Dieses System beruht auf chromosomalen Translokationen, welche mittels klassisch genetischer Methoden generiert wurden (zur genaueren Beschreibung siehe Abb. 6.2A und Robinson et al., 1999).

Der Translokationsstamm ist konditional letal für weibliche Embryonen: Unter restriktiven Bedingungen - der Anwendung eines Hitzeschockprotokolls - überleben ausschließlich (>99.9%; Hendrichs et al., 1995) männliche Insektenlarven, die nachfolgend herangezüchtet, im Puppenstadium sterilisiert und freigesetzt werden (Abb. 6.2B). Im Jahre 2001 wurden 60% der weltweit produzierten sterilen Mittelmeerfruchtfliegen über dieses System separiert (sog. „male only strains“; <http://www-ididas.iaea.org/ididas/start.htm>).

Unter ökonomischen Gesichtspunkten besonders vorteilhaft ist, daß die weiblich-spezifische Letalität bereits im Embryonalstadium eintritt, so daß die kostenintensive Fütterung weiblicher Larven entfällt. Als nachteilig erwiesen sich folgende Eigenschaften (Robinson et al., 1999; Robinson, 2002a): Erstens ist aufgrund der Translokationsgenetik die Fertilität des Stammes auch unter permissiven Bedingungen um 50% reduziert. Zweitens zeigen insbesondere Weibchen des Translokationsstammes eine verminderte Fitness. Drittens ist dieses System speziesspezifisch und die Einzelkomponenten können nicht direkt auf andere Schadinsekten übertragen werden. Vergleichbare Separationssysteme für weitere Fruchtfliegenschädlinge existieren bislang nicht oder befinden sich im Anfangsstadium der Entwicklung (Meats et al., 2002). Viertens, und am bedeutsamsten, ist die

Stabilität des Translokationsstammes im großtechnischen Produktionsmaßstab nicht hinreichend gewährleistet. Rekombinationsereignisse mit der Folge der Reversion des gezüchteten Merkmals treten mit einer Frequenz von  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  auf (G. Franz, pers. Mitteilung; Caceres, 2002). Revertanten setzen sich rasant im Translokationsstamm durch und lassen diesen zusammenbrechen. Eine kontinuierliche Produktion im Maßstab von  $10^7$  -  $10^8$  Insektenpuppen pro Woche wurde erst nach Einführung eines Qualitätssicherungssystems möglich, das die manuelle Identifizierung und Entfernung von Revertanten beinhaltet (Fisher & Caceres, 2000; Caceres, 2002).

Eine Kombination dieses Separationssystems mit dem transgenbasierten Sterilisierungssystem erscheint prinzipiell als möglich, obwohl beide Systeme in der embryonalen Entwicklungsphase wirken. Da das Separationssystem physikalische Bedingungen (Hitzeschock), das transgenbasierte Sterilisierungssystem jedoch chemische Bedingungen ( $T_c$ ) zur Unterscheidung permissiver und restriktiver Zustände verwendet, sollten sich beide Systeme in ihrer Wirkung nicht beeinflussen. Dazu müßte allerdings überprüft werden, wie sich Hitzeschockbedingungen auf die Charakteristika supprimierbar embryospezifisch letaler Stämme auswirken.



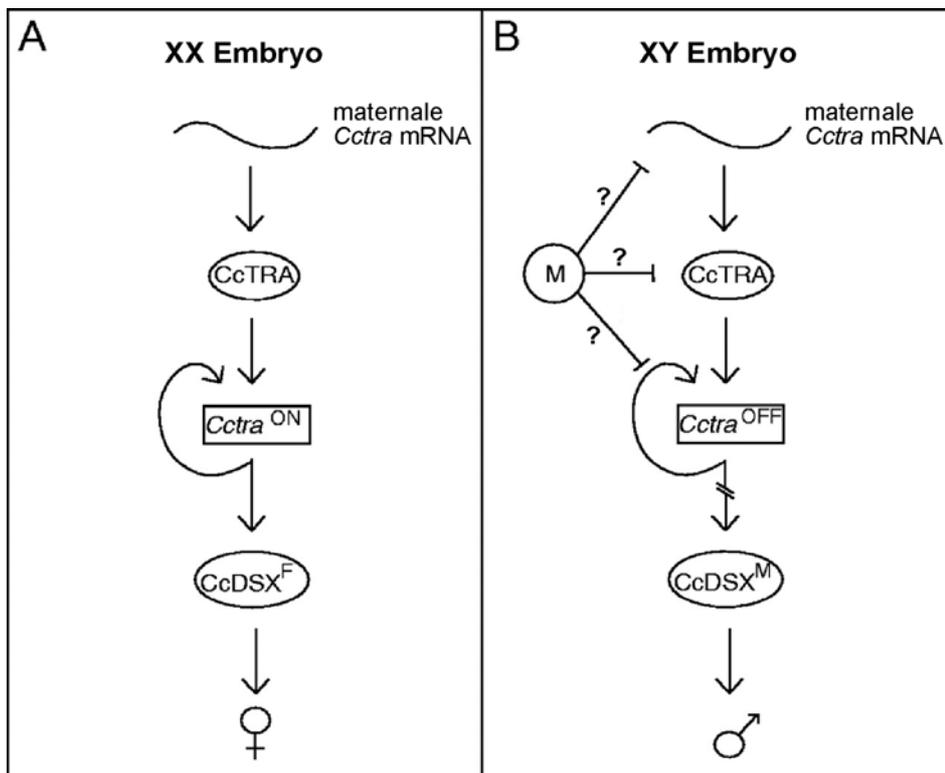
**Abb. 6.2: Klassisch genetisches Geschlechterseparationssystem für die Mittelmeerfruchtfliege.**

**A)** Männliche Insekten tragen eine reziproke Translokation eines autosomalen Fragmentes auf das Y-Chromosom: T(Y;A). Das translozierte Fragment enthält die wildtypischen Allele eines essentiellen Gens (+) und eines Phänotypenmarker gens (+). Das Marker gen (*wp* (*white pupae*), verleiht braune (+) bzw. weiße (*wp*) Puppenfarbe) wird zur Unterscheidung männlicher und weiblicher Puppen im Rahmen von Qualitätskontrollmaßnahmen des Systems eingesetzt. Ein rezessiv temperatursensitives Allel, *tsl*, des essentiellen Gens wird zur Abtötung der Weibchen verwendet: Weibchen sind bzgl. *tsl* homozygot und sterben unter restriktiven Bedingungen im Embryonalstadium. Männchen hingegen überleben diese Bedingungen aufgrund der Wildtypkopie auf dem translozierten Fragment. Modifiziert nach Robinson et al. (1999).

**B)** Flußdiagramm der Anwendung des Separationssystems im Rahmen der SIT. Unter restriktiven Bedingungen werden weibliche Embryonen abgetötet. Männliche Puppen werden durch  $\gamma$ -Strahlen sterilisiert und als Adulte freigesetzt. Modifiziert nach Hendrichs et al. (1995).

### 6.5.2 Kombination des Sterilisierungssystems mit einem transgenbasierten Maskulinisierungssystem

Ebenfalls für die Mittelmeerfruchtfliege ist ein System beschrieben worden, das über Modulation der Geschlechtsdeterminationskaskade weibliche Insekten in männliche transformiert (Pane et al., 2002). In der Kaskade übernimmt der Spleißfaktor CcTRA (*Ceratitis capitata* Transformer) die Funktion eines binären genetischen Schalters: Im „ON-Zustand“ stimuliert CcTRA rückkoppelnd seine eigene Synthese und definiert weibliches Zellschicksal. Im „OFF-Zustand“ hingegen resultiert männliches Zellschicksal (zur genaueren Beschreibung siehe Abb. 6.3).



**Abb. 6.3: Modell der Geschlechtsdeterminationskaskade in *Ceratitis capitata*.**

Maternale *Cctra* mRNA wird in Embryonen deponiert. Im weiblichen XX-Embryo (A) wird maternales Transkript zu funktionellem CcTRA translatiert. CcTRA fungiert als Spleißfaktor zygotisch transkribierter *Cctra* prä-mRNA, so daß neues funktionelles CcTRA produziert wird (Autoaktivierung der Proteinbiosynthese). CcTRA bewirkt zudem das Spleißen von *Ccdsx* (*Ceratitis capitata doublesex*) prä-mRNA, und die weiblich-spezifisch produzierte CcDSX<sup>F</sup>-Isoform ist an der Induktion weiblicher Entwicklungsvorgänge beteiligt. Im XY-Embryo hingegen (B) wird der Y-chromosomal kodierte *m*-(maleness)-Faktor exprimiert und das M-Protein inhibiert auf bislang nicht geklärte Weise die Biosynthese funktionellen CcTRA-Proteins. Somit findet keine CcTRA-Autostimulation und auch kein weiblich-spezifisches Spleißen der *Ccdsx* prä-mRNA statt. Die CcDSX<sup>M</sup>-Isoform induziert männliche Entwicklungsvorgänge. Nach Pane et al., 2002.

Die Funktion eines Gens kann mittels der RNAi-(RNA-Interferenz)-Technik sowohl nach Injektion als auch nach transgenvermittelter Synthese von dsRNA ausgeschaltet werden (Kennerdell & Carthew, 1998; Fortier & Belote, 2000; Lam & Thummel, 2000). Pane et al. (2002) injizierten

dsRNA des *Cctra*-Transkriptes in *Ceratit*-Embryonen und beobachteten, daß sich zu 85% (n=272) männliche Fruchtfliegen entwickelten. Das Ausschalten der *Cctra*-Genfunktion verschob somit das erwartete 1:1 Verhältnis stark in Richtung Männchen. Karyotypische XX Männchen (wildtypische *Ceratit*-Männchen sind heterogametisch, Weibchen homogametisch) erwiesen sich zudem als fertil. Offenbar kodiert das Y-Chromosom in *Ceratit* keine zur männlichen Fertilität notwendigen Genfunktionen.

Von diesem RNAi-Ansatz ausgehend, könnte ein Maskulinisierungssystem konstruiert werden, das auf einem Transgen zur Synthese von dsRNA des *Cctra*-Transkriptes beruht. Dieses System würde möglicherweise effizient Weibchen in Männchen umwandeln. Dazu müßte ein Element zur Konditionalität integriert werden (z.B. ein temperatursensitiv aktiver Promotor), so daß restriktive Bedingungen zur Maskulinisierung und permissive Bedingungen zur Zucht angewendet werden können. Ein solches hitzeschockinduzierbares Maskulinisierungssystem sollte analog zu dem klassisch genetischen Separationssystem mit dem in dieser Arbeit vorgestellten transgenbasierten Sterilisierungssystem kombinierbar sein.

## 6.6 Das Enhancernachweissystem zur Identifizierung adäquater Enhancer in Schadspezies

Geschlechts- oder embryospezifisch aktive Enhancer aus *D. melanogaster* können auf eine Schadspezies übertragen oder aus einer Schadspezies über Klonierung homologer Gene und zugehöriger genregulatorischer Sequenzen isoliert werden. Eine weitere methodische Alternative zur Identifizierung geeigneter Enhancer besteht in der Mutagenese der Schadspezies. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein System zur insertionellen Mutagenese konstruiert und funktionell in *Drosophila melanogaster* analysiert, das sich auf Mutatoren mit Reporterfunktion für *cis*-regulatorische genomische Sequenzen stützt.

### 6.6.1 Enhancernachweis mit *piggyBac*-basierten Mutatoren

Mit *piggyBac*-basierten Mutatoren,  $\{GAL4\Delta\}$ ,  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  und  $\{tTA\}$ , konnten aus ungefähr 50% der G<sub>2</sub>-Kreuzungsansätze stabile und unabhängige Neuinsertionen isoliert werden (siehe Tab. 5.7). In einer vergleichbaren Untersuchung eines *P*-basierten Mutators wurden Sprungraten zwischen 36% und 83% gemessen (P[ry+11]; Berg & Spradling, 1991). Somit erwiesen sich *piggyBac*-basierte Mutatoren im Vergleich zu *P*-basierten als ähnlich effizient mobilisierbar.

Hinsichtlich der Enhancernachweisfunktion unterscheiden sich die drei Mutatoren: Während mit  $\{tTA\}$  *in vivo* im Adultstadium kaum Enhancer nachgewiesen wurden, erwiesen sich  $\{GAL4\Delta\}$  und  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  als hervorragend geeignet zu diesem Zweck. Zum Enhancernachweis in einer Schadspezies bieten sich somit die Mutatortransgene  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  und  $\{GAL4\Delta\}$  an. Die hohe Signalintensität, die mit dem  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ -Mutator beobachtet wurde, resultiert möglicherweise aus

einer autostimulatorischen GAL4-Synthese (siehe Kap. 5.3.2.6). Auch Hassan et al. (2000) beschreiben den Einsatz eines GAL4-UAS-Konstruktes zur Signalverstärkung im Rahmen eines Projektes zur Kartierung des Schicksals neuronaler Zellen. Im Unterschied zu  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  separierten Hassan et al. (2000) das GAL4-UAS-Konstrukt von dem Enhancer-GAL4-Konstrukt, so daß zwei unabhängige Transgene zur Signalverstärkung im Genom integriert waren.

Bei der Verwendung signalverstärkender Konstruktionen ist zu bedenken, daß GAL4 in hoher, möglicherweise cytotoxischer intrazellulärer Konzentration (Gill & Ptashne, 1988) synthetisiert werden kann. Ein Indiz dafür ist die niedrigere Transpositionsfrequenz, die für  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  gemessen wurde (verglichen mit  $\{GAL4\Delta\}$  und  $\{tTA\}$ ; siehe Tab. 5.7).

### 6.6.2 Übertragbarkeit des Enhancernachweissystems auf Insektenspezies

Die Funktionalität von  $\{GAL4\Delta+UAS\}$  und  $\{GAL4\Delta\}$  in *D. melanogaster* konnte in dieser Arbeit demonstriert werden. Sind die einzelnen Komponenten auch auf Schadspezies übertragbar?

Daten zur Übertragbarkeit des Transformationssystems und des Tet-Systems sind bereits diskutiert worden (siehe Kap. 6.2.2.1 und 6.2.2.2). In Jumpstartertransgenen steht das Transposasegen unter Kontrolle des *hsp70*- oder des *atub*-Promotors (beide aus *D. melanogaster*). Während die phylogenetische Konservierung der *atub*-Promotoraktivität nicht bekannt ist, erwies sich der *hsp70*-Promotor sowohl in *Drosophila* als auch in *Bombyx mori* als temperaturabhängig induzierbar (Lis et al., 1983; Uhlřova et al. 2002). Sollte dennoch die Transposase im Schadinsekt nicht hinreichend über den konstruktendogenen Promotor exprimiert werden können, könnten genomische Enhancer mit Aktivität in der Keimbahn zur Expressionsverstärkung hinzugezogen werden. Dazu bieten sich insbesondere Jumpstarterkonstrukte mit terminal lokalisiertem und daher genomischen Enhancern leicht zugänglichem Promotor an.

*GAL4* $\Delta$ -exprimierende Mutatoren erwiesen sich in *Drosophila* als besonders geeignet zum Enhancernachweis. Ob GAL4 als ursprünglich aus der Hefe isolierter Transaktivator in weiteren Insektenspezies seine Funktion erfüllt, ist jedoch nicht bekannt. Neben der verkürzten Variante *GAL4* $\Delta$  (Ma & Ptashne, 1987), die in dieser Arbeit Einsatz fand, könnte auch das nicht modifizierte *GAL4* (Brand & Perrimon, 1993) hinsichtlich seines Transaktivierungspotentials im Schadinsekt untersucht werden. Darüber hinaus existiert die Variante *GAL4VP16*, die sowohl in der Taufliege als auch im Zebrafisch erfolgreich eingesetzt worden ist (Köster & Fraser, 2001). Ferner steht ein weiteres binäres Genexpressionssystem für *D. melanogaster* zur Verfügung, das auf einer Chimären aus der bakteriellen LexA-DNA-Bindungsdomäne und der GAL4-Transaktivierungsdomäne basiert (Szűts & Bienz, 2000). Vor Anwendung des Enhancernachweissystems in einer Schadspezies sollte die Funktionalität des GAL4 $\Delta$ -Transaktivatorproteins in dieser Spezies überprüft werden.

### 6.6.3 Identifizierung von Mutatorneinsertionen in Nicht-Modellinsekten

Für die Pilotmutagenese (siehe Abb. 5.19) wurden *Drosophila*-Stämme ohne Augenpigmentierung verwendet. Dies ist zwar keine unabdingbare Voraussetzung zur Erkennung der Augenfluoreszenzmarker (Berghammer et al., 1999), erleichtert jedoch die Durchmusterungsprozedur (Nystedt et al., 2003). Mutanten der Insektenpezies ohne Augenpigmentierung sind daher vorteilhaft zur Identifizierung von Sprungereignissen des Mutators. Das Selektionsprinzip für diese Sprungereignisse basierte in der Pilotmutagenese dieser Arbeit auf dem Vorhandensein heterogametischer Chromosomen. Das X-Chromosom ( $22 \cdot 10^6$  bp) nimmt in der Spezies *Drosophila melanogaster* rund ein Achtel ( $\sigma$ ) bzw. ein Viertel ( $\varphi$ ) der Gesamtgenomsequenz ein. X-chromosomale Mutatorinsertionen werden somit nach einem Keimbahntransformationsexperiment statistisch häufig erhalten. Diese Situation liegt in vielen Insektenpezies nicht vor, in denen die Gonosomen eine geringe Größe besitzen. Ferner sind die Gonosomen einiger Insektengattungen (z.B. culicine und anopheline Mosquitos) homomorph (Übersichtsartikel: Saccone et al., 2002).

Die Identifizierung neuer Mutatorinsertionen könnte in diesen Spezies folgendermaßen ablaufen: Zum einen könnten  $\{GAL4\Delta+UAS\}$ -Insertionen mit sichtbarem Enhanceraktivitätsmuster aber ohne Augenfluoreszenz (siehe Abb. 5.18D) als Ausgangsstamm zur Mutagenese Verwendung finden. Die Neuinsertion des Mutators würde dann anhand des Erwerbs der Augenfluoreszenz (und des Verlustes des ursprünglichen Enhanceraktivitätsmusters) nachgewiesen werden. In analoger Weise könnte auch die Änderung eines bestimmten Enhanceraktivitätsmusters zur Identifizierung einer Neuinsertion dienen. Zum anderen könnte der Ausgangsstamm eine Chromosomeninversion aufweisen, die das Mutatortransgen und ein dominantes Phänotypenmarkergen trägt (R. Beeman, pers. Mitteilung): Im Zuge eines Sprungereignisses, d.h. nach Einkreuzen des Jumpstarters, kann der Mutator den invertierten Chromosomenbereich verlassen. Eine solche Neuinsertion kann in der folgenden Generation (entspricht  $G_3$  in Abb. 5.19) identifiziert werden, wenn das Insekt erstens die Augenfluoreszenz des Mutatormarkers zeigt und zweitens den dominanten Phänotypenmarker nicht trägt.

## 6.7 Funktionelle Genomanalyse im Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

Der vorangegangene Abschnitt thematisierte das Anwendungspotential der *piggyBac*-Mutagenese in Schadinsekten, die (noch) nicht zu Modellorganismen zählen. In diesem Abschnitt wird die Anwendung von *piggyBac* zur funktionellen Genomanalyse in der Modellspezies *D. melanogaster* diskutiert. Unter der funktionellen Genomanalyse wird das Studium der Zusammensetzung, der Struktur und der Funktion eines Genoms verstanden. Die funktionelle Genomanalyse setzt sich zum Ziel, genomweit sättigend Gene und korrespondierende Proteine zu identifizieren, die in einem biologischen Prozeß (z.B. Metabolismus oder Signaltransduktion) eine Rolle spielen (Übersicht: Brown, 2003b).

Ein wichtiger Aspekt der funktionellen Genomanalyse ist die Korrelation von Sequenzinformation mit einem Phänotyp. Das Genom von *Drosophila melanogaster* ist sequenziert worden (Adams et al., 2000). In der aktuellen Datenbankversion (<http://www.fruitfly.org/annot/release3.html>) sind 13676 proteinkodierende Gene annotiert. Insertionelle Mutagenese kann einen wesentlichen Beitrag leisten, diesen Genen Funktionen zuzuweisen: Dazu werden möglichst viele Gene des Genoms durch eine Transposoninsertion markiert und mutiert (engl. gene disruption). Um Gene mit einer Funktion in dem zu untersuchenden biologischen Prozeß zu finden, wird nach einer als „Forward Genetics“ bezeichneten Strategie verfahren: Innerhalb einer geordneten Kollektion an insertionellen Mutanten werden diejenigen Mutanten mit einer phänotypisch sichtbaren Fehlfunktion in dem Prozeß herausgefiltert. Da die molekulare Lokalisation der Transposoninsertion bekannt ist, ist mit der Mutante auch das korrespondierende Gen identifiziert.

### 6.7.1 Funktionelle Genomanalyse mit dem *P*-Element

In der *Drosophila*-Genetik trug die insertionelle Mutagenese mit *P*-Elementen bereits entscheidend zur Aufklärung von Genfunktionen bei (Übersichtsartikel: Bellen, 1999). Etwa ein Viertel aller essentiellen Gene der Autosomen (Spradling et al., 1999) und des X-Chromosoms (Peter et al., 2002) wurden durch eine *P*-Element-Insertion zur Letalität mutiert.

Um einen hohen genomischen Sättigungsgrad zu erreichen, sollte der Transposontyp genomische Positionen statistisch möglichst uniform verteilt adressieren. *P*-Elemente erwiesen sich hierfür jedoch als nur bedingt geeignet, da sie insertionelle Präferenzen aufweisen: Lokal integrieren *P*-Elemente präferentiell am 5' Ende eines Gens (Spradling et al., 1995) und global adressieren sie Gene mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit (Engels, 1996). Loci mit hoher *P*-Insertionswahrscheinlichkeit wurden daher im Rahmen großangelegter Mutageneseprojekte überproportional häufig getroffen, während für *P*-Elemente weniger zugängliche Loci unterrepräsentiert oder nicht mutierbar waren (Spradling et al., 1999; Peter et al., 2002). Definiert man einen genomischen Locus mit mehr als fünf unabhängigen *P*-Insertionen als „hotspot“, so wurden bei der Mutagenese der Autosomen ca. 40% und bei der Mutagenese des X-Chromosoms 46% aller *P*-Neuinsertionen in „hotspot“-Loci erhalten. Diese *P*-Insertionen sind redundant und erniedrigen wesentlich die Effizienz eines Mutageneseprojekts.

Ein weiterer, mit dem „hotspot“-Verhalten zusammenhängender Grund spricht gegen die Verwendung von *P*-Elementen zur genomweiten Mutagenese: Bei *P*-Elementen findet die Exzision häufig nicht exakt, sondern unter Mitnahme flankierender genomischer Sequenzen statt. Am ursprünglichen Insertionslocus wird dabei eine Deletion hinterlassen. Da ein *P*-Element mehrfach transponieren kann, erzeugt es möglicherweise am ersten Insertionslocus eine Deletion und inseriert anschließend in einen „hotspot“-Locus. Während die Sekundärinsertion kartiert wird (inverse PCR), korreliert der Phänotyp mit der primär erzeugten Deletion (und kann nicht kartiert werden). Dieser „hit

and run“-Mechanismus der *P*-Elemente erschwert die eindeutige Zuordnung des Phänotyps zur Transposoninsertion und hinterläßt Kollateralschäden auf dem mutagenisierten Chromosom.

### 6.7.2 Funktionelle Genomanalyse mit *piggyBac*

Nach einer Modellrechnung könnten mehr als 85% aller essentiellen *Drosophila*-Genfunktionen durch eine *P*-Element-Insertion ausgeschaltet werden. Dieses Ziel kann jedoch nur mit erheblichem Aufwand erreicht werden (Spradling et al., 1999). Vorliegende Daten zu *piggyBac* weisen darauf hin, daß eine genomsättigende Mutagenese eher mit *piggyBac* oder mit einer Kombination aus *P* und *piggyBac* erreichbar ist:

Bereits in der Pilotmutagenese dieser Arbeit, die einen sehr limitierten Umfang und daher keineswegs statistische Aussagekraft besitzt, wurden mit *piggyBac* Gene adressiert, für die kein *P*-Allel beschrieben ist (siehe Tab. 5.9). In einer größer angelegten Mutagenesestudie (Kollaborationsprojekt mit Prof. Häcker: Nystedt et al., 2003) wurden 57% der *piggyBac*-Insertionen (n=304) innerhalb von *Drosophila*-Genen erhalten, die bislang nicht von einem *P*-Element getroffen worden waren. Darüber hinaus wurden 70% der *piggyBac*-Neuinsertionen in unabhängigen Transkriptionseinheiten gefunden (Nystedt et al., 2003). Dies steht im Gegensatz zu *P*-Mutageneseprojekten, bei denen nur 20-30% aller Transposoninsertionen nicht redundant waren (Spradling et al., 1999; Peter et al., 2002). Diese Daten deuten auf ein Insertionsverhalten des *piggyBac*-Transposons hin, das zu *P* verschieden ist: *piggyBac* scheint genomische Positionen statistisch gleichmäßiger zu adressieren und damit auch in Loci zu inserieren, die dem *P*-Element nicht oder wenig zugänglich sind.

Auch lokal besitzt *piggyBac* andere Insertionspräferenzen als das *P*-Element: Von den neun in dieser Arbeit untersuchten revertierbar letalen *piggyBac*-Insertionen wurden vier in Intronbereichen lokalisiert. 35% der Insertionen, die im Rahmen der größer angelegten *piggyBac*-Mutagenesestudie (Nystedt et al., 2003) molekular charakterisiert wurden, befanden sich in Introns, davon mehr als die Hälfte im ersten Intron eines Gens. Während *P*-Elemente lokal das 5' Ende eines Gens präferieren (Spradling et al., 1995), inseriert *piggyBac* bevorzugt in Intronsequenzen. Dieses Charakteristikum weist *piggyBac* als sehr geeignet für Mutageneseprojekte aus, die zum Studium der Lokalisierung von Genprodukten ausgeführt werden: In dieser als Exonfalle (engl. exon trap) bezeichneten Strategie (Morin et al., 2001) trägt der Mutator *GFP*, das von einer Spleißakzeptor und einer Spleißdonorsequenz flankiert ist. Wenn der Mutator im Intronbereich eines Gens inseriert, kann *GFP* in die mRNA des Gens gespleißt werden. Die zelluläre und subzelluläre Lokalisation des GFP-Fusionsproteins kann anschließend anhand des Fluoreszenzsignals bestimmt werden.

*piggyBac* rekonstituiert nach der Exzision die Ursprungssequenz der Insertionsstelle (keine Zielstellenduplikation, siehe Tab. 3.1). Drei der Exzisionschromosomen letaler *piggyBac*-Insertionen wurden in dieser Arbeit molekular untersucht. Dabei wurde die Integrität der ursprünglichen DNA-Sequenz festgestellt (siehe Kap. 5.3.2.3). Dieses Ergebnis bestätigt den präzisen Exzisionsmodus, der

für *piggyBac* beschrieben worden ist (Elick et al., 1996). Bei der Reversionsanalyse zeigte sich ein konsistentes Ergebnis (entweder Reversion oder keine Reversion) in unabhängigen Parallelansätzen einer Letalinsertion (diese Arbeit und Nystedt et al., 2003). Dies läßt den Schluß zu, daß in den untersuchten Ansätzen Exzisionsreaktionen stets exakt verliefen. Die Präzision des Exzisionsmechanismus' ist einerseits vorteilhaft, denn das „hit and run“-Phänomen, welches bei *P*-Elementen auftritt, wird mit *piggyBac* umgangen. Andererseits wird die Möglichkeit der inexakten *P*-Element-Exzision in der *Drosophila*-Genetik zur Erzeugung von Deletionen und damit von Nullallelen eines Gens verwendet. Diese Methode scheint auf *piggyBac*-Insertionen nicht übertragbar zu sein.

Möglicherweise wird das Ziel der genomweit sättigenden insertionellen Mutagenese am ehesten durch die Kombination beider Transposontypen erreicht. Dieser Ansatz wird gegenwärtig im Rahmen des *Drosophila*-Genomprojektes verfolgt. Ca. 40% aller *Drosophila*-Gene konnten bereits durch eine Transposoninsertion markiert werden (<http://flypush.imgen.bcm.tmc.edu/pscreen/>; Stand: März 2003). Die Kombination beider Transposontypen eröffnet darüber hinaus die Möglichkeit, insertionelle Mutagenese mit einer Vielzahl an genetischen Werkzeugen zu verknüpfen, die in der *Drosophila*-Genetik Verwendung finden und auf dem *P*-Element basieren. Die Grundlage dafür wurde gelegt, denn die Stabilität von *P*-Element-Insertionen während einer *piggyBac*-Mutagenese konnte demonstriert werden (Nystedt et al., 2003).

Die Tatsache<sup>1</sup>, daß sich von 929 Genen, die mit Krankheiten des Menschen assoziiert sind, 548 Gene als Orthologe in *Drosophila* wiederfinden, unterstreicht die zukünftige Relevanz der Taufliege als genetisch hervorragend charakterisiertem Modellorganismus. Die Tatsache<sup>1</sup>, daß bislang nur 151 dieser Gene in *Drosophila* genauer charakterisiert wurden, hebt die Notwendigkeit der funktionellen Genomanalyse hervor. Insertionelle Mutagenese mit dem Transposon *piggyBac* wird dazu einen wesentlichen Beitrag leisten.

---

<sup>1</sup> Zahlen entnommen aus einem Vortrag von Prof. Jäckle, gehalten anlässlich eines Transfer-Workshops des „Fonds der Chemischen Industrie“ zum Thema „Biologische Netzwerke – intra- und interzelluläre Kommunikation“. Darmstadt, 9. Oktober 2002.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbott, M.K. & Lengyel, J.A.** (1991). Embryonic head involution and rotation of male terminalia require the *Drosophila* locus *head involution defective*. *Genetics* 129: 783-789.
- Abrams, J.M.** (1999). An emerging blueprint for apoptosis in *Drosophila*. *Trends Cell Biol* 9: 435-440.
- Abrams, J.M.** (2002). Competition and compensation: coupled to death in development and cancer. *Cell* 110: 403-406.
- Adams, M.D. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Anderson, D.T.** (1972). The development of hemimetabolous insects. In: *Developmental Systems: Insects* (Hrsg. Counce, S.J. & Waddington, C.H.). S. 95-241. Academic Press, New York.
- Arora, K., Dai, H., Kazuko, S.G., Jamal, J., O'Connor, M.B., Letsou, A., & Warrior, R.** (1995). The *Drosophila schnurri* gene acts in the Dpp/TGF beta signaling pathway and encodes a transcription factor homologous to the human MBP family. *Cell* 81: 781-790.
- Atkinson, P.W.** (2002). Genetic engineering in insects of agricultural importance. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1237-1242.
- Atkinson, P.W. & James, A.A.** (2002). Germline transformants spreading out to many insect species. *Adv Genet* 47: 49-86.
- Atkinson, P.W., Pinkerton, A.C., & O'Brochta, D.A.** (2001). Genetic transformation systems in insects. *Annu Rev Entomol* 46: 317-346.
- Baehrecke, E.H.** (2002). How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 779-787.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A., & Tsien, R.Y.** (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11984-11989.
- Bangs, P. & White, K.** (2000). Regulation and execution of apoptosis during *Drosophila* development. *Dev Dyn* 218: 68-79.
- Baron, U. & Bujard, H.** (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol* 327: 401-421.
- Baron, U., Gossen, M., & Bujard, H.** (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* 25: 2723-2729.
- Baumhover, A.H., Graham, A.J., Bitter, B.A., Hopkins, D.E., New, W.D., Dudley, F.H., & Bushland, R.C.** (1955). Screw-Worm Control Through Release of Sterilized Flies. *J Econ Entomol* 48: 462-466.
- Beall, E.L. & Rio, D.C.** (1996). *Drosophila* IRBP/Ku p70 corresponds to the mutagen-sensitive *mus309* gene and is involved in *P*-element excision *in vivo*. *Genes Dev* 10: 921-933.
- Bellen, H.J.** (1999). Ten years of enhancer detection: lessons from the fly. *Plant Cell* 11: 2271-2281.
- Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R.K., & Gehring, W.J.** (1989). *P*-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev* 3: 1288-1300.
- Bello, B., Resendez-Perez, D., & Gehring, W.J.** (1998). Spatial and temporal targeting of gene expression in *Drosophila* by means of a tetracycline-dependent transactivator system. *Development* 125: 2193-2202.

- Berg, C.A. & Spradling, A.C.** (1991). Studies on the rate and site-specificity of *P* element transposition. *Genetics* 127: 515-524.
- Berghammer, A.J., Klingler, M., & Wimmer, E.A.** (1999). A universal marker for transgenic insects. *Nature* 402: 370-371.
- Bergmann, A., Agapite, J., McCall, K., & Steller, H.** (1998). The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell* 95: 331-341.
- Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B.Z., & Steller, H.** (2002). Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev Cell* 2: 159-170.
- Beverley, S.M. & Wilson, A.C.** (1984). Molecular evolution in *Drosophila* and the higher Diptera II. A time scale for fly evolution. *J Mol Evol* 21: 1-13.
- Bier, E. et al.** (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a *P-lacZ* vector. *Genes Dev* 3: 1273-1287.
- Bishop, J.M.** (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235-248.
- Bloem, S., Bloem, K.A., Carpenter, J.E., & Calkins, C.O.** (1999). Inherited sterility in codling moth (*Lepidoptera: Tortricidae*): effect of substerilizing doses of radiation on insect fecundity, fertility and control. *Ann Entomol Soc Am* 92: 222-229.
- Bonnivard, E., Bazin, C., Denis, B., & Higuete, D.** (2000). A scenario for the *hobo* transposable element invasion, deduced from the structure of natural populations of *Drosophila melanogaster* using tandem TPE repeats. *Genet Res* 75: 13-23.
- Brand, A.H. & Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
- Brown, J.L. & Wu, C.** (1993). Repression of *Drosophila* pair-rule segmentation genes by ectopic expression of *tramtrack*. *Development* 117: 45-58.
- Brown, J.R.** (2003a). Ancient horizontal gene transfer. *Nat Rev Genet* 4: 121-132.
- Brown, S.M.** (2003b). *Essentials of Medical Genomics*. Wiley-Liss, Hoboken, New Jersey.
- Bushland, R.C.** (1971). Sterility principle for insect control. In: Historical development and recent innovations in sterility principle for insect control or eradication. Proceedings of a consultants meeting, IAEA, Vienna. S. 3-14.
- Bushman, F.** (2002). *Lateral DNA Transfer*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Caceres, C.** (2002). Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitidis capitata*). *Genetica* 116: 107-116.
- Calcagno, G.E., Manso, F., & Vilardi, J.C.** (2002). Comparison of mating performance of medfly (*Diptera: Tephritidae*) genetic sexing and wild type strains: field cage and video recording experiments. *Florida Entomol* 85: 41-50.
- Callaerts, P., Halder, G., & Gehring, W.J.** (1997). PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* 20: 483-532.
- Carpenter, J.E. & Gross, H.R.** (1993). Suppression of feral *Helicoverpa zea* (*Lepidoptera: Noctuidae*) populations following the infusion of inherited sterility from released substerile males. *Environ Entomol* 22: 1084-1091.
- Cary, L.C., Goebel, M., Corsaro, B.G., Wang, H.G., Rosen, E., & Fraser, M.J.** (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* 172: 156-169.

- Catteruccia, F., Godfray, H.C.J., & Crisanti, A.** (2003). Impact of genetic manipulation on the fitness of *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Science* 299: 1225-1227.
- Chung, J.H., Whiteley, M., & Felsenfeld, G.** (1993). A 5' element of the chicken *beta-globin* domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74: 505-514.
- Coates, C.J., Turney, C.L., Frommer, M., O'Brochta, D.A., & Atkinson, P.W.** (1997). Interplasmid transposition of the *mariner* transposable element in non-drosophilid insects. *Mol Gen Genet* 253: 728-733.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., & Varmus, H.E.** (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Conforti, E., Torti, C., Malacrida, A.R., & Bernocchi, G.** (1999). Mature and developing visual system of *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae): histochemical evidence of nitric oxide synthase in the wild type and the *white eye* mutant strains. *Brain Res* 843: 1-11.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., & Falkow, S.** (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173: 33-38.
- Cubitt, A.B., Woollenweber, L.A., & Heim, R.** (1999). Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Methods Cell Biol* 58: 19-30.
- Degenkolb, J., Takahashi, M., Ellestad, G.A., & Hillen, W.** (1991). Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1591-1595.
- Dettner, K. & Zwölfer, H.** (1999). Biologische, chemische und biotechnische Schädlingsbekämpfung. In: *Lehrbuch der Entomologie* (Hrsg. Dettner, K. & Peters, W.), S.639-668. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Dröge, M., Pühler, A., & Selbitschka, W.** (1998). Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. *J Biotechnol* 64: 75-90.
- Duffy, J.B.** (2002). GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34: 1-15.
- Elick, T.A., Bauser, C.A., & Fraser, M.J.** (1996). Excision of the *piggyBac* transposable element *in vitro* is a precise event that is enhanced by the expression of its encoded transposase. *Genetica* 98: 33-41.
- Engels, W.R.** (1996). *P* elements in *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol* 204: 103-123.
- Enkerlin, W. & Mumford, J.** (1997). Economic evaluation of three alternative methods for control of the Mediterranean fruit fly (*Diptera: Tephritidae*) in Israel, Palestinian Territories, and Jordan. *J Econ Entomol* 90: 1066-1072.
- Fisher, K. & Caceres, C.** (2000). A filter rearing system for mass reared genetic sexing strains of Mediterranean fruit fly (*Diptera: Tephritidae*). In: *Area-wide control of fruit flies and other insect pests* (Hrsg. Tan, K.-H.), S. 543-551. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia.
- Fortier, E. & Belote, J.M.** (2000). Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. *Genesis* 26: 240-244.
- Franz, G., Gencheva, E., & Kerremans, P.** (1994). Improved stability of genetic sex-separation strains for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genome* 37: 72-82.
- Franz, G. & Savakis, C.** (1991). *Minos*, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the *Tc1*-like family of transposons. *Nucleic Acids Res* 19: 6646.
- Fraser, M.J. Jr.** (2000). The *TTAA*-specific family of transposable elements: identification, functional characterization, and utility for transformation of insects. In: *Insect Transgenesis: Methods and Applications* (Hrsg. Handler, A.M. & James, A.A.), S. 250-268. CRC Press, Boca Raton.

- Garabedian, M.J., Shepherd, B.M., & Wensink, P.C.** (1986). A tissue-specific transcription enhancer from the *Drosophila* *yolk protein 1* gene. *Cell* 45: 859-867.
- Geer, B.W. & Green, M.M.** (1962). Genotype, phenotype and mating behavior of *Drosophila melanogaster*. *Am Nat* 96: 175-181.
- Gehring, W.J.** (2002). The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int J Dev Biol* 46: 65-73.
- Gehring, W.J. & Ikeo, K.** (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 15: 371-377.
- Geyer, P.K. & Corces, V.G.** (1992). DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev* 6: 1865-1873.
- Gill, G. & Ptashne, M.** (1988). Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* 334: 721-724.
- Gillott, C.** (1995). Entomology. (Kap. 24: Insects and Humans, S. 691-744). Plenum Press, New York.
- Gossen, M. & Bujard, H.** (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5547-5551.
- Gossen, M. & Bujard, H.** (1993). Anhydrotetracycline, a novel effector for tetracycline controlled gene expression systems in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res* 21: 4411-4412.
- Gossen, M. & Bujard, H.** (2002). Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. *Annu Rev Genet* 36: 153-173.
- Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E., & Steller, H.** (2000). Induction of apoptosis by *Drosophila reaper, hid* and *grim* through inhibition of IAP function. *EMBO J* 19: 589-597.
- Grether, M.E., Abrams, J.M., Agapite, J., White, K., & Steller, H.** (1995). The *head involution defective* gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev* 9: 1694-1708.
- Hagler, J.R. & Jackson, C.G.** (2001). Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annu Rev Entomol* 46: 511-543.
- Haining, W.N., Carboy-Newcomb, C., Wei, C.L., & Steller, H.** (1999). The proapoptotic function of *Drosophila* *Hid* is conserved in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4936-4941.
- Halder, G., Callaerts, P., & Gehring, W.J.** (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267: 1788-1792.
- Handler, A.M., Gomez, S.P., & O'Brochta, D.A.** (1993). A functional analysis of the *P*-element gene-transfer vector in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 22: 373-384.
- Handler, A.M. & Harrell, R.A., 2nd** (1999). Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. *Insect Mol Biol* 8: 449-457.
- Handler, A.M. & McCombs, S.D.** (2000). The *piggyBac* transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. *Insect Mol Biol* 9: 605-612.
- Handler, A.M. & Harrell, R.A., 2nd** (2001). *Polyubiquitin*-regulated *DsRed* marker for transgenic insects. *Biotechniques* 31: 824-828.
- Handler, A.M.** (2001). A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 111-128.
- Handler, A.M.** (2002). Use of the *piggyBac* transposon for germ line transformation of insects. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1211-1220.

- Hannon, G.J.** (2002). RNA interference. *Nature* 418: 244-251.
- Harkin, D.P. et al.** (1999). Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell* 97: 575-586.
- Hassan, B.A., Bermingham, N.A., He, Y., Sun, Y., Jan, Y.N., Zoghbi, H.Y., & Bellen, H.J.** (2000). *atonal* regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the *Drosophila* brain. *Neuron* 25: 549-561.
- Heinrich, J.C. & Scott, M.J.** (2000). A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8229-8232.
- Hemingway, J. & Ranson, H.** (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45: 371-391.
- Hendrichs, J., Franz, G., & Rendon, P.** (1995). Increased effectiveness and applicability of the sterile insect technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. *J Appl Entomol* 119: 371-377.
- Holbrook, F.R. & Fujimoto, M.S.** (1970). Mating competitiveness of unirradiated and irradiated Mediterranean fruit flies. *J Econ Entomol* 63: 1175-1176.
- Holt, R.A. et al.** (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298: 129-149.
- Hooper, G.H.S. & Katiyar, K.P.** (1971). Competitiveness of gamma-sterilized males of the Mediterranean fruit flies. *J Econ Entomol* 64: 1068-1071.
- Horn, C.** (1999). Entwicklung universeller Transformationsvektoren zur genetischen Manipulation von Insekten. Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Horn, C., Jaunich, B., & Wimmer, E.A.** (2000). Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev Genes Evol* 210: 623-629.
- Horn, C. & Wimmer, E.A.** (2000). A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol* 210: 630-637.
- Horn, C., Schmid, B.G., Pogoda, F.S., & Wimmer, E.A.** (2002). Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1221-1235.
- Horn, C., Offen, N., Nystedt, S., Häcker, U., & Wimmer, E.A.** (2003). *piggyBac*-based insertional mutagenesis and enhancer detection as a tool for functional insect genomics. *Genetics* 163: 647-661.
- Houck, M.A., Clark, J.B., Peterson, K.R., & Kidwell, M.G.** (1991). Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis*. *Science* 253: 1125-1128.
- Huang, M.A., Rehm, E.J., & Rubin, G.M.** (2000). Recovery of DNA sequences flanking *P*-element insertions: inverse PCR and plasmid rescue. In: *Drosophila* Protocols (Hrsg. Sullivan, W., Ashburner, M. & Hawley, S.), S. 429-437. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Hunter, C., Sung, P., Schejter, E.D., & Wieschaus, E.** (2002). Conserved domains of the nullo protein required for cell-surface localization and formation of adherens junctions. *Mol Biol Cell* 13: 146-157.
- Hurst, G.D.D., Hammarton, T.C., Bandi, C., Majerus, T.M.O., Bertrand, D., & Majerus, M.E.N.** (1997). The diversity of inherited parasites of insects: the male-killing agent of the ladybird beetle *Coleomegilla maculata* is a member of the Flavobacteria. *Genet Res Camb* 70: 1-6.

- IAEA** (2003). Insect Pest Control Newsletter No. 60. Die halbjährlich erscheinenden „Newsletter“ sowie die „Annual Reports“ geben eine aktuelle Übersicht über laufende, von der International Atomic Energy Agency (IAEA, Seibersdorf, Österreich) koordinierte SIT-Programme. Die pdf-Versionen dieser Veröffentlichungen sind unter [http://www.iaea.or.at/programmes/nafa/d4/public/d4\\_pbl\\_i7.html](http://www.iaea.or.at/programmes/nafa/d4/public/d4_pbl_i7.html) erhältlich.
- IAEA/UNDP** (1998). IAEA Technical Co-operation: Building Development Partnerships: Defeating the medfly. Die online-Version dieser Broschüre ist unter <http://www.iaea.org/worldatom/Press/Booklets/> erhältlich.
- Ibnsouda, S., Schweisguth, F., de Billy, G., & Vincent, A.** (1993). Relationship between expression of *serendipity alpha* and cellularisation of the *Drosophila* embryo as revealed by interspecific transformation. *Development* 119: 471-483.
- Ibnsouda, S., Schweisguth, F., Jullien, D., Kücherer, C., Lepesant, J.A., & Vincent, A.** (1995). Evolutionarily conserved positive and negative *cis*-acting elements control the blastoderm-specific expression of the *Drosophila serendipity alpha* cellularisation gene. *Mech Dev* 49: 71-82.
- Ibnsouda, S., Ferrer, P., & Vincent, A.** (1998). Conservation of read-through transcription of the *Drosophila serendipity* genes during evolution is gratuitous. *Mol Gen Genet* 259: 484-490.
- Kennerdell, J.R. & Carthew, R.W.** (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell* 95: 1017-1026.
- Kettle, D.S.** (1995). Medical and Veterinary Entomology. (Teil III : Diseases of which the pathogens are transmitted by insects and acarines, S. 486-690). CAB International, Wallingford.
- Klinakis, A.G., Loukeris, T.G., Pavlopoulos, A., & Savakis, C.** (2000). Mobility assays confirm the broad host-range activity of the *Minos* transposable element and validate new transformation tools. *Insect Mol Biol* 9: 269-275.
- Knipling, E.F.** (1955). Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *J Econ Entomol* 48: 459-462.
- Knipling, E.F.** (1998). Role of parasitoid augmentation and sterile insect techniques in areawide management of agricultural insect pests. *J Agric Entomol* 15: 273-301.
- Knott, A., Garke, K., Urlinger, S., Guthmann, J., Müller, Y., Thellmann, M., & Hillen, W.** (2002). Tetracycline-dependent gene regulation: combinations of transregulators yield a variety of expression windows. *Biotechniques* 32: 796-800.
- Kokoza, V., Ahmed, A., Wimmer, E.A., & Raikhel, A.S.** (2001). Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyBac* transposable element vector pBac[3xP3-EGFP afm]. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 1137-1143.
- Köster, R.W. & Fraser, S.E.** (2001). Tracing transgene expression in living zebrafish embryos. *Dev Biol* 233: 329-346.
- Krafsur, E.S.** (1998). Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect population: 55 years and counting. *J Agric Entomol* 15: 303-317.
- Kurada, P. & White, K.** (1998). Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating *hid* expression. *Cell* 95: 319-329.
- Kusano, K., Johnson-Schlitz, D.M., & Engels, W.R.** (2001). Sterility of *Drosophila* with mutations in the Bloom syndrome gene--complementation by *Ku70*. *Science* 291: 2600-2602.
- LaChance, L.E., Schmidt, C.H., & Bushland, R.C.** (1967). Radiation-induced sterilization. In: Pest Control (Hrsg. Kilgore, W.W. & Douthett, R.L.), S. 147-196. Academic Press, San Diego.

- Lam, G. & Thummel, C.S.** (2000). Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. *Curr Biol* 10: 957-963.
- Lecuit, T., Samanta, R., & Wieschaus, E.** (2002). *slam* encodes a developmental regulator of polarized membrane growth during cleavage of the *Drosophila* embryo. *Dev Cell* 2: 425-436.
- Lee, P. et al.** (1998). Conditional lineage ablation to model human diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11371-11376.
- Lehner, C.F. & O'Farrell, P.H.** (1990). *Drosophila cdc2* homologs: a functional homolog is coexpressed with a cognate variant. *EMBO J* 9: 3573-3581.
- Liddell, S. & Bownes, M.** (1991). Investigation of *cis*-acting sequences regulating expression of the gene encoding yolk protein 3 in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 230: 219-224.
- Lindquist, D.A., Abusowa, M., & Hall, M.J.** (1992). The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med Vet Entomol* 6: 2-8.
- Lindsley, D.L. & Zimm, G.G.** (Hrsg) (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Lis, J.T., Simon, J.A., & Sutton, C.A.** (1983). New heat shock puffs and beta-galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an *hsp70-lacZ* hybrid gene. *Cell* 35: 403-410.
- Lux, S.A. et al.** (2002). Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (*Diptera, Tephritidae*) mass reared for the sterile insect technique. *Florida Entomol* 85: 102-112.
- Ma, J. & Ptashne, M.** (1987). Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* 48: 847-853.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., & Lukyanov, S.A.** (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat Biotechnol* 17: 969-973.
- Mayer, D.G., Atzeni, M.G., Stuart, M.A., Anaman, K.A., & Butler, D.G.** (1998). Mating competitiveness of irradiated flies for screwworm fly eradication campaigns. *Prev Vet Med* 36: 1-9.
- Mazumdar, A. & Mazumdar, M.** (2002). How one becomes many: blastoderm cellularization in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 24: 1012-1022.
- Meats, A., Maheswaran, P., Frommer, M., & Sved, J.** (2002). Towards a male-only release system for SIT with the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, using a genetic sexing strain with a temperature-sensitive lethal mutation. *Genetica* 116: 97-106.
- Medhora, M., Maruyama, K., & Hartl, D.L.** (1991). Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mos1* in *Drosophila*. *Genetics* 128: 311-318.
- Meier, P., Evan, G., & Abrams, J.M.** (1998). Dying like flies. An emerging blueprint for apoptosis in *Drosophila*. *Cell* 95: 295-298.
- Morin, X., Daneman, R., Zavortink, M., & Chia, W.** (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15050-15055.
- Müller, H.J.** (1954). The nature of the genetic effects produced by radiation. In: Radiation biology. High energy radiation (Hrsg. Hollaender, A.), S. 351-473. McGraw Hill, New York.
- Mumford, J.D.** (2000). Economics of area-wide pest control. In: Area-wide control of fruit flies and other insect pests (Hrsg. Tan, K.-H.), S. 39-49. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia.

- National Research Council** (2002). Animal Biotechnology: Science-based Concerns. The National Academic Press, Washington, USA.
- Nielsen, K.M., Bones, A.M., Smalla, K., & van Elsas, J.D.** (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria--a rare event? *FEMS Microbiol Rev* 22: 79-103.
- Nystedt, S., Barmchi, M.P., Horn, C., Wimmer, E.A., & Häcker, U.** (2003). *piggyBac* based insertional mutagenesis in the presence of stably integrated *P* elements in *Drosophila*. Eingereicht bei: Proc Natl Acad Sci U S A.
- O'Brochta, D.A. & Atkinson, P.W.** (1996). Transposable elements and gene transformation in non-drosophilid insects. *Insect Biochem Mol Biol* 26: 739-753.
- Ochman, H., Ajioka, J.W., Garza, D., & Hartl, D.L.** (1990). Inverse polymerase chain reaction. *Biotechnology* 8: 759-760.
- O'Kane, C.J.** (1998). Enhancer traps. In *Drosophila: A practical approach* (Hrsg. Roberts, D.B.), S. 131-178. IRL Press, Oxford.
- O'Kane, C.J. & Gehring, W.J.** (1987). Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9123-9127.
- Pane, A., Salvemini, M., Delli Bovi, P., Polito, C., & Saccone, G.** (2002). The *transformer* gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development* 129: 3715-3725.
- Patterson, G., Day, R.N., & Piston, D.** (2001). Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* 114: 837-838.
- Pedigo, L.P.** (2002). Entomology & Pest Management. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Peter, A. et al.** (2002). Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep* 3: 34-38.
- Petit, C.** (1958). Le déterminisme génétique et psycho-physiologique de la compétition sexuelle chez *Drosophila melanogaster*. *Bull Biol France et Belg* 92: 1-329.
- Phelps, C.B. & Brand, A.H.** (1998). Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* 14: 367-379.
- Pinkerton, A.C., Michel, K., O'Brochta, D.A., & Atkinson, P.W.** (2000). Green fluorescent protein as a genetic marker in transgenic *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 9: 1-10.
- Postner, M.A. & Wieschaus, E.F.** (1994). The nullo protein is a component of the actin-myosin network that mediates cellularization in *Drosophila melanogaster* embryos. *J Cell Sci* 107: 1863-1873.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., & Cormier, M.J.** (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.
- Proverbs, M.D. & Newton, J.R.** (1962). Influence of gamma radiation on the development and fertility of the codling moth, *Carpocapsa pomonella* (L.) (*Lepidoptera: Olethreutidae*). *Can J Zool* 40: 401-420.
- Reischl, J.** (2001). Untersuchungen zur Funktion der *otd/Otx*-Genfamilie bei der embryonalen Kopfentwicklung im Modellorganismus *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität Bayreuth.
- Rio, D.C. & Rubin, G.M.** (1988). Identification and purification of a *Drosophila* protein that binds to the terminal 31-base-pair inverted repeats of the *P* transposable element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8929-8933.
- Roberts, D.B.** (Hrsg.) (1998). *Drosophila: A practical approach*. IRL Press, Oxford.

- Robinson, A.S., Franz, G., & Fisher, K.** (1999). Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata*: Development, mass rearing and field application. *Trends Entomol* 2: 81-104.
- Robinson, A.S. & Franz, G.** (2000). The application of transgenic insect technology in the sterile insect technique. In: *Insect Transgenesis: Methods and Applications* (Hrsg. Handler, A.M. & James, A.A.), S. 307-318. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Robinson, A.S.** (2002a). Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica* 116: 5-13.
- Robinson, A.S.** (2002b). Mutations and their use in insect control. *Mutat Res* 511: 113-132.
- Ronaldson, E. & Bownes, M.** (1995). Two independent *cis*-acting elements regulate the sex- and tissue-specific expression of *yp3* in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res* 66: 9-17.
- Ronchi, E., Treisman, J., Dostatni, N., Struhl, G., & Desplan, C.** (1993). Down-regulation of the *Drosophila* morphogen *bicoid* by the torso receptor-mediated signal transduction cascade. *Cell* 74: 347-355.
- Rørth, P.** (1998). GAL4 in the *Drosophila* female germline. *Mech Dev* 78: 113-118.
- Rose, L.S. & Wieschaus, E.** (1992). The *Drosophila* cellularization gene *nullo* produces a blastoderm-specific transcript whose levels respond to the nucleocytoplasmic ratio. *Genes Dev* 6: 1255-1268.
- Rubin, G.M. & Spradling, A.C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218: 348-353.
- Saccone, G., Pane, A., & Polito, L.C.** (2002). Sex determination in flies, fruitflies and butterflies. *Genetica* 116: 15-23.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sarkar, A., Coates, C.J., Whyard, S., Willhoeft, U., Atkinson, P.W., & O'Brochta, D.A.** (1997). The *Hermes* element from *Musca domestica* can transpose in four families of cyclorrhaphan flies. *Genetica* 99: 15-29.
- Schejter, E.D. & Wieschaus, E.** (1993). *bottleneck* acts as a regulator of the microfilament network governing cellularization of the *Drosophila* embryo. *Cell* 75: 373-385.
- Schnappinger, D. & Hillen, W.** (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Arch Microbiol* 165: 359-369.
- Schweisguth, F., Yanicostas, C., Payre, F., Lepesant, J.A., & Vincent, A.** (1989). *cis*-regulatory elements of the *Drosophila* blastoderm-specific *serendipity alpha* gene: ectopic activation in the embryonic PNS promoted by the deletion of an upstream region. *Dev Biol* 136: 181-193.
- Scott, K.C., Taubman, A.D., & Geyer, P.K.** (1999). Enhancer blocking by the *Drosophila* *gypsy* insulator depends upon insulator anatomy and enhancer strength. *Genetics* 153: 787-798.
- Sgonc, R., Boeck, G., Dietrich, H., Gruber, J., Recheis, H., & Wick, G.** (1994). Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet* 10: 41-42.
- Sheng, G., Thouvenot, E., Schmucker, D., Wilson, D.S., & Desplan, C.** (1997). Direct regulation of *rhodopsin 1* by Pax-6/eyeless in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev* 11: 1122-1131.
- Shi, Y.** (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9: 459-470.

- Simmons, G.M., Plummer, D., Simon, A., Boussy, I.A., Frantsve, J., & Itoh, M.** (1998). Horizontal and vertical transmission of *hobo*-related sequences between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. In: Horizontal gene transfer (Hrsg. Syvanen, M. & Kado, C.I.), S. 285-293. Chapman & Hall, London.
- Simpson, L. & Wieschaus, E.** (1990). Zygotic activity of the *nullo* locus is required to stabilize the actin-myosin network during cellularization in *Drosophila*. *Development* 110: 851-863.
- Song, Z. & Steller, H.** (1999). Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 9: 49-52.
- Spradling, A.C. & Rubin, G.M.** (1982). Transposition of cloned *P* elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218: 341-347.
- Spradling, A.C. et al.** (1999). The Berkeley *Drosophila* Genome Project gene disruption project: Single *P*-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* 153: 135-177.
- Spradling, A.C., Stern, D.M., Kiss, I., Roote, J., Laverly, T., & Rubin, G.M.** (1995). Gene disruptions using *P* transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10824-10830.
- Staebling-Hampton, K., Laughon, A.S., & Hoffmann, F.M.** (1995). A *Drosophila* protein related to the human zinc finger transcription factor PRDII/MBPI/HIV-EP1 is required for *dpp* signaling. *Development* 121: 3393-3403.
- Stein, J.A., Broihier, H.T., Moore, L.A., & Lehmann, R.** (2002). *Slow as molasses* is required for polarized membrane growth and germ cell migration in *Drosophila*. *Development* 129: 3925-3934.
- Sundararajan, P., Atkinson, P.W., & O'Brochta, D.A.** (1999). Transposable element interactions in insects: crossmobilization of *hobo* and *Hermes*. *Insect Mol Biol* 8: 359-368.
- Szüts, D. & Bienz, M.** (2000). LexA chimeras reveal the function of *Drosophila* Fos as a context-dependent transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5351-5356.
- Telfer, W.H. & Kunkel, J.G.** (1991). The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol* 36: 205-228.
- Theurkauf, W.E., Baum, H., Bo, J., & Wensink, P.C.** (1986). Tissue-specific and constitutive *alpha-tubulin* genes of *Drosophila melanogaster* code for structurally distinct proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 8477-8481.
- Thomas, D.D., Donnelly, C.A., Wood, R.J., & Alphey, L.S.** (2000). Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* 287: 2474-2476.
- Thummel, C. & Pirrotta, V.** (1992). New pCaSpeR *P*-element-vectors. *Dros Inf Serv* 71: 150.
- Tittel, J.N. & Steller, H.** (2000). A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol* 1: 1-6.
- Tsien, R.Y.** (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67: 509-544.
- Uhlířova, M., Asahina, M., Riddiford, L.M., & Jindra, M.** (2002). Heat-inducible transgenic expression in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev Genes Evol* 212: 145-151.
- Varghese, J., Sade, H., Vandenabeele, P., & Sarin, A.** (2002). Head involution defective (Hid)-triggered apoptosis requires caspase-8 but not FADD (Fas-associated death domain) and is regulated by Erk in mammalian cells. *J Biol Chem* 277: 35097-35104.
- Vincent, A., Colot, H.V., & Rosbash, M.** (1986). Blastoderm-specific and read-through transcription of the *sry alpha* gene transformed into the *Drosophila* genome. *Dev Biol* 118: 480-487.
- Vreysen, M.J. et al.** (2000). *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J Econ Entomol* 93: 123-135.

- Vreysen, M.J.** (2001). Principles of area-wide integrated tsetse fly control using the sterile insect technique. *Med Trop 61*: 397-411.
- Vucic, D., Kaiser, W.J., & Miller, L.K.** (1998). Inhibitor of apoptosis proteins physically interact with and block apoptosis induced by *Drosophila* proteins HID and GRIM. *Mol Cell Biol 18*: 3300-3309.
- Walters, M.L., Staten, R.T., & Roberson, R.C.** (2000). Pink Bollworm Integrated Management using sterile insects under field trial conditions, Imperial Valley, California. In: Area-wide control of fruit flies and other insect pests (Hrsg. Tan, K.-H.), S. 201-206. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia.
- Wang, S.L., Hawkins, C.J., Yoo, S.J., Müller, H.A., & Hay, B.A.** (1999). The *Drosophila* caspase inhibitor DIAP1 is essential for cell survival and is negatively regulated by HID. *Cell 98*: 453-463.
- Watanabe, K. & Sato, M.** (1998). Plasmid-mediated gene transfer between insect-resident bacteria, *Enterobacter cloacae*, and plant-epiphytic bacteria, *Erwinia herbicola*, in guts of silkworm larvae. *Curr Microbiol 37*: 352-355.
- Wilson, C., Pearson, R.K., Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Grossniklaus, U., & Gehring, W.J.** (1989). *P*-element-mediated enhancer detection: an efficient method for isolating and characterizing developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes Dev 3*: 1301-1313.
- Wimmer, E.A., Simpson-Brose, M., Cohen, S.M., Desplan, C., & Jäckle, H.** (1995). *Trans*- and *cis*-acting requirements for blastodermal expression of the head gap gene *buttonhead*. *Mech Dev 53*: 235-245.
- Wyss, J.H.** (2000). Screwworm eradication in the Americas - overview. In: Area-wide control of fruit flies and other insect pests (Hrsg. Tan, K.-H.), S. 79-86. Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia.
- Xiong, W.C. & Montell, C.** (1993). *tramtrack* is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the *Drosophila* eye. *Genes Dev 7*: 1085-1096.
- Yang, T.T., Cheng, L., & Kain, S.R.** (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res 24*: 4592-4593.
- Yin, D.X., Zhu, L., & Schimke, R.T.** (1996). Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal Biochem 235*: 195-201.
- Yoo, S.J. et al.** (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat Cell Biol 4*: 416-424.







## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Darüber hinaus erkläre ich, daß ich weder an der Universität Bayreuth, noch an einer anderen Hochschule versucht habe, eine Dissertation einzureichen, oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

---

Carsten Horn

Bayreuth, den 14. April 2003