

## 10 Jahre Genetik-Lehrstuhl

*hsp82-neo*-Mutagenese und Gene-Trapping in *D. melanogaster*

HEINZ SASS

LEHRSTUHL FÜR GENETIK, INSTITUT FÜR BIOLOGIE II, UNIVERSITÄT LEIPZIG

Zielführend für diese gen-individualisierenden Analysen im Genom von *D. melanogaster* sind transgene Varianten des Fusionsgens *hsp82-neo*. In das Fliegen-genom integriert, erzeugt es eine bleibende Resistenz gegen G418 (neomycinähnliches Antibiotikum). Durch Transposition einer *hsp82-neo*-Genfalle ohne Promotor und Spleiss-Donor in ein Intron von *D. melanogaster* wird das Wirtsgen inaktiviert und das neue, chimäre Fusionsgen exprimiert. Die Remobilisierung und gleichzeitige Aktivierung eines bisher inaktiven *hsp82-neo*-Transgens ergab 165 solcher Genfalllinien.

Die Entschlüsselung der DNA-Sequenzen einer ganzen Reihe von Organismen wie auch der *Drosophila*-Fruchtfliege<sup>[1]</sup> erlauben rechnergestützte Sequenzvergleiche ganzer Genome und tragen zum Verständnis vielfältiger Artenentstehung bei (z. B. <sup>[2, 3]</sup>). In unserem Institut haben wir Genfallen-Insertionsmutagenese<sup>[4]</sup> (gene trap mutagenesis) mit *hsp82-neo* in *D. melanogaster* eingesetzt, um annotierte Gene und ihre Funktionen zu studieren.

***hsp82-neo* im Transgenplasmid**

Daten aus DNA-Sequenzvergleichen reichen für die ortsspezifische, funktionale Analyse

von Genen nicht aus. Gentransfer und Genieren von Transgenvarianten sind für solche Untersuchungen von großem Nutzen. Zur Erzeugung transgener *Drosophila* wird ein künstliches Genexpressionskonstrukt (ein mobiles Transposon) über einen Vektor im Erbgut verankert. Um das Transgen in das Genom von *D. melanogaster* zu integrieren und in aufeinander folgenden Generationen funktional zu untersuchen, wurden Teile des *hsp82* von *D. pseudoobscura* dem bakteriellen *neo* Gen 5' vorgeschaltet (**Abb. 1**). Die Konstruktionskriterien waren eine einzelne, dauerhafte Insertion des *hsp82-neo*-Transgens im Genom, seine Identifikation im DNA- und

RNA-Profil und eine vom Genprodukt erzeugte Antibiotikum-Resistenz des Tieres.

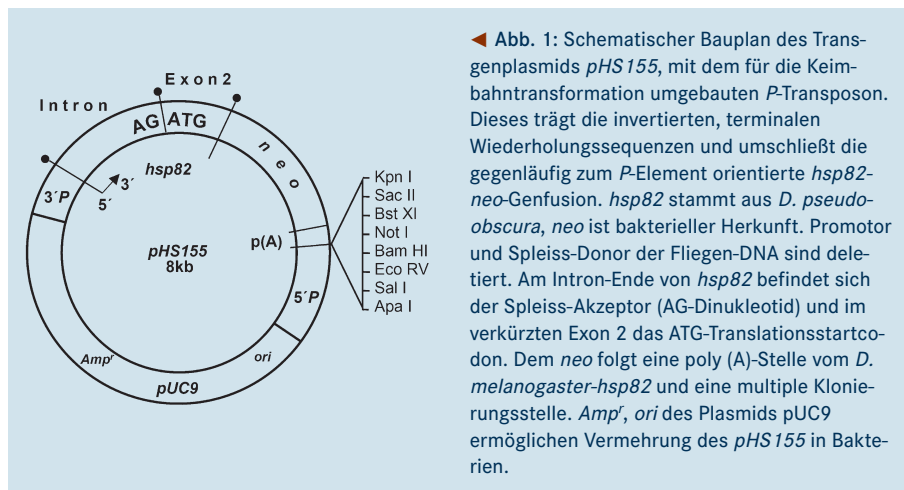
**Genomweiter Einsatz des *hsp82-neo*-Transgens im Modellorganismus**

Das bakterielle Neomycin-Resistenzgen (*neo*) codiert für Neomycin-Phosphotransferase, die, in *D. melanogaster* exprimiert, G418-Resistenz erzeugt. Um *neo* in *D. melanogaster* zu aktivieren, wurde ein DNA-Segment mit dem *D. pseudoobscura hsp82*-Promotor, dem Intron und dem Anfang des zweiten Exons, der den ATG-Start-Code enthielt, mit *neo* fusioniert<sup>[5, 6]</sup>. Für effizientes Prozessieren des *hsp82-neo*-Primärtranskriptes (prä-mRNA) zur mRNA erhielt das (3')-*neo*-Ende das poly (A)-Signal des *D. melanogaster hsp82*-Gens (**Abb. 1**). Von Sequenzen eines P-Elementes flankiert kann das *hsp82-neo*-Transgen so als eine autonome Expressionseinheit in eine zufällige Stelle des Erbguts eingebaut werden. Nur Larven, die Neomycin-Phosphotransferase exprimieren und das im Futter vorhandene G418 abbauen können, wurden zu transgenen Fruchtfliegen.

Mit der G418-Selektion entstanden zunächst 13 vitale Fliegenlinien: 10 mit einer Insertion, 3 mit Doppelinsertionen. Jede Fliegenlinie wurde für *hsp82-neo* homozygot gezüchtet. Dabei wurde der Homozygotenvorteil (2 *neo*-Genkopien) größerer Überlebensrate gegenüber hohem G418-Futtergehalt (1 mg/ml) in drei aufeinander folgenden Generationen ausgenutzt (Heterozygote, d. h. 1 *neo*-Genkopie für *hsp82-neo*, schlüpfen später als die ersten Homozygoten).

***hsp82-neo*-RNA auf der Spur**

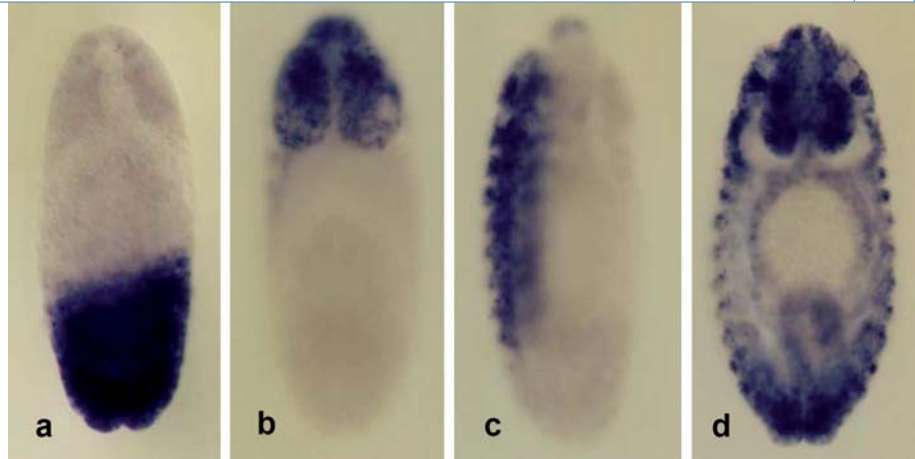
Die Transkriptionsorte aller 13 transgenen Fliegenlinien wurden in einem *in situ*-Hybridisierungsansatz für alle Embryonen gleichzeitig dargestellt. RNA-Verteilungsmuster unterschiedlicher Konzentration von *hsp82-neo* sind immunocytochemisch als Phosphatase-Färbung unterschiedlicher Blauintensität sichtbar (**Abb. 2**). Im frühen Embryo ist die maternale *hsp82-neo*-RNA einheitlich verteilt. Später wird vom vorderen Embryopol ausge-



hend *hsp82-neo*-RNA fortschreitend abgebaut, bis schließlich nur am hinteren Embryopol stabile *hsp82-neo*-RNA verbleibt (**Abb. 2a**). Bei der zygotischen RNA-Synthese entstehen Expressionsdomänen von *hsp82-neo* im Gehirn und benachbartem Gewebe sowie im ventralen Strickleiternervensystem (**Abb. 2b, 2c**). Reife Embryonen präsentieren vielfältige *hsp82-neo*-Expressionsfärbungen (**Abb. 2d**). Zusammen mit der Ausprägung der G418-Resistenz verifizierten die *in situ*-Hybridisierungsstudien an 13 transgenen Fliegenlinien die Konservierung von *cis*-regulatorischen Elementen und *trans*-regulatorischen Faktoren über 25–55 Millionen Jahre Evolution von *D. melanogaster* zu *D. pseudoobscura* [7,8].

### Promotorloses *hsp82-neo* ohne Spleiss-Donor als Genfalle

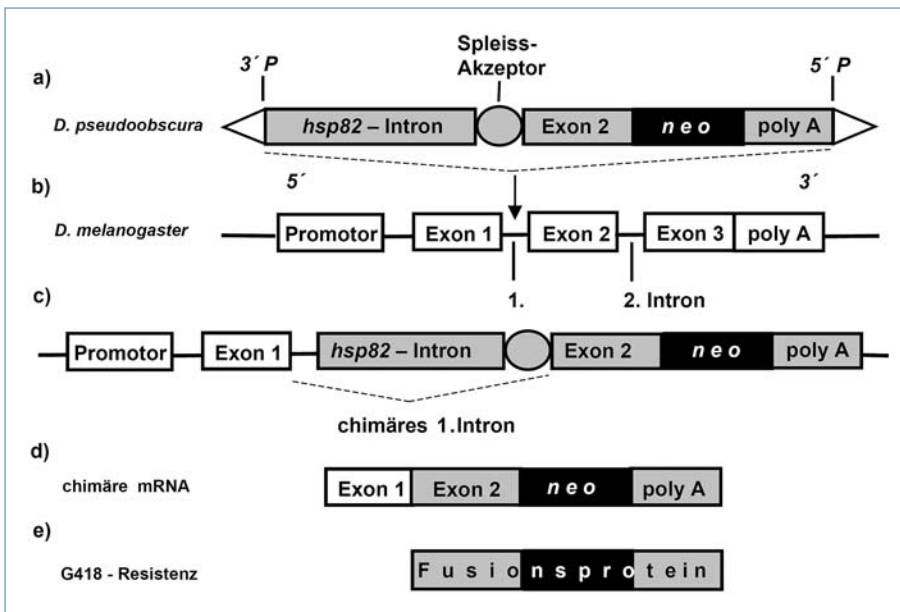
An den Exon/Intron-Übergängen gibt es konservierte, kurze Sequenzelemente in der DNA, den Spleiss-Donor (5') und den Spleiss-Akzeptor (3'). Im Genfallenvektor *pHS155*



▲ **Abb. 2:** Transkriptionsaktivität in *hsp82-neo*-transgenen *D. melanogaster*-Linien. Die Markierung von RNA in Gesamtembryonen mittels *in situ*-Hybridisierung von Digoxigenin-markierter *neo*-DNA wird als Phosphatase-Blaufärbung sichtbar. Anteriorer Embryopol ist oben, posterior unten. **a)** Im frühen Embryo wird eine Abnahme von *hsp82-neo*-RNA sichtbar. Zygotische Transkription von *hsp82-neo* findet **b)** z. B. im Kopf und Gehirnbereich, **c)** im ventralen Nervenstrang und **d)** im reifen Embryo noch in zusätzlichen Geweben, z. B., Darm, Malpighischen Gefässen, Gonaden statt.

(**Abb. 1**) ist der *hsp82*-Intronanfang mit dem Spleiss-Donor deletiert (**Abb. 3a**). Erfolgreich funktioniert die Genfalle nur, wenn das verkürzte Intron als Teil des *hsp82-neo*-Transgens in ein Intron eines aktiven *D. melano-*

*gaster*-Gens in gleichsinniger 5'-3'-Orientierung springt und demzufolge von dessen Promotor (**Abb. 3b, 3c**) wirtsgemäß exprimiert wird. Dann wird *hsp82-neo* als integrierter Bestandteil eines chimären Fusionstrans-



▲ Abb. 3: Schema der *hsp82-neo*-Insertionsmutagenese beim Gene-Trapping in *D. melanogaster*. a) Das *hsp82-neo*-Transgen aus *pHS155* (Abb. 1) wird aktiviert, b) wenn es in ein Intron von *D. melanogaster* springt und c) dort ein chimäres Fusionsgen mit dem Wirtsgen bildet. d) Dann findet die Transkription und Prozessierung des Primärtranskripts zur reifen, chimären mRNA statt und führt e) zur Synthese des Fusionsproteins mit Neomycin-Phosphotransferase-Aktivität. In den dann G418-resistenten Fliegen können die Eigenschaften der in der *hsp82-neo*-Falle „gefangenen“ Gene untersucht werden.

kriptes synthetisiert. Das *hsp82-neo*-Transgen fungiert als

- 1) G418-Resistenzgen,
- 2) Reportergen auf RNA und Proteinebene und
- 3) Insertionsmutagen.

Als Resistenzgen (mit einem eigenen ATG-Start- und Stop-Codon) ermöglicht es als bloße Neomycin-Phosphotransferase oder als Fusionsprotein die Entwicklung von Larven auf G418-haltigem Futter (0,6–1mg/ml). Reporterfunktion übt *hsp82-neo* aus, indem es das räumlich-zeitliche Expressionsmuster des Wirtsgens im Zellgeschehen übernimmt. Dokumentiert wird es durch RNA-Lokalisation und den Nachweis der exprimierten Neomycin-Phosphotransferase, sei es immunhistochemisch *in situ* oder im Western Blot. Ein Insertionsmutagen ist *hsp82-neo* deshalb, weil es durch seine eigene poly (A)-Stelle die Transkription des unterbrochenen Wirtsgens 3' von *neo* verhindert. Potenzielle Funktionsausfälle des betroffenen Gens können gegebenenfalls studiert werden.

Die Insertion der *hsp82-neo*-Genfalle aktivierte *neo* und ergab G418-resistente Allele ohne erkennbaren Phänotyp, z.B. *CG9328<sup>hsp82-neo</sup>*, *CG4674<sup>hsp82-neo</sup>*, *CG7823<sup>hsp82-neo</sup>*, *CG1782<sup>hsp82-neo</sup>* [9, 10]. Der Erhalt charakteri-

sierter transgener *D. melanogaster* bot die reizvolle Chance, durch spezielle Kreuzungsgenetik ein inaktives *hsp82-neo*-Transgen zu remobilisieren, in neue Wirtsgene zu integrieren und durch Selektion auf hohe G418-Resistenz stark exprimierte zu identifizieren. Wir erwarten, dass es sich dabei bevorzugt um konstitutiv exprimierte Haushaltsgene handelt. Im Falle der Leipziger Linie *L5* führte die Remobilisierung zu 165 neuen Genfallen-Fliegenlinien [10].

Unsere bisherigen Forschungsergebnisse zeigen, dass das Konzept der *hsp82-neo*-Genfalle aufgegangen ist und nun die Analyse der erhaltenen Insertionsmutanten erfolgt. Ziel ist es, annotierte Gene zu identifizieren und die wildtypischen Funktionen *hsp82-neo*-mutierter Gene zu untersuchen. Denkbar sind phänotypische Auswirkungen, Gen-Netzwerke, etc. Die am Leipziger Lehrstuhl für Gene-

tik gewonnenen genomischen Daten werden in unser Kooperationsprojekt „Formen des Lebens“ mit Philosophen, Informatikern, Biologen und Medizinern unter dem Stichwort „Gene Ontology“ einbezogen ([http://db.uni-leipzig.de/aktuell/index.php?modus=pmanzeige&pm\\_id=1458](http://db.uni-leipzig.de/aktuell/index.php?modus=pmanzeige&pm_id=1458)) [11, 12], um biologische Klassifizierungssysteme mithilfe computergestützter Datenintegration zu entwickeln.

### Danksagung

Mit dankbarer Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SA 893/1-1), die VolkswagenStiftung („Formen des Lebens“), die Alexander von Humboldt-Stiftung (Prof. B. Smith) und das Land Sachsen.

### Literatur

- [1] Adams, M.D., et al. (2000): *Science* 287: 2185–2195.
- [2] Krauss, V., Pecyna, M., Kurz, K., Sass, H. (2005): *Mol Biol Evol.* 22: 74–84.
- [3] Krauss, V., Fassel, A., Fiebig, P., Patties, I., Sass, H. (2006): *BMC Evol Biol.* 6: 18.
- [4] Stanford, W.L., Cohn, J.B., Cordes, S.P. (2001): *Nat Rev Genet.* 2: 756–768.
- [5] Sass, H. (1990): *Gene* 89: 179–186.
- [6] Sass, H., Meselson, M. (1991): *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6795–6799.
- [7] Sass, H. (1994): *Development Genes and Evolution (Historical Archive)* 204: 101–111.
- [8] Russo, C.A., Takezaki, N., Nei, M. (1995): *Mol Biol Evol.* 12: 391–404.
- [9] Dröse, B. (2003): Insertionsmutagenese bei *Drosophila melanogaster* mit dem Gene-Trap-Vektor *pHS155*: Diplomarbeit (Uni Leipzig).
- [10] König, C. (2006): Molekulare Anatomie und Funktionsstudien transgener *hsp82-neo*-Reporterexpression in *Drosophila melanogaster*: Diplomarbeit (Uni Leipzig).
- [11] Smith, B., Ceusters, W., Klagges, B. et al. (2005): *Genome Biol.* 6: R46.
- [12] Smith, B., Klagges, B. (2005): *Allgemeine Zeitschrift für Philosophie* 30: 5–26.

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Heinz Sass  
Lehrstuhl für Genetik, Institut für Biologie II  
Universität Leipzig  
Johannisallee 21–23  
D-04103 Leipzig  
Tel.: 0341-9736875  
Fax: 0341-9736897  
sass@rz.uni-leipzig.de  
[www.uni-leipzig.de/~genetics](http://www.uni-leipzig.de/~genetics)

### AUTOR



#### Heinz Sass

1966–1973 Studium der Biologie und Chemie in Marburg und Tübingen; 1973–1978 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen; 1978–1983 wiss. Angestellter, Uni Heidelberg; 1983–1984 Visiting Scientist, Worcester Found. f. Exp. Biol. in Shrewsbury, USA; 1984–1988 Research Associate, Harvard Univ., Cambridge (Mass.), USA; 1988–1992 wiss. Angestellter und Lehrbeauftragter, Uni Mainz, 1992 Habilitation für Genetik, 1992–1996 Privatdozent, wiss. Mitarbeiter bei G. Technau; seit 1996 Prof. für Genetik, Uni Leipzig.