



**Identifizierung und Charakterisierung
des *fruitless*-Orthologs *Am-fru*
bei der Honigbiene *Apis mellifera***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Miriam Müller
aus Mutlangen

Düsseldorf, Mai 2010

aus dem Institut für Genetik
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Martin Beye
Koreferent: Prof. Dr. Klaus Lunau

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2010

I. Einleitung.....	6
I.1. Verhalten.....	6
I.2. Beispiele für angeborenes, genetisch charakterisiertes Verhalten.....	7
I.2.1. Monogamie bei Wühlmäusen.....	7
I.2.2. Futtersammelverhalten bei Taufliegen und Honigbienen.....	8
I.2.3. Männliches Paarungsverhalten der Taufliege.....	8
I.3. Verhalten der Honigbiene.....	10
II. Zielsetzung.....	13
III. Verwendete Materialien und Methoden.....	14
III.1. Materialien.....	14
III.1.1. Verbrauchsmaterialien.....	14
III.1.2. Chemikalien.....	14
III.1.3. Enzyme.....	14
III.1.4. Puffer.....	14
III.1.5. Kitsysteme.....	14
III.1.6. Oligonukleotide.....	15
III.1.7. Vektoren.....	16
III.1.8. Bakterienstämme.....	16
III.1.9. Optische Hilfsmittel und Mikroskope.....	16
III.1.10. Verwendete Software.....	16
III.2. Methoden.....	17
III.2.1. Molekulargenetische Methoden.....	17
III.2.1. a Gesamt-RNA Extraktion.....	17
III.2.1. b Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA mit Dynabeads.....	17
III.2.1. c Erstellen einer 3'- bzw. 5'- Library.....	18
III.2.1. d Synthese von Doppelstrang-cDNA.....	20
III.2.1. e Synthese doppelsträngiger RNA zur Injektion bei RNAi Experimenten....	21

III. 2.2. Proteinbiochemische Methoden.....	23
III.2.2. a Aufreinigung von GST-gekoppeltem, rekombinant exprimiertem Protein zur Immunisierung eines Kaninchens.....	23
III.2.2. b Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus Kaninchenserum unter Verwendung einer HiTrap™ Säule.....	25
III.2.2. c SDS-PAGE und Western Blot.....	28
III.2.2. d whole mount Färbung des Bienengehirns.....	31
III.2.2. e Fertigung und Färbung von Kryoschnitten des Bienengehirns.....	31
III.2.3. Mikromanipulation und künstliche Honigbienenaufzucht.....	32
III.2.3. a Mikroinjektion zur RNA Interferenz (RNAi).....	32
III.2.3. b Künstliche Honigbienenaufzucht.....	33
IV. Ergebnisse.....	35
IV.1. Die Sequenz der BTB kodierenden Domäne von <i>fruitless</i> im Honigbienen genom.....	35
IV.2. Genstruktur und Spleißmuster von <i>fruitless</i> bei der Honigbiene.....	36
IV.3. Entwicklungsabhängige Transkription von <i>Am-fru</i>	37
IV. 4. Am-Fru-Protein wird im Honigbienengehirn männchen-spezifisch exprimiert.....	43
IV. 5. Am-Fru-Protein ist im Zellkern lokalisiert.....	46
IV.6. Das geschlechtsspezifische Spleißen von <i>Am-fru</i> Transkripten steht unter Kontrolle des <i>fem</i> -Gens.....	48
IV.6.1. Embryonale Repression von <i>fem</i> in weiblichen Honigbienen bewirkt eine Vermännlichung des <i>Am-fru</i> Spleißmusters.....	48
IV.6.2. <i>fem</i> siRNA induzierte Vermännlichung des <i>Am-fru</i> Spleißmusters bewirkt Am-Fru Proteinexpression im weiblichen Honigbienengehirn.....	51
IV.7. Injektion von <i>Am-fru^M</i> dsRNA in männliche, haploide Honigbienen mit dem Ziel der <i>Am-fru^M</i> Repression.....	53

V. Diskussion.....	55
V.1. <i>Am-fru</i> ist das Honigbienenortholog des <i>fru</i> -Gens.....	55
V.2. Die zeitliche <i>Am-fru^M</i> - bzw. <i>fru^M</i> -Transkription und das Am-Fru- bzw. Fru ^M - Expressionsmuster im Gehirn sind konserviert.....	59
V.3. Geschlechtsspezifisches Spleißen von <i>Am-fru</i> ist <i>fem</i> -Gen reguliert.....	61
V. 4. Ausblick.....	63
VI. Zusammenfassung.....	65
VI.1. Kurzfassung in deutscher Sprache.....	65
VI.2. Summary in English.....	66
VII. Literaturverzeichnis.....	67
VIII. Anhang.....	72

I. Einleitung

I. 1. Verhalten

Es gibt viele Betrachtungsweisen von Verhalten, beispielsweise den evolutiven Hintergrund, psychologische und physiologische Mechanismen (McFarland, 1999). Grundsätzlich entsteht das Verhalten eines Individuums aus Interaktion von äußerem Stimulus und den bestehenden internen Bedingungen. Jedes Verhaltensmuster wird mit der Art der internen Informationsverarbeitung determiniert. Die internen Verhältnisse zur Informationsverarbeitung werden während der Entwicklung des Individuums festgelegt (McFarland, 1999). Die allgemeine Fähigkeit, Verhaltensmuster durch Lernen zu verändern, besitzen alle Spezies mit komplexem Gehirn (Grasso und Basil 2009).

Grundlegende Verhaltensmuster sind jedoch genetisch determiniert und damit angeboren. Angeborene Verhaltensmuster („Fixed Action Patterns“, FAPs) sind im engeren Sinn komplexe motorische Abläufe, deren Einzelkomponenten eine definierte zeitliche Abfolge zeigen (Eckert et al., 2002). Die Entwicklung des Nervensystems bildet eine Grundvoraussetzung von Verhalten. Nur wenn ein Stimulus mit Hilfe adäquater Rezeptorsysteme aufgenommen und vom Individuum als Signal verarbeitet wird, kann als Antwort Verhalten spezifiziert werden. Für diese Signalverarbeitung ist die Differenzierung des neuronalen Netzwerkes erforderlich.

Bei der Taufliege ist ein genetisch determiniertes neuronales Netzwerk vorhanden. Es bildet sich während der Entwicklung des Individuums mit Beginn der Metamorphose aus und ist für das männliche Paarungsverhalten erforderlich (Arthur et al., 1998). Die geschlechtsspezifische Differenzierung des neuronalen Netzwerkes der Taufliege wird von den geschlechtsbestimmenden Genen *doublesex (dsx)* und *fruitless (fru)* determiniert (Ito et al., 1996, Ryner et al., 1996, Rideout et al., 2010). Das neuronale Netzwerk verschiedener Spezies ist unterschiedlich komplex. Allgemein werden das zentrale Nervensystem (CNS) und das periphere Nervensystem unterschieden. Das Gehirn eines Individuums ist Teil des CNS. Das Gehirn von Honigbienen ist relativ einfach gebaut, es besteht aus etwa 1 Mio. Nervenzellen (Menzel et al., 2006). Abbildung Einleitung 1 zeigt das adulte Gehirn einer Arbeiterin (verändert nach Snodgrass, 1956).

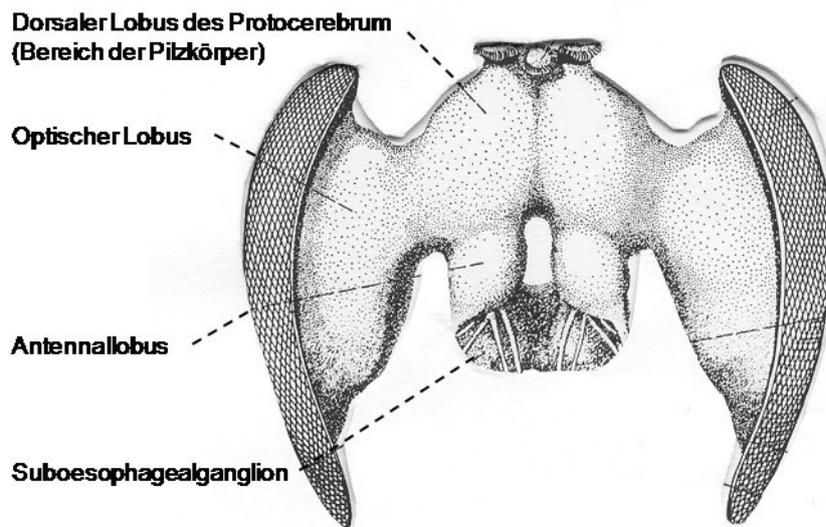


Abb. Einleitung 1: Schematische anteriore Darstellung des adulten weiblichen Honigbienenengehirns einer Arbeiterin (verändert nach Snodgrass, 1956)

Honigbienen zeigen ein komplexes angeborenes Verhaltensrepertoire bei einfachem Gehirn. Daher wurden unter anderen auch Honigbienen als Modellorganismen in klassischen Verhaltensexperimenten untersucht. Die Verhaltensexperimente befassen sich hauptsächlich mit den komplexen weiblichen Verhaltensformen von Arbeiterinnen (von Frisch, 1965, Menzel et al., 2006).

I.2. Beispiele für angeborenes, genetisch charakterisiertes Verhalten

I.2.1. Monogamie in Wühlmäusen

Ein Beispiel für angeborenes Verhalten ist die monogame Lebensweise der Wühlmausart *Microtus Ochrogaster*. Mit diesem Verhalten sind repetitive Sequenzen assoziiert, die „upstream“ (strangaufwärts) des Promotors vom *Arginin Vasopressin 1a Rezeptor Gen (V1aR)* liegen (Young et al., 1999). Bei *Microtus ochrogaster* treten die repetitiven Sequenzen auf, bei *Microtus montanus*, einer polygam lebenden Rocky-Mountains-Wühlmaus, treten sie nicht auf. Transgene Rocky-Mountains-Wühlmäuse, die den *V1aR* der Präriewühlmaus exprimieren, zeigen eine gesteigerte Neigung zu monogamen Verhaltensformen (Young et al., 1999). In anderen *Microtus* Arten (*M. subterraneus*, *M. richardsoni*, *M. californicus*) bei denen ebenfalls die repetitiven Sequenzen im 5' Bereich des

VlaR Gens auftreten, wurde kein monogames Verhalten beobachtet (Fink, S. et al., 2006). In *Microtus ochrogaster* ist das monogame Verhalten jedoch durch *VlaR* genetisch determiniert (Young et al., 1999).

I.2.2. Futtersammelverhalten bei Taufliegen und Honigbienen

In Populationen von *Drosophila melanogaster* treten genetische Polymorphismen des *forager* Gens (*for*) auf. Individuen, deren *for*-Gen stärker exprimiert wird, zeigen höhere Mobilität während der Futtersuche (Sokolowski, 2001). D. h. Fliegen mit geringerer *for*-Expression verweilen bei der Futteraufnahme länger an einer Stelle, Fliegen mit höherer *for*-Expression wechseln häufiger die Position, an der sie Futter aufnehmen. Auch in der Honigbiene wird *for* im Gehirn von Sammelbienen stärker exprimiert als im Gehirn von Stockbienen (Ben-Shahar et al., 2002). *for* kodiert für eine cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG). cGMP-Behandlung von Stockbienen führt zu höherer PKG-Aktivität. Diese höhere PKG-Aktivität korreliert mit Sammelverhalten der behandelten Arbeiterinnen (Ben-Shahar et al., 2002).

I.2.3. Männliches Paarungsverhalten der Taufliege

Das männliche Paarungsverhalten von *Drosophila* ist ebenfalls ein Beispiel für angeborenes Verhalten. Selbst in völliger Isolation aufgezogene Männchen sind in der Lage sich mit jungfräulichen Weibchen erfolgreich zu paaren (Greenspan und Ferveur 2000). Das männliche Paarungsverhalten setzt sich aus einer festgelegten Abfolge einzelner Schritte zusammen (Orientieren, Folgen und Antippen, Flügelspreizen, Wing-Song, Lecken, Kopulation) (Greenspan, 1995) und wird vom *fru*-Gen spezifiziert (Ryner et al., 1996). Das *fru*-Gen weist 6 Promotoren auf (Davis und Hiroki 2001) und führt zusätzlich über alternatives Spleißen zu verschiedenen Transkriptvarianten (Ryner et al., 1996). *fru* ist ein Transkriptionsfaktor der BTB-Zinkfinger Familie, der während der Entwicklung von *Drosophila* essentiell ist (Anand et al., 2001, Dornan et al., 2005, Billeter et al., 2006). Deletionsmutanten sind in beiden Geschlechtern letal (Anand et al., 2001, Song et al., 2002). Das männliche Paarungsverhalten wird von männchen-spezifisch gespleißten *fru*-Transkripten spezifiziert (Ito et al., 1996, Ryner et al., 1996), die zu männchen-spezifischer Fru^M Proteinexpression im CNS führen (Lee et al., 2000). Induzierte Fru^M Proteinexpression im weiblichen Fliegenhirn führt zu männlichen Paarungsverhaltensformen (Demir und Dickson, 2005, Manoli et al., 2005). Die geschlechtsspezifische Spleißmusterregulierung von *fru*-Transkripten resultiert aus der Geschlechtsdifferenzierung.

Die Geschlechtsdifferenzierung bei Drosophila

Das initiale Signal der Geschlechtsdeterminierung der Taufliege resultiert aus dem Verhältnis von Gonosomen zu Autosomen. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Anzahl von X-Chromosomen führen zu unterschiedlich gespleißten Transkriptvarianten des Schaltergens *Sex-lethal (Sxl)* und entscheiden dadurch, ob der männliche oder weibliche Entwicklungsweg eingeschlagen wird (Parkhurst and Ish-Horowicz, 1992). Durch Translation entstehendes Sxl-Protein ist an der Regulierung des Gens *transformer (tra)* beteiligt, das zusammen mit *transformer2 (tra-2)* die geschlechtsspezifische Expression von *dsx* kontrolliert (Tian and Maniatis, 1993; Lynch and Maniatis, 1996). Sowohl die weibliche als auch die männliche Dsx-Proteinvariante sind aktiv und regulieren in beiden Geschlechtern die Phänotyp prägenden Gene am Ende der somatischen Geschlechtsbestimmungskaskade (Burtis and Baker 1989). Neben *dsx*, das in der Taufliege für die somatische Geschlechtsdifferenzierung außerhalb des Nervensystems verantwortlich ist (Baker et al., 2001; Billeter et al., 2002) wird auch das geschlechtsspezifische Spleißen der *fru*-Gen Transkripte von *tra* und *tra-2* reguliert (Ryner et al., 1996). Männchen-spezifisch gespleißte *fru*-Transkripte kodieren „full-length“ (vollständige) Proteine. Weibchen-spezifisch gespleißte *fru*-Transkripte kodieren im 5' Bereich für zusätzliche 101 N-terminale Aminosäuren, gefolgt von einem Stopkodon (Ryner et al., 1996). Geschlechtsspezifisch gespleißte *fru*-Transkripte führen daher zur männchen-spezifischen Fru^M Proteinexpression im CNS (Lee et al., 2000)

Männchen-spezifisch exprimiertes Fru^M-Protein spezifiziert männliches Paarungsverhalten bei Drosophila

Von Promotor P1 initiierten *fru*-Transkripten (*fru*-P1-Transkripte), die männchen-spezifisch gespleißt werden, werden Fru^M-Proteine translatiert (Lee et al., 2000). Neben der N-terminalen BTB-Domäne besitzen diese Proteine einen von möglichen drei C-terminalen C₂H₂ Zink-Fingern (Ryner et al., 1996). Von anderen Zink-Finger-Proteinen ist bekannt, dass verschiedene Zink-Finger unterschiedliche Spezifität bedeuten können und durch ihre Bindung an unterschiedliche Zielsequenzen unterschiedliche Gene beeinflusst werden können (Billeter et al., 2006). Die Expression der Fru^M-Proteine erfolgt in 2% der Neuronen des CNS und beginnt kurz vor der Metamorphose mit Expressionsmaximum im Puppenstadium (Lee et al., 2000). Für das männliche Paarungsverhalten ist die Ausbildung der Fru^M-Protein exprimierenden Neuronen essentiell. Ohne *fru^M*-Transkripte und damit ohne Fru^M Expression erfolgt kein männliches Paarungsverhalten (Ito et al., 1996, Ryner et a., 1996, Lee und Hall 2001, Demir und Dickson 2005). Die Expression männchen-spezifischer *fru*-

Transkriptvarianten in weiblichen Taufliegen führt dazu, dass diese Individuen das spezifisch männliche Werbeverhalten zeigen (Demir und Dickson, 2005; D. S. Manoli et al., 2005). Fru^M exprimierenden Neuronen in einigen Gehirnbereichen männlicher Taufliegen konnten einzelne Schritte der festen Abfolge männlichen Paarungsverhaltens zugeordnet werden. Beispielsweise ist der dorsale Bereich des männlichen Fliegengehirns mit Verhaltensweisen am Anfang des männlichen Paarungsverhaltens (Orientieren, Folgen, Flügelspreizen) assoziiert (Ferveur und Greenspan, 1998). In diesem Bereich wurden 5 Fru^M-Protein exprimierende Neuronengruppen detektiert (Lee et al., 2000). Gehirnregionen der Antennalloben und Pilzkörper sind an der Geschlechterkennung am Beginn des männlichen Paarungsverhaltens beteiligt (Ferveur et al., 1995). Ohne Fru^M Expression im Bereich der Antennalloben ist die Geschlechterkennung gestört (Hall 1994). Eine Gruppe von 30 Fru^M-Protein exprimierenden Interneuronen tritt ausschließlich im männlichen Gehirn auf (Tissot et al., 2000). Die Fru^M Expression verhindert während der Metamorphose in diesen Nervenzellen den programmierten Zelltod und ermöglicht so ihre Ausdifferenzierung (Tissot et al., 2000). Es wird vermutet, dass diese Interneuronen an männchen-spezifischer Signalverarbeitung beteiligt sind und so an Verhalten-spezifisierenden Prozessen mitwirken (Tissot et al., 2000). Die meisten der Fru^M exprimierenden Neuronen des männlichen Taufliegengehirns existieren auch in Weibchen. Daher kann nicht angenommen werden, dass die unterschiedliche Differenzierung des weiblichen und männlichen Gehirns alleine von Fru^M spezifiziert wird. Zumindest ein weiterer Faktor könnte Dsx^M sein (Kimura et al., 2008, Rideout et al., 2010). In einigen Gehirnregionen, die für die Spezifizierung des männlichen Paarungsverhaltens essentiell sind, werden Fru^M und Dsx^M koexprimiert (Billeter et al., 2006, Rideout et al., 2007). Beispielsweise zeigt ein anterior im dorsalen Gehirnbereich nahe der Mittellinie gelegenes Neuronencluster Koexpression (Rideout et al., 2010). Dieses Neuronencluster ist für die Spezifizierung von Lecken und Kopulation beim männlichen Paarungsverhalten bekannt (Hall 1977, 1979, Ferveur und Greenspan 1998).

I. 4. Verhalten der Honigbiene

Die Honigbiene *Apis mellifera* ist ein eusoziales Insekt. Sie zeigt neben erlerntem Verhalten wie z.B. Unterscheidung von Futter- und anderen Pflanzen ein großes angeborenes Verhaltensrepertoire. Das angeborene Verhalten ist individuell oder sozial und zwischen Weibchen und Männchen differenziert. Individuelle angeborene Verhaltensformen sind z.B.

die eigene Körperpflege, Betteln um Futter oder die Reaktion des Individuums auf Pheromone. Pheromone lösen Aggressivität, aber auch soziale Verhaltensformen von Bienen aus. So wirkt das Königinnenpheromon anziehend auf junge Arbeiterinnen, die den Hofstaat bilden und die Königin pflegen und füttern (McFarland, 1999 Kapitel 11). Der Übergang von individuellem und sozialem Verhalten ist oft fließend. Geschlechtsspezifisches Verhalten ist klar differenziert. Die Königin ist nach ihrem Paarungsflug als einzige fruchtbare weibliche Biene im Stock ausschließlich für die Erzeugung von Nachkommen zuständig. Sie legt täglich bis zu 3000 Eier (McFarland, 1999 Kapitel 11). Arbeiterinnen sind sterile weibliche Bienen. Sie zeigen soziale Arbeitsteilung. Eine Arbeiterin durchläuft dabei verschiedene Stufen, in denen sie ein jeweils anderes Verhaltensspektrum zeigt. Beispielsweise kümmern sich Ammenbienen um die Brutpflege und Füttern Nestgenossen. Sammelbienen fliegen zur Nahrungsbeschaffung aus und sammeln Pollen und Nektar für das Bienenvolk. Männliche Bienen, die Drohnen, zeigen keine der bei Weibchen beobachteten sozialen Verhaltensformen. Sie beteiligen sich nicht an Futterbeschaffung, Nestbau, Pflege von Brut und Nestgenossen etc. Das einzig beschriebene spezifisch männliche Verhalten ist die Begattung einer jungfräulichen Königin auf dem Paarungsflug. Die strikte Trennung der angeborenen, geschlechtsspezifischen Verhaltensmuster von weiblichen und männlichen Honigbienen macht sie zum vielversprechenden Untersuchungsobjekt für Verhaltensstudien. Das angeborene geschlechtsspezifische Verhalten ist mit der Geschlechtsdifferenzierung genetisch determiniert. Die Geschlechtsdifferenzierung der Honigbiene ist mit Hilfe von genetischen Werkzeugen manipulierbar (Gempe et al., 2009). Die Untersuchung von in ihrer Geschlechtsdifferenzierung manipulierten Bienen könnte zum Verständnis der Prozesse beitragen, die vom genetischen Programm zum Verhalten führen.

Die Geschlechtsdifferenzierung bei der Honigbiene

Die Geschlechtsdifferenzierung der Honigbiene erfolgt durch komplementäre Geschlechtsbestimmung und das Gen *complementary sex determiner (csd)* wirkt dabei als initiales Signal. Weibliche Tiere gehen aus befruchteten Eiern hervor und besitzen zwei verschiedene *csd*-Allele. Männliche Tiere gehen aus unbefruchteten Eiern hervor und besitzen nur ein *csd*-Allel. Der heterozygote Allelzustand in weiblichen Individuen ist der aktive Zustand von *csd*, der homo- bzw. hemizygoten Allelzustand in männlichen Individuen ist der inaktive Zustand von *csd* (Beye et al. 2003). Unter der Kontrolle von *csd* steht das geschlechtsspezifisch gespleißte Gen *feminizer (fem)*. *fem* in der Honigbiene ist das Ortholog von *tra* in der Taufliege. In weiblichen Honigbienen führt aktives *fem^F* zur weibchen-

spezifisch gespleißten Transkriptvariante *Am-dsx^F*. In männlichen Honigbienen finden wir *fem* in inaktivem Zustand, was zur männchen-spezifisch gespleißten Transkriptvariante *Am-dsx^M* führt (Gempe et al., 2009). Über das Auftreten eines möglichen Orthologs von *fruitless*, seine Position in der geschlechtsbestimmenden Genkaskade und seine möglichen Funktionen ist bei der Honigbiene bisher nichts bekannt.

II. Zielsetzung

Die Honigbiene zeigt ein großes Spektrum geschlechtsspezifischer, angeborener Verhaltensweisen. Die Geschlechtsdifferenzierung der Honigbiene wird von der geschlechtsdeterminierenden Genkaskade spezifiziert. Einige Gene der Geschlechtsdetermination sind bereits bekannt. *csd* wirkt als initiales Signal auf *fem*, das wiederum *dsx* spezifiziert. Die Geschlechtsdifferenzierung der Taufliege wird zum Teil von orthologen Genen determiniert. *tra*, das orthologe Gen von *fem*, spezifiziert auch hier *dsx*. Außerdem reguliert *tra* in der Taufliege das geschlechtsspezifische Spleißen von *fru*. Das *fru*-Gen spezifiziert in der Taufliege das männliche Paarungsverhalten.

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung des *fru*-Orthologs *Am-fru* bei der Honigbiene. Ich möchte das zeitliche Transkriptionsmuster des *Am-fru*-Gens untersuchen, sowie die Exonstruktur und das Spleißmuster der auftretenden Transkripte klären. Nach der Entwicklung eines geeigneten Antikörpers möchte ich in immunhistologischen Untersuchungen die Expression von Am-Fru-Protein im Bienenhirn darstellen und strebe einen Vergleich mit der Fru^M Proteinexpression im Taufliegenhirn an. Außerdem möchte ich die Regulierung von geschlechtsspezifischem *Am-fru* Spleißen in die geschlechtsdeterminierende Genkaskade der Honigbiene einordnen und herausfinden, ob *Am-fru* ein Kandidat für ein Verhalten-regulierendes Gen ist. Mit der Entwicklung genetischer Werkzeuge zur Manipulation des geschlechtsspezifischen Spleißmusters und der Expression von *Am-fru* möchte ich zu späteren funktionellen Untersuchungen beitragen.

III. Verwendete Materialien und angewandte Methoden

III. 1. Materialien

III. 1.1. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie zum Beispiel Latex- / Nitrilhandschuhe, Reaktionsgefäße und Petrischälchen wurden von handelsüblichen Anbietern wie vwr etc. verwendet.

III. 1.2. Chemikalien

Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „für Analyse“ von gängigen Herstellern bezogen. Größtenteils wurden Produkte der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Steinheim) verwendet.

III. 1.3. Enzyme

Enzyme sowie zugehörige Puffersysteme für molekularbiologische Arbeiten wurden von Firmen wie Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt am Main), Peqlab (Erlangen) oder Promega (Mannheim) bezogen.

III. 1.4. Puffer

Selbst hergestellte Puffer und Lösungen wurden mit doppelt destilliertem, soweit erforderlich mit DEPC-behandeltem, nukleasefreiem dH₂O angesetzt und bei Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert.

III. 1.5. Kitsysteme

Für einige Arbeiten wurden Kitsysteme oder einzelne Komponenten daraus genutzt.

Folgende Kitsysteme wurden verwendet:

DynabeadsTM mRNA Purification Kit, Dynal Biotech ASA, Oslo (Norwegen)

FirstChoiceTM RLM-RACE Kit, Ambion, Austin (USA)

GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich, Steinheim

HiTrap NHS-activated HP, Amersham Biosciences, Freiburg

Qiagen Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden

Qiagen PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden

pGEMTM-T bzw. pGEMTM-T easy Vektor System, Promega, Mannheim

ProBondTM Purification System, Invitrogen, Karlsruhe

RiboMAX Synthese Kit, Promega, Mannheim

III. 1.6. Oligonukleotide

Alle selbst entworfenen spezifischen Oligonukleotide (Primer) wurden von MWG synthetisiert.

Am-fru Forward Primer:

1 (3'Ende3) TGCCGGTCGGTCTGTCATATCACGAGA
5 (Exon1) GTCGACCTGCATCCACGCCAC
6 (Exon2-male) AACTGATCCTCCTTCCGTGCTGCG
7 (Exon3-female) TCGCGATGCTACGTCAACTGTAGG
12 (Exon7) GACCTATGTCTCCTGCATCACAGC
18 (Exon2-male) GTTATTCCCGAATCGACGTAAGT
20 (Exon2-male +T7) taatacgaactcactatagggcgaGTTATTCCCGAATCGACGTAAGT
24 (Exon3-female) TGCACCGTCGCGAATCTCTGTTGC
29 (Exon2-male) AACTCGGCTCGGTGCGAACGATG
30 (Exon3-female) TCCGAAACGATGGGGGCCAAACTATTC
31 (Exon7) ACCTATGTCTCCTGCATCACAGCCA
32 (Exon8) AGCAACAACAGGCACGCTAAGCGA
35 (3'Ende2) ACGATGCCCGTATACACGTAGCGA
37 (Fru-Pep1) gatcggatccccGTTAGTCAGCATCTGCTACCGATG
72 (Exon4) GACGTTAAGGGTCGGGTGGC
76 (Exon5) CGGCACGTATAGTAGCGACGC

Am-fru Reverse Primer:

2 (3'Ende1) AGTGGTTCCTGATGTGCGTCACGA
3 (3'Ende2) CTCCTCTCGTCGCTGTTACTCTGT
4 (3'Ende3) TCTCGTGATATGACAGACCGACCG
13 (Exon7) GCTGGATGGTTGTTCCACCGTAGG
14 (3'Ende3) CGTATGTGGGAGCGGAGGGTGTC
19 (Exon2-male) CTGAAATTCGTGAACATGAAATCCTG
21 (Exon2-male+T7) taatacgaactcactatagggcgaCTGAAATTCGTGAACATG AAATCCTG
38 (Fru-Pep1) gatcgtcgaactcaCACAGGAGGGCTTGATTTGTAAGT
74 (Exon7) GCTGTGATGCAGGAGACATAGGTC
77 (3'Ende2) CTCGCGTTTTAGGACAGCGTGTTTC

Elongationsfaktor Forward Primer:

EF800_For GTGATCGGCCACGTTGATTC

EF_For (RT) ACGTCGACTCTGGCAAGTC

Elongationsfaktor Reverse Primer:

EF800_Rev GCTGCTGGAGCGAATGTTAC

EF_Rev (RT) TACCAGCAGCAACAATTAATACAG

III. 1.7. Vektoren

pGEMTM-T bzw. pGEMTM-Teasy

pGEX-5x-1

III. 1.8. Bakterienstämme

E.-coli Top10TM

E.-coli DH5 α

III. 1.9. Optische Hilfsmittel und Mikroskope

Zeiss Stemi 2000, Zeiss, Oberkochen

Konfokales Laserscanning-Mikroskop Zeiss LSM510

Fluoreszenz-Stereomikroskop

Gel-Dokumentations-Apparatur

III. 1.10. Verwendete Software

Staden Package,

Vektor-NTI 10 (Invitrogen)

Adobe Photoshop CS2 Version9.0 (Adobe systems incorporated)

Office Package 2007 (Microsoft)

Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download/>),

LSM-Software (Zeiss)

BLAST (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

BLAST (FlyBase) (<http://flybase.org/blast/>)

III. 2. Methoden

III. 2.1. Molekulargenetische Methoden

III. 2.1. a Gesamt-RNA Extraktion

Trizol:

0,8 M Guanidin thiocyanat (9,5 g)

0,4 M Ammonium thiocyanate (3,1 g)

0,1 M NaAc pH = 5 (3,5 ml einer 3 M Stocklösung)

5% Glycerol (=Glycerin) (5 g)

38% Phenol (48 ml Phenol für RNA (Lagerung bei 4°C)

Mit DEPC behandeltem dH₂O auf 100 ml auffüllen (= 33 ml)

Eier, Larvalstadien oder Kopffregionen von Embryonen in 50 µl Trizol (oder entsprechend mehr Trizol, immer mind. ca. 5 faches Volumen) 2 x 1 min vortexen bzw. mit einem Plastikstempel „zermörsern“, 5 min bei RT inkubieren, 10 µl Chloroform zusetzen (Menge entspricht 1/5 Volumen von Trizol), 30 sec vortexen, 5 min bei RT inkubieren, 15 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge bei RT zentrifugieren. Die RNA befindet sich in der oberen Phase, die in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wird. 20 µl Iso-propanol zusetzen und Mischen durch Invertieren (Menge entspricht 2/5 Volumen von Trizol), 10 min bei RT inkubieren, 10 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugieren. Pellet (RNA) mit 50 µl (oder entsprechend mehr) 70% EtOH (in DEPC behandeltem dH₂O) waschen: 10 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugieren, EtOH abnehmen und Pellet bei RT trocknen (nicht zu lange). Das Pellet lösen in gewünschter Menge nukleasefreiem dH₂O.

III. 2.1. b Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA mit Dynabeads

Photometrisch wird die Konzentration der total RNA bestimmt (1 + 79 µl) und je etwa 350 ng bis 500 ng über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um zu prüfen, ob die total RNA nicht degradiert ist. (Im Agarosegel sollten die zwei Banden der 18 S und 28 S RNA sichtbar sein). Die Beads dürfen zu keinem Zeitpunkt austrocknen. 35 – 40 µg RNA werden auf 50 µl mit DEPC behandeltem bzw. nukleasefreiem dH₂O aufgefüllt. RNA Lösung für 2 min auf 65 °C erhitzen, dann auf Eis stellen. Zwischenzeitlich 100 µl resuspendierte Dynabeads in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben und dieses auf den Magneten setzen. Überstand abnehmen und Beads einmal waschen mit 50 µl Binding Buffer, Überstand

abnehmen und werfen. 50 µl Binding Buffer und RNA-Mix (Binding Puffer und RNA-Mix müssen das gleiche Volumen haben) zugeben und gut mischen durch Rotation für 3-5 min. bei RT. 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Magneten stellen, Überstand abnehmen und werfen. Zwei mal mit je 100 µl Washing Buffer B waschen, Überstand jeweils werfen. Elution mit 2 x 10 µl 10 mM Tris-HCl: Dazu jeweils 2 min auf 75 °C erhitzen und dann sofort auf den Magneten stellen, eluierte mRNA in ein neues RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen, in das 0,5 µl RNase Inhibitor vorgelegt wurde. (Man geht von einem Anteil von 5% mRNA im Eluat aus, so dass bei 75 µg eingesetzter total RNA mit 375 ng / µl Eluat gerechnet würde.)

Regenerierung der Beads:

- (1) Beads in 100 µl Reconditioning Solution resuspendieren und in ein neues, RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- (2) 2 min auf 65 °C erhitzen
- (3) 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Magneten setzen, Überstand abnehmen und werfen
- (4) Zwei mal in Reconditioning Solution waschen (Schritt (1) und (3))
- (5) Resuspendieren der Beads in 100 µl Storage Buffer, auf Magneten setzen, Überstand abnehmen, Schritt (5) noch drei mal wiederholen
- (6) Resuspendieren der Beads in 100 µl Storage Buffer, Lagerung bei 4°C.

III. 2.1. c Erstellen einer 3'- bzw. 5'- Library

(Aus weiblichen und männlichen Bienenköpfen von Puppen im Alter von 2 bis 4 Tagen)

Gesamt-RNA Extraktion

(siehe III.2.1.a) wobei 3 Köpfe etwa einem Gewicht von 50 bis 60 mg entsprechen und daher mit je 500 µl Trizol homogenisiert werden. Die Köpfe werden in tiefgekühltem Zustand (flüssiger Stickstoff) in ein gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und (bei RT, nicht in Stickstoff) mit kühlem Trizol überschichtet und sofort mit dem Biovortexer homogenisiert. In den folgenden Schritten werden die einzusetzenden Mengen entsprechend des Trizols um den Faktor 10 gesteigert (100 µl Chloroform, 200 µl Isopropanol etc.). Die RNA wird zuletzt in je 20 µl DEPC behandeltem (nukleasefreiem) dH₂O aufgenommen. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und Zugabe von je 0,5 µl RNase Inhibitor. Lagerung der RNA bei -20°C.

Isolierung von mRNA mit Dynabeads:

(siehe III.2.1.b)

Photometrische Konzentrationsbestimmung:

Bsp.: 6,2554 µg / µl

Bsp.: 6,1275 µg / µl

Zur Überprüfung der RNA, ob diese nicht degradiert ist, werden je etwa 0,6 µg über ein 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Etidium-Bromid gefärbt. Je 75 µg Gesamt-RNA werden mittels Dynabeads entsprechend des Herstellerprotokolls zur Aufreinigung der enthaltenen mRNA eingesetzt. Die Elution erfolgt mit 2 x 10 µl 10 mM Tris-HCl. Die mRNA wird nach Zugabe von je 0,5 µl RNase-Inibitor bei -70°C eingefroren.

Reverse Transkription

Wie im Ambion-RACE-Kit beschrieben wird die cDNA-Synthese durchgeführt, wobei 2 µl der gewonnenen mRNA eingesetzt werden auch wenn dies deutlich mehr als den vorgeschlagenen 50 ng entsprechen dürfte. Lagerung der 3'-(5'-) RACE-Library bei -20 °C bzw. -70°C und Weiterverarbeitung in der Outer RACE-PCR.

Grundsätzlich werden die Outer- und anschließenden Inner- RACE PCRs entsprechend der Beschreibung im Ambion-RACE-Kit durchgeführt.

Bsp.: Outer 3'RACE-PCR:

Neben den Ansätzen mit weiblicher bzw. männlicher cDNA wird je ein Ansatz mit 1:10 verdünntem Template und je ein Ansatz ohne eigenen Outer Primer (Amfru3out-1) sowie eine Negativkontrolle ohne Template verwendet.

Entgegen des Vorschlags im Ambion-RACE -Kit (50 µl) werden 20 µl Ansätze verwendet und die Mengen entsprechend angepasst:

1 µl Produkt der Reversen Transkription (vom vorausgegangenen Schritt)

2 µl Taq Puffer

2 µl dNTP-Mix

1 µl Outer Primer

0,7 µl 3'RACE Outer Primer aus dem Ambion Kit

0,2 µl Polymerase (1:20 Mischung aus Pwo (1Teil) und Taq (19 Teile))

13,1 µl nukleasefreies dH₂O

Reaktionsgefäße auf Eis halten bis das PCR-Gerät 94°C erreicht hat, dann ins Gerät einsetzen:

(„Hot start“) PCR-Programm: (Annealingtemperatur ist an jeweilige Primer anzupassen)

2 min 94°C

30 sec 94°C

40 sec 58°C → 36 Zyklen (35 Wiederholungen)

1 min 30 sec 72°C

7 min 72°C anschließende Kühlung auf 12°C

Je 3 µl der Outer 3'RACE-Produkte werden 1: 20 verdünnt (der Rest wird als Kontrolle über ein 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt).

Bsp.: Inner 3'RACE-PCR (Primer wurden in Bezug auf die Annealingtemperatur entsprechend gewählt, PCR Programm wie Outer 3'RACE-PCR). Die 20 µl Ansätze bestehen aus:

2 µl dNTPs (2 mM)

1 µl Template

1 µl Inner Primer

0,7 µl 3' RACE Inner Primer aus dem Ambion Kit

2 µl Taq Puffer

0,2 µl Polymerase (Taq + Pwo = 19 + 1)

13,1 µl nukleasefreies Wasser dH₂O

(Zusätzlich wurde auch hier je ein Ansatz mit um Faktor 10 verdünntem Template und je ein Ansatz ohne eigenen Inner Primer (1: Inner3'RACE) sowie eine Negativkontrolle verwendet.)

III. 2.1. d Synthese von Doppelstrang-cDNA

Gesamt-RNA Extraktion (z.B. aus Bieneneiern oder versch. Larvenstadien)

(siehe III.2.1.a)

Isolierung von mRNA aus Gesamt-RNA mit Dynabeads:

(siehe III.2.1.b)

cDNA-Synthese aus m-RNA:

A) Erststrang cDNA-Synthese:

11 µl mRNA und 1 µl Primer (Random Primer z.B. von Fermentas) vorsichtig mischen, in einer Microzentrifuge 3-5 sec. Anzentrifugieren, 5 min auf 70 °C erhitzen, dann auf Eis abkühlen (Kondenswasser mit Hilfe der Microzentrifuge unten vereinigen) auf Eis halten und 4 µl Puffer (5 x Reaction Buffer), 1 µl Ribonuclease Inhibitor (20u/µl) sowie 2 µl 10 mM dNTP-Mix zugeben. Kondenswasser mit Hilfe der Microzentrifuge unten vereinigen, bei verwendetem Random Primer für 5 min bei 25 °C inkubieren (bei Oligo-dT-Primer 5 min bei 37 °C inkubieren). 1 µl Reverd Aid H Minus m-MuLV reverse Transkriptase (200u/µl) zugeben, bei verwendetem Random Primer für 10 min bei 25 °C und anschließend für 60 min bei 42°C inkubieren (bei Oligo-dT-Primer nur 60 min bei 42 °C inkubieren). Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70°C, anschließend Abkühlen auf Eis.

B) Zweitstrang cDNA-Synthese:

20 µl Erststrang cDNA-Ansatz (siehe oben)
10 µl Puffer (10 x DNA Polymerase I Puffer)
4 µl DNA Polymerase I
0,32 µl RNase H

Auf 100 µl mit nukleasefreiem dH₂O auffüllen und für 2 h bei 16°C inkubieren.

C) Aufreinigung über eine geeignete Säule:

(z.B. Gel-Elutionskit von Eppendorf)

100 µl Ansatz (Zweitstrang cDNA), 500 µl optional Wash Buffer (nicht Bestandteil des Eppendorf Kits sondern von sigma) und 100 µl Isopropanol mischen durch Invertieren und entsprechend den Angaben des Kits über die Säule geben und waschen. Anschließende Elution mit 30 µl Elutionspuffer oder nukleasefreiem dH₂O (auf 40-50°C erwärmtes Wasser bewirkt höhere Ausbeute durch bessere Löslichkeit).

Überprüfung der cDNA

Zur Überprüfung, ob die cDNA-Synthese für Transkripte bis 800 bp erfolgreich verlaufen ist, wird in einer Test-PCR ein 800 bp großes Fragment des Elongationsfaktors unter Verwendung des Oligonukleotidpaars „EF800“ amplifiziert. Bei Bedarf wird die cDNA-Konzentration per Nanodrop-Messung bestimmt und zur Vergleichbarkeit auf den gewünschten Wert verdünnt.

III. 2.1. e Synthese doppelsträngiger RNA zur Injektion bei RNAi Experimenten

Das zur gewünschten Sequenz passende, spezifische Primerpaar (forward und reverse Primer) besitzt jeweils am 5'Ende eine T7 Promotorsequenz. Nach Optimierung der PCR Bedingungen (Größtmögliche Reduktion der als Template eingesetzten Plasmid-DNA, Annealingtemperatur, Elongationszeit etc.) wird das Produkt aus 20 bis 30 Ansätzen zu je 20 µl vereinigt. Die Aufreinigung erfolgt über eine geeignete Säule (z.B. PCR Purification Kit von Qiagen), Proben des Eluates werden zur Konzentrationsbestimmung gelelektrophoretisch über 1% Agarose aufgetrennt sowie photometrisch gemessen. Die Synthese der RNA erfolgt entsprechend der Herstellerangaben im RiboMAX Synthese Kit von Promega, wobei alle Mengen auf die Hälfte der Angaben reduziert eingesetzt werden.

Ein Ansatz (50µl) enthält :

T7 Transkriptions Buffer 10 µl
rNTPs (jeweils 25mM) 15 µl
DNA etwa 5-7 µg
H₂O entsprechend
EnzymMix 5 µl

Synthese 6 Stunden bei 37 °C

Eine Kontrollprobe (1 µl) wird abgenommen und bei -20°C gelagert.

DNase-Restriktion (10 U pro 1 µg eingesetzter DNA) für 15 min bei 37 °C

Eine Kontrollprobe (1 µl) wird abgenommen und bei -20°C gelagert.

Phenol / Chloroform – Fällung der RNA (saures Phenol verwenden):

Nach Zugabe des gleichen Volumens einer 1:1 Mischung aus saurem Phenol und Chloroform wird durch Invertieren gemischt, dann zentrifugiert in der Tischzentrifuge bei RT mit maximaler Geschwindigkeit für 5 min. Der Überstand wird in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform gemischt und zentrifugiert in der Tischzentrifuge bei RT mit maximaler Geschwindigkeit für 5 min. Der Überstand wird mit 1/10 Volumen 3 M NaAc und 1 Volumen Isopropanol gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Zentrifugieren in der Tischzentrifuge bei RT mit maximaler Geschwindigkeit für 7 min. Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Waschen des Pellets durch Überschichten mit 70% EtOH (in DEPC behandeltem dH₂O) und anschließendem Zentrifugieren in der Tischzentrifuge bei RT mit maximaler Geschwindigkeit für 5 min. Das Pellet wird getrocknet und vorsichtig resuspendiert in 20-30 µl nukleasefreiem dH₂O, das auf 40°C bzw. 65°C erwärmt wurde (bessere Löslichkeit der RNA).

Annealing der beiden Einzelstränge zu doppelsträngiger RNA (dsRNA):

Die gelöste einzelsträngige RNA wird 15 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert und anschließend bei abgeschaltetem Block gleichmäßig auf RT abkühlen gelassen (30 bis 60 min).

Die RNA Konzentration wird photometrisch und eventuell gelelektrophoretisch über 1% Agarose bestimmt. Eine Probe des DNA-Templates, sowie die abgenommenen Kontrollproben (siehe oben) werden ebenfalls gelelektrophoretisch über 1% Agarose aufgetrennt. Alle dsRNA Proben werden vor dem Auftragen zur Trennung in Einzelstränge für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gehalten.

III. 2.2. Proteinbiochemische Methoden

III. 2.2. a Aufreinigung von GST-gekoppeltem, rekombinant exprimiertem Protein zur Immunisierung eines Kaninchens

Purification buffer:

20 mM Hepes / KOH pH = 7,9

500 mM NaCl

20% Glycerol

immer vor Gebrauch frisch zugesetzt werden

1 mM DTT

1 mM EDTA

1 mM PMSF

2 µg / ml Aprotinin (Aliquots -80°C; möglichst nicht mehrfach auftauen)

und an entsprechender Stelle Pefabloc bzw. Complete Mini EDTA-free, siehe unten

Elutionspuffer:

100 mM Tris pH = 8,0

120 mM NaCl

20 mM Glutathion reduced

500 ml LB-Medium mit Ampicillin (je nach Resistenz) werden mit einer Übernachtskultur des Bakterienklons angeimpft ($OD_{600} \sim 0,1$). (Der E.-coli DH5 α Bakterienklon wurde mit pGEX-5x-1 transformiert, das im Anschluss an die Aminosäuren GIP das Am-Fru-Proteinfragment VSQHLLPMFLKTAELQIRGLTDNSVNNKTEEKSPSEPETQTGIRHTESPNLQPPPEK RKRKASGSYDVSLSGPPSERFMSDSQTSSQCSYKSSPPV kodiert.) Bei $OD_{600} = 0,5-0,6$ wird die Bakterienkultur zur Proteinexpression induziert durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 0,5 mM (0,1 – 1,0 mM). Inkubation für 1 Stunde (1-2h) bei 37°C auf dem Schüttler, anschließend abkühlen der Kultur auf Eis (10 – 15 min) und Zentrifugation bei 4°C für 15 min mit 3800 g. Pellet mit ca. 20 ml Purification buffer waschen (Nicht resuspendieren). Nach diesem Schritt können die pelletierten Zellen bei Bedarf bis zu mehrere Monate bei -80°C gelagert werden. Die Zellen werden in 2 x 8 ml (bzw. 1 x 16 ml) eiskaltem Purification buffer mit 2 Tabletten Pefabloc (bzw. Complete Mini EDTA-frei von roche; je nach Anbieter) resuspendiert und anschließend auf Eis mit Ultraschall aufgebrochen. [8 x (je 20 sec. Schallen und 20 sec. Pause)] Nach Zugabe von Triton-X-100 mit einer Endkonzentration von 0,5% (bis 1%) wird das Lysat für 30 min auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich invertiert. Zentrifugation bei 4°C für 20 min mit 16100 g. Der Überstand wird in ein sauberes Röhrchen überführt und 250 µl Glutathion-Agarose, die zuvor in Purification buffer equilibriert wurde (je nach Hersteller „Glutathion-Sephadex“) zugegeben. [Die Beads

müssen vor der ersten Verwendung entsprechend den Herstellerangaben quellen bzw. gewaschen werden. Die Lagerung der Beads ist produktabhängig, hier in 2 M NaCl mit 1 mM NaN_3 bei 4°C, und sie werden nach Gebrauch entsprechend den Herstellerangaben wieder gereinigt.] Kopplung: die Proteinlösung inkubiert unter ständiger Bewegung (z.B. Rotator) mit den Beads bei 4°C für 45 min. Waschen: 3 x mit je 10 ml eiskaltem Purification buffer (30 ml mit 2 Tabletten Pefabloc oder Complete Mini) mit 0,1 % Triton-X-100 und anschließend 2 x mit je 10 ml eiskaltem Purification buffer (20 ml mit 1 Tablette Pefabloc oder Complete Mini) OHNE 0,1 % Triton-X-100. Nach jedem Waschschrift wird jeweils mit 500 g bei 4°C für 5 min zentrifugiert.

Die Beads werden in ein Eppendorf Gefäß überführt, erneut bei 500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend mit 3 x 250 µl eiskaltem Elutionspuffer eluiert: Der Elutionspuffer wird jeweils 15 min bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert, Zentrifugation jeweils mit 500 g bei 4°C für 5 min in der Tischzentrifuge. Der Überstand (enthält das Protein!) wird bei -70°C gelagert, bzw. gleich mit 5 x Lämmli-Puffer versetzt, aufgeköcht und dann tiefgekühlt, falls die Proteinlösung nicht direkt über eine SDS-PAGE aufgetrennt wird. (SDS-PAGE: siehe III.2.2.c)

Fixierung des SDS-Gels 1 Stunde in 12% Trichloressigsäure, Färbung mit 160 ml kolloidalem Coomassie + 40 ml MeOH über Nacht, Entfärbung mit 25% MeOH in dH_2O .

Die Proteinbande wird ausgeschnitten und (nach massenspektrometrischer Untersuchung einer Probe) zur Immunisierung eines Kaninchens, die durch die Firma Seqlab (Göttingen) vorgenommen wurde, eingeschickt (ohne Puffer, nur fest verschlossen).

Zur Reinigung der Beads werden gebraucht

Cleansing buffer 1: 0,1 M Borsäure mit NaOH auf pH = 8,5
0,5 M NaCl

Cleansing buffer 2: 0,1 M Na-Acetat mit Essigsäure auf pH = 4,5

Die Reinigung der Beads erfolgt durch Waschen mit:

5 Beadsvolumina Cleansing buffer 1

5 Beadsvolumina dH_2O

5 Beadsvolumina Cleansing buffer 2

5 Beadsvolumina dH_2O

wobei jeweils 5 min bei 4°C mit 500g zentrifugiert wird.

Lagerung der Beads bei 4°C in 2 M NaCl mit 1 mM NaN_3

III. 2.2. b Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus Kaninchenserum unter Verwendung einer HiTrap™ Säule

Alle verwendeten Puffer werden filtriert, bevor sie über die Säule gegeben werden (Filterporengröße 4,5 µm oder 2 µm sind geeignet). Alle Puffer und die Säule werden bei 4°C (Kühlraum) verwendet.

Coupling Puffer: (20 ml)

0,2 M NaHCO₃ (0,33604 g)

0,5 M NaCl (0,5844 g)

pH = 8,3

1 mM HCl (Eiskalt)

2 M Glycin-HCl (20 ml)

pH = 2,0 (3,0028 g)

Puffer A (50 ml)

0,5 M Glycin (1,87675 g)

0,5 M NaCl (1,461 g)

pH = 8,3

Puffer B (50 ml)

0,1 M Acetat (Na-Acetat) (0,41015 g)

0,5 M NaCl (1,461 g)

pH = 4

Puffer neutral (storage buffer) (20 ml)

0,05 M Na₂HPO₄ (0,1419 g)

0,1% NaN₃ (0,02 g)

pH = 7

start Puffer (PBS ohne Tris) 10x start Puffer (50 ml)

140 mM NaCl (4,14 g)

2,7 mM KCl (0,107 g)

10 mM Na₂HPO₄ (0,89 g)

1,8 mM KH₂PO₄ (0,123 g)

pH = 7,4

Für Pre-wash-step start Puffer (siehe oben) mit pH = 4,8Elutions Puffer (50 ml)

0,1 M Glycin-HCl (0,37535 g)

pH = 3,0

Vorlage Puffer (20 ml)

0,1 M Tris-HCl (0,24228 g)

pH = 8,3

4,5 mg Ligand (Epitop, mit dem das Kaninchen immunisiert wurde) werden in 1 ml Coupling Puffer gelöst. Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz sollte die OD₂₈₀ der Lösung bestimmt werden, wobei zur späteren Berechnung die Absorption (nicht die Konzentration) notiert werden muss.

Alle Puffer dürfen nicht schneller als mit 30 Tropfen pro Minute mit Hilfe einer Spritze durch die Säule gedrückt werden.

(1) Vorbereitung der Säule:

Die Kappe am oberen Säulenende wird abgeschraubt und ein Tropfen eiskaltes HCl (1 mM) aufgetropft. Nachdem der Adapter aufgeschraubt wurde kann der Verschluss am unteren Säulenende entfernt werden. Mit 3 x 2 ml 1 mM HCl wird das Isopropanol aus der Säule ausgewaschen. 1 ml Ligand in Coupling Puffer wird auf die Säule gegeben und bei verschlossener Säule für 4 Stunden bei 4 °C inkubiert. (Für Liganden, die kleiner als M = 5000 und / oder Säurestabil sind, würde die Ansäuerung auf pH = 2,5 durchgeführt.) Mit 3 x 1 ml Coupling Puffer wird die Säule gewaschen, der Durchlauf aufgefangen und ein Teil des Durchlaufs zur erneuten OD₂₈₀ Messung 1:1 mit 2 M Glycin-HCl pH 2,0 verdünnt (Glycin-HCl „neutralisiert“ die ausgewaschenen Hydroxygruppen, die sonst das Messergebnis beeinflussen würden).

Beispielrechnung für

$$\text{Kopplungseffizienz} = [(A - B) / A] \times 100 = \quad [\%]$$

A: Kopplungslösung (OD₂₈₀ x 1 ml); B: Ungebunden Durchlauf (OD₂₈₀ x 3 ml x 2 wegen Verdünnung)

A: (Gemessen wurden 10 µl Kopplungslösung plus 70 µl dH₂O; Blank: dH₂O)

OD₂₈₀ (Verdünnung schon eingerechnet) : 0,248 A (Absorption)

B: (Gemessen wurden 50 µl Durchlauf plus 50 µl Glycin-HCl; Blank: 50 µl Coupling Puffer plus 50 µl Glycin-HCl)

OD₂₈₀ (Verdünnung schon eingerechnet) : 0,018 A (Absorption)

Kopplungseffizienz:

$$[0,248 - (3 \times 0,018) / 0,248] \times 100 = 78,2 \%$$

Da die folgenden Schritte nicht mehr am selben Tag vorgenommen werden, wird die Säule an dieser Stelle in Puffer neutral (2 ml) über Nacht gelagert.

Waschen und Deaktivieren der Säule:

Über die Säule werden 3 x 2 ml Puffer A, dann 3 x 2 ml Puffer B und anschließend wieder 3 x 2 ml Puffer A gegeben. Puffer A wird 4 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach 3 x 2 ml Puffer B folgen wieder 3 x 2 ml Puffer A und zuletzt nochmals 3 x 2 ml Puffer B. Zur Aufbewahrung der Säule (falls diese nicht sofort zur AK-Aufreinigung verwendet wird) werden 2 ml Puffer neutral auf die Säule gegeben und diese darin (im zweiten ml) bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert.

(2) Aufreinigung des AKs:

3 ml start Puffer, dann 3 ml Elutionspuffer und nochmals 10 ml start Puffer werden über die Säule gegeben, bevor ca. 10 ml Serum (das zuvor 2 Stunden bei 4 °C und mit 10000 g bzw. 12000 g zentrifugiert wurde), über die Säule gegeben werden (Tropfgeschwindigkeit ca. 0,4 bis 0,5 ml pro Minute). Mit 10 ml start Puffer wird die Säule gewaschen. Bei Aufreinigung mit Pre-wash-step (wie von Herrn Dr. Benli –SEQLAB- empfohlen) werden 3 ml Prewash-Puffer über die Säule gegeben, bevor die Elution beginnt. Zur Elution wird je 500 µl Fraktion ebensoviel (also 500 µl) 0,1 M Tris-HCl pH = 8,3 (Vorlagepuffer) vorgelegt. Die Elution erfolgt mit 3 ml Elutionspuffer.

Re-Equilibrierung der Säule:

Die Säule wird mit 7 – 10 ml start Puffer gewaschen und dann mit 3 ml Puffer neutral, in dem die Säule auch bei 4°C gelagert wird, durchtropft.

(Zur Kontrolle der Aufreinigung und der photometrischen Ergebnisse werden von den Elutionsfraktionen 50 µl Aliquots abgenommen (späterer Test per Dot Blot) und der Rest bei -20 °C gelagert.)

Je 1 µl der Elutionsfraktionen werden in 40 µl Elutionspuffer und 40 µl Vorlagepuffer verdünnt und photometrisch bei einer OD von 280 nm gemessen. (Nullreferenz: 40 µl Elutionspuffer und 40 µl Vorlagepuffer) Die drei bis vier Fraktionen mit den höchsten Messwerten werden per „Dot-Blot“ getestet und anschließend vereinigt.

Dot-Blot:

10 x TBS (1Liter): 12 g Tris ,88 g NaCl, pH = 8,0 (mit HCl)

Die Lösung wird autoklaviert, auf 1 x TBS verdünnt und durch Zugabe von 1 ml Tween20 je Liter wird 1 x TBST hergestellt.

Kopplungslösung (4,5 mg in 1 ml) des Liganden (Antigen, mit dem das Kaninchen immunisiert wurde) wird mit Wasser oder 1 x TBST verdünnt (1: 10 bis 1 : 1 Mio) und davon jeweils 3 x 1 µl für den Test auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. Blocken für 1 Stunde; Inkubation in prim. AK (1:1000) für 1 Stunde; Waschen in TBST; Inkubation in sek. AK (z.B. AP-gekoppelter Anti Rabbit 1 : 10000) für 50 min; Waschen in TBST. Substratlösung (z.B. ECL-Reagenzien) aufbringen, Nitrocellulosemembran in transparente Folie einschlagen und Röntgenfilm auflegen. Der Röntgenfilm wird entwickelt.

Elutionsfraktionen mit hoher OD sollten auch ein deutliches Signal (AK-Nachweis) des Liganden ergeben.

Entsalzung der eluierten Antikörper:

Entsprechende Elutionsfraktionen werden über Nanosep Centrifugal Devices Säulen (100 K) von „PALL“ entsalzt. Entsprechend der Anleitung (S. 5) wird die Säule mit 500 µl DEPC behandeltem dH₂O gewaschen und anschließend in 500 µl Schritten die Elutionsfraktionen zentrifugiert. (Bei 100 K Säulen mit 14 000g für je 5 - 10 min bei 4 °C). Vom Filter der Säule werden die Antikörper am Ende mit der verbleibenden Lösung abgenommen und mit etwas start Puffer (siehe oben) werden noch am Filter haftende Antikörper resuspendiert und ebenfalls abgenommen. Das Endvolumen der Elutionsfraktionen beträgt dann etwa 200 bis 400 µl (wobei etwa 100 µl davon Start Puffer sind).

III. 2.2. c SDS-PAGE und Western Blot

SDS-Gel:

(Elektrophorese mit bis zu 8 Volt pro cm Lauflänge beim Sammelgel und bis zu 15 Volt pro cm Lauflänge im Trenngel)

7% SDS-Gele (klein von Biorad)

Für 2 Gele:	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid („Gel 40“)	1,9 ml	326 µl
1,5 M Tris pH = 8,8	1,9 ml	---
0,5 M Tris pH = 6,8	---	626 µl
10 % SDS	75 µl	25 µl
dH ₂ O	3,65 ml	1,5 ml
10 % APS	37,5 µl	25 µl
TEMED	3,75 µl	2,5 µl

10 x Laufpuffer: (1 Liter)

0,25 M Tris (30,25 g)

1,92 M Glycin (144g)

1 % SDS (10 g)

Mit dH₂O auf 1 Liter auffüllenSDS-Probenpuffer (5 x Lämmli pH = 6,8 für 10 ml) [nugi-zentrum und hu-berlin]

100 mg Bromphenolblau

1,5 g SDS

3,5 g Glycerin

3,2 ml 1 M Tris-HCl pH = 6,8

2,5 ml β-Mercaptoethanol

(SDS-Probenpuffer Rezept alternativ – weniger SDS und β-Mercaptoethanol:)

Für 25 ml:

6 ml 0,5 M TrisHCl pH = 6,8

2,5 ml Glycerol

4 ml 10 % SDS

2 ml β-Mercaptoethanol

0,5% Bromphenolblau

9,5 ml dH₂OKathodenpuffer: (1 Liter)

0,04 M 6-amino-capronacid (5,25 g)

20 % Methanol (200 ml)

0,01 % SDS (100 mg)

Anodenpuffer 1:

0,3 M Tris (36,42 g)

20 % Methanol (200 ml)

pH = 10,4

Anodenpuffer 2:

3 mM Tris (0,36 g)

20 % Methanol

pH = 10,4

Western Blot: (0,8 -1 Volt pro cm²)10 x TBS: (1Liter)

100 mM (12 g) Tris

150 mM (88 g) NaCl

Autoklavieren

1 x TBST: (1Liter)

100 ml 10 x TBS

1 ml Tween20

Auf 1 Liter auffüllen

Stripping Puffer: (1Liter)

200 mM Glycin (15 g)

150 mM NaCl (8,76 g)

pH = 2,8

autoklavieren

0,05 % Tween20 (0,5 ml)

Semi-Trockenblot:

Kathode (- Pol)	
6 Whatman Filterpapiere	In Kathodenpuffer
SDS-Gel	In Kathodenpuffer
Nitrocellulose (oder andere) Membran	In Anodenpuffer I
3 Whatman Filterpapiere	In Anodenpuffer I
5 Whatman Filterpapiere	In Anodenpuffer II
Anode (+Pol)	

III. 2.2. d whole mount Färbung des Bienenhirns

Fixativ:

4% Paraformaldehyd in PBS im Wasserbad bei 56°C bis 58°C in Lösung bringen (einige Stunden). Nicht über 60°C erhitzen, da MeOH entstehen würde. Lagerung dunkel bei 4°C.

Dekaptieren der Biene / Bienenpuppe und Präparation des Gehirns in gekühltem PBS. Dazu werden Uhrmacherpinzetten oder ähnliches Präparationsbesteck sowie ein Binokular zur besseren Optik verwendet. Präparierte Gehirne werden z.B. mit Hilfe eines kleinen Spatellöffels in kaltes Fixativum überführt und mindestens 2 bis höchstens 4 Nächte bei 4°C inkubiert. Waschen 3 x 10 min in PBS auf Eis, 2 x 10 min in PBS bei RT dann waschen 2 x 10 min in PBS mit 0,2% Triton-X 100 bei RT. Präinkubation (Blocken) 1 h in PBS mit 0,2% Triton-X 100 und 3% NGS (Normal goat serum) bei RT auf dem Schüttler (ca. 500 µl pro Gehirn). Inkubation im primären Antikörper (Anti-Am-Fru 1: 10 000) in PBS mit 0,2% Triton-X 100 und 3% NGS für 3 bis 4 Nächte bei 4°C auf dem Schüttler (ca. 500 µl pro Gehirn).

Waschen 4 x 10 min in PBS bei RT. Inkubation im sekundären Antikörper (DonkeyAntiRabbit-Cy3 1: 200) in PBS mit 0,2% Triton-X 100 und 1% NGS über Nacht bei RT auf dem Schüttler (ca. 500 µl pro Gehirn) und im Dunkeln. Waschen 3 x 10 min in PBS bei RT im Dunkeln. Entwässerung in aufsteigender EtOH-Reihe jeweils 10 min in 30, 50, 70, 90, 95, 3 x 100 im Dunkeln. (100% EtOH ist absolut wasserfrei z.B. durch Tonkügelchen oder ein anderes hygroskopisches Granulat und unvergällt.) Um Transparenz des Gewebes zu erreichen wird das Gehirn anschließend für mindestens 2 bis höchstens 5 Nächte in Methylsalicylat inkubiert. Die Untersuchung des Gehirns am Laserscanning-Mikroskop erfolgt in Methylsalicylat. Dazu werden z.B. individuell gefertigte Objektträger mit einem Glasring (Stärke 1,5 mm) in der Mitte verwendet. (Vorsicht, Methylsalicylat greift Kunststoff an, daher sind Silikon und diverse Klebstoffe ungeeignet. Glaskleber ist für mehr als ausreichende Dauer resistent.)

III. 2.2 e Fertigung und Färbung von Kryoschnitten des Bienenhirns

Fixierlösung:

4% Paraformaldehyd in PBS mit 8% Sucrose

Paraformaldehyd in PBS bei 56°C bis 58°C im Wasserbad in Lösung bringen (nicht über 60°C erhitzen, da sonst MeOH entsteht, dauert einige Stunden), anschließend Abkühlen lassen und Sucrose zugeben. Lagerung dunkel bei 4°C.

Dekaptieren der Biene / Bienenpuppe und Präparation des Gehirns in gekühltem PBS. Dazu werden Uhrmacherpinzetten oder ähnliches Präparationsbesteck sowie ein Binokular verwendet. Präparierte Gehirne werden z.B. mit Hilfe eines kleinen Spatellöffels in kalte Fixierlösung überführt und 90 min bei RT inkubiert. Waschen 3 x 10 min in PBS bei RT. Inkubation in aufsteigender Sucrosereihe in PBS: jeweils 30 min in 10% Sucrose sowie 20% Sucrose, anschließend 30% Sucrose über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Einfrieren der Gehirne in Tissue Imbed Media auf Trockeneis. Dazu Gehirn luftblasenfrei in Einbettmittel überführen, das z.B. in einem Plastikdeckel von Schnappdeckelgläschen vorgelegt wird und durch Positionierung des Deckels auf einer Scheibe Trockeneis einfrieren. Kryoschnitte anfertigen (10 bzw. 20 µm). Kryoschnitte in PBS mit 0,1% Triton-X 100 waschen (3 mal). Inkubation im primären Antikörper (Anti-Am-Fru 1: 10 000 in PBS mit 0,1% Triton-X 100 und 0,1% BSA) über Nacht bei 4°C. Kryoschnitte in PBS mit 0,1% Triton-X 100 waschen (3 mal). Inkubation im sekundären Antikörper (DonkeyAntiRabbit-Cy3 1: 200 in PBS mit 0,1% Triton-X 100 und 0,1% BSA) bei RT für 2 h.[wenn zusätzlich Kernfärbung gewünscht wird, Inkubationslösung nach 1,5 h absaugen und gegen identische Lösung mit zugesetztem Hoechst34580 von Mol Probes ersetzen, bei RT für 20-30 min inkubieren], Kryoschnitte in PBS mit 0,1% Triton-X 100 waschen (3 mal). Einbettung in Glycerin-Propyl-Gallat, Deckglas an den Rändern mit Nagellack versiegeln.

III. 2.3. Mikromanipulation und künstliche Honigbienenaufzucht

III. 2.3. a Mikroinjektion zur RNA Interferenz (RNAi)

Durch Injektion doppelsträngiger RNA entsprechender Sequenz wird der intrazelluläre Abbau bestimmter Transkripte initiiert. Die resultierende vorübergehende Repression eines bestimmten Gens ist als RNA Interferenz Technik oder kurz RNAi bekannt. Zur Injektion werden kurze, 19 bzw. 21 Nukleotide umfassende doppelsträngige RNA Sequenzen, sogenannte siRNA (small interfering RNA) verwendet. Auch die Injektion längerer dsRNA Sequenzen ist möglich. Diese bis mehrere hundert Nukleotide umfassende doppelsträngige RNA wird nach Injektion durch intrazelluläre Mechanismen enzymatisch in 19 bzw. 21 Nukleotide umfassende Abschnitte unterteilt.

16% Schwefelsäure gegen Pilzbefall auf den Dosenboden gegeben. Die Individuen werden in feuchter Atmosphäre bei 34,5°C im Dunkeln aufgezogen, wobei die Embryonen bis zum Schlüpfen auf den Einsteckzellen verbleiben. Kurz vor dem Schlüpfen der säureempfindlichen Larven wird die Schwefelsäure in den Dosen gegen Wasser ausgetauscht. Geschlüpfte Larven werden auf vorgewärmten (34,5°C) Futterbrei umgesetzt und in trockenen oder mit Wasser benetzten Dosen bei 34,5°C im Dunkeln gehalten. Der Futterbrei wird bei Bedarf ersetzt oder ausgetauscht. Er enthält 3,6% Glucose, 3,6% Fructose, 1% Hefeextrakt sowie 52% Gelee Royale. Zur Herstellung werden Zucker und Hefeextrakt im Mörser homogenisiert oder direkt in warmem Leitungswasser gelöst und anschließend mit Gelee Royale gemischt. Lagerung von Aliquots bei -20°C bis mindestens 12 Monate. Lagerung von Aliquots in Gebrauch bei 4°C bis etwa 1Woche.

IV. Ergebnisse

IV.1. Die Sequenz der BTB kodierenden Domäne von *fruitless* im Honigbienen genom

fruitless in *Drosophila* zählt zur Familie der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und weist eine BTB-Domäne auf. Die Sequenz aus 66 Aminosäuren der BTB-Domäne wurde in der Datenbank NCBI mit dem Honigbienen genom verglichen. Mit der Funktion TBLASTN wurde dazu das Genom nach Sequenzabschnitten durchsucht, die für eine ähnliche Aminosäuresequenz kodieren. Bei der Suche mit TBLASTN ergaben sich 80% Identität mit einer Sequenz auf Chromosom 9 des Honigbienen genomes:

BTB Fru: ETVKAHQ TILSACSPYFETIFLQNQH PPIIYLKDVRYSEMRSLLDFMYKGEVNVGQSSLPMFLKT

BTB Am-Fru: ETVKAHQ TILSACSPYFESIFLQNT HPHPIIFLKD VNETEMKALLHFMYKGEVNV SQHLLPMFLKT

Die im Honigbienen genom gefundene Sequenz entspricht der von Exon 6 (Vgl. Abb.1) des *Am-fru*-Gens kodierten BTB-Domäne.

IV.2. Genstruktur und Spleißmuster von *fruitless* bei der Honigbiene

Transkripte des Gens *fruitless* treten in der Taufliege in unterschiedlichen Geweben, unter anderem in Neuronen des Gehirns auf. Das Expressionsmaximum männchen-spezifischer Fru-Proteine in Neuronen des Gehirns erfolgt im Puppenstadium (G. Lee et al., 2000). Unter der Annahme, dass auch im Gehirn der Honigbiene die Transkription des orthologen Gens von *fruitless* erfolgt, wurden DNA-Banken (3'- sowie 5'- Libraries) aus der Kopfregion drei Tage alter männlicher und weiblicher Bienenpuppen erstellt. Mit Hilfe der Libraries konnten in 3' sowie 5' RACE-Experimenten Sequenzabschnitte „upstream“ (strangaufwärts) und „downstream“ (strangabwärts) der entdeckten BTB kodierenden Sequenz des *fruitless* Orthologs in der Honigbiene nachgewiesen werden.

Es wurden drei Promotorsequenzen P1, P2, P3 des *Am-fru*-Gens identifiziert. Promotor P1 („upstream“ von Exon 1, vgl. Abb. 1) ist für die Transkription von prä-mRNA verantwortlich, die geschlechtsspezifisch gespleißt wird.

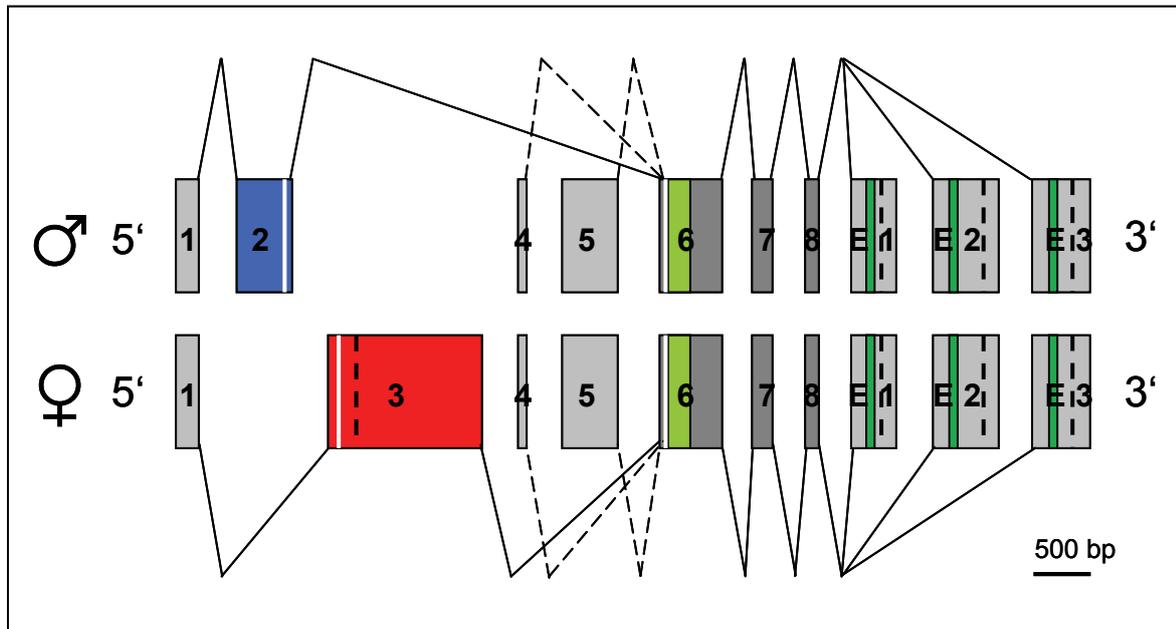


Abb. 1: Exonstruktur der *Am-fru* Spleißvarianten in männlichen und weiblichen Honigbienen

Geschlechtsspezifisch gespleißte *Am-fru* Transkripte entstehen unter Promotor P1. Männchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* Transkriptvarianten beinhalten die Exons 1-2-6-7-8 sowie jeweils eins der drei 3' Enden E1, E2, E3. Weibchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* Transkriptvarianten bestehen aus den Exons 1-3-6-7-8 sowie jeweils einem der drei 3' Enden E1, E2, E3. *Am-fru* Transkripte, die unter Promotor P2 oder P3 entstehen, beginnen am 5' Ende mit Exon 4 oder Exon 5 und kommen in Männchen und Weibchen vor.

- 1, 4, 5: Exon 1, 4 bzw. 5 bildet das 5' Ende der P1-, P2-, P3- *Am-fru* Transkripte
- 2: männchen-spezifisches Exon 2 (blau)
- 3: weibchen-spezifisches Exon 3 (rot)
- 6, 7, 8: Exons 6-7-8 bilden den konstitutiv gespleißten Bereich (dunkelgrau)
- E1, E2, E3: alternative 3' Sequenzen (hellgrau)
- hellgrün: BTB-Domäne kodierender Bereich in Exon 6
- dunkelgrün: C₂H₂ Zink-Finger-Domäne kodierende Bereiche in E1, E2, E3
- weiße Balken: Startkodons
- schwarze unterbrochene Balken: Stopkodons

In weiblichen Honigbienen wurde mRNA nachgewiesen, die im 5' Bereich ein weibchen-spezifisches Exon 3 enthält (siehe Abb.1). Dieses weibchen-spezifische Exon beinhaltet ein Stopkodon, das zum vorzeitigen Translationabbruch führt. In männlichen Honigbienen konnte mRNA nachgewiesen werden, die im 5' Bereich ein männchen-spezifisches Exon 2 enthält (siehe Abb. 1). Dieses männchen-spezifische Exon beinhaltet kein Stopkodon, die mRNA kodiert für ein „full-length“ (vollständiges) Protein. Dem in beiden Geschlechtern unterschiedlichen 5' Bereich folgt ein konstitutiv gespleißter Sequenzabschnitt, der sich aus den Exons 6, 7 und 8 zusammensetzt (vgl. Abb. 1). Exon 6 kodiert für die BTB-Domäne (siehe Abb.1, hellgrüner Bereich in Exon 6). Im 3' Bereich der P1-Transkripte befindet sich jeweils einer von drei möglichen Zn-Finger kodierenden Sequenzabschnitten (siehe Abb.1, Ende 1, Ende 2, Ende 3).

Unter Promotor P2 und P3 („upstream“ von Exon 4 bzw. Exon 5, vgl. Abb.1) entstandene Transkripte wurden im 5'Bereich nicht geschlechtsspezifisch gespleißt. Das 5'Ende der mRNA dieser Transkripte wurde von Exon 4 bzw. Exon 5 gebildet (vgl. Abb.1).

IV.3. Entwicklungsabhängige Transkription von *Am-fru*

Ein Gen kann zeitabhängig vom Entwicklungsstadium und auch Gewebe-spezifisch exprimiert werden. Dazu können die Transkription des Gens oder die Translation der entstandenen Transkripte zeitlich und Gewebe-abhängig reguliert werden. Untersuchungen an der Honigbiene sollten zeigen, in welchen Entwicklungsstadien geschlechtsspezifisch gespleißte sowie nicht-geschlechtsspezifische *Am-fru* Transkriptvarianten auftreten. Zur Übersicht der Honigbienenentwicklung siehe Abbildung Anhang 1. Aus weiblichen und männlichen Honigbienen der Entwicklungsstadien L1, L2, L3, L4, L5 (Streckmade), Pw (Puppe mit weißen Augen, 1-2 Tage alt) und Pp (Puppe mit pigmentierten Augen, mindestens 6 Tage alt) wurde Gesamt-RNA extrahiert und zur Synthese von cDNA verwendet. Dabei wurden für jedes Entwicklungsstadium 3 bis 8 Tiere gleichen Geschlechts vereinigt. Tiere des Larvalstadiums 1 bis 3 wurden im Ganzen extrahiert. Bei Tieren des Larvalstadiums 4 und 5 wurde die RNA aus dem Kopf einschließlich der Thorakalsegmente 1 und 2 extrahiert. Bei Puppen wurde RNA aus dem Kopf extrahiert.

Zum Nachweis von geschlechtsspezifisch gespleißten *Am-fru* Transkripten, die unter Kontrolle von Promotor P1 entstanden sind, wurden unter anderen die Oligonukleotidpaare 7 & 2 und 6 & 2 verwendet (vgl. Abb. Anhang 2). Sequenzabschnitte einer weibchen-spezifischen Spleißvariante (Exons 3-6-7-8 mit 3'Ende 1), die mittels PCR mit Oligonukleotidpaar 7 & 2 amplifiziert wurden, sind in Abb. 2 dargestellt. Weibchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* Transkripte sind in weiblichen Honigbienen ab dem L1-Stadium nachweisbar (Abb. 2 ♀). Zusätzlich konnte die weibchen-spezifische Spleißvariante auch in cDNA vereinigter männlicher Honigbienen ab dem L2-Stadium nachgewiesen werden (Abb. 2 ♂). In cDNA aus einzelnen Männchen (vgl. z.B. 10 männliche L5-Kontrolltiere in IV.6.1.) konnten dagegen keine weibchen-spezifischen Spleißvarianten nachgewiesen werden. Daher wird im Folgenden die Bezeichnung „weibchen-spezifisch“ weiterhin verwendet.

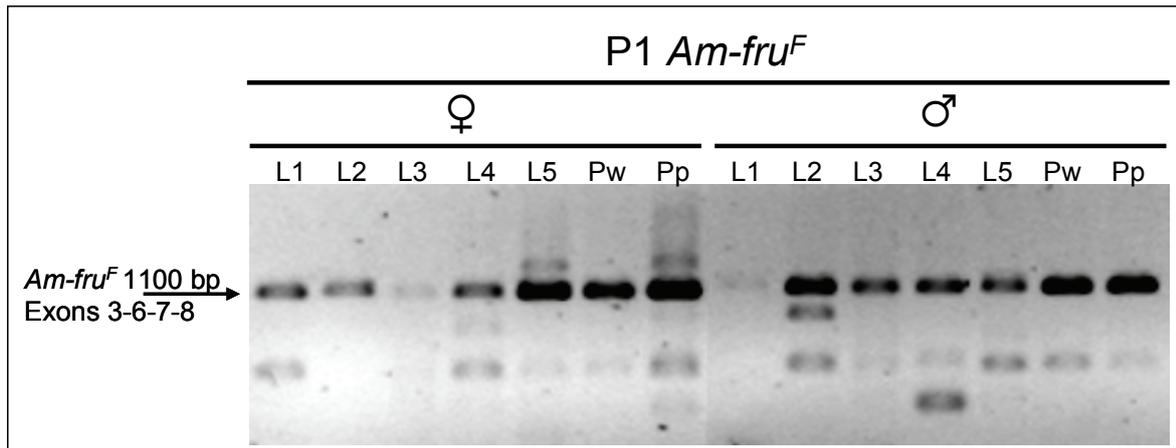


Abb. 2: PCR-Produkt, das zu weibchen-spezifisch gespleißtem *Am-fru* Transkript in verschiedenen Entwicklungsstadien der Honigbiene korrespondiert (*Am-fru^F*, Exons 3-6-7-8 mit 3'Ende 1)

Mit Hilfe von Oligonukleotidpaar 7 & 2 PCR-amplifizierte DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. *Am-fru^F* wurde in vereinigter cDNA von jeweils 3 bis 8 weiblichen Tieren der Entwicklungsstadien L1 bis L5, Pw und Pp nachgewiesen. In vereinigter cDNA von jeweils 3 bis 8 männlichen Tieren der Entwicklungsstadien L2 bis L5, Pw und Pp wurde *Am-fru^F* ebenfalls nachgewiesen.

P1 *Am-fru^F*: PCR-Produkt, das zu weibchen-spezifisch gespleißtem *Am-fru* P1-Transkript korrespondiert

♀: cDNA 3 bis 8 weiblicher Individuen

♂: cDNA 3 bis 8 männlicher Individuen

L1 – L5: Larvalstadien 1 bis 5

Pw: Puppen mit weißen Augen (1-2 Tage alte Puppen)

Pp: Puppen mit pigmentierten Augen (mindestens 6 Tage alte Puppen)

Sequenzabschnitte einer männchen-spezifischen Spleißvariante (Exons 3-6-7-8 mit 3'Ende 1), die mittels PCR mit Oligonukleotidpaar 6 & 2 amplifiziert wurden, sind in Abb. 3 dargestellt. Männchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* Transkripte waren ausschließlich in männlichen Honigbienen ab dem L5-Stadium nachweisbar.

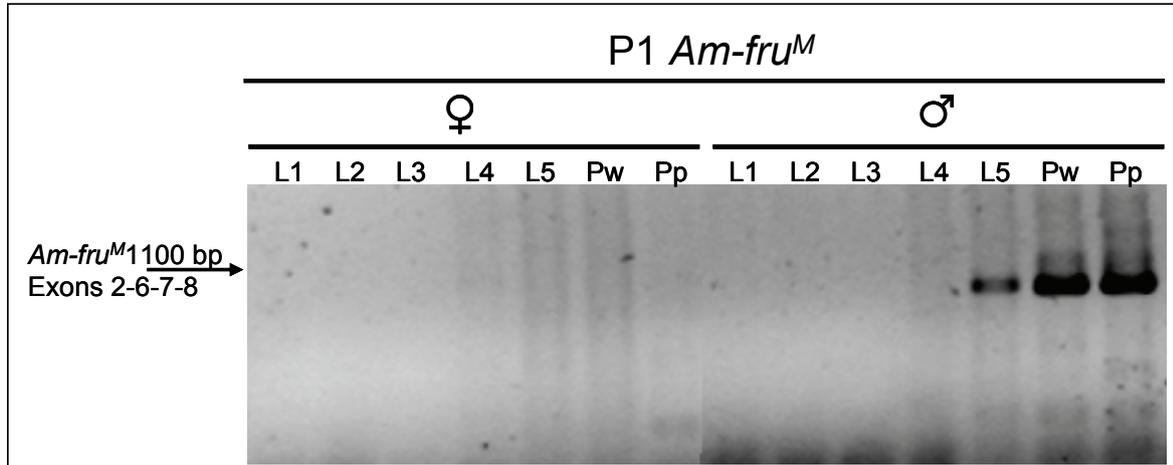


Abb. 3: PCR-Produkt, das zu männchen-spezifisch gespleißtem *Am-fru* Transkript in verschiedenen Entwicklungsstadien der Honigbiene korrespondiert (*Am-fru^M*, Exons 2-6-7-8 mit 3'Ende 1)

Mit Hilfe von Oligonukleotidpaar 6 & 2 PCR-amplifizierte DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. *Am-fru^M* wurde ausschließlich in cDNA von männlichen Tieren der Entwicklungsstadien L5, Pw und Pp nachgewiesen.

P1 *Am-fru^M*: PCR-Produkt, das zu männchen-spezifisch gespleißtem *Am-fru* P1-Transkript korrespondiert

♀: cDNA 3 bis 8 weiblicher Individuen

♂: cDNA 3 bis 8 männlicher Individuen

L1 – L5: Larvalstadien 1 bis 5

Pw: Puppen mit weißen Augen (1-2 Tage alte Puppen)

Pp: Puppen mit pigmentierten Augen (mindestens 6 Tage alte Puppen)

Zum Nachweis von *Am-fru* P2-Transkripten wurde ein Sequenzabschnitt der Exons 4-6-7 (vgl. Abb. 1) mit Oligonukleotidpaar 72 & 74 amplifiziert (vgl. Abb. Anhang 2). Unter Kontrolle von Promotor P2 entstandene *Am-fru* Transkripte waren in Weibchen und Männchen von Larvalstadium 1 bis zur Puppe in allen untersuchten Entwicklungsstadien nachweisbar (siehe Abb. 4).

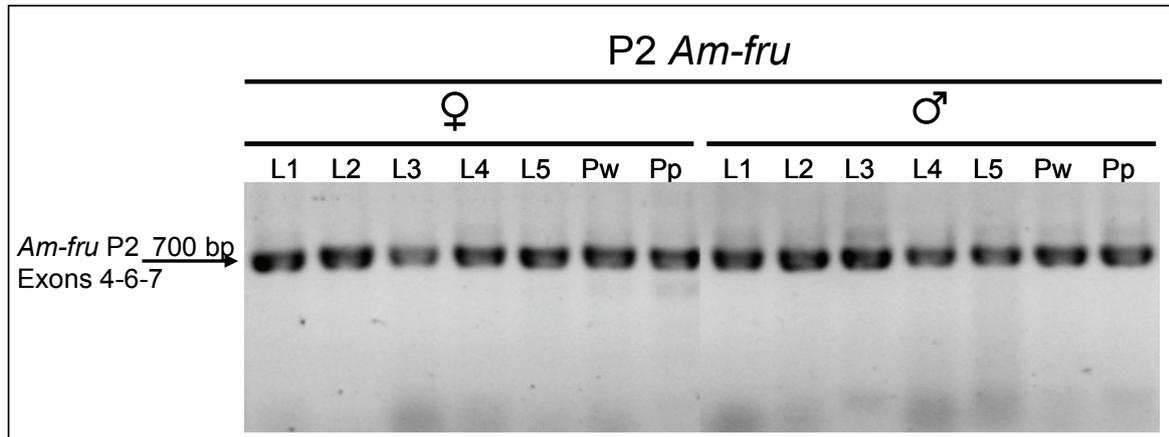


Abb. 4: PCR-Produkt, das zu *Am-fru* P2-Transkripten in verschiedenen Entwicklungsstadien der Honigbiene korrespondiert (*Am-fru*, Exons 4-6-7)

Mit Hilfe von Oligonukleotidpaar 72 & 74 PCR-amplifizierte DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. P2-Transkripte von *Am-fru* wurden in cDNA von Weibchen und Männchen der Entwicklungsstadien L1 bis L5, Pw und Pp nachgewiesen.

- P2 *Am-fru* :** PCR-Produkt, das zu *Am-fru* P2-Transkripten korrespondiert
- ♀: cDNA 3 bis 8 weiblicher Individuen
- ♂: cDNA 3 bis 8 männlicher Individuen
- L1 – L5:** Larvalstadien 1 bis 5
- Pw:** Puppen mit weißen Augen (1-2 Tage alte Puppen)
- Pp:** Puppen mit pigmentierten Augen (mindestens 6 Tage alte Puppen)

Zum Nachweis von *Am-fru* P3-Transkripten wurde ein Sequenzabschnitt der Exons 5-6-7 (vgl. Abb. 1) mit Oligonukleotidpaar 74 & 76 amplifiziert (vgl. Abb. Anhang 2). Unter Kontrolle von Promotor P3 entstandene *Am-fru* Transkripte waren von Larvalstadium 1 bis zur Puppe in allen untersuchten Entwicklungsstadien in Weibchen und Männchen nachweisbar (siehe Abb. 5). Neben amplifizierten P3-Transkriptfragmenten der Exons 5-6-7 wurde unter Verwendung des Oligonukleotidpaares 74 & 76 zusätzlich ein alternatives Produkt amplifiziert (siehe Doppelbanden in Abb. 5). Das aus RACE-Experimenten (vgl. IV. 2.) bekannte P3-Transkript ließ ein korrespondierendes PCR-Produkt von 800 bp erwarten. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab, dass sich das größere Produkt von dem erwarteten Transkript um 94 Nukleotide unterschied. Ein Vergleich des Sequenzabschnitts mit dem Honigbienen genom auf NCBI hat ergeben, dass die 94 Nukleotide der genomischen Nukleotidsequenz zwischen den Exons 5 und 6 entsprechen. Damit war das größere PCR-Produkt ein alternatives Spleißprodukt oder noch unvollständig gespleißtes Transkript mit Intron.

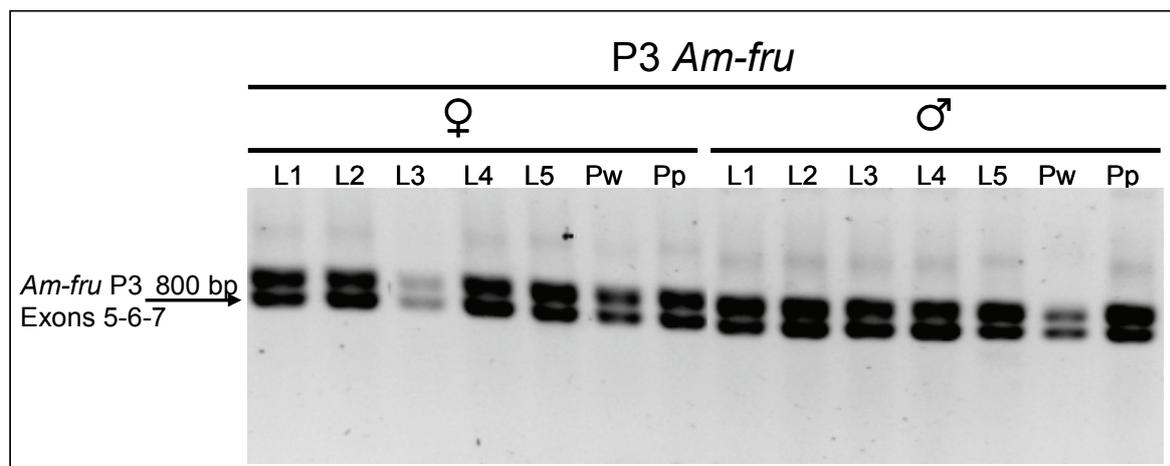


Abb. 5: PCR-Produkt, das zu *Am-fru* P3-Transkripten in verschiedenen Entwicklungsstadien der Honigbiene korrespondiert (*Am-fru*, Exons 5-6-7)

Mit Hilfe von Oligonukleotidpaar 74 & 76 PCR-amplifizierte DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. P3-Transkripte von *Am-fru* wurden in cDNA von Weibchen und Männchen der Entwicklungsstadien L1 bis L5, Pw und Pp nachgewiesen.

- P2 *Am-fru* :** PCR-Produkt, das zu *Am-fru* P3-Transkripten korrespondiert
- ♀: cDNA 3 bis 8 weiblicher Individuen
- ♂: cDNA 3 bis 8 männlicher Individuen
- L1 – L5:** Larvalstadien 1 bis 5
- Pw:** Puppen mit weißen Augen (1-2 Tage alte Puppen)
- Pp:** Puppen mit pigmentierten Augen (mindestens 6 Tage alte Puppen)

Das entwicklungsabhängige zeitliche Transkriptionsmuster der *Am-fru* Spleißvarianten ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Die nachgewiesenen Transkripte wurden nicht auf Gewebespezifität untersucht, da zur Gesamt-RNA Extraktion und cDNA-Synthese ganze Tiere (L1-L3), Kopf und zwei Thorakalsegmente (L4, L5) oder ganze Köpfe (Pw, Pp) verwendet wurden (siehe oben).

Tabelle 1: Zeitliches Auftreten geschlechtsspezifisch sowie nicht-geschlechtsspezifisch gespleißter *Am-fru* Transkripte in weiblichen und männlichen Honigbienen zwischen Larvalstadium 1 und Puppenstadium.

<i>Am-fru</i> Transkript	Promotor	Geschlecht	Entwicklungsstadium						
			L1	L2	L3	L4	L5	Pw	Pp
weibchen-spezifisch gespleißt Exons 3-6-7	P1	weiblich	+	+	+	+	+	+	+
		männlich	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
männchen-spezifisch gespleißt Exons 2-6-7	P1	weiblich	-	-	-	-	-	-	-
		männlich	-	-	-	-	+	+	+
nicht geschlechtsspezifisch gespleißt Exons 4-6-7	P2	weiblich	+	+	+	+	+	+	+
		männlich	+	+	+	+	+	+	+
nicht geschlechtsspezifisch gespleißt Exons 5-6-7	P3	weiblich	+	+	+	+	+	+	+
		männlich	+	+	+	+	+	+	+

Untersucht wurde vereinigte cDNA aus jeweils 3 bis 8 Tieren in den Entwicklungsstadien L1 bis L5, Pw und Pp. In cDNA entsprechender Stadien nachgewiesene Transkripte sind mit + gekennzeichnet. Kein Nachweis in cDNA entsprechender Stadien ist mit - gekennzeichnet. Mit (+) gekennzeichnet ist weibchen-spezifisch gespleißtes Transkript, das in cDNA vereinigter männlicher Tiere nachgewiesen werden konnte, in cDNA einzelner Männchen jedoch nicht nachweisbar war (vgl. z.B. 10 männliche L5-Kontrolltiere in IV.6.1. Abb. 9). Die Bezeichnung weibchen-spezifisch wird daher im Folgenden weiter verwendet.

L1 – L5: Larvalstadien 1 bis 5

Pw: Puppen mit weißen Augen (1-2 Tage alte Puppen)

Pp: Puppen mit pigmentierten Augen (mindestens 6 Tage alte Puppen)

IV. 4. Am-Fru-Protein wird im Honigbienenhirn männchen-spezifisch exprimiert

Als Zielsequenz des für immunhistologische Untersuchungen generierten Anti-Am-Fru Antikörpers habe ich einen 98 Aminosäuren langen Sequenzabschnitt des Am-Fru-Proteins gewählt (VSQHLLPMFLKTAEALQIRGLTDNSVNNKTEEKSPSPETQTGIRHTESPNLQPPPEKRRK ASGSYDVLSGPPSERFMSDSQTSSQCSYKSSPPV). Die Sequenz wird von Nukleotiden der Exons 6 und 7 kodiert (vgl. Abb. 1), beginnend mit den 12 Nukleotiden, die das 3'Ende der BTB-kodierenden Sequenz bilden (siehe auch Abb. Anhang 2, kursiv gedruckte Sequenz). Die Zielsequenz (Antigen) des Anti-Am-Fru Antikörpers wird vom konstitutiv gespleißten Abschnitt kodiert, den alle *Am-fru* Transkripte gemeinsam haben. Die Immunisierung eines Kaninchens wurde von der Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt. Für rekombinante Expression und Reinigung des Antigens sowie Aufreinigung des polyklonalen Antikörpers aus Serum siehe Material & Methoden, III.2.2. a, b.

Mindestens 8 Gehirne weiblicher und männlicher Bienen der folgenden Entwicklungsstadien wurden anhand von „whole mount staining“ mit dem Anti-Am-Fru Antikörper untersucht: L5, drei Tage alte Puppen (P_3), ein Tag alte Adulte (A_1) und 7 Tage alte Adulte (A_7). Am-Fru-Protein konnte im männlichen Gehirn aller untersuchten Individuen in den Entwicklungsstadien L5 bis A_7 detektiert werden. Die Anzahl der Am-Fru exprimierenden Neuronen im männlichen Gehirn änderte sich im Verlauf der Entwicklungsstadien (siehe Abb. 6 A und B). In den Gehirnen weiblicher Individuen wurde in keinem untersuchten Entwicklungsstadium Am-Fru-Protein detektiert (siehe Abb. 6 C). Das im männlichen Gehirn detektierte Am-Fru-Protein resultierte aus translatierten geschlechtsspezifisch gespleißten Transkripten des Promotors P1. Aus P2- und P3-Transkripten resultierendes Protein hätte im weiblichen und männlichen Gehirn zur Detektion durch Anti-Am-Fru geführt. Im weiblichen Bienenhirn wurde jedoch in keinem der untersuchten Entwicklungsstadien Am-Fru-Protein detektiert.

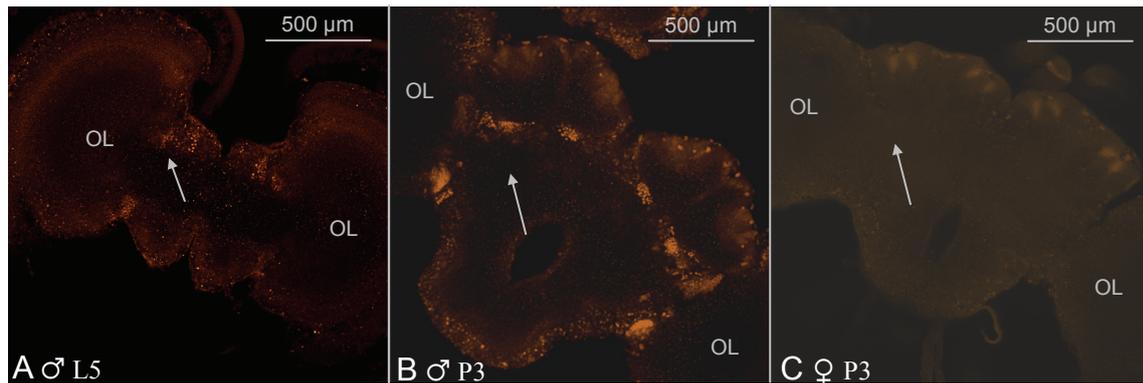


Abb. 6: Immunhistologische Färbung (whole mount staining) mit Anti-Am-Fru Antikörper zur Darstellung von Am-Fru-Protein im Honigbienehirn von Larven und Puppen

A, B: Detektiertes Am-Fru-Protein im Gehirn einer männlichen Honigbiene im L5-Stadium (A) und im Gehirn einer männlichen Honigbiene im P₃-Stadium (B). C: Am Beispiel des Gehirns einer weiblichen Honigbiene im P₃-Stadium ist deutlich zu erkennen, dass keine Detektion von Am-Fru-Protein im weiblichen Gehirn erfolgt ist. A, B und C zeigen einen optischen Schnitt in zentraler Ebene des Gehirns zwischen anterior und posterior. In B und C sind die optischen Loben nur teilweise dargestellt. Pfeile markieren einen Bereich nahe des optischen Lobus (A, B, C), in dem in männlichen Gehirnen Am-Fru Detektion deutlich erkennbar ist (A und B). Primärantikörper: Anti-Am-Fru; Sekundärantikörper: donkey-anti-rabbit-Cy3;

♀: weibliches Gehirn ♂: männliches Gehirn L5: Larvalstadium 5 P₃: drei Tage alte Puppe OL: optischer Lobus

Zur Abschätzung der Anzahl Am-Fru-Protein exprimierender Neuronen im männlichen Gehirn, wurde die frei verfügbare Software „Image J“ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download/>) verwendet. Für die Zählung der mit Anti-Am-Fru Antikörper detektierten Neuronen im männlichen Bienehirn wurden nach whole mount Färbung zunächst Stapelaufnahmen am konfokalen Mikroskop angefertigt. In diesen „z-stacks“ wurde ein Gehirn von anterior nach posterior in etwa 80 bis 120 einzelnen Ebenen im Abstand von 5 µm dargestellt. Damit sollte jede Zelle in zumindest einer Aufnahme „angeschnitten“ bzw. dargestellt werden. Mit Hilfe der Software „Image J“ konnten durch whole mount Färbung detektierte Zellen jeder Ebene einzeln manuell markiert und gezählt werden. Durch den manuellen Wechsel der optischen Ansicht auf die darunter und darüber liegenden Ebenen einer detektierten Zelle wurde die Markierung jeweils nur einmal und in der Ebene gesetzt, die den größten Schnitt durch die detektierte Zelle darstellt. Die Zählung an einem Gehirn des L5-Stadiums ergab ca. 479 Am-Fru exprimierende Neuronen. Nach wiederholter Zählung an zwei Gehirnen des P₃-Stadiums ergab sich aus Werten zwischen 1761 und 1923 eine gemittelte Anzahl von 1853 Am-Fru exprimierenden Neuronen. Die Zählung an einem A₁-Gehirn ergab ca. 832 Am-Fru exprimierende Neuronen. Damit lag das Maximum Am-Fru exprimierender Neuronen im männlichen Gehirn des P₃-Stadiums. In allen 13 untersuchten männlichen P₃-Gehirnen waren neben einigen symmetrisch auftretenden Neuronengruppen, den Clustern oder Subclustern, weitere vereinzelt angeordnete Am-Fru exprimierende Nervenzellen erkennbar. Sehr viele der

einzelnen angeordneten detektierten Neuronen befanden sich in der Nähe der Pilzkörper (siehe Abb. 7 D, gespaltene Pfeile). Ein Teil der in Form von Subclustern akkumulierten Am-Fru exprimierenden Neuronen wurde Bereichen zugeordnet, die mit der Verarbeitung optischer Reize assoziiert sind (siehe Sterne in Abb. 7 C; W. Rössler, persönl. Mitteilung). Andere Subcluster, beispielsweise in der Nähe der Antennalloben (siehe Abb. 7 A, Pfeile) konnten bislang noch nicht definierten Gehirnregionen zugeordnet werden, da dazu eine vorhandene genaue Kartierung des Bienenhirns erforderlich gewesen wäre.

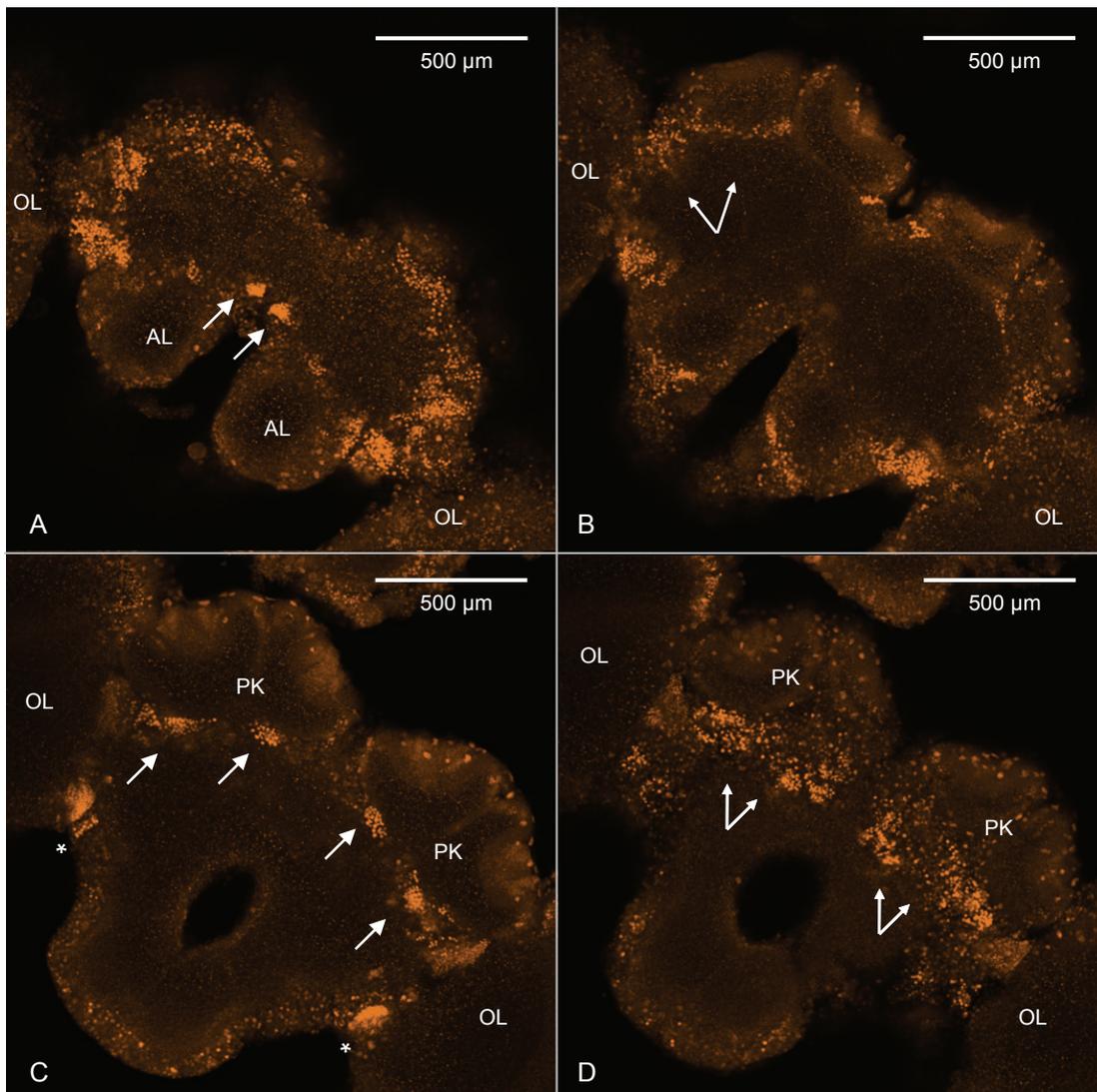


Abb. 7: Immunhistologische Färbung (whole mount staining) mit Anti-Am-Fru Antikörper zur Darstellung von Am-Fru-Protein im männlichen Honigbienenhirn einer drei Tage alten Puppe (P₃)

A bis D: optische Schnitte durch vier Ebenen des männlichen Bienenpuppenhirns von anterior (A) nach posterior (D), die optischen Loben sind nur teilweise dargestellt. In Gruppen akkumulierte, gefärbte Neuronen in der Nähe der Antennalloben (Pfeile in A) in der Nähe der Pilzkörper (Pfeile in C) und in der Nähe der optischen Loben (Sterne in C) sind deutlich erkennbar. Regionen mit vereinzelter auftretenden gefärbten Neuronen sind am Übergang zum optischen Lobus (gespaltener Pfeil in B) und in der Nähe der Pilzkörper (gespaltene Pfeile in D) gut sichtbar. Primärantikörper: Anti-Am-Fru; Sekundärantikörper: donkey-anti-rabbit-Cy3;

AL: Antennallobus **PK:** Pilzkörper **OL:** optischer Lobus

IV. 5. Am-Fru-Protein ist im Zellkern lokalisiert

Als Transkriptionsfaktor ist Fru-Protein bei der Taufliege im Zellkern lokalisiert. Wenn Am-Fru-Protein ebenfalls im Zellkern lokalisiert ist, wäre das ein Hinweis darauf, dass auch Am-Fru als Transkriptionsfaktor wirken könnte. Die intrazelluläre Lokalisation von Am-Fru-Protein innerhalb von einzelnen Neuronen des Bienengehirns wurde anhand von Kryoschnitten untersucht. Vom Gehirn männlicher Honigbienen des P₃-Stadiums wurden dazu Kryoschnitte angefertigt. Am-Fru-Protein wurde durch den Anti-Am-Fru Antikörper detektiert, Zellkerne wurden mit Hoechst (Hoechst34580) markiert. Hoechstfarbstoff und Fluorochrom des Sekundärantikörpers (donkey-anti-rabbit-Cy3) zur Detektion von Anti-Am-Fru besitzen Emissionsmaxima in verschiedenen Wellenlängenbereichen (Hoechst34580: 440 nm; Cy3: 560 nm). Dies ermöglichte unter Verwendung verschiedener Filter die getrennte Aufnahme der beiden Fluoreszenzsignale am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM510). Die Überlagerung beider Aufnahmen zeigte Kolo-kalisation des Hoechstfarbstoffes und des vom Sekundärantikörper detektierten Anti-Am-Fru Antikörpers in den Nervenzellen des Gehirns (Abb. 8). Die Lokalisation von Am-Fru-Protein im Zellkern der Neuronen ist ein Hinweis auf seine mögliche Funktion als Transkriptionsfaktor.

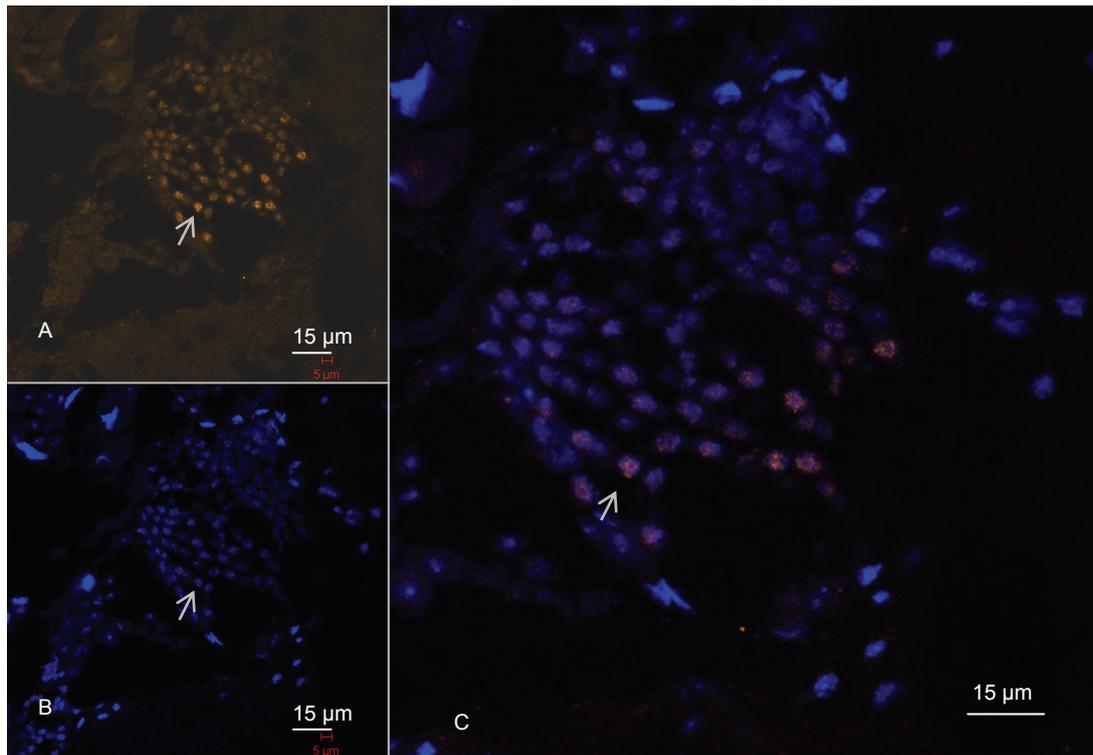


Abb. 8: Kolokalisation von detektiertem Am-Fru-Protein und Hoechstfarbstoff im Kern von Neuronen eines männlichen Bienenhirns im P₃-Stadium

A, B, C: Ausschnitt vom Kryoschnitt durch das Zentralhirn nahe des Antennallobus. Am-Fru-Protein Detektion (Primärantikörper: Anti-Am-Fru; Sekundärantikörper: donkey-anti-rabbit-Cy3) und Kernfärbung (Hoechstfarbstoff: Hoechst34580) wurden am selben Kryoschnitt durchgeführt. A: Aufnahme des detektierten Am-Fru-Proteins mit Hilfe der Fluoreszenz des Cy3-Fluorochroms (orange); B: Aufnahme des Zellkern-lokalisierten Hoechstfarbstoffes (blau); C: Überlagerung von A und B erzeugte bei Kolokalisation violett. Der Pfeil markiert ein Neuron an dem die Kolokalisation im Kern gut zu erkennen war.

IV.6. Das geschlechtsspezifische Spleißen von *Am-fru* Transkripten steht unter Kontrolle des *fem*-Gens

IV.6.1. Embryonale Repression von *fem* in weiblichen Honigbienen bewirkt eine Vermännlichung des *Am-fru* Spleißmusters

Mit Hilfe von embryonaler Gen-Repression sollte geklärt werden, unter dem Einfluss welchen Gens geschlechtsspezifisches Spleißen der *Am-fru* P1-Transkripte erfolgt. Sowohl „downstream“ vom initialen Signal (*csd*) der geschlechtsdeterminierenden Genkaskade als auch „downstream“ von *fem* wäre die Einordnung von *Am-fru* vorstellbar. Die Injektion von 50 pg *fem* siRNA (small interfering RNA) in 0 bis 6 Stunden alte weibliche Bienenembryonen sind eine effektive Dosis zur Repression von *fem* (Hasselmann und Gempe et al., 2008). Die in diesem Experiment untersuchten injizierten Tiere und Kontrolltiere (siehe Tabelle 2) wurden bis zum Erreichen des L5-Stadiums aufgezogen. Die männchen-spezifische *Am-fru* Spleißvariante ist in nicht behandelten männlichen Tieren ab diesem Entwicklungsstadium nachweisbar (vgl. IV. 3). Für den Nachweis der Transkripte wurde in diesem Experiment die Gesamt-RNA aus den Gehirnen der Versuchstiere extrahiert und anschließend cDNA synthetisiert.

Tabelle 2: Nachweis geschlechtsspezifisch gespleißter *Am-fru* Transkripte aus cDNA weiblicher Honigbienen des L5-Stadiums nach embryonaler *fem* Repression, nach embryonaler dH₂O Injektion und bei im Embryonalstadium nicht injizierten Weibchen

	Weibchen					
Behandlung	Anzahl			Anzahl L5-Gehirne mit Nachweis von (Anzahl an untersuchten L5 in %)		
	Embryonen	L1 Schlupfrate (%)	L5 Bezug zu L1 (%)	<i>Am-fru^M</i>	<i>Am-fru^M</i> & <i>Am-fru^F</i>	<i>Am-fru^F</i>
50 pg <i>fem</i> siRNA	370	81 (22%)	35* (42%)	3 (12%)	22 (85%)	1 (4%)
dH ₂ O	160	89 (56%)	44 (49%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)
keine Injektion	70	49 (70%)	24 (49%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)

Von 370 *fem* siRNA injizierten weiblichen Embryonen erreichten 35 Tiere das L5-Stadium. 5 dieser Individuen wurden wegen verzögerter Entwicklung von der Untersuchung ausgeschlossen, das Gehirn von weiteren 4 dieser 35 Tiere wurde zum Nachweis von Am-Fru-Protein (vgl. IV.6.2.) präpariert und somit ebenfalls in diese Untersuchung nicht einbezogen (*). In cDNA aus den Gehirnen von 3 der untersuchten 26 Individuen konnte ausschließlich männchen-spezifisch gespleißtes *Am-fru* Transkript (*Am-fru^M*: Exons 2-6-7) nachgewiesen werden. In cDNA aus den Gehirnen von 22 der untersuchten 26 Individuen konnte männchen-spezifisch gespleißtes *Am-fru* Transkript (*Am-fru^M*: Exons 2-6-7) sowie weibchen-spezifisch gespleißtes *Am-fru* Transkript (*Am-fru^F*: Exons 3-6-7) nachgewiesen werden. In cDNA aus dem Gehirn von 1 der untersuchten 26 Individuen konnte ausschließlich weibchen-spezifisch gespleißtes *Am-fru* Transkript (*Am-fru^F*: Exons 3-6-7) nachgewiesen werden. In cDNA aus den Gehirnen von 10 untersuchten mit dH₂O injizierten Weibchen und 10 untersuchten nicht-injizierten Weibchen konnte jeweils ausschließlich weibchen-spezifisch gespleißtes *Am-fru* Transkript nachgewiesen werden. Nicht in der Tabelle erfasst sind 10 unbehandelte haploide, männliche Larven des L5-Stadiums aus deren cDNA aus den Gehirnen ausschließlich männchen-spezifisch gespleißtes *Am-fru* Transkript (*Am-fru^M*: Exons 2-6-7) nachgewiesen wurde.

Bei 25 von 26 *fem* siRNA injizierten weiblichen Tieren konnte im Gehirn der Streckmaden (L5) die männchen-spezifisch gespleißte Transkriptvariante von *Am-fru* (Exons 2-6-7, vgl. Abb. 1) nachgewiesen werden. In Abb. 9 sind PCR-amplifizierte *Am-fru^M* und *Am-fru^F* Transkripte am Beispiel von 8 *fem* siRNA injizierten weiblichen Tieren gezeigt.

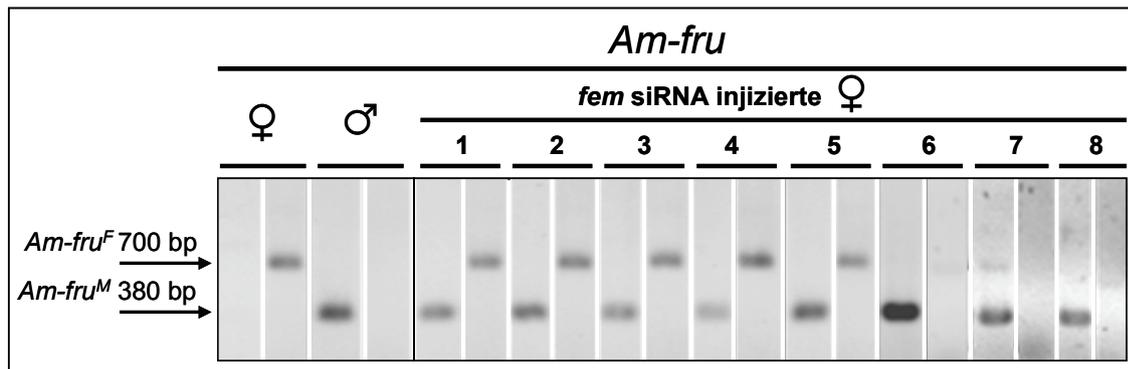


Abb. 9: PCR-Produkte nach embryonaler *fem*-Repression in Weibchen, die zu geschlechtsspezifisch gespleißten *Am-fru* P1-Transkripten korrespondierten

In zwei verschiedenen PCRs wurden von jeder Larve des L5-Stadiums vorhandene männchen-spezifisch gespleißte sowie weibchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* Transkripte amplifiziert. In der 1. Spur ist für jedes Individuum das zu männchen-spezifisch gespleißtem *Am-fru* Transkript (*Am-fru^M*: Exons 2-6-7) korrespondierende Produkt (380 bp) dargestellt. In der 2. Spur ist für jedes Individuum das zu weibchen-spezifisch gespleißtem *Am-fru* Transkript (*Am-fru^F*: Exons 3-6-7) korrespondierende PCR-Produkt (700 bp) dargestellt. Von 10 weiblichen, nicht-injizierten Kontrolltieren, in denen jeweils ausschließlich weibchen-spezifisch gespleißte *Am-fru^F* Transkripte nachgewiesen wurden, ist ein Beispiel dargestellt (♀). Von 10 männlichen, unbehandelten Kontrolltieren, in denen jeweils ausschließlich *Am-fru^M* Transkripte nachgewiesen wurden, ist ein Beispiel dargestellt (♂). Nach embryonaler Repression von *fem* in weiblichen Honigbienen konnten bei 22 von 26 Weibchen im L5-Stadium *Am-fru^M* und *Am-fru^F* Transkripte nachgewiesen werden. Beispielhaft sind 5 dieser Individuen dargestellt (*fem* siRNA injizierte ♀, 1-5). Nach embryonaler Repression von *fem* in weiblichen Honigbienen konnten bei 3 von 26 Weibchen im L5-Stadium ausschließlich *Am-fru^M* Transkripte nachgewiesen werden (*fem* siRNA injizierte ♀, 6-8).

Bei 22 der 26 injizierten Versuchstiere konnte die männchen-spezifische und die weibchen-spezifische Transkriptvariante von *Am-fru* (Exons 3-6-7, vgl. Abb. 1) nachgewiesen werden (5 der Individuen sind in Abb. 9, Spuren 1-5 dargestellt). Damit zeigte sich bei ca. 85% der weiblichen Versuchstiere ein „partieller switch“ des Spleißmusters von *Am-fru*, wobei sowohl weibchen-spezifische als auch männchen-spezifische Spleißvarianten nachweisbar waren. In 3 der 26 weiblichen Versuchstiere, dies entspricht ca. 12%, zeigte sich nach Injektion von *fem* siRNA eine vollständige Verschiebung des Spleißmusters von *Am-fru* zur männchen-spezifisch gespleißten Transkriptvariante (die drei Individuen sind in Abb. 9 in den Spuren 6-8 dargestellt). In 1 der 26 weiblichen Versuchstiere, dies entspricht ca. 4%, zeigte sich nach Injektion von *fem* siRNA kein Effekt auf das Spleißmuster von *Am-fru*, so dass nur die weibchen-spezifische Transkriptvariante nachweisbar war.

Bei 25 von 26 *fem* siRNA injizierten weiblichen Tieren konnte die männchen-spezifisch gespleißte Transkriptvariante von *Am-fru* nachgewiesen werden. Das zeigt, dass geschlechtsspezifisches Spleißen von *Am-fru* unter der Kontrolle von *fem* erfolgt. Somit ist

Am-fru in der geschlechtsbestimmenden Genkaskade der Honigbiene „downstream“ von *fem* einzuordnen.

IV.6.2. *fem* siRNA induzierte Vermännlichung des *Am-fru* Spleißmusters bewirkt Am-Fru Proteinexpression im weiblichen Honigbienenhirn

Die Auswirkung von *fem* siRNA induzierter Vermännlichung des *Am-fru* Spleißmusters auf die Am-Fru Proteinexpression im Gehirn der Versuchstiere des L5-Stadiums wurde mit Hilfe des Anti-Am-Fru Antikörpers untersucht. Anhand des angewandten „whole mount staining“ wurde Am-Fru-Protein in präparierten Streckmadengehirnen detektiert. Im Gehirn nicht-injizierter weiblicher Kontrolltiere des L5-Stadiums konnte mittels des Anti-Am-Fru Antikörpers kein Am-Fru-Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 10 D). Im Gehirn nicht-injizierter männlicher Kontrolltiere des L5-Stadiums wurden etwa 500 Am-Fru-Protein exprimierende Neuronen detektiert, die größtenteils in Clustern angeordnet sind (siehe Abb. 10 A bis C, vgl. auch IV. 4. und Abb. 6 A).

In vier weibliche Versuchstiere wurde im Embryonalstadium *fem* siRNA injiziert und nach Aufzucht bis zum L5-Stadium die Am-Fru Proteinexpression im Gehirn untersucht. In zwei der vier untersuchten Streckmadengehirne konnte Am-Fru Proteinexpression nachgewiesen werden (siehe Abb.10 F). Die detektierten Am-Fru-Protein exprimierenden Neuronen traten in Clustern auf. Im Vergleich zu Gehirnen männlicher Kontrolltiere des L5-Stadiums war die Anzahl der Cluster reduziert.

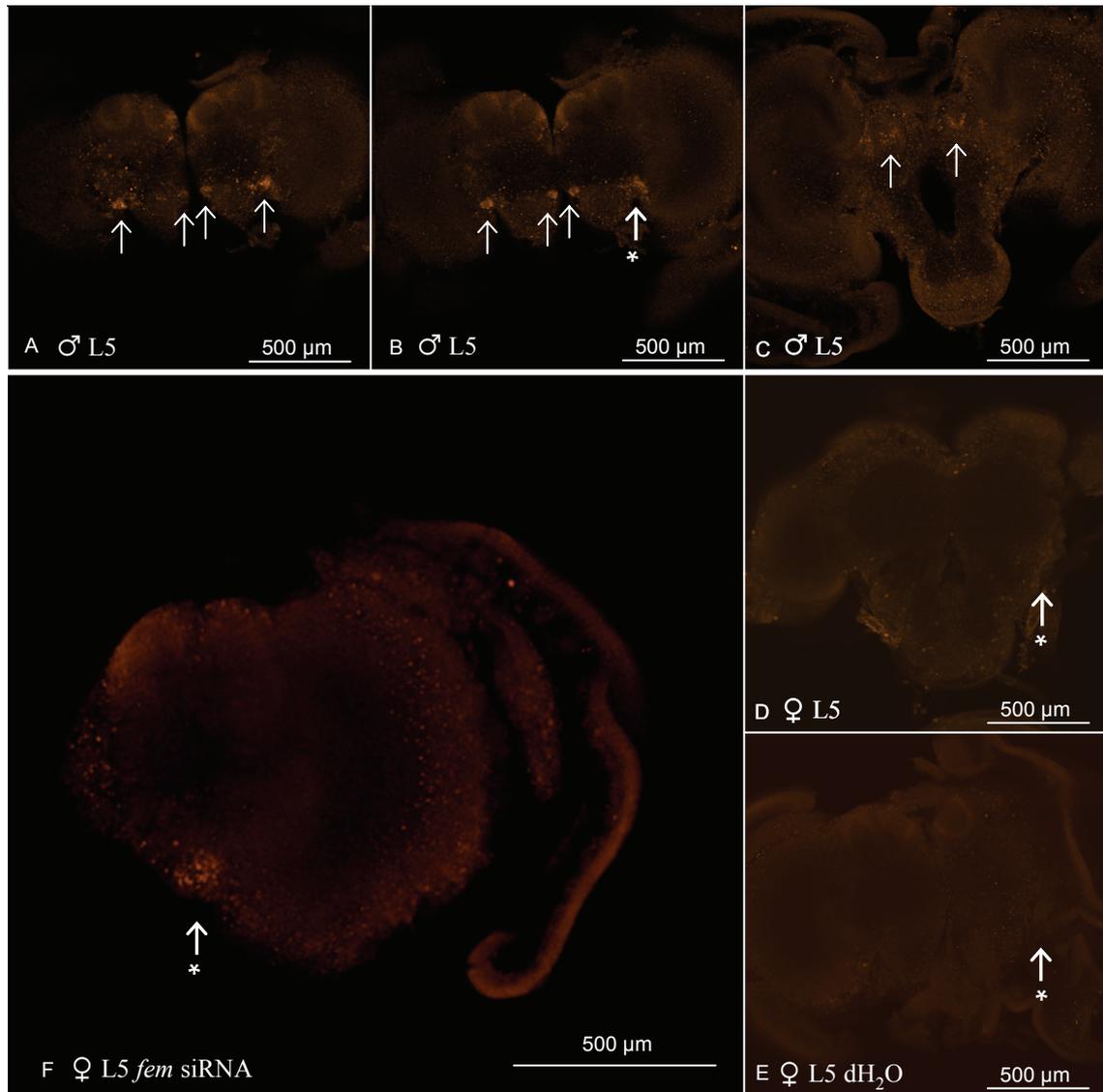


Abb. 10: Immunhistologische Färbung (whole mount staining) von Am-Fru-Protein im männlichen Honigbienenhirn (A-C) sowie nach *fem* Repression im weiblichen Honigbienenhirn (F) des Larvalstadiums 5 (L5)

In B, D, E und F ist eine vergleichbare Region des Gehirns markiert (**Pfeil mit Stern**). In B (männliches Gehirn) und F (Teil eines weiblichen Gehirns nach Injektion von *fem* siRNA) ist detektiertes Am-Fru-Protein deutlich erkennbar.

A bis C: optische Schnitte durch drei Ebenen des männlichen Streckmadengehirns von anterior (A) nach posterior (C), Pfeile markieren detektiertes Am-Fru-Protein im männlichen Gehirn

D bis F: optische Schnitte durch eine mit (B) vergleichbare Ebene des weiblichen Streckmadengehirns

D: weibliches unbehandeltes Gehirn

E: weibliches Gehirn nach Injektion von dH₂O

F: Teil eines weiblichen Gehirns nach Injektion von *fem* siRNA

Primärantikörper: Anti-Am-Fru; Sekundärantikörper: donkey-anti-rabbit-Cy3

IV.7. Injektion von *Am-fru^M* dsRNA in männliche, haploide Honigbienen mit dem Ziel der *Am-fru^M* Repression

In diesem Experiment wurde untersucht, ob mit Hilfe von *Am-fru^M* dsRNA Injektion in männliche, haploide Honigbienenembryonen, *Am-fru^M* reprimiert wurde. Die injizierte *Am-fru^M* dsRNA bestand aus etwa 480 Nukleotiden des männchen-spezifischen Exons 2 (vgl. Abb. 1). 0 bis 6 Stunde alte haploide, männliche Embryonen wurden mit 80 bis 2000 pg *Am-fru^M* dsRNA sowie mit 240 und 1000 pg Q-Marker dsRNA injiziert, bzw. als nicht-injizierte Kontrollgruppe aufgezogen. Die in diesem Experiment untersuchten injizierten Tiere und Kontrolltiere (siehe Tabelle 3) wurden bis zum Erreichen des L5-Stadiums aufgezogen. Die männchen-spezifische *Am-fru^M* Spleißvariante ist in nicht behandelten männlichen Tieren ab diesem Entwicklungsstadium in der Kopfreion nachweisbar (vgl. IV. 3).

Tabelle 3: Schlupfrate (L1), Überlebensrate (L5) und *Am-fru^M* Nachweis bei männlichen, haploiden Embryonen nach Injektion von *Am-fru^M* dsRNA, Q-Marker dsRNA sowie ohne Injektion

		Anzahl haploider Männchen			
		Embryonen	L1 (Schlupfrate in %)	L5 (Anteil an L1 in %)	L5 mit Nachweis von <i>Am-fru^M</i> (Anteil an L5 in %)
<i>Am-fru^M</i> dsRNA	2000 pg	29	5 (17%)	1 (20%)	1 (100%)
	1000 pg	164	11 (7%)	0 (0%)	--
	500 pg	30	2 (6%)	1 (50%)	0 (0%)
	240 pg	108	32 (30%)	3 (9%)	3 (100%)
	80 pg	18	3 (17%)	0 (0%)	--
Q-Marker dsRNA	1000 pg	52	5 (10%)	0 (0%)	--
	240 pg	23	4 (17%)	0 (0%)	--
keine Injektion		29	19 (66%)	0 (0%)	--

Überlebende Larven des L5-Stadiums, aus deren cDNA männchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* Transkripte (*Am-fru^M*: Exons 2-6-7) nachgewiesen werden konnten, sind in der letzten Spalte dargestellt. Nicht in der Tabelle erfasst sind 5 unbehandelte männliche, haploide Larven des L5-Stadiums, aus deren cDNA *Am-fru^M* nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 12).

Bei dsRNA injizierten Embryonen war die Schlupfrate mit 6-30% geringer als die nicht-injizierter männlicher, haploider Embryonen mit 66%. Die absolute Überlebensrate war mit 0-3 Larven des L5-Stadiums bei allen Versuchstiergruppen gering. Aus den Gruppen der nicht-injizierten sowie mit Q-Marker dsRNA injizierten Embryonen erreichte kein Individuum das L5-Stadium. Aus insgesamt 349 mit *Am-fru^M* dsRNA injizierten Embryonen schlüpften 53 L1-Larven (15%), von denen 5 Individuen das Streckmadenstadium erreichten. Aus cDNA der Kopfreion von vier dieser fünf Streckmaden konnte unter Verwendung des Oligonukleotidpaares 29 & 13 ein zu männchen-spezifischen *Am-fru* P1-Transkripten (*Am-fru^M*: Exons 2-6-7, vgl. Abb.1) korrespondierendes Produkt amplifiziert werden (siehe Abb. 12, Spuren 1, 3, 4, 5). Einen eindeutigen Hinweis auf *Am-fru^M* Repression ergab dieses Experiment nicht. Mit der geringen Versuchstierzahl konnte nicht festgestellt werden, ob durch embryonale *Am-fru^M* dsRNA Injektion in männliche, haploide Honigbienen *Am-fru^M* reprimiert werden kann.

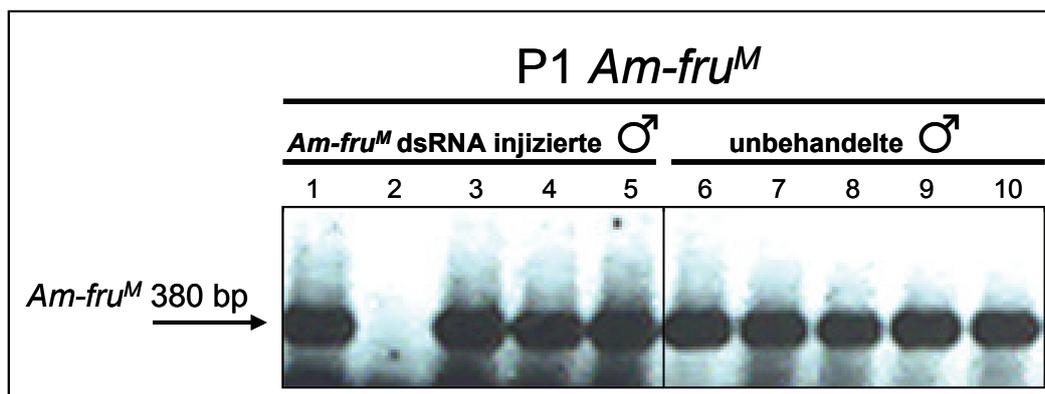


Abb. 12: PCR-Produkt, das zu männchen-spezifisch gespleißtem *Am-fru* P1-Transkript (*Am-fru^M*: Exons 2-6-7) korrespondiert, nach embryonaler *Am-fru^M* dsRNA Injektion sowie bei unbehandelten haploiden Männchen im L5-Stadium

Außer bei der in Spur 2 dargestellten Larve, konnte bei allen Individuen das zu *Am-fru^M* Transkripten korrespondierende PCR-Produkt nachgewiesen werden.

- 1 bis 5:** männliche, haploide Larven des L5-Stadiums nach embryonaler Injektion von *Am-fru^M* dsRNA
- 1:** Injektion von 2000 pg *Am-fru^M* dsRNA
- 2:** Injektion von 500 pg *Am-fru^M* dsRNA
- 3 bis 5:** Injektion von 240 pg *Am-fru^M* dsRNA
- 6 bis 10:** unbehandelte männliche, haploide Larven des L5-Stadiums

V. Diskussion

V. 1. *Am-fru* ist das Honigbienenortholog des *fru*-Gens

Am-fru Transkripte und *fru* Transkripte sind gleich strukturiert

Das *Am-fru*-Gen wird anhand von 3 Promotoren transkribiert. Die entstehenden Transkripte werden alternativ gespleißt. Vom *fru*-Gen der Taufliege sind 6 Promotoren beschrieben (Davis und Hiroki 2001). Die Transkripte werden ebenfalls alternativ gespleißt (Ryner et al. 1996, Davis und Hiroki 2001). Zum besseren Überblick wird in Abb. 13 die Exonstruktur der *Am-fru* (vgl. auch Abb. 1 in IV. 2) und *fru* Spleißvarianten schematisch dargestellt. *Am-fru* Transkripte enthalten einen konstitutiv gespleißten Bereich aus den Exons 6-7-8 (vgl. Abb. 1 bzw. 13). Das Exon 6 kodiert die konservierte BTB-Domäne, die in ihrer Aminosäuresequenz zu 80% mit der BTB-Domäne von Fru-Proteinen übereinstimmt. Die meisten *fru*-Transkripte der Taufliege kodieren für Proteine, die neben der hoch konservierten BTB-Domäne am N-terminus (Stogios et al. 2005) auch einen von vier alternativen Zink-Fingern am C-terminus aufweisen (Ito et al. 1996, Ryner et al. 1996, Goodwin et al., 2000). Geschlechtsspezifisch gespleißte *fru*-Transkripte kodieren für Proteine mit einem von drei alternativen Zink-Fingern am C-terminus (Ryner et al., 1996). Auch *Am-fru* Transkripte werden am 3'Ende alternativ gespleißt und die Spleißprodukte kodieren ebenfalls Proteine mit einem von mindestens drei alternativen Zink-Fingern am C-terminus. Die Aminosäuresequenzen der drei C-terminalen Zink-Finger von Am-Fru-Proteinen sind laut TBLASTN (<http://flybase.org/blast/>) zu 95% (21 von 22 AS), zu 63% (15 von 24 AS) und zu 91% (19 von 21 AS) identisch mit den C-terminalen Zink-Fingern von Fru-Proteinen. P1-Transkripte von *Am-fru* werden am 5'Ende geschlechtsspezifisch gespleißt. Die männchen-spezifische Spleißform enthält das männchen-spezifische Exon 2 (vgl. Abb. 1 bzw. 13). Diese Transkripte kodieren für ein „full-length“ Protein. Auch P1-Transkripte von *fru* werden am 5'Ende geschlechtsspezifisch gespleißt (vgl. Abb. 13). Die männchen-spezifische Variante kodiert ein „full-length“ Protein, dessen Expression im CNS von Taufliegenmännchen kurz vor der Metamorphose beginnt (Lee et al. 2000). Die weibchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* P1-Transkriptvariante enthält das weibchen-spezifische Exon 3 (vgl. Abb. 1 bzw. 13). Das in Exon 3 enthaltene Stopkodon bedingt vorzeitige Termination von Translation. Im weibchen-spezifischen *fru* P1-Transkript von *Drosophila* ist ebenfalls ein Stopkodon eingefügt (vgl. Abb. 13), so dass P1-Spleißvarianten in weiblichen Taufliegen kein „full-length“ Protein kodieren (Ryner et al.,

1996). *Am-fru* P2- und *Am-fru* P3-Transkripte werden nicht geschlechtsspezifisch gespleißt, sie treten in weiblichen und männlichen Honigbienen auf. Nicht geschlechtsspezifisch gespleißte *fru*-Transkripte treten in der Taufliede genauso in Weibchen und Männchen auf (Anand et al., 2001, Song et al., 2002, Dornan et al., 2005).

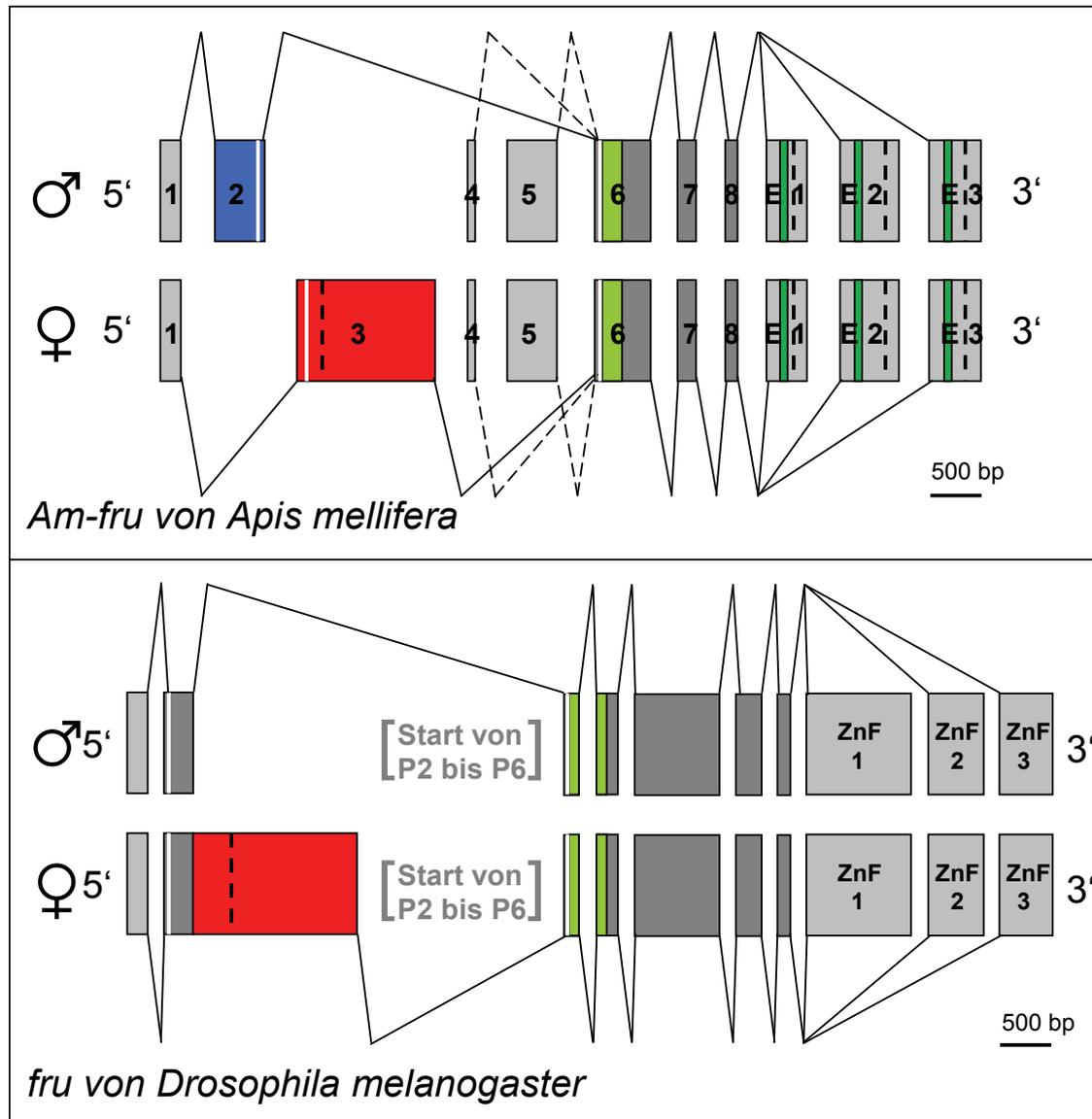


Abb. 13: Exonstruktur der *Am-fru* und *fru* Spleißvarianten in Männchen und Weibchen von Honigbiene (*Apis mellifera*) und Taufliede (*Drosophila melanogaster*)

Geschlechtsspezifisch gespleißte *Am-fru* und *fru* Transkripte entstehen unter Promotor P1. Hellgraue Exons im 5' Bereich sind in Transkripten von Weibchen und Männchen enthalten. Das männchen-spezifische Exon 2 von *Am-fru* wurde blau, weibchen-spezifische Sequenzabschnitte von *Am-fru* und *fru* wurden rot dargestellt. Der konstitutiv gespleißte mittlere Bereich der Transkripte wurde dunkelgrau dargestellt. Die BTB-kodierende Sequenz ist hellgrün markiert. E 1-3 bzw. ZnF 1-3 sind drei alternative 3' Sequenzen, die jeweils ein Zink-Finger-Motiv kodieren. Die Position der Zink-Finger kodierenden Sequenzen ist bei *Am-fru* dunkelgrün markiert. Weiße Balken markieren Startkodons, unterbrochene schwarze Balken markieren Stopkodons. Der 5' Bereich nicht geschlechtsspezifisch gespleißter *fru*-Transkripte von Promotor P2 bis P6 wurde nicht dargestellt [Start von P2 bis P6].

Die Spleißvarianten von *Am-fru* und *fru* sind in ihrer Grundstruktur gleich aufgebaut. Geschlechtsspezifisch gespleißte Transkriptvarianten in der Honigbiene sowie in der Taufliede entstehen aus P1-Transkripten. Die Transkripte kodieren Proteine mit N-terminaler BTB-Domäne und C-terminalem Zink-Finger. 63-95% der Aminosäuresequenz von N-terminaler BTB-Domäne und C-terminalem Zink-Finger sind zwischen Am-Fru der Honigbiene und Fru der Taufliede identisch.

Am-Fru-Protein wird wie Fru-Protein männchen-spezifisch im Gehirn exprimiert

Der von mir entwickelte Anti-Am-Fru Antikörper detektierte Am-Fru-Protein im männlichen Bienengehirn. Im weiblichen Bienengehirn wurde kein Am-Fru-Protein detektiert. Die Zielsequenz des Antikörpers wird von einem *Am-fru* Transkriptabschnitt der Exons 6-7 kodiert (vgl. Abb. Anhang 2, kursiv gedruckte Sequenz). Die Exons 6-7-8 (vgl. Abb. 1 bzw. 13) bilden den konstitutiv gespleißten Bereich aller *Am-fru* Transkripte. *Am-fru* P2- und *Am-fru* P3-Transkripte werden nicht geschlechtsspezifisch gespleißt, sie treten in gleicher Form in Weibchen und Männchen auf. Würde im Bienengehirn detektiertes Am-Fru-Protein aus Translation dieser Transkripte resultieren, so wäre es im weiblichen und männlichen Gehirn detektiert worden. Am-Fru-Protein wurde jedoch ausschließlich im männlichen Bienengehirn detektiert. Am-Fru-Protein im Gehirn resultiert also aus Translation von *Am-fru* P1-Transkripten. Im weiblichen Gehirn erfolgt keine Am-Fru Proteinexpression. Mit Exon 3 wird in weibchen-spezifisch gespleißten *Am-fru* P1-Transkripten ein Stopkodon eingefügt. Das Stopkodon terminiert die Translation in Weibchen vorzeitig. Männchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* P1-Transkripte kodieren dagegen für ein „full-length“ (vollständiges) Protein. Entweder treten P2- und P3-Transkripte von *Am-fru* im Gehirn der Honigbiene nicht auf. Die unter IV. 3. nachgewiesenen Transkripte könnten aus anderen Geweben stammen, da die Gesamt-RNA Extraktion nicht ausschließlich aus dem Gehirn, sondern mindestens aus dem ganzen Kopf erfolgte. Oder P2- und P3-Transkripte von *Am-fru* sind im Gehirn vorhanden, werden aber nicht translatiert. Kontrolle der Translation, um Proteinexpression zu regulieren, ist z.B. bei *Sex-lethal* aus der Taufliede beschrieben (Bashaw and Baker, 1997). Msl-2 Protein wird männchen-spezifisch exprimiert, da die Transkripte in Weibchen zwar vorhanden, ihre Translation jedoch unterdrückt wird (Bashaw and Baker, 1997, Penalva and Sanchez, 2003). Wie die Am-Fru Proteinexpression im männlichen Bienengehirn resultiert auch die männchen-spezifische Fru Proteinexpression im Taufliedengehirn aus männchen-spezifisch gespleißten *fru* P1-Transkripten (Lee et al., 2000).

fem- bzw. *tra*-Gen reguliertes geschlechtsspezifisches Spleißen von *Am-fru* bzw. *fru* ist konserviert

Geschlechtsspezifisches Spleißen von *Am-fru* P1-Transkripten ist in der Honigbiene *fem*-reguliert. Fem^F-Protein spezifiziert in Weibchen die weibchen-spezifische Spleißvariante von *Am-fru*. In Männchen entsteht ohne vorhandenes Fem^F-Protein die männchen-spezifische Spleißvariante von *Am-fru*. Wird *fem* in Weibchen embryonal reprimiert, so entstehen männchen-spezifische Spleißprodukte von *Am-fru* P1-Transkripten. *fem* ist das Honigbienenortholog des *tra*-Gens von *Drosophila* (Gempe et al., 2009). In *Drosophila* werden geschlechtsspezifische Spleißvorgänge der *fru* P1-Transkripte von *tra* reguliert. In Anwesenheit des Tra/Tra-2 Komplexes kommt es dabei in Weibchen zur weibchen-spezifischen Spleißform (Ryner et al., 1996). In der Erzwespe *Nasonia vitripennis* wurde ebenfalls geschlechtsspezifisches Spleißen von *fru* P1-Transkripten beschrieben (Bertossa et al., 2009). Im Kopf gynandromorpher Wespen erfolgt geschlechtsspezifisches Spleißen der *fru* P1-Transkripte dem jeweiligen Geschlecht des Gewebes entsprechend. Ob es sich beim spezifizierenden Faktor des Spleißvorgangs um *tra* handelt, wurde in *Nasonia* nicht nachgewiesen. Eine identische Sequenz von 14 Nukleotiden liegt in *fru* von *Nasonia* und in *Am-fru* von *Apis* im gleichen Abstand zur weiblichen Spleißstelle (Bertossa et al., 2009). Es wird vermutet, dass regulierende Faktoren des geschlechtsspezifischen Spleißvorgangs von *fru* bei *Nasonia* an diese Sequenz binden. In der Fiebermücke *Anopheles gambiae* wurden ebenfalls geschlechtsspezifisch gespleißte *fru*-Transkripte identifiziert (Gailey et al., 2006). Der Spleißvorgang wird vermutlich mit Hilfe der identifizierten Tra/Tra-2 Bindestellen vermittelt (Gailey et al., 2006). Geschlechtsspezifisches Spleißen von *Am-fru* bzw. *fru* wird in *Apis*, in *Drosophila* und eventuell in weiteren Hymenoptera (*Nasonia*) und Diptera (*Anopheles*) von *tra*-Gen Orthologen spezifiziert. Von *tra*-Gen Orthologen reguliertes geschlechtsspezifisches Spleißen von *Am-fru* bzw. *fru* scheint ein hoch konserviertes Prinzip zu sein. Es wurde in der geschlechtsdeterminierenden Genkaskade seit der evolutiven Aufspaltung von *Apis* und *Drosophila* vor 300 Mio. Jahren konserviert.

Am-fru Transkripte besitzen die gleiche Grundstruktur in ihrer Exonabfolge wie *fru* Transkripte. Männchen-spezifisch exprimiertes Am-Fru- sowie Fru-Protein im Gehirn resultiert aus männchen-spezifisch gespleißten *Am-fru* P1- bzw. *fru* P1-Transkripten. Das geschlechtsspezifische Spleißen der P1-Transkripte erfolgt *fem*-Gen- bzw. *tra*-Gen-reguliert. Das sind Hinweise auf ähnliche Funktionen von *Am-fru* und *fru* und dafür, dass *Am-fru* und

fru orthologe Gene sind, deren Platz in der geschlechtsdeterminierenden Genkaskade konserviert ist.

V.2. Die zeitliche *Am-fru^M*- bzw. *fru^M*-Transkription und das Am-Fru- bzw. Fru^M-Expressionsmuster im Gehirn sind konserviert

In männlichen Honigbienen wurden ab dem L5-Stadium *Am-fru^M* Transkripte nachgewiesen. Ab dem gleichen Entwicklungsstadium wurde Am-Fru-Protein im Kern von Neuronen des Gehirns detektiert. Transkript und Protein konnten in den Puppenstadien, also während der Metamorphose gleichfalls nachgewiesen werden. In der Metamorphose strukturiert die Bienenlarve sich zum adulten Tier um (Snodgrass, 1956). Auch das Insektengehirn wird während der Ausdifferenzierung in der Metamorphose reorganisiert (Tissot and Stocker 2000). Männchen-spezifische *Am-fru* Transkripte und Am-Fru-Protein sind damit in der entscheidenden Differenzierungsphase des Gehirns anwesend. Im Gehirn von Honigbienenmännchen wurde Am-Fru-Protein in vereinzelt Neuronen aber auch in dicht gepackten Zellgruppen (Clustern) detektiert. Die Anzahl Am-Fru-Protein exprimierender Neuronen änderte sich in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Im Gehirn 3 Tage alter Puppen wurden die meisten Am-Fru-Protein exprimierenden Neuronen detektiert. Der Vergleich mit *Drosophila* zeigt neben der zeitlichen Übereinstimmung auch Ähnlichkeiten im räumlichen Expressionsmuster. Im männlichen Taufliegengehirn wird Fru^M-Protein ebenfalls kurz vor Beginn der Metamorphose beschrieben und tritt zeitgleich mit männchen-spezifisch gespleißtem *fru*-Transkript auf (Lee et al., 2000). Fru^M-Protein exprimierende Neuronen treten auch im Taufliegengehirn sowohl vereinzelt als auch in Clustern auf. Die größte Anzahl Fru^M-Protein exprimierender Neuronen wurde im Gehirn 2 Tage alter Taufliegenpuppen festgestellt (Lee et al., 2000). Das ist wie im Fall der Honigbiene die mittlere Metamorphosephase. Im Gegensatz zum Bienengehirn bleibt die detektierte Zellzahl auch im adulten Taufliegengehirn hoch (Lee et al., 2000). Ohne die genaue „Kartierung“ des Bienengehirns war eine Zuordnung der detektierten Am-Fru-Protein exprimierenden Neuronencluster zu definierten Gehirnregionen nicht möglich. Trotzdem fällt eine ähnliche lokale Anordnung von Clustern im Bienen- und Taufliegengehirn auf. Im dorsalen Bereich des Gehirns männlicher Taufliegenpuppen wurden 5 Fru^M-Protein exprimierende Neuronengruppen detektiert (Lee et al., 2000). Derselbe Bereich des männlichen

Taufliegengehirns ist mit den frühen Verhaltensäußerungen (Orientierung, Folgen, Flügelspreizen) des männlichen Paarungsverhaltens assoziiert (Ferveur und Greenspan 1998). Im männlichen Bienenhirn wurden im dorsalen Bereich ebenfalls Am-Fru-Protein exprimierende Neuronen detektiert. Neben vereinzelt Neuronen nahe der Pilzkörper und optischen Loben wurden auch im dorsalen Bereich Zellcluster detektiert. In unmittelbarer Nachbarschaft zu den Antennalloben befinden sich beispielsweise im Bienen- sowie Taufliegenhirn (Lee et al., 2000) Zellcluster Am-Fru- bzw. Fru-Protein exprimierender Neuronen. Von Taufliegenmännchen ist bekannt, dass speziell die Gehirnregion der Antennalloben und Pilzkörper an der Geschlechterkennung zu Beginn des männlichen Paarungsverhaltens beteiligt sind (Ferveur et al., 1995). Mutanten ohne geschlechtsspezifisch gespleißte *fru*-Transkripte im Bereich der Antennalloben zeigen Defekte in der Geschlechterkennung (Hall 1994). Im Taufliegenhirn sind also bestimmte Bereiche mit definierten Teilschritten des männlichen Paarungsverhaltens assoziiert. Falls die Zuordnung von Neuronen zu spezifischen Verhaltensformen übertragbar wäre, könnte dieser Gehirnbereich auch beim Honigbienen-Drohn in die Erkennung der Königin involviert sein. Drohnen orientieren sich beim Paarungsflug zunächst olfaktorisch am Königinnenpheromon (Brockmann et al., 2006). Antennen und Antennalloben sind an der Verarbeitung olfaktorischer Reize beteiligt. Nach meiner Einschätzung sind zumindest einige detektierte Neuronencluster von Bienen- und Taufliegenhirn vergleichbar. Z.B. fallen während des Expressionsmaximums im Puppenhirn der Taufliege 4 besonders dicht gepackte paarweise Neuronengruppen auf, die anterior nahe der Mittellinie angeordnet sind (Lee et al., 2000). Eins dieser Clusterpaare nahe des Antennallobus könnte z.B. dem in Abb. 6 A durch Pfeile markierten Clusterpaar im Honigbienenhirn entsprechen. Die Clusterpaare im dorsalen Bereich des Taufliegenhirns könnten z.B. dicht gepackten Clustern nahe der Pilzkörper des Bienenhirns (Abb. 6 B / C) entsprechen. Sollten sich die detektierten Neuronen von Honigbienen- und Taufliegenhirn tatsächlich entsprechen, so weist das auf konservierte neuronale Schaltkreise hin. Am-Fru-Protein exprimierende Neuronen im Honigbienenhirn und Fru^M-Protein exprimierende Neuronen im Taufliegenhirn wären über 300 Mio. Jahre Evolution konserviert.

V.3. Geschlechtsspezifisches Spleißen von *Am-fru* ist *fem*-Gen reguliert

Embryonale fem Repression bewirkt männchen-spezifisch gespleißte Am-fru Transkripte in Weibchen

Weibliche Honigbienen zeigten nach *fem* Repression männchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* P1-Transkripte im L5-Stadium. Nach *fem* Repression zeigte sich Am-Fru Proteinexpression im weiblichen Gehirn des L5-Stadiums. Männchen-spezifisches Spleißen von *Am-fru* ist der „default“ Spleißvorgang, der ohne Einwirkung des weibchen-spezifischen Fem^F-Proteins eintritt. Die *fem*-reprimierten weiblichen Embryonen behielten ihre Vermännlichung bis ins L5-Stadium bei, in dem die männchen-spezifisch gespleißten *Am-fru* Transkripte nachgewiesen wurden. Zwischen Embryonalstadium und L5-Stadium liegt ein Entwicklungszeitraum von 11 Tagen (vgl. Abb. Anhang 1). In unbehandelten weiblichen Embryonen wird die Autoregulationsschleife von *fem* etabliert (Gempe et al., 2009). Weibchen-spezifisch gespleißtes *fem*^F wird translatiert und das entstehende Fem^F-Protein spezifiziert wiederum weibliches Spleißen von *fem*^F. In den Versuchstieren wurde mit Hilfe von RNAi in weiblichen Embryonen *fem* reprimiert. Die spezifisch weibliche Autoregulation von *fem* wurde damit unterbrochen und der männliche Zustand konnte langfristig erhalten werden. Ohne Fem^F kommt es zur männchen-spezifischen Spleißform von *Am-fru* P1-Transkripten. Es stellt sich jedoch die Frage, ob *fem* für das weibchen-spezifische Spleißen von *Am-fru* notwendig ist. Bei *fem* Repression in Weibchen entstanden männchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* Transkripte. Da es bei Injektion von *fem* siRNA in Weibchen nicht zu 100% Repression von *fem* kommen muss (Gempe et al. 2009), sind männliche und weibliche Spleißformen von *Am-fru* in den weiblichen Versuchstiere nachvollziehbar (vgl. IV. 6.1. Abb. 9). Aber auch aus vereinigter cDNA mehrerer männlicher Honigbienen konnte das zur weiblichen *Am-fru* Transkriptvariante korrespondierende PCR-Produkt amplifiziert werden. In Männchen scheint die weibliche Spleißform im Vergleich zur männlichen unterrepräsentiert zu sein, da sie in männlichen Einzeltieren nicht nachgewiesen werden konnte. Erst in vereinigter cDNA mehrerer Männchen scheint die Konzentration der weiblichen Spleißform für einen Nachweis ausreichend hoch zu sein. Wenn zumindest in geringer Zahl die weibliche Spleißform auch in Männchen aufgetreten ist, dann bedeutet das, dass die weibliche Variante in den Männchen ohne *fem*^F entstehen konnte. Bei *Drosophila* (Ryner et al., 1996) und auch bei *Anopheles* (Gailey et al., 2006) wird beschrieben, dass durch die Verwendung alternativer Spleißstellen im selben Exon von *fru* die männchen- bzw. weibchen-spezifischen Transkripte entstehen. In Weibchen wird die weiter „downstream“

gelegene Spleißstelle des Exons genutzt und mit der zusätzlichen Sequenz ein Stopkodon ins Transkript integriert. In Männchen wird die weiter „upstream“ gelegene Spleißstelle des Exons genutzt, das Stopkodon wird nicht integriert. In *Drosophila* ist die Notwendigkeit vom Tra/Tra-2 Komplex als Spleiß-Aktivator beschrieben, um den weibchen-spezifischen Spleißvorgang zu aktivieren (Ryner et al., 1996). In der Honigbiene tritt kein gemeinsames Exon mit zwei unterschiedlichen Spleißstellen auf, sondern es gibt das männchen-spezifische Exon 2 und das weibchen-spezifische Exon 3 (vgl. Abb. 1 bzw. 13). In geschlechtsspezifisch gespleißten *Am-fru* Transkripten trat immer entweder nur Exon 2 oder nur Exon 3 auf. Die geschlechtsspezifischen Spleißvarianten entstehen durch „Exonskipping“. Geschlechtsspezifische Spleißmusterregulierung von *Am-fru* wäre durch Fem^F-aktiviertes weibchen-spezifisches Spleißen denkbar, so wie Tra zusammen mit Tra-2 in *Drosophila* weibliches Spleißen von *fru* aktiviert (Ryner et al., 1996). Dies kann aufgetretene weibchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* Transkripte in Männchen allerdings nicht erklären. Entstehende weibchen-spezifisch gespleißte Transkripte sind funktionell nicht relevant, da mit dem eingefügten Stopkodon kein vollständiges Protein translatiert werden kann. Funktionell relevant ist dagegen, dass keine männchen-spezifisch gespleißten Transkripte in Weibchen auftreten. Neben *fem* könnten außerdem auch noch weitere Faktoren an der geschlechtsspezifischen Spleißmusterregulierung von *Am-fru* beteiligt sein. In *Drosophila* bilden Tra und Tra-2 den Spleiß-Aktivator-Komplex (Ryner et al., 1996). Möglicherweise interagiert bei der Honigbiene ein *tra-2*-Ortholog mit *fem*, um geschlechtsspezifisches Spleißen von *Am-fru* zu regulieren.

Am-fru^M dsRNA Injektion sollte Am-fru^M Repression in Männchen bewirken

Im Experiment zeigten männliche, haploide Embryonen eine sehr geringe Überlebensrate. Die Repression von *Am-fru^M* konnte nach Injektion von *Am-fru^M* dsRNA in der kleinen Stichprobe von 5 Überlebenden im L5-Stadium nicht festgestellt werden. Ob grundsätzlich mit Hilfe von embryonaler *Am-fru^M* dsRNA Injektion *Am-fru^M* reprimiert werden kann, bleibt zu klären. Eine Alternative zur Injektion männlicher, haploider Embryonen könnten männliche Bienenlarven sein. Zumindest in älteren weiblichen Embryonen (Maleszka et al., 2007) und jungen weiblichen Larven des L1-Stadiums (Nelson et al., 2007) wurde die RNAi-Technik bereits erfolgreich angewandt. Nach Injektion von *csp5* dsRNA in 10 bis 14 Stunden alte Embryonen wurde *csp5* (small chemosensory protein) Repression nachgewiesen (Maleszka et al., 2007). In frisch geschlüpfte Larven des L1-Stadiums konnte *vitellogenin* dsRNA einer Länge von ca. 500 bp injiziert und damit die Vitellogenin-Expression reprimiert werden

(Nelson et al., 2007). Für größere reprimierende Moleküle wie z.B. phosphorodiaminate morpholino oligomers (PMOs) wurde in Zellkultur gezeigt, dass sie Zellmembranen nur langsam durchdringen (Moulton et al., 2004). Eventuell könnte die Aufnahme von dsRNA in Zellen begünstigt werden, wenn die dsRNA z.B. an Cholesterol, einen membranverwandten Baustein, gekoppelt würde. Die Aufnahme von siRNA in Leberzellen konnte zumindest durch Kopplung an Steroide oder Lipidbausteine verstärkt werden (Lorenz et al., 2004).

V.4. Ausblick

In der Metamorphose wird die Honigbiene anatomisch neustrukturiert (Snodgrass, 1956). Auch das Insektengehirn wird in dieser Entwicklungsphase tiefgreifend reorganisiert (Tissot and Stocker, 2000). Die Metamorphose beginnt am Ende des L5-Stadiums und dauert während den Puppenstadien an. Ab dem L5-Stadium konnten männchen-spezifisch gespleißte *Am-fru* Transkripte nachgewiesen werden und Am-Fru-Protein wurde im männlichen Honigbienengehirn detektiert. Am-Fru-Protein wird während entscheidender Differenzierungsprozesse des neuronalen Netzwerks geschlechtsspezifisch im Honigbienengehirn exprimiert. Die geschlechtsspezifische Gehirndifferenzierung könnte von Am-Fru reguliert werden, so dass sich neuronale Regelkreise ausbilden, die männliches Verhalten spezifizieren. Verhaltensstudien an männlichen Honigbienen nach *Am-fru^M* Repression würden zur funktionellen Analyse beitragen. Sie könnten klären, ob Am-Fru-Protein im Honigbienengehirn für männliches Paarungsverhalten erforderlich ist, so wie Fru-Protein für das männliche Paarungsverhalten der Taufliege. Auch die Untersuchung des Verhaltens weiblicher Tiere nach induzierter Am-Fru Proteinexpression im Gehirn könnte dabei helfen, den Einfluss von *Am-fru* auf geschlechtsspezifisches Verhalten aufzuklären. Falls Am-Fru Proteinexpression im Gehirn erforderlich und hinreichend ist für die Spezifizierung des männlichen Paarungsverhaltens, sollten Weibchen das männliche Verhalten zeigen, wenn Am-Fru Proteinexpression in ihrem Gehirn induziert wurde. Diese Weibchen könnten z.B. eine veränderte Reaktion auf das Königinnenpheromon zeigen. Das Pheromon der Königin wirkt anziehend auf junge Arbeiterinnen und induziert bei ihnen Pflege- und Fütterverhalten gegenüber der Königin (McFarland, 1999 Kapitel 11). Das Königinnenpheromon, dessen Hauptbestandteil 9-ODA ((2E)-9-oxodecenoic acid) ist, wirkt auf Drohnen ebenfalls anziehend, induziert bei ihnen jedoch Paarungsverhalten (Brockmann et al., 2006). Möglicherweise reguliert *Am-fru* geschlechtsspezifisches Verhalten in der

Honigbiene jedoch nicht alleine. Es könnten weitere Gene involviert sein. In der Taufliede ist männchen-spezifisches Paarungsverhalten *fru*-Gen reguliert (Baker et al., 2001; Billeter, 2006; Yu und Dickson, 2006). Es gibt jedoch Bestandteile der festen Abfolge ausgeführter männlicher Verhaltensweisen bei der Taufliedenpaarung, die zusätzlich unter Einfluss von *dsx* stehen. Dazu gehört z.B. der „Courtship-song“ oder „Wing-song“ (Rideout et al. 2007). Ohne männchen-spezifische Dsx^M Expression wird der Ablauf des männlichen Paarungsverhaltens gestört, die frühen Schritte (Orientierung, Folgen) werden unterbrochen, so dass nachfolgende Schritte nicht ausgeführt werden (Rideout et al., 2010). In der Honigbiene wurde Am-Dsx Expression bis jetzt noch nicht untersucht. Falls *Am-fru* männliches Verhalten der Honigbiene spezifiziert, könnte das auch anhand von verändertem weibchen-spezifischem Verhalten feststellbar sein. Honigbienen zeigen ein großes Spektrum weibchen-spezifischer Verhaltensmuster, die eventuell bei Am-Fru Proteinexpression im Gehirn nicht auftreten. Daher bietet sich die Verhaltensuntersuchung von Arbeiterinnen an, bei denen Am-Fru Proteinexpression im Gehirn induziert wurde, d.h. nachdem eine Vermännlichung stattgefunden hat. Die Untersuchung weibchen-spezifischer Verhaltensmuster der Taufliede steckt noch in den Anfängen (Rideout et al., 2010). Die Fru^M Expression im weiblichen Taufliedengehirn führt jedoch zu männchen-spezifischen Verhaltensformen der Paarung (Demir und Dickson, 2005; Manoli et al., 2005).

VI. Zusammenfassung

VI. 1. Kurzfassung in deutscher Sprache

Das Genom der Honigbiene *Apis mellifera* enthält das *fruitless*-Ortholog *Am-fru*. Bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* ist *fru* ein Verhalten-regulierendes Gen, das für das männchen-spezifische Paarungsverhalten (male courtship behaviour) verantwortlich ist. *Am-fru* und *fru* zeigen im Genaufbau starke strukturelle Ähnlichkeiten. Sie weisen mehrere Promotoren auf. Von Promotor P1 initiierte Transkripte werden geschlechtsspezifisch gespleißt. Transkripte der übrigen Promotoren unterscheiden sich in den Geschlechtern nicht. Neben einem konstitutiv gespleißten Bereich, den alle nachgewiesenen Transkripte enthalten und der für die BTB-Domäne kodiert, befindet sich am 3' Ende jeweils eine von drei möglichen Sequenzvarianten, die für einen Zink-Finger kodiert. Das geschlechtsspezifische Spleißmuster der von Promotor P1 initiierten *Am-fru* Transkripte wird von *fem* reguliert. Das Gen *fem* ist Teil der geschlechtsdeterminierenden Genkaskade. Es ist das Honigbienenortholog von *tra*, das in der Taufliege das geschlechtsspezifische Spleißmuster von *fru* reguliert. In Honigbienen- und Taufliegenweibchen kodiert eine im 5' Bereich eingefügte, weibchen-spezifische *Am-fru*- bzw. *fru*-Sequenz ein Stopkodon und damit vorzeitigen Translationsabbruch. Das Einfügen des Stopkodons erfolgt bei *Am-fru* mit Hilfe eines weibchen-spezifischen Exons. Bei *fru* der Taufliege wird in Weibchen die „downstream“ (strangabwärts) liegende Spleißstelle in einem gemeinsamen Exon aktiviert, so dass mit der zusätzlichen Sequenz ein Stopkodon eingefügt wird. Männchen-spezifisch gespleißte Transkripte von *Am-fru* und *fru* sind im männlichen Gehirn kurz vor Beginn der Metamorphose nachweisbar. Die Proteinexpression von Am-Fru und Fru im männlichen Gehirn beginnt zeitgleich mit dem Auftreten der Transkripte. Die Anzahl der Am-Fru bzw. Fru exprimierenden Neuronen hat ihr Maximum im mittleren Puppenstadium. Das liegt zeitlich inmitten der Metamorphose, wenn die Ausdifferenzierung des Gehirns erfolgt. Die Kernlokalisierung und die funktionellen Domänen (N-terminale BTB-Domäne und C-terminaler Zink-Finger) lassen auch bei Am-Fru auf die Funktion als Transkriptionsfaktor schließen. Das möglicherweise vergleichbare räumliche Muster Am-Fru- und Fru-Protein exprimierender Neuronen im Bienen- und Taufliegengehirn könnte bedeuten, dass diese Neuronen konservierte Schaltkreise ausbilden. Zur funktionellen Analyse von *Am-fru* würden Verhaltensstudien beitragen. Die Veränderung des geschlechtsspezifischen Spleißmusters und der resultierenden Am-Fru Proteinexpression im Gehirn könnte dazu mit Hilfe von RNAi induziert werden.

VI. 2. Summary in English

The *fruitless* ortholog *Am-fru* is encoded in the honeybee genome. We know that in *Drosophila fru* is responsible for the male-specific court ship behaviour. *Am-fru* and *fru* show genetically similar structures. Both genes contain different promoters of which the first one leads to sex-specifically spliced transcripts. The other promoters lead to transcripts that do not differ in both sexes. The BTB domain is encoded from a sequence that is part of the constitutively spliced region of all found transcripts. The 3' end consists of one out of three possible sequences, each encoding a zink-finger. The sex-specific splicing pattern of *Am-fru* transcripts derived from promoter P1 is regulated by *fem*. As part of the sex-determining cascade of the honeybee *fem* is the ortholog of *tra* that controls sex-specific splicing of *fruitless* in *Drosophila*. A female-specific sequence in the 5' region of *Am-fru* and *fru* transcripts introduces a stop codon that leads to a translational stop prematurely. In *Am-fru* a female-specific exon introduces the stop codon. In *fru* of *Drosophila* the downstream splice site of a common exon is female-specifically activated. The introduced sequence contains the stop codon. Male-specifically spliced transcripts and protein expression of *Am-fru* and *fru* are detectable in male brain after an individual has reached the prepupal stage. This means the developmental stage before the beginning of metamorphosis. The number of Am-Fru respectively Fru expressing neurons in the male brain shows its maximum in midpupal stage. The midpupal stage means in the middle of metamorphosis, when differentiation of the brain takes place. Am-Fru is as well as Fru protein localized in the nuclei of the neurons. This is a further hint that *Am-fru* should be a transcriptional factor like *fru*, remembering the functional domains (N-terminal BTB domain and C-terminal zink-finger). The possibly comparable spatial pattern of Am-Fru and Fru protein expressing neurons in the honeybee brain and in the fruit fly brain could mean there are highly conserved neuronal circuits. For functional analysis of *Am-fru* behavioural studies may help. RNAi-induced changes in sex-specific splicing pattern of *Am-fru* may help to manipulate Am-Fru protein expression in brain and possibly allow the observation of ongoing behavioural changes.

VII. Literaturverzeichnis

- Anand, A., Vilella, A., Ryner, L. C. et al. 2001 Molecular genetic dissection of the sex-specific and vital functions of the *Drosophila melanogaster* sex determination gene *fruitless*. *Genetics* **158**: 1569-1595
- Arthur, B. J., Jallon, J. M., Caflisch, B., Choffat, Y. and R. Nothiger 1998 Sexual behaviour in *Drosophila* is irreversibly programmed during a critical period. *Curr. Biol.* **8**: 1187-1190
- Baker, B. S., Taylor, B. J., Hall, J. C. 2001 Are complex behaviors specified by dedicated regulatory genes? Reasoning from *Drosophila*. *Cell* **105**: 13-24
- Bashaw, G. J. and Baker, B. S. 1997 The Regulation of the *Drosophila msl-2* Gene Reveals a Function for *Sex-lethal* in Translational Control. *Cell* **89**: 789-798
- Ben-Shahar, Y., Robichon, A., Sokolowski, M. B. and Robinson, G. E. 2002 Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* **296**: 741
- Bertossa, R. C., van de Zande, L. and Beukeboom, L. W. 2009 The *fruitless* Gene in *Nasonia* Displays Complex Sex-Specific Splicing and Contains New Zinc Finger Domains. *Mol. Biol. Evol.* **26**(7): 1557-1569
- Beye, M., Hasselmann, M., Fondrk, M. K., Page, R. E. and Omholt, S. W., 2003 The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* **114**: 419-429
- Billeter, J. C., Goodwin, S. F. and O'Dell, K. M. 2002 Genes mediating sex-specific behaviors in *Drosophila*. *Adv. Genet.* **47**: 87-116
- Billeter, J. C., Rideout, E. J., Dornan, A. J. and Goodwin, S. F. 2006 Control of male sexual behavior in *Drosophila* by the sex determination pathway. *Curr. Biol.* **16**: R766-R776
- Billeter, J. C., Vilella, A., Allendorfer, J. B., Dornan, A. J., Richardson, M., Gailey, D. A. and Goodwin, S. F. 2006 Isoform specific control of male neuronal differentiation and behavior in *Drosophila* by the *fruitless* gene. *Curr. Biol.* **16**: 1063-1076
- Brockmann, A., Dietz, d., Spaethe, J. and Tautz, J. 2006 Beyond 9-ODA: Sex Pheromon Communication in the European Honey Bee *Apis mellifera* L. *Journal Chem. Ecology* **32**: 657-667

- Burtis, K. C. and Baker, B. S., 1989 *Drosophila doublesex* gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* **56**: 997-1010
- Davis, H. P. and Hiroki, I. 2001 Genomic structure of the sexual behaviour gene *fruitless*. *Dros Inf Ser.* **84**: 65-66
- Demir, E. and Dickson, B.J., 2005 *fruitless* splicing specifies male courtship behavior in *Drosophila*. *Cell* **121**: 785-794
- Dornan, A. J., Gailey, D. A. and Goodwin, S. F. 2005 GAL4 enhancer trap targeting of the *Drosophila* sex determination gene *fruitless*. *Genesis.* **42**: 236-246
- Eckert, R., Randall, D., Burggreen, W. und French, K. Vierte Auflage 2002 Tierphysiologie: 11. Neuronale Verarbeitung und Verhalten Thieme-Verlag
- Ferveur, J.-F. and Greenspan, R. 1998 Courtship behavior of brain mosaics in *Drosophila*. *J. Neurogenet.* **12**: 205-226
- Ferveur, J.-F., Störtkuhl, K. F., Stocker, R. F. and Greenspan, R. 1995 Genetic feminization of brain structures and changed sexual orientation in male *Drosophila*. *Science* **267**: 902-905
- Fink, S., Excoffier, L. and Heckel Gerald 2006 Mammalian monogamy is not controlled by a single gene. *PNAS* **103**: 10956-10960
- Gailey, D. A., Billeter, J.-C., Liu, J. H., Bauzon, F., Allendorfer, J. B. and Goodwin, S. F. 2006 Functional Conservation of the *fruitless* Male Sex-Determination Gene Across 250 Myr of Insect Evolution. *Mol. Biol. Evol.* **23**(3): 633-643
- Gempe, T., Hasselmann, M., Schiott, M., Hause, G., Otte, M. und Beye, M. 2009 Sex Determination in Honeybees: Two Separate Mechanisms Induce and Maintain the Female Pathway. *PLoS Biology* **7**: e1000222
- Goodwin, S. F., Taylor, B. J., Villella, A., Foss, M., Ryner, L. C., Baker, B. S. and Hall, J. C. 2000 Aberrant splicing and altered spatial expression patterns in *fruitless* mutants of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **154**: 7225-7245
- Grasso, F. W. and Basil, J. A. 2009 The Evolution of Flexible Behavioral Repertoires in Cephalopod Molluscs. *Brain Behav Evol* **74**: 231-245

- Greenspan, R. J. 1995 Understanding the genetic construction of behavior. *Sci.Am.* **272**: 72-78
- Hall J. C. 1977 Portions of the central nervous system controlling reproductive behavior in *Drosophila melanogaster*. *Behav. Genet.* **7**: 291-312
- Hall J. C. 1979 Control of male reproductive behavior by the central nervous system of *Drosophila*: dissection of a courtship pathway by genetic mosaics. *Genetics* **92**: 437-457
- Hall J. C. 1994 The mating of a fly. *Science* **264**: 1702-1714
- Hall, J. C. 1994 Pleiotropy of behavioral genes. In *Flexibility and Constraint in Behavioral Systems*, ed. Greenspan, R. J. and Kyriacou, C. P., pp. 15-28. Berlin:Dahlem Konferenzen Publ. 313 pp.
- Hasselmann, M., Gempe, T., Schiott, M., Nunes-Silva, C., G., Otte, M. and Beye, M. 2008 Evidence für evolutionary nascence of a novel sex-determination pathway in honeybees *Nature* **454**: 519-522
- Ito, H., Fujitani, K., Usui, K., Shimizu-Nishikawa, K., Tanaka, S. and Yamamoto, D. 1996 Sexual orientation in *Drosophila* is altered by the *satori* mutation in the sex-determination gene *fruitless* that encodes a zinc finger protein with a BTB domain. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**: 9687-9692
- Kimura, K., Ote, M., Tazawa, T. and Yamamoto, D. 2005 *Fruitless* specifies sexually dimorphic neural circuitry in the *Drosophila* brain. *Nature* **438**: 229-233
- Lee, G., Foss, M., Goodwin, S.F., Carlo, T., Taylor, B. J. and Hall, J. C. 2000 Spatial, temporal, and sexually dimorphic expression patterns of the *fruitless* gene in the *Drosophila* central nervous system. *J. Neurobiol.* **43**: 404-426
- Lee, G. and Hall, J. C. 2001 Abnormalities of male-specific Fru protein and serotonin expression in the CNS of *fruitless* mutants in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **21**: 513-526
- Lee, G., Hall, J. C. and Park, H. D. 2002 *doublesex* gene expression in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* **16**: 229-248
- Lorenz, G., Hadwiger, P., John, M., Vornlocher, H.-P. and Unverzagt, C. 2004 Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14** :4975-4977

- Lynch, K. W. and Maniatis, T., 1996 Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the *Drosophila doublesex* splicing enhancer. *Genes Dev.* **10**: 2089-2101
- Maleszka, J, Foret, S., Saint, R. and Maleszka, R. 2006 RNAi-induced phenotypes suggest a novel role for chemosensory protein CSP5 in the development of embryonic integument in the honeybee (*Apis mellifera*). Springer Verlag
- Manoli, D. S., Foss, M., Vilella, A., Taylor, B. J., Hall, J. C. and Baker, B. S. 2005 Male-specific *fruitless* specifies the neural substrates of *Drosophila* courtship behaviour. *Nature* **436**: 395-400
- McFarland, D. Third edition 1999 Animal Behavior PearsonPrenticeHall
- Menzel, R., Lebouille, G. and Eisenhardt, D. 2006 Small Brains, bright minds. *Cell* **124**: 237-239
- Moulton, H. M., Nelson, M. H., Hatlevig, S. A., Reddy, M. T. and Iversen, P.L. 2004 Cellular Uptake of Antisense Morpholino Oligomers Conjugated to Arginine-Rich Peptides. *Bioconjugate Chem.* **15**: 290-299
- Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page, R. E. jr and Amdam, G. V. 2007 The Gene *vitellogenin* Has Multiple Coordinating Effects on Social Organization. *PLoS Biology* **5**: e62
- Parkhurst, S. M. and Ish-Horowicz, D. 1992 Common denominators for sex. *Curr. Biol.* **2**: 629-631
- Penalva, L. O. F. and Sanchez, L. 2003 RNA Binding Protein Sex-Lethal (Sxl) and Control of *Drosophila* Sex Determination and Dosage Compensation *Microbiol. And Mol. Biol. Reviews* **67**: 343-359
- Rideout, E. J., Billeter, J. C. and Goodwin, S.F. 2007 The sex-determination genes *fruitless* and *doublesex* specify a neural substrate required for courtship song. *Curr. Biol.* **17**: 1473-1478
- Rideout, E. J., Dornan, A. J., Neville, M. C. and Goodwin, S.F 2010 Control of sexual differentiation and behavior by the *doublesex* gene in *Drosophila melanogaster*. *Nature Neuroscience* **13**: 458-466

- Ryner, L. C., Goodwin, S. F., Castrillon, D. H. Anand, A., Vilella, A. et al. 1996 Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene. *Cell* **87**: 1079-1089
- Snodgrass, R. E. 1956 Anatomy of the honeybee Comstock
- Sokolowski, M. B. 2001 *Drosophila*: genetics meets behaviour *Nat. Rev. Genet.* **2**: 897
- Song, H. J., Billeter, J. C., Reynaud, E., Carlo, T., Spana, E. P., Perrimon, N., Goodwin, S. F., Baker, B. S. and Taylor, B. J. 2002 The *fruitless* gene is required for the proper formation of axonal tracts in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Genetics* **162**: 1703-1724
- Stogios, P. J., Drowns, G. S., Jauhal, J. J., Nandra, S. K. and Prive, G. G. 2005 Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* **6**: R82
- Tian, M. and Maniatis, T., 1993 A splicing enhancer complex controls alternative splicing of *doublesex* pre-mRNA. *Cell* **74**: 105-114
- Tissot, M. and Stocker, R. F. 2000 Metamorphosis in *Drosophila* and other insects: the fate of neurons throughout the stages. *Prog. Neurobiol.* **62**: 89-111
- von Frisch 1965 *Tanzsprache und Orientierung der Bienen*. (Berlin/Heidelberg/New York: Springer Verlag)
- Young, L. J., Nilsen, R., Waymire, K. G., MacGregor, G. R. and Insel, T. R. 1999 Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V1a receptor from a monogamous vole. *Nature* **400**: 766-768
- Yu, J. Y. and Dickson, B. J. 2006 Sexual behavior: do a few dead neurons make the difference? *Curr. Biol.* **16**: R23-R25

VIII. Anhang

Abbildung Anhang 1: Schematische Übersicht über die Entwicklungsstadien männlicher und weiblicher Honigbienen vom Ei bis zum adulten Tier

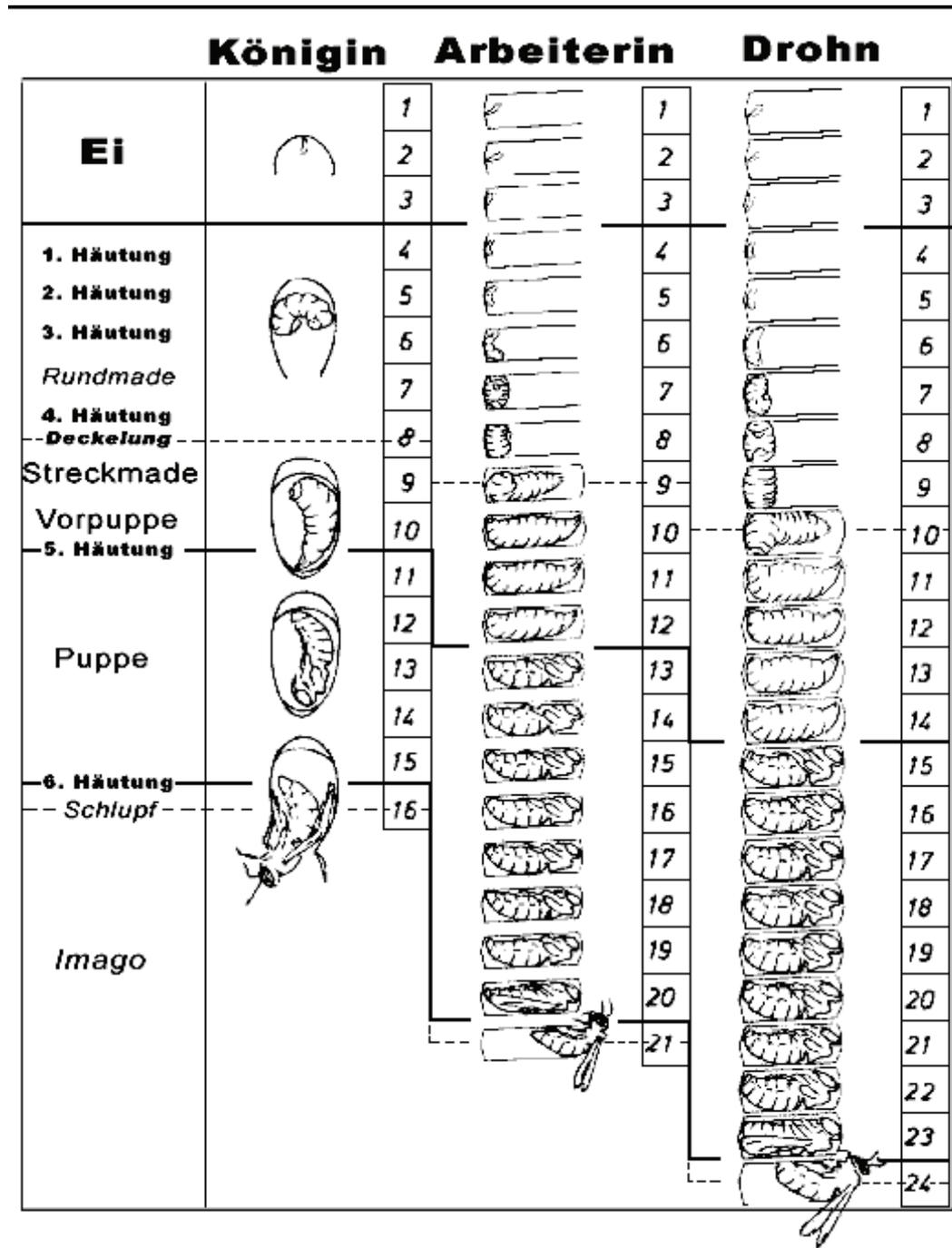


Abbildung Anhang 2:***Am-fru* Exonsequenzen**

Startkodons sind in schwarz fett gedruckt, Stopkodons sind in grau fett gedruckt. Zink-Finger kodierende Sequenzabschnitte sind grün dargestellt. Der vom Anti-Am-Fru Antikörper detektierte Proteinbereich wird von der kursiv gedruckten Sequenz kodiert. Unterstrichene Bereiche markieren Primerbindestellen, eine Liste der *Am-fru*-Oligonukleotide befindet sich im Anschluss an die *Am-fru* Sequenz.

Exon 1 (204 bp)

Aaaattaggggggatgttccgtgcagcgtacacg**tcgacctgcatccacgccaccctctctctctctcgggccaccctggcctca**
gtcgcgctccgcccgaacttgatataacgaaagt**tattcccgaatcgacgtaact**gtgccgttctcgtctcccgtctgaaacgaa
agaaaagaaagagaaataataaaga

Exon 2 (492 bp)

Cggaaagtattcccgaatcgacgtaactgtgccgttctcgtctcgtctgaaacgaaagaaagaaagagaaataataaagagaa
aaaaggggaaaagaactgaaaaaaaaaaaaaactctctcaccgttccaccgcgccctgatcgtcatgaccggcgagacaagtt
taagacgctgcatactcggctcggcgaacgatgtaatacaatcaagtccgttattgctgctgactgtattgtgttactgtaactgt
catgtgcgaggatatactgtctacgacagagatcgagttacgtgaacgtgaagaggatctcttggcctgttccaaggggagaag
aattcgtctcgtgaagatcgccggaagatttctcgtcgtgagggggagaactgatcctcctccgtcgtcgtggtgcggctacg
acaggccgacaggaatt**catgttcacgaatttcagtaacca**

Exon 3 (1350 bp)

Gaaaaaattaggaaaatatttttagaacgaaaaagaaaaaagaagaaagaaaaat**gtt**gtacaaaactaacgaaccgt
tategttactttcacgctcgtttagcaccgtgcacgtttaaactagct**taaaa**agagattcgagc**ataaa**atcgatgctttactcgat
cgttctcgtcgaacgacaaggg**ataaac**ggaagcaaa**ata**actcttctactcttttttcccccttttttctcgaatgccatactcg
gatgacgcatcgatcgacgtatgatccatcgatcgcgcaaatatcctcgtcgcgagaggaggaaaatcgttcgcaatgcacg**ta**
aaaaagagtctataaaagtcacgatttcatctgtacagacaataatcgtgaaacgtataatagaacgttcgacatgggtcttgggtaaa
gttccccctccccctccccctcccccttcccccttcccccttcaagatcacgattttaaaccgtccttctctccttaagctacatcgccg
cattgtcggcaggaacatatggccgagcgcagcagcgtgctctttatcgggacggcgtatttt**at**gcgaacttcttaccactgcat
taaactttatt**gcaccgctcgaatctctgttgc**tttttattcagcttgaattgtgcacgtgaatcttccacgaactactactcgt**aaa**atc
aatt**ccgaaacgatggggccaaactattctcattg**attcatatataaaatagaatttataatcacgatataatataaaatgatt
aaagtttgaatt**gat**cggagtgatataatataatataaaaaaagaaaaagagagaaaaaaatcgcacgaatatatattatt
tccaccgatttccactgattaggaggaagaaatgatgaatacgg**ataaaaa**acgcgatacgttattacgatcgcgctc**gta**att
tttgatgcgcgcgagttatcgcgcgcgatcgcggcgtgcgaaaaatcgcgccagccgctggcaccgctgcacttccggtatata
tcgcgcaagaatcgtccctgaagatttccagcttcgcacaagacggagaaaatgtttatt**tcgcatgctacgtaactgtagggca**
agaaacaggcgacgtatcgaatacacaatacgtcgc**gatgta**atatacttctgctgctccgcttgttttctcgtggaacaatcaag
gccatcgcgagataaattatgcagataacagtgatgctcgggtattccacctgatggaggatctacagg

Exon 4 (75 bp)

Aaaattggcagattggtatggtagtg**ggacgttaagggtcgggtggc**gttgaatggcaaaaagtttgcgaaaggg

Exon 5 (487 bp)

Agttagctggcgtgggttaggtaataaagccgcgtggaagcgtgttgaatggttagaaatcgagcatcaacaaatcgagttttcg
cgagaaggctcgtggctagacgagtagcggccgacaatggcgcccaagcctcgcgaatattgacattgccgaaaacattatctcgaat
ataggatattatcatatccgtgggtgacacatactcgcgtcgaatataacttaaccttctttaaattcgcgctacattatcgaagtgaatc

gtgtacagagttatttgcgtgccgaggttatgcgaaaaatgtttcggcacgtatagtagcgacgcgtgaaccctgaagggtttaca
gttatactgcaatgtggcacatttgcagaagcacggaggaagtgtgtgggtctagagttgcgatataatctctgaggagatatcgtcaa
gccgatataggagagtgtcgtgaagaaggcgt

Exon 6 (552 bp)

Tcgggattggagatagacaagatggaccaacagtattgcctacgggtggaacaaccatccagccaacctcacagacgttctcagctcc
ttacttgccagagagcactctgcgacgtaaacctggcgtgtgtggagaaaattcaaggcacaccagacgatactctctcatgcagt
ccatatttggagacatttctcctcagaatacccatccccatccaattatctctgaaggatgtcaatgaaacggaaatgaaggcattgctg
cactttatgtataagggggaagttaacgtagtcagcaictgctaccgatgttccttaaacagctgaggcattacagattagaggcct
cactgataatagtgtaaataacaagacagaagagaaaaagtcctcgcagaaccagaaacgaaactggattagccatactg
aatgcctaaccttcagcctcctcctgaaaagaggaaacgaaaggctcgggcagctatgatgtttcccttagtggtccaccagtg
aacggttcattgcagattctcag

Exon 7 (180 bp)

Acatcgtcacaatgtagttacaatcaagccctcctgtgattccaaagtcaataatgccatgggagctgatttgaagatggtagtcg
acctatgtctcctgcatcacagccacaaccttcgatcaagaattagatcatcacttaccagacttccatgacaacatttccctcca

Exon 8 (123 bp)

Ggtcatccagttggactgctaggagaagaaggaggcaacaacaggcagcctaagcgatggcgtgtcaggaattgaatcatctga
acatcataatccccagaaatgctcgcacgggctcgat

Ende 1: (398 bp ohne Poly-a)

Ggttcaaagcctggcacatcgcggtgacfttgaccgggtgccaggcggctgcaaccttcacaggtgcaagctgtcggcaagggt
cgtgacgcacatcaggaacctaccacgtccacttccccggcaggtttgagtgtcctctctgtcgtgccacgtacacacgtagcgaca
acctgcgcacgcactataaattcaaacccccgaggcaagaaggtcgatctaaacgatttcgtgacaggcacttggcgtctccgc
gatgagtaaataatgatgataccatgaacacgctgtcctaaacgcgagttggaccgtgcacgcgtctgtatataatcttatacatataata
tatttacacgtacgtacacgcgccccaaaagcaagaaaatcag

Ende 2: (579 bp ohne Poly-a)

Gagctgaaaaattggcgatcgcgcaatatttggagacagagtaacagcgacgagaggaggcgggtgctcgtgtgcggtaaggtc
gtgtcgaacgtgcgcaatcactattacgttcccttcccgggaagtagcgcctgcccgtctgcccgtgacgcggttacacgcgtagcgacact
tgtcacgcacacgcgtagcaagcagcgcacgcgcgcaatagcgaagcgcgagccccaaccgagaaccgcccgatctaccgcca
cgatccttccaatcaatcggagggtgcccgtccctttacacggatgcctatgccacttccgcttccgattacgacaacggttacagat
gcccgtatacacgtagcgacaacctgcgcacgcactataaattcaaacccccgaggcaagaaaggtcgatctaaacgatttcgtgac
aggcacttggcgtctccgcgatgagtaaataatgatgataccatgaacacgctgtcctaaacgcgagttggaccgtgcacgcgtct
gtatataatcttatacatataataatatttacacgtacgtacacgcgcccc

Ende 3: (507 bp ohne Poly-a)

Ggtacgatgccagcgtgcccggctggtctgtcatatcacgagatgttcgcccgtgctcgtcggctcggccgcccctttggagatgccgtg
cctgtggcaaacaggtgaccaaccgttggcaccacttccacatacacaggccaaaggtccctgtgcccctattgcccggccacgta
cagcaggatcgacacctccgctccacatacgcaccaagcacaggagatagttcgcgcaagagtccttcgtaaggggtcgtt
cgcgaaggggcccgtgtgaggacgctgattgccccgcgaaggaagcggcactcccgccacttccgccccctcgtctcttcgacg
acaggccttcgatcgcgcttcttcggattcgggctaccctgaccgttggccgtgcgccaaccaaacctgtcttcgaggaggggaaac
gcgtgaaagatccgttcttcgaccgtggttcttttaattaataaagcgtgcttctcgagagtagg

Am-fru Forward Primer:

1 (3'Ende3) TGCCGGTCCGGTCTGTCATATCACGAGA
5 (Exon1) GTCGACCTGCATCCACGCCAC
6 (Exon2-male) AACTGATCCTCCTTCCGTGCTGCG
7 (Exon3-female) TCGCGATGCTACGTCAACTGTAGG
12 (Exon7) GACCTATGTCTCCTGCATCACAGC
18 (Exon2-male) GTTATTCCCGAATCGACGTAAGT
20 (Exon2-male +T7) taatacgaactcactatagggcgaGTTATTCCCGAATCGACGTAAGT
24 (Exon3-female) TGCACCGTCGCGAATCTCTGTTGC
29 (Exon2-male) ATACTCGGCTCGGTGCGAACGATG
30 (Exon3-female) TCCGAAACGATGGGGGCCAAACTATTC
31 (Exon7) ACCTATGTCTCCTGCATCACAGCCA
32 (Exon8) AGCAACAACAGGCACGCTAAGCGA
35 (3'Ende2) ACGATGCCCGTATACACGTAGCGA
37 (Fru-Pep1) gatcgatccccGTTAGTCAGCATCTGCTACCGATG
72 (Exon4) GACGTTAAGGGTCGGGTGGC
76 (Exon5) CGGCACGTATAGTAGCGACGC

Am-fru Reverse Primer:

2 (3'Ende1) AGTGGTTCCTGATGTGCGTCACGA
3 (3'Ende2) CTCCTCTCGTCGCTGTTACTCTGT
4 (3'Ende3) TCTCGTGATATGACAGACCGACCG
13 (Exon7) GCTGGATGGTTGTTCACCGTAGG
14 (3'Ende3) CGTATGTGGGAGCGGAGGGTGTC
19 (Exon2-male) CTGAAATTCGTGAACATGAAATCCTG
21 (Exon2-male+T7) taatacgaactcactatagggcgaCTGAAATTCGTGAACATG AAATCCTG
38 (Fru-Pep1) gatcgatccccCACAGGAGGGCTTGATTTGTAAGT
74 (Exon7) GCTGTGATGCAGGAGACATAGGTC
77 (3'Ende2) CTCGCGTTTTAGGACAGCGTGTTTC

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Martin Beye angefertigt. Ihm danke ich für das zur Verfügung gestellte Thema, seine Unterstützung und die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Klaus Lunau danke ich für die Übernahme der zweiten Begutachtung meiner Arbeit.

Für praktische Tipps bei der Erstellung von dsRNA danke ich Herrn Dr. Martin Hasselmann. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Marianne Otte für die Unterstützung bei der Erstellung von Fluoreszenzaufnahmen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop. Bei Frau Dr. Tanja Gempe bedanke ich mich für die freundliche Überlassung der *fem* siRNA und hilfreiche Anregungen bei der schriftlichen Darstellung meiner Arbeit. Frau Sylvia Tannebaum und Herrn Ferdi Grawe danke ich für die bereitwillige Überlassung von Labormaterial zur Fertigung von Kryoschnitten. Bei Herrn Waldemar Seidel möchte ich mich für die Unterstützung bei der kreativen Umsetzung gefertigter Hilfsmaterialien zur Darstellung whole-mount gefärbter Bienegehirne bedanken. Frau Brigitte Haumann danke ich für ihre kompetente und bereitwillige Organisation von Verwaltungsangelegenheiten. Für Hilfe beim Korrekturlesen danke ich Frau Dr. Marianne Otte, Frau Inga Nissen, Frau Sarah Lechner und Frau Christine Seelmann.

Für das gute Klima im Laboralltag und die allzeitige Bereitschaft zur gegenseitigen Unterstützung möchte ich mich nachdrücklich bei allen Mitgliedern der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, die eine entspannte Arbeitsatmosphäre geschaffen haben.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich bis jetzt in all meinen Entscheidungen unterstützt haben.

Erklärung

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

Düsseldorf, den 26. Mai 2010

.....

Miriam Müller