

Genetische Studien in *Drosophila*

Der Modellorganismus *Drosophila*

In dieser Lektion lernen Sie *Drosophila melanogaster* als einfachen, mehrzelligen Modellorganismus kennen und sehen, wie *Drosophila* zur Identifizierung von Genen benutzt wird, die an grundlegenden Prozessen wie Zelldifferenzierung oder Wachstum beteiligt sind.

Drosophila wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Thomas Hunt Morgan zum ersten Mal als Versuchstier benutzt. Für seine Entdeckung, dass Chromosomen die Grundlage der Vererbung sind, erhielt er 1933 den Nobelpreis. Seither gibt es auf der Welt tausende von "Fliegenforschern".

Neben der kurzen Generationszeit (10 Tage vom Ei zur Fliege) und der kostengünstigen Haltung besitzt *Drosophila* weitere, für genetische Studien vorteilhafte Eigenschaften. Männliche und weibliche Fliegen können leicht per Auge unterschieden und somit die Geschlechter für Kreuzungen einfach voneinander

getrennt werden (Abbildung 1a). Weiterhin besitzt *Drosophila* nur 4 Chromosomenpaare: 3 Autosomenpaare und ein Paar Geschlechtschromosomen (Abbildung 1b). Die geringe Chromosomenzahl ist in der Genetik deshalb von Vorteil, weil Gene, die auf dem gleichen Chromosom liegen, gemeinsam vererbt werden, wenn kein Crossing-over stattfindet. So ist es einfacher herauszufinden, auf welchem Chromosom eine Mutation liegt (man nennt dies auch „Kartieren einer Mutation“). Das Genom von *Drosophila* wurde im Jahr 2000 sequenziert. Von den ungefähr 15.000 Genen sind etwa 50% homolog zu menschlichen Genen. Erkenntnisse, die an *Drosophila* als Modellorganismus gewonnen werden, können deshalb auch auf höhere Organismen, insbesondere den Menschen übertragen werden.

Ein weiterer Vorteil von *Drosophila* liegt in ihrem Körperaufbau. *Drosophila* entwickelt sich über drei Larvenstadien und einem Puppenstadium bis zur adulten Fliege (Abbildung 2).

Schon die Larve zeigt ein Segmentierungsmuster und eine Aufteilung in Kopf, Thorax und Hinterleib

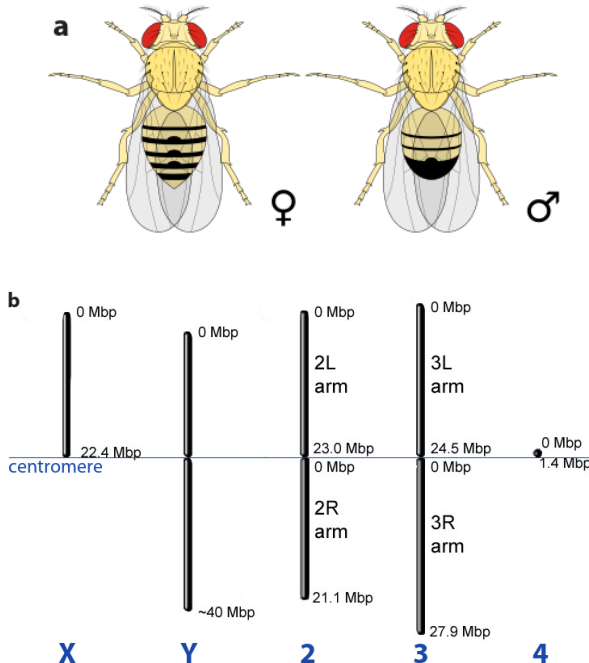


Abbildung 1 a) Morphologische Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen bei *Drosophila*. Beim Weibchen ist die Färbung des Hinterleibs (Abdomen) segmentiert, während beim Männchen der gesamte hintere Teil des Abdomens schwarz gefärbt ist. b) Das Genom von *Drosophila* besteht aus 4 Chromosomen und ca. 180 Millionen Basenpaaren. (Abbildungsquelle: Wikipedia, *Drosophila melanogaster*)

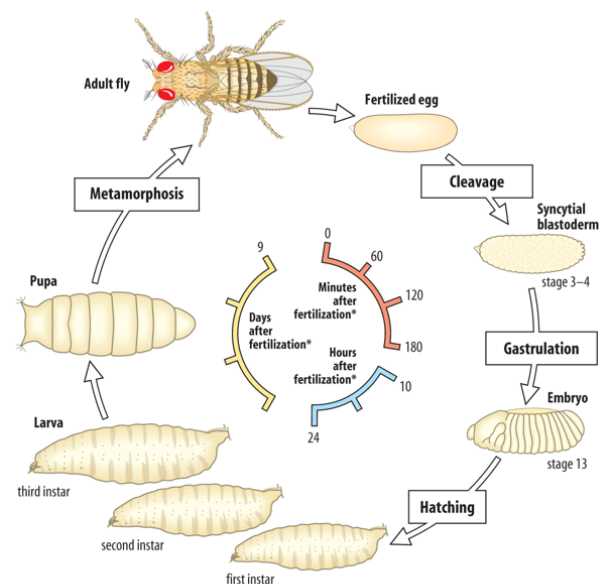


Abbildung 2 Lebenszyklus von *Drosophila*. Im befruchteten Ei teilen sich zunächst die Zellkerne, ohne dass sich Zellmembranen bilden; das Syncytium entsteht (eine Zelle mit vielen Zellkernen). Nach 12-15 Stunden schlüpft aus dem Ei die Larve (1. Larvenstadium, „first instar“). Die Larve wächst über zwei weitere Larvenstadien („second“ und „third instar“), bevor sie sich verpuppt. Während der Metamorphose werden die larvalen Organe in adulte Strukturen umgewandelt. (Abbildungsquelle: StudyBlue)

(Abdomen, Abbildung 3), die in diesem Stadium von aussen noch nicht sichtbar ist. In der Vorlesung „Biologie II: Zellbiologie“ haben Sie gelernt, wie der Embryo entlang der anterior-posterioren Achse in Segmente geteilt wird. Dabei entsprechen die embryonalen Segmente den späteren larvalen Segmenten. Veränderungen des Segmentierungsmusters der Larve können daher als Phänotyp zur Identifizierung von Mutationen dienen. Die Segmentierungsgene (Lücken-, Paarregel- und Segmentpolaritätsgene) und die charakteristischen Phänotypen, die Mutationen in diesen Genen bewirken (z.B. *Hedgehog*), kennen Sie bereits. Später in dieser Lektion werden Sie erfahren, wie genetische Studien zur Entdeckung dieser Mutationen geführt haben.

Die adulte Fliege besitzt weitere anatomische Merkmale, an denen die Auswirkungen von Mutationen

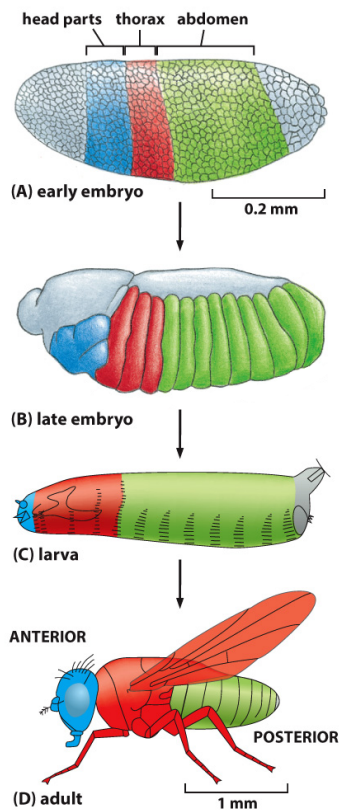


Abbildung 3 Die Entstehung der Segmente in *Drosophila*. a) Im frühen Embryo (3 Stunden nach der Befruchtung) ist die Segmentierung zwar noch nicht sichtbar, die Regionen der späteren Segmente (farblich markiert) sind jedoch durch differentielle Genexpression bereits festgelegt. b) Nach etwa 10 Stunden sind die Segmente bereits klar definiert und im Embryo sichtbar. c) Die embryonalen Segmente entsprechen den larvalen Segmenten. d) Die Aufteilung in Segmente spiegelt sich auch in der Fliege wieder. (Abbildungsquelle: figure 21-18, *Molecular Biology of the Cell*, 6th edition, Garland Science)

untersucht werden können. Unterschiede in der Augenfarbe, Flügelform oder Borstenanzahl lassen sich leicht im Binokular erkennen. Aufgrund des klar definierten Segmentierungsmusters ist *Drosophila* noch immer der Modellorganismus der Wahl zur Untersuchung der Embryonalentwicklung. Obwohl sich die Entwicklungslinien von *Drosophila* und Wirbeltieren vor mehr als 700 Millionen Jahren getrennt haben, sind viele Entwicklungsprozesse stark konserviert – denken Sie zum Beispiel an die Funktion der *Hox*-Gene oder die Wirkung von Signalkaskaden wie z.B. des Wnt- oder Hedgehog-Signalwegs.

Der Erfolg von *Drosophila* als genetischer Modellorganismus gründet sich auch auf die vielen zur Verfügung stehenden Techniken und Ressourcen: Sammlungen verschiedener Fliegenmutanten (*engl. mutant libraries*) oder genetisch modifizierter Fliegen (z.B. zur Expression von GFP-markierten Proteinen oder zur Hemmung der Genexpression durch RNA-Interferenz) sind für Forscher frei zugänglich. Sichtbare Marker - Mutationen, die zu einem bestimmten Phänotyp führen (z.B. gebogene Flügel) können benutzt werden, um Fliegen aufgrund ihres Genotyps zu selektionieren. Wir werden den Einsatz solcher Marker später in dieser Lektion genauer besprechen.

Der einzige nennenswerte Nachteil von *Drosophila* ist die Notwendigkeit der Lebendhaltung – Eier oder Larven können nicht zur Lagerung eingefroren und später “wiederbelebt” werden, wie es beispielsweise bei Bakterien oder Hefe möglich ist.

Genetische Studien in *Drosophila* identifizierten die ersten Gene der Embryonalentwicklung

In einem der Videos aus der Einführungsvorlesung haben Sie die Studie von Christiane Nüsslein-Vollhard und Eric Wieschaus kennengelernt, die 15 grundlegende Genen identifiziert hat, deren Mutationen zu Fehlern in der Segmentierung der Larve führen. Diese Entdeckung brachte den beiden Forschern den Nobelpreis ein. Im sogenannten “Heidelberg-Screen” (benannt nach dem Ort des Geschehens, dem European Molecular Biology Laboratory, EMBL) suchten sie nach Mutationen, die zu einem rezessiven Phänotyp führen. Dazu mutagenisierten sie Fliegen (Parentalgeneration, P_0) und kreuzten deren Nachkommen (Filialgeneration

F₁). Die Nachkommen dieser Kreuzungen (F₂) waren somit heterozygot für die Mutation, so dass Kreuzungen der Fliegen der F₂-Generation untereinander zu Fliegen führten, die homozygot für die Mutation waren. In diesen Fliegen kann sich ein mögliches rezessives Merkmal ausbilden und einen veränderten Phänotyp zur Folge haben.

Der Screen von Nüsslein-Vollhard und Wieschaus war einer der ersten Screens überhaupt, beim dem larvale anstatt adulte Phänotypen untersucht wurden. So konnten auch Mutationen in Genen identifiziert werden, die in frühen Schritten der Embryonalentwicklung, z.B. der Musterung, eine wichtige Rolle spielen. Mutationen in solchen Genen führen normalerweise zum Tod der Larve; in adulten Tieren können daher die Auswirkungen dieser Mutationen nicht untersucht werden. *Drosophila* war für einen solchen Screen gut geeignet, da die Musterung bereits in der Cuticula (der äusseren Schicht) der frühen Larve sichtbar ist, so dass man dieses Muster in einem genetischen Screen als Phänotyp "auslesen" kann.

Entscheidend für das Gelingen des Screens war eine weitere Besonderheit der *Drosophila*-Embryonalentwicklung: der Maternaleffekt. Sie haben in der Vorlesung Biologie II: Zellbiologie bereits gelernt, dass die Mutter das Ei mit Genprodukten (z.B. Bicoid-mRNA) belädt, die für die Ausbildung der anterior-posterioren und dorso-ventralen Achse entscheidend sind. Die Genprodukte der Maternaleffekt-Gene erlauben es dem Embryo also, die ersten Entwicklungsschritte, die zur Bildung einer Larve nötig sind, zu durchlaufen. Nur sehr wenige zygotische Gene sind für die ersten Schritte der Embryonalentwicklung nötig. Daher beeinflussen die meisten Mutationen die frühe Embryogenese nicht, sodass sich die mutanten Embryonen zu Larven entwickeln können, in denen die Auswirkungen der Mutationen untersucht werden können.

Nüsslein-Vollhard und Wieschaus hatten sich zum Ziel gesetzt, mit ihrem Screen alle Gene, die für Segmentierung und Musterung des Embryos verantwortlich sind, zu identifizieren. Es gab dabei allerdings ein entscheidendes Problem: Mutanten mit defekter Embryonalentwicklung werden höchstwahrscheinlich sterben und sich nie zur adulten Fliege entwickeln. Wie kann man also solche Mutationen, die embryonal oder larval letal sind, für die nächste Generation erhalten, wenn man

die Mutanten nicht weiterkreuzen kann (da sie bereits als Larve sterben)? Die Lösung ist, heterozygote Fliegen (also Fliegen, die nur eine Kopie des mutanten Allels tragen) herauszunehmen und diese für weitere Kreuzungen aufzubewahren. Da im Screen nach rezessiven Phänotypen gesucht wird, sind heterozygote Fliegen phänotypisch normal und lebensfähig. Wie kann man aber heterozygote Fliegen von Fliegen, die keine Mutation tragen (wildtyp, WT), unterscheiden, wenn beide gleich aussehen?

Hierfür benutzten die Forscher spezielle Versionen von Chromosomen, die einen sichtbaren (phänotypischen) Marker besitzt (wie z.B. die gebogenen Flügel in Abbildung 4 rechts). So kann nach Kreuzungen verfolgt werden, in welchen Fliegen diese spezielle Version eines Chromosoms vorkommt. Diese speziellen Chromosomen, die man Balancer-Chromosomen nennt, besitzen einige für genetische Screens essentielle Merkmale, die wir nun kurz vorstellen werden.

Balancer-Chromosomen sind Werkzeuge, um letale Mutationen zu isolieren und für weitere Generationen zu erhalten

Balancer-Chromosomen werden in Modellorganismen (neben *Drosophila* auch im Fadenwurm *C. elegans* oder der Maus) benutzt, um Mutationen, die homozygot zum Tod des Organismus führen, über mehrere Generationen in einer Population erhalten zu können. Balancer-Chromosomen tragen einen dominanten phänotypischen Marker, somit können Fliegen, die dieses Balancer-Chromosom tragen, leicht identifiziert und isoliert werden. Wird eine Fliege, die heterozygot für ein Balancer-Chromosom und eine Mutation ist, mit einer Wildtyp-Fliege (WT) gekreuzt, so kann man in den Nachkommen bestimmen, welche Fliege das Balancer-Chromosom erhalten hat. Abbildung 4 zeigt die Kreuzung eines Weibchens, das eine Mutation *m* auf den einen und ein Balancer-Chromosom als das andere Chromosom trägt, mit einem WT-Männchen. 50% der Nachkommen werden das Balancer-Chromosom, aber nicht die Mutation erhalten (rechts) und 50% die Mutation, aber nicht das Balancer-Chromosom (links). Da das Balancer-Chromosom einen dominanten

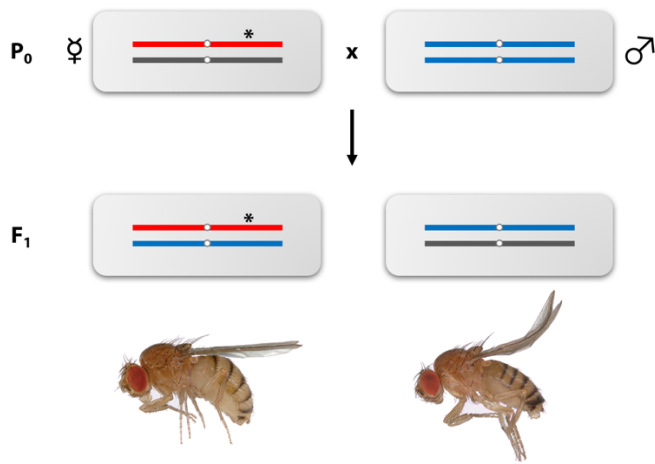


Abbildung 4 Balancer-Chromosomen in *Drosophila*. Die Weibchen tragen auf einem der homologen Chromosomen eine Mutation (symbolisiert durch *), das andere Chromosom ist ein Balancer, der gebogene Flügel verursacht (symbolisiert durch ein graues Chromosom). Werden sie mit WT-Männchen gekreuzt (symbolisiert durch blaue Chromosomen) so tragen die Nachkommen entweder die Mutation (links) oder den Balancer (rechts). Gezeigt ist hier nur das 2. Chromosom, die restlichen *Drosophila*-Chromosomen (1,3 und 4) sind nicht abgebildet.

Marker trägt (gebogene Flügel), kann man die Fliegen voneinander unterscheiden.

In der in Abbildung 4 gezeigten Kreuzung bestünde aber nun die Möglichkeit, dass es zwischen dem Chromosom, das die Mutation trägt und dem Balancer-Chromosom in der Meiose (z.B. bei der Keimzellbildung der weiblichen Fliege in P₀) zu einem Crossing-Over kommt. Durch ein solches Ereignis könnten Chromosomen entstehen, die entweder die Mutation und den Marker tragen oder keines von beidem. Die glatten bzw. gebogenen Flügel wären dann kein Anzeichen für die An- bzw. Abwesenheit der Mutation mehr.

Um dieses durch Crossing-Over verursachte Problem zu umgehen, haben Balancer-Chromosomen weitere Merkmale, die sie von "normalen" Chromosomen unterscheiden: Sie enthalten ein oder mehrere umgekehrte DNA-Stücke. Ein Beispiel für ein Balancer-Chromosom zeigt Abbildung 5, wobei die Zahlen cytologischen Positionen auf dem Chromosom entsprechen (dies sind Orientierungshilfen für die Anordnung der Gene auf den Chromosomen; die Nummer beschreibt die Lage eines Gens). Durch die Umkehrung bestimmter DNA-Stücke unterscheidet sich die Anordnung der Gene im Balancer-Chromosom, manche Genregionen (z.B. 21-22) sind sogar

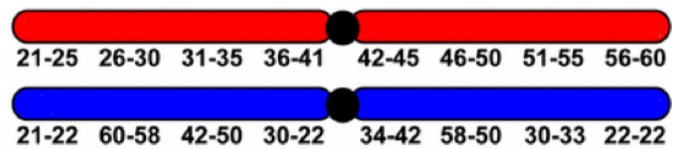


Abbildung 5 Die Anordnung der Gene auf dem wildtypischen Chromosom 2 (rot) und dem entsprechenden Balancer-Chromosom (blau) ist verschieden.

doppelt vorhanden. Für jedes "natürliche" *Drosophila*-Chromosom gibt es entsprechende Balancer-Chromosomen.

Dieses "verkrüppelte" Balancer-Chromosom ist also nicht mehr homolog zum entsprechenden WT-Chromosom. Normalerweise würde in der Meiose zwischen homologen Chromosomen Rekombination stattfinden und DNA-Material zwischen den Chromosomen ausgetauscht. Wenn aber eines der Chromosomen ein Balancer-Chromosom ist, so führen Crossing-over-Ereignisse an umgekehrten oder verdoppelten DNA-Bereichen zu zwei "verkrüppelten" Chromosomen mit Deletionen oder Duplikationen oder Chromosomen mit zwei oder keinem Centromer. Daher werden Zellen, die aus einer Meiose hervorgehen, bei der Rekombination zwischen einem Balancer- und einem WT-Chromosom stattgefunden hat, nicht überleben.

Viele Balancer-Chromosomen zeigen noch ein drittes Merkmal: Sie tragen eine rezessive Mutation (Letalfaktor), die homozygot letal ist. Fliegen, die zwei Kopien eines Balancer-Chromosoms erhalten, sind also nicht lebensfähig. Ist in Fliegen eine bestimmte, homozygot letale Mutation auf einem Chromosom (z.B. eine, die die Embryonalentwicklung beeinflusst) zusammen mit dem entsprechenden Balancer-Chromosom vorhanden, so kann diese homozy-

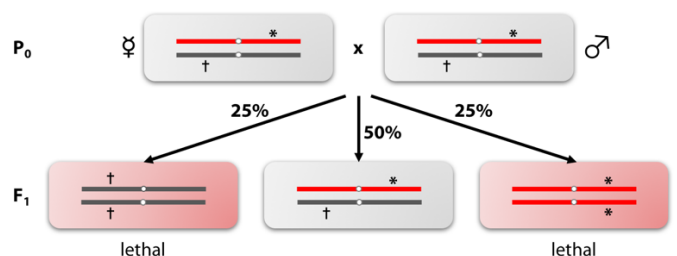


Abbildung 6 Letalfaktoren (symbolisiert durch †) auf dem Balancer bewirken, dass Mutationen (symbolisiert durch *) in einer Population erhalten bleiben, da Individuen, die homozygot für den Balancer sind, sterben. Wenn die Mutation (*) auch homozygot letal ist, so überleben nur Individuen, die den Balancer und die Mutation tragen (Mitte).

got letale Mutation stabil weitergehalten werden (Abbildung 6, Mitte). Da nur Fliegen, die heterozygot für das Balancer-Chromosom und die Mutation sind, überleben, können sowohl das Balancer-Chromosom als auch die Mutation stabil in der Fliegenpopulation erhalten werden (Abbildung 6).

Der Versuchsaufbau des „Heidelberg-Screens“

Als Ausgangspopulation für den Screen benutzten Nüsslein-Vollhard und Wieschaus männliche Fliegen, die sie mit Ethylmethansulfonat (EMS) fütterten, um Mutationen in den Spermien dieser Fliegen zu erzeugen. Sie entschieden, sich zuerst auf Mutationen zu beschränken, die auf dem 2. Chromosom liegen.

Frage: Warum muss eine Entscheidung für ein bestimmtes Chromosom getroffen werden? Kann man nicht alle Mutationen auf allen Chromosomen gleichzeitig im Screen untersuchen?

Abbildung 7 zeigt das Kreuzungsschema des Screens. Die mutagenisierten Männchen (P_0) werden mit Weibchen, die den Balancer tragen, gekreuzt. Da die Mutationen in den Keimzellen der mutagenisierten Männchen zufällig und in jeder Keimzelle unterschiedlich entstehen, tragen die Nachkommen dieser Männchen (F_1) unterschiedliche Mutationen. Jedes einzelne Männchen aus der F_1 -Generation, das ein Balancer-Chromosom und ein „mutiertes“ Chromosom trägt, wird nun einzeln mit Balancer-Weibchen gekreuzt. Das heisst, für jedes Männchen der F_1 -Generation wird eine separate Kreuzung angesetzt, so dass man nun parallel mit mehreren Tausenden von Kreuzungen arbeitet! Aus jeder Kreuzung entsteht nun eine F_2 -Generation, in der die Fliegen heterozygot für die EMS-induzierte Mutation sind. Kreuzt man nun die Fliegen innerhalb einer F_2 -Generation miteinander (also Fliegen, die aus der gleichen Kreuzung stammen, d.h., Geschwister mit identischem Genotyp), so sind in der F_3 -Generation 25% der Fliegen homozygot für den Balancer – diese Embryonen sterben aufgrund des letalen Markers auf dem Balancer. 50% der Fliegen werden den Balancer und das mutierte Chromosom enthalten; diese Tiere sind lebensfähig und können

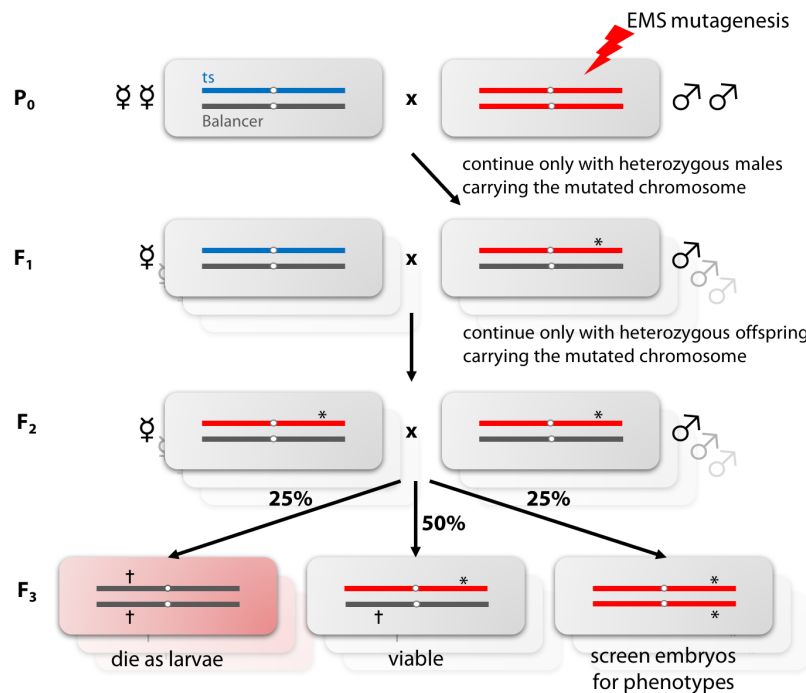


Abbildung 7 Kreuzungsschema des Heidelberg-Screens. Die mit EMS mutagenisierten Männchen werden mit Weibchen gekreuzt, die einen Balancer (graues Chromosom) und ein anderes Chromosom mit einem selektierbaren Marker (symbolisiert durch M, blaues Chromosom) tragen. Jedes einzelne Männchen aus der resultierenden F_1 -Generation wird mit Balancer-Weibchen weiter gekreuzt, so dass viele verschiedene F_2 -Generationen entstehen, die alle eine bestimmte Mutation (symbolisiert durch *) und einen Balancer tragen. Werden nun Männchen und Weibchen der gleichen F_2 -Generation miteinander gekreuzt, entstehen in der F_3 -Generation Fliegen, die homozygot für die EMS-induzierte Mutation sind (rechts); diese Fliegen werden nun weiter auf einen bestimmten Phänotyp untersucht. (Abbildungsquelle: D. St Johnston, Nat. Rev. Genet.)

weitergezüchtet werden. 25% der Fliegen der F₃-Generation sind homozygot für das mutierte Chromosom.

In diesem Screen wurden die Fliegen der F₃-Generation zunächst dahingehend überprüft, ob es Fliegen gab, die keinen Balancer enthalten (diese wären homozygot für die EMS-induzierte Mutation). Tauschen Fliegen ohne Balancer auf, bedeutet dies, dass die Mutation nicht letal ist; diese Fliegen würden nicht weiter beobachtet, da sie keine der gesuchten Mutationen enthalten (erinnern Sie sich, dass im Screen nach Genen gesucht wurden, die für die Embryonalentwicklung entscheidend sind!). Gab es dagegen in der F₃-Generation nur Fliegen, die den Balancer trugen, so mussten alle homozygot mutanten Fliegen gestorben sein, was bedeuten würde, dass es sich bei dieser Mutation um eine embryonal oder larval letale, also möglicherweise interessante Mutation handeln könnte. Diese Fliegen wurden also weitergekreuzt und untersucht, ob ein Teil der Embryonen (der erwartete Anteil an homozygoten Embryonen wäre 25%) einen Unterschied im Segmentierungsmuster zeigen, dass man an der Cuticula der Embryonen ablesen kann. Embryonen mit einem Segmentierungsmuster, das vom WT abweicht, waren interessant, weil sie auf eine Mutation in einem der gesuchten Musterungsgene hinwiesen.

Tatsächlich wurden durch die Untersuchung der homozygot letalen Mutationen die grundlegenden Entwicklungsgene in *Drosophila* entdeckt. Die Mutationen wurden aufgrund ihres Phänotyps in Gruppen eingeteilt. Die dazugehörigen Gene fallen in funktionelle Klassen, die Lücken-, Paarregel- und Segmentpolaritätsgene, die nach einer festgelegten Hierarchie die Musterung des Embryos bestimmen.

Frage: Welche Gene konnten Nüsslein-Vollhard und Wieschaus in ihrem Screen wohl nicht finden?

Der Screen von Nüsslein-Vollhard und Wieschaus war revolutionär: Beadle und Tatum verwendeten einen genetischen Screen, um Enzyme von Stoffwechselprozessen (Biosynthese von Aminosäuren) zu identifizieren. Nüsslein-Vollhard und Wieschaus wendeten erstmals dieselbe Logik auf Entwicklungsprozesse an. Somit war dies der erste Screen, der Gene identifizierte, die in der Embryonalentwicklung eine Rolle spielen. Der Screen hatte aber zwei entscheidende Nachteile: Erstens war er sehr zeitauf-

wendig und arbeitsintensiv, da mehrere Generationen hergestellt und viele Tiere untersucht werden mussten, um rezessive Phänotypen zu entdecken. Zweitens erlaubte er zwar die Entdeckung von Genen, die in der frühen Embryonalentwicklung eine Rolle spielen; die Rolle dieser Gene in späteren Entwicklungsschritten konnte jedoch nicht weiter untersucht werden, da Mutationen in essentiellen Genen fast immer im Embryonal- oder Larvenstadium zum Tod führen. Daher konnte nur die allererste Funktion des Gens in der Entwicklung untersucht werden. Viele der Segmentierungsgene, z.B. *Hedgehog* oder *Wnt*, haben auch wichtige Funktionen in späteren Entwicklungsschritten, z.B. der Bildung von Gliedmassen oder des Nervensystems. Wie kann man die Funktionen solcher Gene in späteren Entwicklungsstadien untersuchen, wenn die Mutation eines solchen Gens bereits in frühen Stadien zum Tod führt?

Klonale Screens

Eine Möglichkeit, das Problem der Letalität von Mutationen zu umgehen und so auch die Phänotypen in späteren Entwicklungsschritten zu beobachten sind die sogenannten „klonalen“ Screens. Bei diesen Screens sind nur manche Zellen in einem Gewebe des Organismus homozygot für eine bestimmte Mutation, während der Rest des Tieres heterozygot für die Mutation bleibt. Die Technik basiert darauf, in mitotischen (somatischen) Zellen künstlich Rekombination, also den Austausch von DNA-Stücken, zu induzieren.

Um diese Technik zu verstehen, müssen wir kurz rekapitulieren, was bei der Mitose passiert. Teilt sich eine Zelle, die heterozygot für eine bestimmte Mutation ist, so werden die Tochterzellen auch wieder je eine Kopie des mutierten Chromosoms erhalten. Wird nun während der Mitose künstlich Rekombination induziert, so tauschen die Chromatiden der homologen Chromosomen DNA-Stücke miteinander aus (wie dies normalerweise in der Meiose passiert). Dadurch kann die Mutation von einem Chromatid des einen Chromosoms auf ein Chromatid des homologen Chromosoms übertragen werden. Nach der Teilung der Zelle können so zwei ungleiche Tochterzellen entstehen, die entweder homozygot für die Mutation oder homozygot für das wildtypische Chromosom sind (Abbildung 8).

Um eine solche Rekombination in der Mitose zu induzieren, verwendet man das Enzym Flp-Rekombinase (ein ursprünglich in Hefe vorhandenes Enzym), das eine ortsspezifische Rekombination zwischen Zielstellen, sogenannten FRT-Stellen, vermittelt. Das bedeutet, dass an einer genau definierten Stelle (der FRT-Stelle) im Genom durch Rekombination DNA-Stücke ausgetauscht werden. Je nachdem, wo sich die FRT-Stelle auf dem Chromosom befindet, wird also definiert, welches DNA-Stück ausgetauscht wird, und es können Zellen erzeugt werden, die homozygot für einen Chromosomenarm sind, der Mutationen trägt. Diese homozygot mutanten Zellen teilen sich mitotisch weiter und erzeugen so „Flecken“ (Klone) homozygot mutanter Zellen, die im Gewebe von heterozygoten Zellen umgeben sind. Je nachdem, wie viele solcher Klone entstehen, kann das Gewebe fast ausschliesslich aus homozygot mutantern Gewebe bestehen, was zu einem Phänotyp führen kann, der vom Wildtyp abweicht. Nach einem solchen Phänotyp kann dann im Screen gesucht werden. Die Flp/FRT-Technik wurde in *Drosophila* etabliert, wurde aber vor Kurzem für den Einsatz in anderen Modellorganismen einschliesslich *C. elegans* und der Maus angepasst.

Damit die Rekombination funktioniert, müssen die FRT-Stellen an identischen Positionen auf den homologen Chromosomen liegen. Diese FRT-Stellen kommen nicht natürlich vor, sondern wurden künstlich in die Fliege eingeführt. Heutzutage gibt es Fliegenlinien, die eine FRT-Stelle für jeden Arm jedes der drei Hauptchromosomen (X, 2, 3) im *Drosophila*-Genom tragen. Auch das Flp-Rekombinase-Gen muss künstlich in die Fliegen eingeführt werden und liegt als Transgen im Fliegen-genom vor. Schauen wir uns nun anhand Abbildung 8 genau an, wie solche Klone erzeugt werden. Fliegen, die ein Chromosom mit einer Mutation (markiert mit *, rotes Chromosom) distal zu einer FRT-Stelle und ein Balancer-Chromosom (graues Chromosom) trägt, werden mit Fliegen gekreuzt, die zwei Chromosomen enthalten, die nur die FRT-Stelle tragen. In der Nachkommenschaft werden 50% der Embryonen heterozygot für die Mutation und die FRT-Stelle sein und 50% werden homozygot für das Chromosom, das nur die FRT-Stelle enthält, sein. Für die mitotische Rekombination interessieren uns nur die Embryonen, die die Mutation enthalten und heterozygot sind.

In diesen Zellen wird in der Mitose durch die Flp-Rekombinase eine ortsspezifische Rekombination zwischen Chromatiden homologer Chromosomen an den FRT-Stellen erzeugt, was zu einem Austausch von DNA-Material führt, das distal zur FRT-Stelle liegt. Teile des blauen Chromosoms werden mit Teilen des roten Chromosoms ausgetauscht und umgekehrt. Während der Zellteilung trennen sich die Schwesterchromatiden, was in einigen Fällen zu Tochterzellen führt, die für die Mutation homozygot sind. Diese Zellen enthalten zwei Kopien des mutanten Allels. Die anderen Zellen enthalten zwei Kopien des Wildtyp-Chromosoms. Diese Zellen können sich vermehren und zu Klonen mit identischen Genotypen heranwachsen.

Wie kann man nun die wildtypischen Zellen von den heterozygoten oder homozygoten Zellen unterscheiden? Um Rekombinationsereignisse sichtbar zu machen, nutzt man einen Trick, bei dem eines der Chromosomen, die an der Rekombination teilnehmen, einen sichtbaren Marker trägt. Der Marker

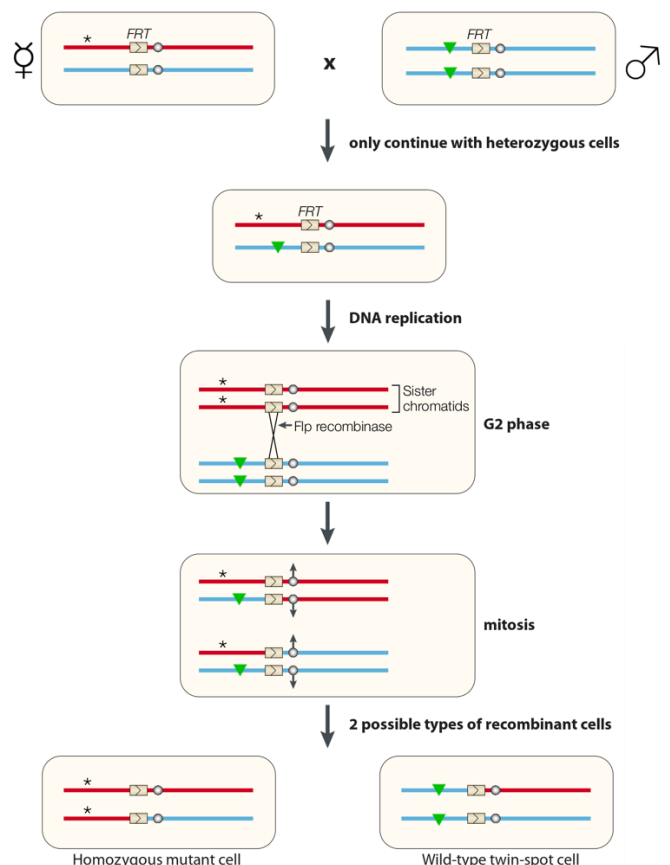


Abbildung 8 Kreuzungsschema zur Herstellung homozygot mutanter Klone mithilfe des Flp/FRT-Systems. Das grüne Dreieck symbolisiert einen sichtbaren Marker (GFP). (Abbildungsquelle: D. St Johnston, Nat. Rev. Genet.)

muss sich auf demselben Chromosomenarm wie die Mutation befinden, so dass sowohl der Marker als auch die Mutation am Rekombinationsereignis teilnehmen. Wenn zum Beispiel das väterliche Chromosom ein Gen trägt, das für einen fluoreszierenden Marker (GFP, grünes Dreieck, Abbildung 8) codiert, werden jene Zellen, die für das Wildtyp-Allel homozygot sind, grüne Fluoreszenz zeigen. Zellen, die für das mutierte Allel homozygot sind, enthalten diesen Marker nicht und zeigen keine Fluoreszenz. So lassen sich deutlich unterscheidbare Bereiche von mutanten und Wildtypzellen erzeugen.

Klonale Screens haben zwei grosse Vorteile gegenüber klassischen F_2 -Screens: Erstens können F_1 -Screens für rezessive Phänotypen durchgeführt werden, da keine zusätzlichen Generationen benötigt werden, um homozygote Mutantenzellen herzustellen (homozygote Zellen entstehen durch die mitotische Rekombination in jeder einzelnen Fliege der F_1 -Generation). Zweitens kann man durch die Verwendung einer Flp-Rekombinase, die in spezifischen Zellen oder in einem bestimmten Stadium während der Entwicklung exprimiert wird, kontrollieren, wo und wann eine Rekombination auftritt, so dass nur bestimmte Zellen (z.B. Augenzellen) homozygot gemacht werden können. So können gewebespezifische Phänotypen von essentiellen Genen unabhängig von ihren anderen Funktionen in der Entwicklung sichtbar gemacht werden. Dadurch, dass eine Mutation erst später in der Entwicklung

„induziert“ wird (d.h., erst in einem späteren Stadium homozygot mutante Zellen entstehen) kann eine embryonale Sterblichkeit umgangen werden.

Frage: Welche Voraussetzung muss erfüllt sein, damit homologe Rekombination in mitotischen Zellen stattfinden kann?

Gewebespezifische klonale Screens

Das Flp/FRT-System kann auf bestimmte Gewebe ausgerichtet werden, indem die Flp-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimiert wird. Ein Beispiel hierfür ist das ey-Flp-System, bei dem die Flp-Rekombinase mit der regulatorischen Region des *eyeless*-Gens fusioniert ist. So wird Flp spezifisch in der sich entwickelnden Augenscheibe exprimiert, sodass homozygote Mutantenklone im erwachsenen Auge, aber nicht im übrigen Tier entstehen (Abbildung 9). Einige Forschergruppen haben diesen Ansatz gewählt, um nach Mutationen zu suchen, die eine Rolle in unterschiedlichen Signalwegen spielen. Ein Beispiel werden Sie in der Vorlesung von Prof. Hafen kennenlernen.

Wie benutzt man nun ein solches gewebespezifisches Flp/FRT-System für einen genetischen Screen? Als Ausgangspopulation dienen Fliegen, die eine FRT-Stelle tragen. Es gibt Fliegen mit FRT-Stellen auf jedem Arm der 2 grossen Autosomen in

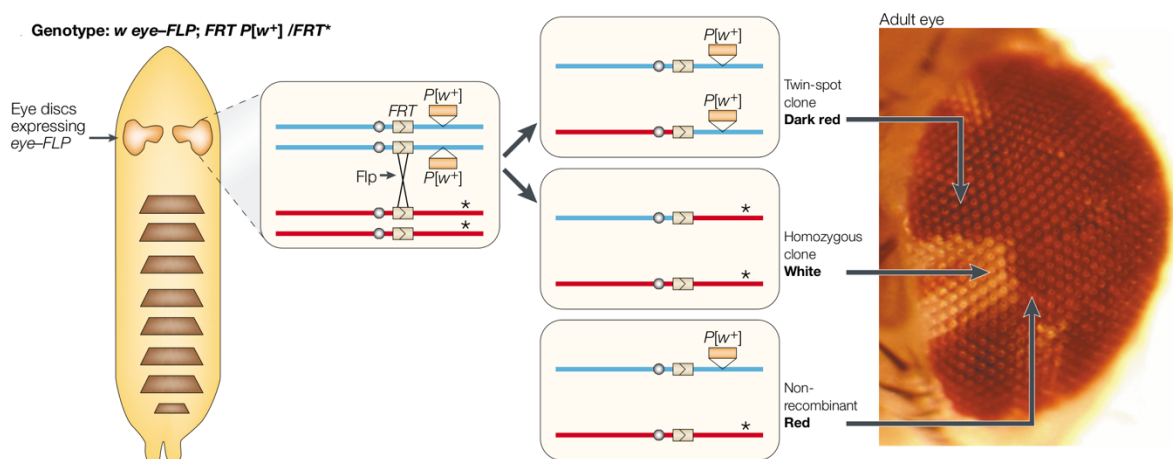


Abbildung 9 Induktion gewebsspezifischer homozygot mutanter Klone mithilfe des Flp/FRT-Systems. Indem die Flp-Rekombinase wird über den Enhancer für das *eyeless*-Gen kontrolliert wird, findet mitotische Rekombination nur im Augengewebe der Larve statt. Dadurch entstehen homozygot mutante Klone im Fliegenauge, während der Rest der Fliege heterozygot für die Mutation (symbolisiert durch *) ist. Das nicht-mutante Chromosom ist mit einem Marker ausgestattet, der rote Augen hervorruft; deshalb erscheinen die Zellen, die keine Mutation, aber zwei Kopien des Markers tragen, dunkelrot (oben) und die heterozygoten Zellen (ohne Rekombination, heterozygot für den Marker, unten) heller rot. Den homozygot mutanten Zellen fehlt aufgrund der Rekombination der Marker; sie erscheinen weiss (Mitte). (Abbildungsquelle: D. St. Johnston, Nat. Rev. Genet.)

Drosophila (dies sind transgene Fliegen, also Fliegen, bei denen die FRT-Stelle künstlich ins Genom eingefügt wurde). Um das gesamte Genom zu screenen, macht man also im Prinzip 4 Screens: beim ersten sucht man Mutationen auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms, beim zweiten auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms, usw. Screens für das X-Chromosom sind speziell, da man hier bedenken muss, dass nur die Weibchen 2 homologe Chromosomen haben; um nach Mutationen auf dem X-Chromosom zu screenen nutzt man deshalb andere Tricks.

Für jeden Screen nutzt man also eine bestimmte FRT-Fliegenlinie als Ausgangspopulation, die man mutagenisiert. Dann werden die mutagenisierten Männchen mit Weibchen gekreuzt, die die gleiche FRT-Stelle und zusätzlich ein Gen, das für die Flp-Rekombinase codiert, tragen (Abbildung 10). In der F₁-Generation schaut man dann, welchen Phänotyp man in den mutanten Zellklonen erhält. Sehen die Augen zum Beispiel durch die Klone anders aus (Grösse, Form, etc.) oder verhalten sich die Zellen im Klon anders als die umgebenden Wildtyp-Zellen, so werden die Fliegen mit der entsprechenden Mutation weitererhalten um herauszufinden, welches Gen von der Mutation betroffen ist.

Wir haben in dieser Lektion bereits viel über Genotypen gesprochen, die vom normalen Wildtyp abweichen: Chromosomen mit sichtbaren Markern, FRT-Sequenzen oder Flp-Rekombinase exprimierende Fliegen. All diese Fliegen sind transgene Fliegen, d.h., sie enthalten eine

modifizierte Version eines Gens oder ein fremdes Gen, das künstlich ins Fliegengenom eingeführt wurde. Wie kommen nun aber die FRT-Sequenzen ins Genom der Fliege oder wie generiert man Flp-exprimierende *Drosophila*?

Die Herstellung transgener Fliegen

Ein Transgen ist ein fremdes oder modifiziertes Gen, das dem Genom hinzugefügt wurde. Die Art, wie ein Transgen in einen Organismus eingeführt wird, hängt vom Organismus ab. Um transgene Fliegen herzustellen, wird das Transgen mithilfe einer feinen Kanüle in Fliegen-Embryonen injiziert (Mikroinjektion). Dabei muss das veränderte Gen mit dem Genom der Zelle rekombinieren, um nach der Zellteilung stabil in den Tochterzellen erhalten zu bleiben. Darüber hinaus muss das veränderte Gen in die Keimbahn integriert werden, damit es der nächsten Generation vererbt werden kann.

Die Herstellung transgener Fliegen erfordert zwar etwas handwerkliches Geschick, ist aber relativ simpel: Die DNA wird in Fliegeneier eingespritzt, wo sie in die Zellkerne aufgenommen wird. Das funktioniert aufgrund einer besonderen Eigenschaft der *Drosophila*-Entwicklung: Erinnern Sie sich daran, dass die befruchtete Eizelle bei *Drosophila* viele Kerne enthält, die nicht durch Zellmembranen getrennt sind, das sogenannte Syncytium. Die DNA wird also in *Drosophila*-Embryos injiziert, die sich im Syncytium befinden, das unter dem Mikroskop als eine mehrkernige Zelle sichtbar ist. In diesem Stadium befinden sich Zellen, die zu Keimzellen werden, am hinteren Ende des Eies (posterior). Wird die DNA in dieses Ende des Embryos injiziert, so werden einige Kerne diese DNA aufnehmen. Wenn diese Zellen dazu bestimmt sind, die zukünftigen Keimzellen zu bilden, wird die Fliege, die sich aus diesem Embryo entwickelt, das Gen in ihre Keimbahn eingefügt haben. Kreuzt man nun eine solche Fliege mit Wildtyp-Fliegen, so werden die Nachkommen das Transgen tragen.

Woher weiss man aber nach der Injektion, welche Fliegen das Transgen in den Keimzellen enthalten? Der Trick ist, dass die transgene DNA ein Markergen enthält (z.B. eines, das den transgenen Fliegen eine andere Augenfarbe verleiht). Wenn das Transgen in die DNA der Keimzellen integriert ist, werden Fliegen, die aus dem injizierten Embryo schlüpfen, den Marker zunächst nicht zeigen, weil ihre somatischen

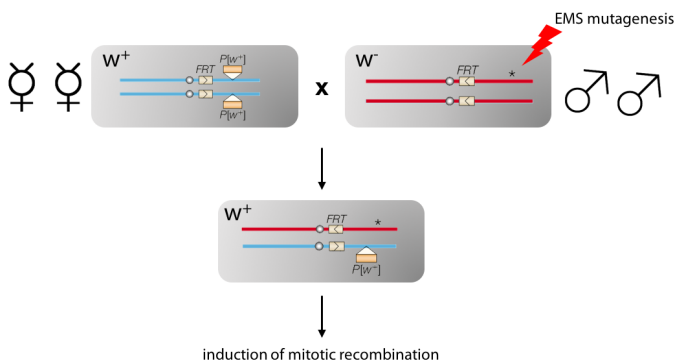
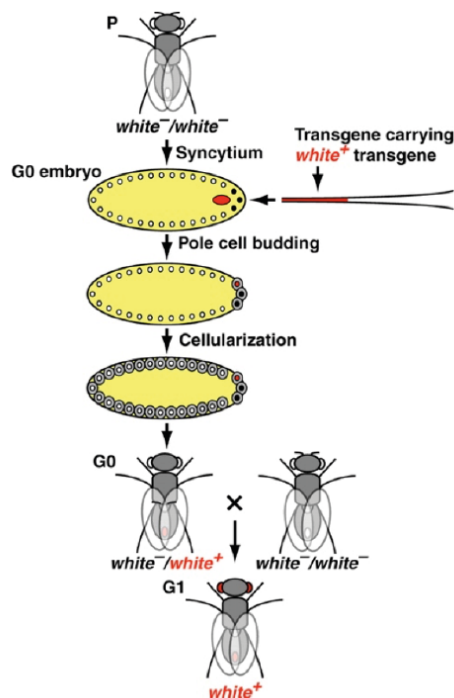


Abbildung 10 Kreuzungsschema eines Flp/FRT-Screens. Männchen, die eine FRT-Stelle tragen, werden mit EMS mutagenisiert und mit Weibchen, die homozygot für eine bestimmte FRT-Stelle und einen sichtbaren Marker sind, gekreuzt. Die Weibchen tragen zusätzlich noch ein Transgen, das für die Flp-Rekombinase codiert. Dies induziert in Embryonen der F₁-Generation mitotische Rekombination und homozygot mutante Klone.

Zellen wildtypisch sind und nur ihre Keimzellen das Transgen enthalten. Paart man aber diese Fliegen mit Fliegen, die keinen Marker enthalten, werden in den Nachkommen einige Fliegen den Marker zeigen (Abbildung 11). Oft ist der für das Transgen verwendete Marker ein Gen, das rote Augen verleiht, damit transgene Fliegen leicht durch ihre roten Augen im Mikroskop erkannt werden. Dieses Gen bezeichnet man als *white*⁺ - in *Drosophila* werden Gene nach ihrem mutanten Phänotyp benannt; das Gen *white* ist für die rote Augenfarbe verantwortlich, weil es bei einer Mutation zu weissen Augen führt. Dies bedingt jedoch, dass die zur Injektion verwendeten Embryonen aus Fliegen stammen, die weisse Augen haben (der Genotyp dieser Fliegen ist *white*⁻, wobei das ⁻ angibt, dass das Gen mutiert ist). Wo im Genom das Transgen eingefügt wird, ist zufällig. Für eine weitere Analyse dieser Fliegen ist es daher wichtig zu bestimmen, auf welchem Chromosom das Transgen

eingefügt ist. Dazu nutzt man ebenfalls das Prinzip der Balancer-Chromosomen.

Im Beispiel, das in Abbildung 11 gezeigt ist, werden die Fliegen, die aus den injizierten Embryonen schlüpfen, mit Fliegen, die weisse Augen haben und ein Balancer-Chromosom für eines der Chromosomen tragen, gekreuzt. Normalerweise beginnt man mit einem Balancer (z.B. wie in Abbildung 11 gezeigt für das 2. Chromosom) bereits bei der ersten Kreuzung (der G₀-Generation – G₀ deshalb, um sie von der F₁-Generation einer klassischen Kreuzung zu unterscheiden), um Zeit zu sparen. Schauen wir uns nun eine Kreuzung mit einem Balancer für das 2. Chromosom an. Das Balancer-Chromosom trägt die Mutation *Curly* (Cy), die gebogene Flügel verleiht. Für die Fliegen in G₁ können wir den Genotyp noch nicht vorhersagen. Aus dem Phänotyp können wir ablesen, dass sie den Balancer und das Transgen (TG) enthalten; diese Fliegen könnten jedoch unterschiedliche Genotypen haben (Abbildung 12):



- Wenn sich das TG auf dem 2. Chromosom befindet, haben die Fliegen den Genotyp TG / Cy.
- Wenn sich das TG NICHT auf dem 2. Chromosom befindet, haben die Fliegen den Genotyp + / Cy; TG. Hierbei steht das + für das wildtypische Chromosom. Das TG ist nun auf einem anderen Chromosom, wobei mit dem ; angezeigt wird, dass ein anderes Chromosom folgt.

Deshalb brauchen wir eine weitere Kreuzung, um festzustellen, wo das TG eingefügt ist. Wir kreuzen daher die rotäugigen Cy-Fliegen mit Balancer-Fliegen (weisse Augen, Cy). Für die Nachkommen dieser Kreuzung gibt es zwei Möglichkeiten:

- Drei verschiedene Phänotypen treten auf, wenn das TG auf dem 2. Chromosom liegt (links in Abbildung 12).
- Vier verschiedene Phänotypen treten auf, wenn das TG auf dem 3. Chromosom liegt (rechts in Abbildung 12).

Abbildung 11 Das Transgen wird im Syncytium-Stadium ins hintere Ende (posterior) des Eies injiziert, wo sich die Keimzellen entwickeln. Die transgene DNA enthält ein Markergen, das rote Augen verleiht (*white*⁺). Embryonen, die aus der Parentalgeneration P stammen und weisse Augen ausbilden (Genotyp *white*⁻) werden mit dem Transgen injiziert (G₀-Generation). Bevor sich Zellen im Embryo ausbilden, werden die späteren Keimzellen am posterioren Ende definiert. Wird das Transgen in die Zellkerne dieser Zellen integriert, so kann es an die nächste Generation (G₁) weitergegeben werden. Das Auftreten roter Augen in Fliegen der G₁-Generation zeigt die Integration des Transgens ins Genom der Fliegen an.

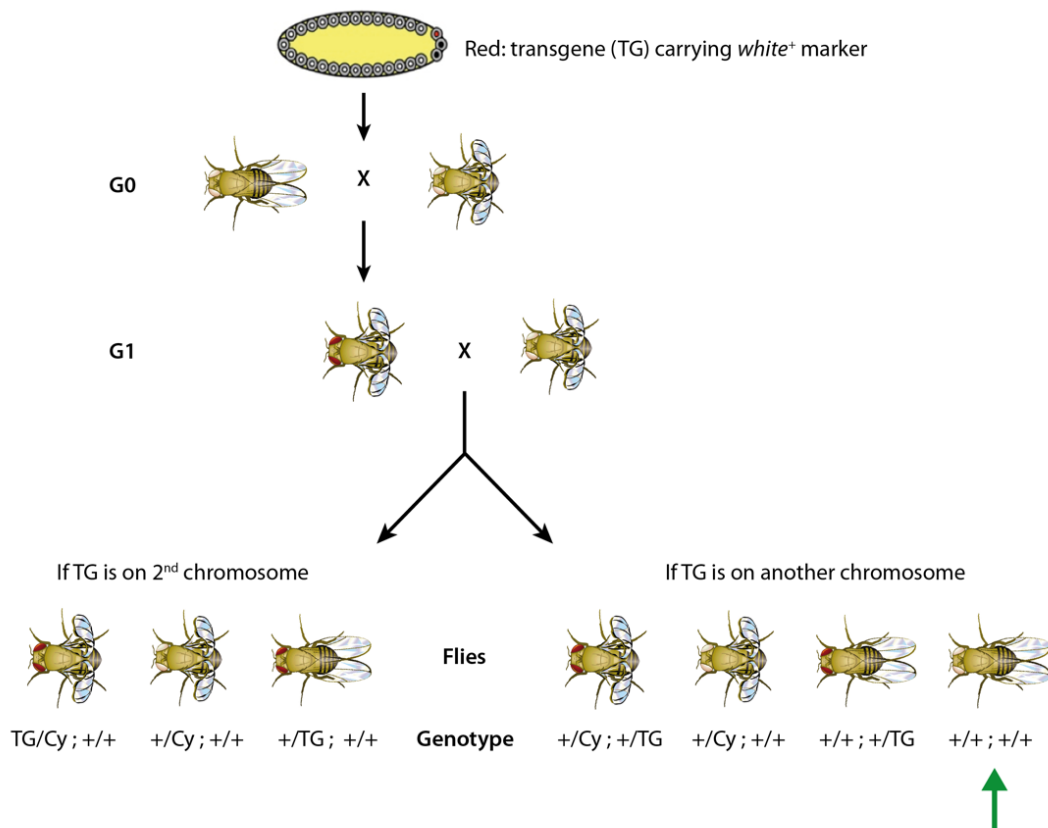


Abbildung 12 Bestimmung der Position eines Transgens im *Drosophila*-Genom. Zwei Kreuzungen mit Fliegen, die ein Balancer-Chromosom tragen sind notwendig, um den Genotyp der transgenen Fliegen zu bestimmen.

voneinander segregieren, befinden sie sich auf verschiedenen Chromosomen (Abbildung 12).

Frage: Wieso beginnt man nicht mit einem Balancer für das X-Chromosom?

Die Integration des Transgens mithilfe von Transposons

Das Hauptziel bei der Herstellung transgener Organismen ist die Integration der eingefügten DNA in die Keimbahn. Dazu muss das veränderte Gen mit dem Genom der Zelle rekombinieren. Bei Bakterien und Hefen tritt eine solche Rekombination aufgrund der sehr effizienten, zelleigenen Rekombinationsmechanismen häufig auf. In komplexeren Organismen fehlen solche effizienten Rekombinationsmechanismen, was die Integration von Fremd-DNA erheblich erschwert. In *Drosophila* nutzt man vor allem die Transposon-vermittelte Integration von Fremd-DNA. Wie Sie bereits im Abschnitt zur bakteriellen Genetik gelernt haben, sind Transposons mobile DNA-Sequenzen, die sich von einem genomischen Ort an einen anderen verlagern können.

In *Drosophila* benutzt man zur Integration von Fremd-DNA ein bestimmtes Transposon, das P-Element. P-Elemente enthalten, wie andere Transposons, zwei terminale Wiederholungen, die wichtig für die Mobilisierung und Transposition sind. Natürlich vorkommende P-Element-Transposons codieren das Enzym P-Transposase, sodass das P-element autonom im Genom transponieren, also „springen“ kann. Für die Herstellung transgener Fliegen möchte man jedoch das autonome „springen“ verhindern, da das integrierte Gen ja an seinem ursprünglichen Platz verbleiben soll. Dazu wurde das P-Transposase-Gen so zerstückelt, dass es nicht mehr funktionell war. So entstand ein nicht-autonomes P-Element (Abbildung 13). Die Sequenz des P-Elements wurde dann in einen geeigneten Vektor eingebracht, in den man das Transgen klonieren kann. Bei der Mikroinjektion wird dieser P-Element-Vektor mit dem darin enthaltenen Transgen in die Eizelle gespritzt. Damit das P-Element ins Genom integriert wird, wird zusätzlich ein weiteres Plasmid, das die P-Transposase codiert, injiziert.

Die Transposition erfolgt durch das Ausschneiden des Transposons aus dem injizierten Plasmid und dessen Insertion in das Wirtsgenom. Dabei ist die

Insertionsstelle generell zufällig; es gibt jedoch sogenannte „Hot Spots“, also Stellen im Genom, in die P-Elemente besonders häufig integrieren.

Die P-Element-vermittelte Integration von Transgenen ist die Grundlage für alle technologischen und wissenschaftlichen Fortschritte der *Drosophila*-Forschung. Die Erkenntnisse, die wir heute über die Funktion von Genen in *Drosophila* haben, wären ohne den Einsatz von P-Elementen undenkbar gewesen.

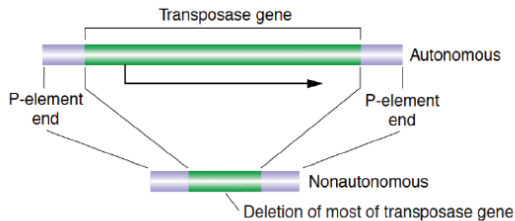


Abbildung 13 Ein autonomes P-Element enthält Sequenzen, die für die Transposase codieren und kann sich im Genom bewegen. Die Enden des P-elements sind invertierte Sequenzen, die für die Transposition nötig sind. Ein nicht-autonomes P-Element enthält ein nicht-funktionelles Transposase-Gen; ein solches Element kann jedoch noch immer durch die Zugabe einer Transposase mobilisiert werden. (Abbildungsquelle: *Introduction to Genetic Analysis*, Griffiths et al., 10th edition, Freeman)

Mit dieser Lektion haben Sie einen Überblick über den Einsatz von *Drosophila* als Modellorganismus für genetische Screens gewonnen. In der folgenden Vorlesung werden Sie eine Anwendung eines gewebsspezifischen klonalen Screens kennenlernen, der zur Identifizierung vieler essentieller Gene, die das Wachstum von multizellulären Organismen steuern, geführt hat. Sie werden dort lernen, wie man nach der Isolierung der Mutanten die Gene identifiziert, die von den Mutationen betroffen sind, um so die grundlegenden Mechanismen und Signalwege aufzudecken, die die Ausbildung eines bestimmten Phänotyps bestimmen.