

Molekulare Charakterisierung des
geschlechtsbestimmenden Locus der Honigbiene
(*Apis mellifera* L.)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Martin Hasselmann
geb. am: 09.07.1972 in: Weimar

Gutachter:

- 1.) Prof. Dr. Robin F.A. Moritz
- 2.) Prof. Dr. Wolf Engels
- 3.) PD Dr. Ralf Koebnik

Datum der Verteidigung: 07.01.2004, Halle (Saale)

urn:nbn:de:gbv:3-000005924

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005924>]

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Der Dissertation zugrunde liegende Publikationen und Manuskripte	14
2.1. Fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee (<i>Apis mellifera</i>)	14
2.2. The Gene <i>csd</i> is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-Type protein	15
2.3. Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee	16
2.4. Signatures of intra-and genomic recombination on a locus under strong balancing selection	17
2.5. Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif	18
3. Zusammenfassung	19
Anhang	21
Erklärung über den persönlichen Anteil an den Publikationen und Manuskripten	
Eidesstattliche Erklärung	
Lebenslauf	

1. Einleitung

Sexuelle Fortpflanzung ist ein grundlegendes Phänomen im Tierreich, welches zu einer Neukombination von Genen führt. Dabei sind die geschlechtsbestimmenden Mechanismen, die zur Ausprägung von männlichen und weiblichen Individuen führen, außerordentlich divers und nur bei wenigen Organismen auf molekularer Ebene verstanden. Die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), der Mensch (*Homo sapiens*) und die Maus (*Mus musculus*) sind Beispiele, bei denen Geschlechtschromosomen einen entscheidenden Beitrag bei der geschlechtsspezifischen genetischen Kontrolle der Geschlechtsdifferenzierung liefern. Das als Genbalance bezeichnete Verhältnis von Geschlechtschromosomen zu Autosomen liefert das primäre Signal der Geschlechtsbestimmung bei *D. melanogaster* und *C. elegans* (CLINE & MEYER 1996), wohingegen beim Menschen *Sry*, ein männlich dominanter Faktor auf dem Y Chromosom, das primäre Signal darstellt (GOODFELLOW & LOVELL-BADGE 1993).

20% aller Tierarten besitzen jedoch eine andere Form der Geschlechtsbestimmung ohne Geschlechtschromosomen, bei ihnen ist die haplo-diploide Geschlechtsbestimmung realisiert. So zeigen zum Beispiel Zecken und Milben (Acarina), Weiße Fliege (Aleyroidea), einige Hemipteren (Coccoidea, Margarodidae), Tripse (Thysanoptera), Borkenkäfer (Scolytidae) eine Reihe von Rotatorien (Monogononta) (BELL 1982) sowie sämtliche Hymenopteren (BULL 1983) diese Form der Geschlechtsbestimmung. Dabei entwickeln sich diploide Weibchen aus befruchteten und haploide Männchen aus unbefruchteten Eiern (MORITZ & SOUTHWICK 1992). WHITING (1933; 1939; 1943) postulierte für *Bracon hebetor* erstmalig einen Locus (den sogenannten Sex-Locus) mit mehreren komplementären Allelen als genetische Basis der geschlechtsbestimmenden Mechanismen innerhalb der Hymenoptera. Allein der allelische Zustand an diesem Locus entscheidet das Geschlecht. Während weibliche Hymenopteren immer heterozygot an dem Sex-Locus sind, tragen fertile Männchen nur ein Sexallel, ein Zustand der als hemizygot bezeichnet wird. Diploide Individuen in homozygotem Allelzustand am Sex-Locus entwickeln sich dagegen zu Männchen, die diploide Spermien erzeugen und triploide, sterile Nachkommen produzieren können (OISHI *et al.* 1993; COOK 1993). Im Fall der Honigbiene werden diese diploiden Männchen im frühen Larvalstadium durch weibliche Bienen detektiert und aufgefressen (MACKENSEN 1951; WOYKE 1963). Dies hat einen außergewöhnlichen Phänotyp auf Kolonieebene zur Folge, bei dem ein unregelmäßig

verdeckeltes Brutbild (Lückenbrut) auf die entfernten diploiden Drohnen hinweist. Der enorme Vorteil der am Sex-Locus heterozygoten, weiblichen Individuen hat zur Folge, dass zahlreiche verschiedene Sex-Allele in Populationen segregieren. Dabei werden seltene Allele gegenüber häufig auftretenden Allelen selektiv bevorzugt. Durch eine hohe Anzahl verschiedener Allele verringert sich die Wahrscheinlichkeit, dass gleiche Allele aufeinandertreffen und zur Homozygotie am Sex-Locus führen. Die Zahl der Sex-Allele in Honigbienenpopulationen wurde durch klassische Kreuzungsexperimente auf 11 bis 19 Allele geschätzt (MACKENSEN 1955; LAIDLAW *et al.* 1956; ADAMS *et al.* 1977). Das populationsgenetische Modell von YOKOYAMA und NEI (1979) postuliert, dass durch balancierte Selektion (überdominante Selektion) Allele am Sex-Locus über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben können, als man dies für neutrale Allele erwarten würde (MARUYAMA & NEI 1981; TAKAHATA 1990; TAKAHATA & NEI 1990). Somit wird durch die balancierte Selektion dem Verlust von Allelen durch genetische Drift entgegengewirkt, was unter der Prämisse des Heterozygotenvorteils zu einem hohen phylogenetischen Alter der Allele führen kann. Diese außergewöhnliche Form der Selektion ist bei anderen Organismen bisher nur in wenigen Fällen bekannt. So sind der MHC-Komplex ('major histocompatibility complex') bei Wirbeltieren (HUGHES & NEI 1989; HEDRICK 1999), der *S*-Locus ('self-incompatibility locus') bei Pflanzen (KUSABA *et al.* 1997; RICHMAN 2000) sowie der Paarungslocus ('mating-compatibility locus') bei Pilzen (MAY *et al.* 1999) Beispiele, bei denen eine solche balancierte Selektion nachgewiesen werden konnte.

Der ausgeprägte selektive Vorteil der Heterozygotie am Sex-Locus war Ausgangspunkt für die Eingrenzung des Sex-Locus auf genomischer DNA-Ebene mittels molekularer Methoden (HASSELMANN *et al.* 2001; 2.1.*). Anschließend konnte ein Gen, im Folgenden als *csd* (*complementary sex determiner*) bezeichnet, in der Sex-Locus Region isoliert und als das primäre Signal der haplo-diploiden Geschlechtsbestimmung bei *A. mellifera* erstmals beschrieben werden (BEYE, HASSELMANN *et al.* 2003; 2.2.). Der funktionelle Nachweis des Einflusses von *csd* auf die geschlechtliche Entwicklung in der Honigbiene war dabei von entscheidender Bedeutung.

Desweiteren wurde untersucht, ob die theoretischen Vorhersagen der balancierten Selektion auf molekularer Ebene bestätigt werden können. Aufgrund des selektiven Vorteils der am Sex-Locus heterozygoten Individuen sollten Hinweise auf eine bevorzugte Änderung der Aminosäure in der Nukleotid-Sequenz von *csd*-Allelen quantifizierbar sein

* Diese Nummerierung entspricht der Gliederung der Publikationen und Manuskripte im Inhaltsverzeichnis.

(HASSELMANN & BEYE; 2.3.). Höchstwahrscheinlich erfolgt die Bestimmung des hetero- bzw. homozygoten Zustandes des Sex-Locus über Proteininteraktion von *csd*-Allelen. Durch die Identifizierung von Regionen, die bevorzugt selektiert werden, konnte ein maßgeblicher Beitrag für funktionelle Analysen der Interaktion von *csd*-Allelen geliefert werden. Weiterhin stellte sich die Frage, ob die Spuren der überdominanten Selektion am Sex-Locus auch im an *csd* angrenzenden genomischen Bereich detektierbar sind. Welche Rolle die Rekombination in der Sex-Locus Region dabei einnimmt und ob sie als evolutive Kraft im Gen zur möglichen Neukombination von Allelen führt, war Gegenstand einer detaillierten Betrachtung in einer weiteren Analyse (HASSELMANN & BEYE; 2.4.)

Vor dem Hintergrund der außerordentlichen Vielfalt genetischer Geschlechtsbestimmung liefert die Analyse von *csd* einen ersten Beitrag für das Verständnis der Evolution haplo-diploider Geschlechtsbestimmung. Außerdem eröffnet sich mit der Isolierung von *csd* erstmalig die Möglichkeit, einen grundlegend anderen primären Schalter einer geschlechtsbestimmenden Regulationskaskade zu studieren.

Feinkartierung der Sex-Locus Region und Identifizierung des *csd* Gens

In der vorliegenden Arbeit stand zunächst die Eingrenzung der Sex-Locus Region mit molekularen Markern auf genomischer DNA-Ebene im Vordergrund. Die Charakterisierung genomischer Regionen durch Kartierung ist eine etablierte Methode, um Gen-Loci einzugrenzen bzw. zu isolieren (BURR & BURR 1991; MERRIAM *et al.* 1991; KOHN *et al.* 2000). Da die Honigbiene keinen genetischen Modellorganismus darstellt, konnte zur Genkartierung nicht auf eine so elegante Methode wie das 'transposon tagging' zurückgegriffen werden, die bei *C. elegans* über Transposon generierte Mutationen zur Anwendung kommt (KORSWAGEN *et al.* 1996). Jedoch konnte ein in der Natur vorkommender Phänotyp bei der Honigbiene genutzt werden, der keine Generierung von Mutanten erforderte. So wurde eine Inzucht Kreuzung (Mutter-Tochter Kreuzung, (LAIDLAW & PAGE 1997)) etabliert, die eine 50-prozentige diploide Drohnenproduktion aufwies. Die daraus resultierende Kartierungspopulation bestand demzufolge nur aus weiblichen, am Sex-Locus heterozygoten Individuen (HASSELMANN *et al.* 2001; 2.1). Neben der Etablierung gezielter Inzucht Kreuzungen bietet die Arbeit mit der Honigbiene als weiteren Vorteil für eine Feinkartierungsstrategie auch eine große Stichprobenzahl für die Kartierungspopulation. Nicht nur der ausgeprägte Phänotyp des Sex-Locus, sondern auch die hohe Rekombinationsrate der Honigbiene (13 cM/Mb; G. Hunt, pers. Mitteilung) besonders in der Sex-Locus Region (22 cM/Mb; BEYE *et al.* 1999) erlaubt eine durch die

Entwicklung neuer, mit dem Sex-Locus gekoppelter Marker geprägte Feinkartierungsstrategie. Dabei war eine hohe Auflösung in der Kartierung zu erwarten, da aufgrund der hohen Rekombinationsrate der physikalische Abstand zwischen genetischen Markern reduziert ist.

Die Feinkartierung erfolgte über einen chromosomalen 'walk', der von dem mit dem Sex-Locus am dichtesten gekoppelten bekannten Marker Q (HUNT & PAGE 1994) gestartet wurde. Dabei sollte sich die Anzahl der Individuen, die für Sex-Locus gekoppelte Marker einen rekombinanten (homozygoten) Genotyp aufweisen, bei schrittweiser Annäherung an den Sex-Locus verringern. Erstmals gelang dieser Nachweis mit der Entwicklung eines neuen, näher am Sex-Locus liegenden, gekoppelten Markers (HASSELMANN *et al.* 2001; 2.1.) und verifizierte, dass der chromosomale 'walk' in Richtung des Sex Locus vollzogen wurde. Für die Feinkartierung von Genen oder QTLs ('quantitative trait loci') ist die Entwicklung neuer variabler Marker von entscheidender Bedeutung. Häufig sind für eine Kreuzung etablierte Marker in einer anderen Kartierungspopulation nicht mehr variabel. Aus diesem Grund wurde eine neue und günstige Methode entwickelt, die es erlaubt, durch zufällige enzymatische Restriktion von PCR-Fragmenten variable Marker in einer genomischen Region zu generieren.

Durch drei weitere neue Sex-Locus gekoppelte Marker konnten der Fortschritt des chromosomalen 'walks' dokumentiert (GFMHi, MKFH-51, GWQFHi) (BEYE, HASSELMANN *et al.* 2003; 2.2.) und eine 24 kb große Region auf genomischer DNA-Ebene isoliert werden, in der alle Individuen der Kartierungspopulation einen heterozygoten Genotyp aufwiesen. Die Sequenzierung dieser Region sollte Aufschluß darüber geben, ob ein oder mehrere Gene in dieser Region vorhanden sind. Zur Identifizierung von Genstrukturen aus Sequenzinformation können Algorithmen von Annotierungs-Software genutzt werden, die standardmäßig in der Genomanalyse z.B. von *Drosophila* und *Homo* ihre Anwendung finden (BAXEVANIS & OUELLETTE 2001). Als Ergebnis dieser Analysen wurden Exone identifiziert, die in nachfolgenden Experimenten mittels RACE und RT-PCR ein vollständiges Transkript, das Gen *complementary sex determiner (csd)*, ergaben.

Um den primären Signalcharakter von *csd* in der haplo-diploiden Geschlechtsbestimmung funktionell nachzuweisen, schienen 'RNA of interference' (RNAi) Experimente die adäquate Methode zu sein (KENNERDELL & CARTHEW 1998). Mit der RNAi-Technik, bei der die Injektion spezifischer doppelsträngiger RNA (dsRNA) zur Unterdrückung der Expression des Zielgens führt, konnten z. B. schon bei Organismen wie

Tribolium (BROWN *et al.* 1999) und *Hydra* (LOHMANN *et al.* 1999) Genfunktionen erfolgreich untersucht werden.

Erstmalig wurde bei der Honigbiene die RNAi-Technik mit der Analyse eines *engrailed* Homeobox-Motivs etabliert und eine 'loss of function' Mutante erzeugt (BEYE *et al.* 2002; 2.5.). Diese Studie ergab, dass *ben* als funktionelles Orthologon der Honigbiene zu *engrailed* bei *Drosophila* angesehen werden kann. Die Unterdrückung der Expression von *ben* führte zu einem Phänotyp mit deutlicher Störung der Metamerie, ein Befund der auch durch *engrailed* Protein-Antikörperfärbungen unterstützt wurde.

Für die funktionelle Analyse von *csd* erfolgte die Injektion von *csd*-dsRNA Fragmenten in genetisch männliche und weibliche Eier. Da über die Wirkungsweise von *csd* auf molekularer Ebene nichts bekannt war, waren verschiedene Effekte der RNAi denkbar. Falls *csd* den weiblichen Entwicklungsweg aktiv initiieren sollte, würde durch die RNAi die *csd*-Funktion in weiblichen Eiern zerstört und der autonom männliche Entwicklungsweg aktiviert werden, folglich würden sich aus den diploiden Eiern diploide Männchen entwickeln. In haploiden Eiern wäre kein Einfluß zu erwarten. Alternativ könnte *csd* auch hemmend in der weiblichen oder männlichen Regulationskaskade wirken, so dass durch den Wegfall der aktiven Hemmung der sonst unterdrückte Entwicklungsprozess aktiviert wird.

Der beobachtete Effekt der *csd*-RNAi bei genetisch weiblichen Larven war eine vollständige Änderung der larvalen Geschlechtsorgane von morphologisch weiblichen in männliche Geschlechtsorgane. *csd*-RNAi in genetisch männlichen Eiern zeigte dagegen keinen Effekt, alle Larven entwickelten Testes. Diese Analysen lassen erkennen, dass bei *csd*-heterozygoten Individuen *csd* ein funktionelles Produkt codiert, welches die weibliche Differenzierung initiiert. Bei *csd*-hemizygoten Individuen, die sich zu Männchen entwickeln, liegt indes ein nicht-funktionelles *csd*-Produkt vor.

Diversität und Selektion in *csd*-Allelen

Nur der heterozygote Allelzustand am Sex-Locus führt zu überlebensfähigen diploiden Individuen. Daraus ergibt sich eine balancierende Selektion an diesem Locus, welche zahlreiche verschiedene geschlechtsbestimmende Allele in Populationen der Honigbienen erwarten läßt (YOKOYAMA & NEI 1979). Das wirft die Frage auf, ob *csd* diese Allelvielfalt zeigt und sich Spuren der Selektion in *csd*-Allelen nachweisen lassen. Die Erhaltung der Vielfalt von geschlechtsbestimmenden Allelen ist für Honigbienenpopulationen von entscheidender Bedeutung, da gerade durch gezielte Züchtungen, die der Verstärkung von

bestimmten Eigenschaften (z.B. Sammelaktivität) dienen, die Gefahr der Inzuchtdepression erhöht wird.

Wenn *csd*-Allele balancierender Selektion unterliegen, so sollten dafür Argumente entsprechend den theoretischen Vorhersagen gefunden werden: 1.) Eine Genealogie von Allelen unter balancierender Selektion zeigt eine außerordentlich hohe Diversität (RICHMAN 1996). 2.) Die terminalen Astlängen dieser Genealogie sind infolge der längeren Verweildauer solcher Allele gegenüber selektiv neutralen Allelen in der Population gegenüber den internen Astlängen signifikant verlängert (TAKAHATA 1990; TAKAHATA & NEI 1990). 3.) Nukleotidaustausche, deren Änderung keinen Einfluß auf die Aminosäurestruktur besitzt (synonyme Austausch), sind unter selektiv neutralen Bedingungen um bis zu viermal häufiger, als Nukleotidaustausche, die eine Aminosäureänderung bewirken (nichtsynonyme Austausch) (MIYATA *et al.* 1980). Die Analyse dieser Nukleotidunterschiede ermöglicht es, Regionen in den Allelen zu ermitteln, die positiver Selektion unterliegen und gehäuft Aminosäureänderungen aufweisen (HUGHES & NEI 1988; WU *et al.* 1998). Dadurch können in *csd* Kandidatenregionen detektiert werden, die in späteren Untersuchungen auf ihre Bedeutung bei der Proteininteraktion von *csd*-Allelen zu testen sind.

Spuren der Selektion von *csd* im Genom und die Rolle der Rekombination

Balancierende Selektion kann erklären, warum eine hohe Zahl von geschlechtsbestimmenden Allelen in Populationen erhalten bleibt. Wie wirkt sich jedoch die starke Selektion am Sex-Locus auf die Nukleotide in der angrenzenden genomischen Region aus? Zu erwarten ist, dass die an diesen Locus gekoppelte Nukleotide akkumuliert werden und zu einer erhöhten Nukleotiddiversität in der genomischen Region führen. Dieser als 'hitchhiking' bekannte Effekt wurde in zahlreichen Arbeiten für positiv selektierte Loci postuliert (SMITH & HAIGH 1974; STROBECK *et al.* 1975; KAPLAN *et al.* 1989; STEPHAN *et al.* 1992) und bisher nur an einem einzigen Locus empirisch bestätigt (O'HUIGIN *et al.* 2000), wobei jedoch keine direkte Messung der Rekombinationsrate erfolgte. Diese hat jedoch einen entscheidenden Einfluß auf die Verteilung der Nukleotidpolymorphismen: Rekombination unterbricht die Kopplung zwischen den Nukleotidpolymorphismen und bewirkt eine Verringerung der Nukleotiddiversität, da selektiv neutrale Variationen verloren gehen (HARTL & CLARK 1997). Sowohl die Nukleotiddiversität als auch die Rekombinationsrate wurde in der Sex-Locus Region in unterschiedlichem physikalischen Abstand zu *csd* gemessen (HASSELMANN & BEYE; 2.4.).

Der Nachweis von Rekombination im Gen *csd* auf genomischer Ebene ist durch die markerbasierende Analyse von rekombinanten Individuen nicht möglich, da in dieser Region nur heterozygote Individuen existieren. Aufgrund der erhöhten Rekombinationsrate in der Sex-Locus Region ist jedoch zu erwarten, dass auch intragenetische Rekombination stattfindet. Somit könnten durch Rekombination als evolutive Kraft über Neukombination von Genregionen neue Allele entstehen (PARHAM & OHTA 1996). Spuren von intragenetischer Rekombination können anhand der Nukleotidpolymorphismen detektiert werden (HUGHES *et al.* 1993; WANG *et al.* 2001) und wurden auch in *csd*-Allelen nachgewiesen (HASSELMANN & BEYE; 2.4.).

In dieser Arbeit sind Ergebnisse dargestellt, die die Identifizierung und Analyse des primären Signals der geschlechtsbestimmenden Regulationskaskade der Honigbiene zeigen. Damit ist eine Voraussetzung geschaffen, zukünftig die Honigbiene auf molekularer Ebene in den Vergleich der verschiedenen Systeme und Mechanismen genetischer Geschlechtsbestimmung bei anderen Organismen mit einzubeziehen.

Literatur

- ADAMS, J., ROTHMAN, E.D., KERR, W.E., und PAULINO, Z.L. (1977). Estimation of the number of sex alleles and queen matings from diploid male frequencies in a population of *Apis mellifera*. *Genetics* **86**: 583-596.
- BAXEVANIS, A.D. und OUELLETTE, B.F.F. (2001). *Bioinformatics - A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*. Wiley Interscience, New York.
- BELL, G. (1982). *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. University of California Press, Los Angeles.
- BEYE, M., HÄRTEL, S., HAGEN, A., HASSELMANN, M., und OMHOLT, S.W. (2002). Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif. *Insect Mol. Biol.* **11**: 527-532.
- BEYE, M., HASSELMANN, M., FONDRK, M.K., PAGE, R.E.JR., und OMHOLT, S.W. (2003). The Gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes a SR-type protein. *Cell* **114**: 419-429.

- BEYE, M., HUNT, G.J., PAGE, R.E., FONDRK, M.K., GROHMANN, L., und MORITZ, R.F.A. (1999). Unusually high recombination rate detected in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Genetics* **153**: 1701-1708.
- BROWN, S.J., MAHAFFEY, J.P., LORENZEN, M.D., DENELL, R.E., und MAHAFFEY, J.W. (1999). Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol. Dev.* **1**: 11-15.
- BULL, J.J. (1983). *Evolution of sex determining mechanisms*. Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA.
- BURR, B. und BURR, F.A. (1991). Recombinants inbreds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. *Trends in Genetics* **7**: 55-60.
- CLINE, T.W. und MEYER, B.J. (1996). Vive la difference: Males vs. females in flies vs. worms. *Annu. Rev. Genet.* **30**: 637-702.
- COOK, J.M. (1993). Sex determination in the Hymenoptera: A review of models and evidence. *Heredity* **71**: 421-435.
- GOODFELLOW, P.N. und LOVELL-BADGE, R. (1993). Sry and sex determination in mammals. *Annu. Rev. Genet.* **27**: 71-92.
- HARTL, D.L. und CLARK, A. (1997). *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- HASSELMANN, M., FONDRK, M.K., PAGE, R.E.JR, und BEYE, M. (2001). Fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insect Mol. Biol.* **10**: 605-608.
- HEDRICK, P.D. (1999). Balancing selection and MHC. *Genetica* **15**: 207-214.
- HUGHES, A.L. und NEI, M. (1988). Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* **335**: 167-170.
- HUGHES, A.L. und NEI, M. (1989). Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: Evidence for overdominant selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 958-962.
- HUGHES, A.L., HUGHES, M.K., und WATKINS, D.I. (1993). Contrasting roles of interallelic recombination at the HLA-A and HLA-B loci. *Genetics* **133** 669-680.
- HUNT, G.J. und PAGE, R.E. (1994). Linkage analysis of sex determination in the honey bee (*Apis mellifera*). *Mol. Gen. Genet.* **244**: 512-518.

- KAPLAN, N.L., HUDSON, R.R., und LANGLEY, C.H. (1989). The "hitchhiking-effect" revisited. *Genetics* **123**: 887-899.
- KENNERDELL, J.R. und CARTHEW, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**: 1017-1026.
- KOHN, M.H., PELZ, H.-J., und WAYNE, R.K. (2000). Natural selection mapping of the warfarin-resistance gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7911-7915.
- KORSWAGEN, H.C., DURBIN, R.M., SMITS, M.T., und PLASTERK, R.H. (1996). Transposon Tc1-derived, sequence-tagged sites in *Caenorhabditis elegans* as markers for gene mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14680-14685.
- KUSABA, M., NISHIO, T., und SATTA, Y. (1997). Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparisons of class I SLG alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implications for the evolution and recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 7673-7678
- LAIDLAW, H.H., GOMES, F.P., und KERR, W.E. (1956). Estimation of the number of lethal alleles in a panmictic population of *Apis mellifera*. *Genetics* **41**: 179-188.
- LAIDLAW, H.H. UND PAGE, R.E. (1997). *Queen Rearing and Bee Breeding*. Wicwas Press, Chesshire, CT.
- LOHMANN, J.U., ENDL, I., und BOSCH, T.C.G. (1999). Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Develop. Biol.* **214**: 211-214.
- MACKENSEN, O. (1951). Viability and sex determination in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Genetics* **36**: 500-509.
- MACKENSEN, O. (1955). Further studies on a lethal series in the honeybee. *J. Hered.* **46**: 72-74.
- MARUYAMA, T. und NEI, M. (1981). Genetic variability maintained by mutation and overdominant selection in finite population. *Genetics* **98**: 441-459.
- MAY, G., SHAW, F., BADRANE, H., und VEKEMANS, X. (1999). The signature of balancing selection: Fungal mating compatibility gene evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 9172-9177.
- MERRIAM, J., ASHBURNER, M., HARTL, D.L., und KAFATOS, F.C. (1991). Toward cloning and mapping the genome of *Drosophila*. *Science* **254**: 221-225.

- MIYATA, T., YASUNAGA, T., und NISHIDA, T. (1980). Nucleotide sequence divergence and functional constraint in mRNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7328-7332.
- MORITZ, R.F.A. und SOUTHWICK, E.E. (1992). *Bees as Superorganisms An Evolutionary Reality*. Springer-Verlag, New York.
- O'HUIGIN, C., SATTI, Y., HASUMANN, A., DAWKINS, R.L., und KLEIN, J. (2000). The implications of intergenic polymorphism for major histocompatibility complex evolution. *Genetics* **156**: 867-877.
- OISHI, K., SAWA, M., HATAKEYAMA, M., und KAGEYAMA, Y. (1993). Genetics and biology of the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera). *Genetica* **88**: 119-127.
- PARHAM, P. und OHTA, T. (1996). Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules. *Science* **272**: 67-74.
- RICHMAN, A.D. (1996). Allelic diversity and gene genealogy at the self-incompatibility locus in the Solanaceae. *Science* **273**: 1212-1216.
- RICHMAN, A.D. (2000). Evolution of balanced genetic polymorphism. *Mol. Ecol.* **9**: 1953-1963.
- SMITH, J.M. und HAIGH, J. (1974). The hitchhiking effect of a favorable gene. *Genet. Res.* **23**: 23-35.
- STEPHAN, W., WHIEHE, T.H.E., und LENZ, M.W. (1992). The effect of strongly selected substitutions on neutral polymorphism: analytical results based on diffusion theory. *Theor. Popul. Biol* **41**: 237-254.
- STROBECK, C., SMITH, J.M., und CHARLESWORTH, B. (1975). The effects of hitchhiking on a gene for recombination. *Genetics* **82**: 547-558.
- TAKAHATA, N. (1990). A simple genealogical structure of strongly balanced allelic lines and trans-species evolution of polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2419-2423.
- TAKAHATA, N. und NEI, M. (1990). Allelic genealogy under overdominant and frequency-dependent selection and polymorphism of major histocompatibility complex loci. *Genetics* **124**: 967-978.
- WANG, X., HUGHES, A.L., TSUKAMOTO, T., ANDO, T., und KAO, T.H. (2001). Evidence that intragenic recombination contributes to allelic diversity of the S-RNase gene at the self-incompatibility (S) locus in *Petunia inflata*. *Plant Physiol.* **125**: 1012-1022.

- WHITING, P.W. (1933). Selective fertilization and sex-determination in Hymenoptera. *Science* **78**: 537-538.
- WHITING, P.W. (1939). Sex determination and reproductive economy in *Habrobracon*. *Genetics* **24**: 110-111.
- WHITING, P.W. (1943). Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics* **28**: 365-382.
- WOYKE, J. (1963). Drone larvae from fertilized eggs of the honeybee. *J. Apic. Res.* **2**, 19-24.
- WU, J., SAUPE, S.J., und GLASS, N.L. (1998). Evidence for balancing selection operating at the heterokaryon incompatibility locus in a group of filamentous fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12398-12403.
- YOKOYAMA, S. und NEI, M. (1979). Population dynamics of sex determining alleles in honey bees and self-incompatibility in plants. *Genetics* **91**: 609-626.

2. Der Dissertation zugrunde liegende Publikationen und Manuskripte

2.1 Fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee

(*Apis mellifera*)

M. Hasselmann¹, M. K. Fondrk², R. E. Page Jr.² und M. Beye¹

¹Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Institut für Zoologie, Biozentrum
Weinberg Weg 22, 06120 Halle, Germany

²Department of Entomology, University of California, Davis, Davis, California
95616

Insect Molecular Biology (2001) **10**(6): 605-608

Abstract

Isolating an unknown gene with fine-scale mapping is possible in a ‘non-model’ organism. Sex determination in honey bees consists of a single locus (sex locus) with several complementary alleles. Diploid females are heterozygous at the sex locus, whereas haploid males arise from unfertilized eggs and are hemizygous. The construction of specific inbred crosses facilitates fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee. The high recombination rate in the honey bee reduces the physical distance between markers compared with model organisms and facilitates a novel gene isolation strategy based on step-wise creation of new markers within small physical distances. We show that distances less than 25 kb can be efficiently mapped with a mapping population of only 1000 individuals. The procedure described here will accelerate the mapping, analysis and isolation of honey bee genes.

2.2. The Gene *csd* is the Primary Signal for Sexual Development in the Honeybee and Encodes an SR-Type Protein

M. Beye¹, **M. Hasselmann**¹, M. K. Fondrk², R. E. Page Jr.², und S. W. Omholt³

¹Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Institut für Zoologie, Biozentrum Weinberg Weg 22, 06120 Halle, Germany

²Department of Entomology, University of California, Davis, Davis, California 95616

³ Agricultural University of Norway, Department of Animal Science, P.O. Box 5025, 1432 AAS, Norway

Cell (2003), Vol. **114**: 419-429

Summary

Haplodiploid organisms comprise about 20% of animals. Males develop from unfertilized eggs while females are derived from fertilized eggs. The underlying mechanisms of sex determination, however, appear to be diverse and are poorly understood. We have dissected the *complementary sex determiner* (*csd*) locus in the honeybee to understand its molecular basis. In this species, *csd* acts as the primary sex-determining signal with several alleles segregating in populations. Males are hemizygous and females are heterozygous at this locus; nonreproducing diploid males occur when the locus is homozygous. We have characterized *csd* by positional cloning and repression analysis. *csd* alleles are highly variable and no transcription differences were found between sexes. These results establish *csd* as a primary signal that governs sexual development by its allelic composition. Structural similarity of *csd* with *tra* genes of Dipteran insects suggests some functional relation of what would otherwise appear to be unrelated sex-determination mechanisms.

2.3. Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee

M. Hasselmann und M. Beye

Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Institut für Zoologie, Biozentrum
Weinberg Weg 22, 06120 Halle, Germany

eingereicht bei: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

Abstract

Patterns of DNA polymorphism in genes are a primary tool to dissect signatures of selection, however, the underlying selective forces are poorly understood in most cases. Theory predicts that diversifying selection operates on the primary gene of sexual regulation in the honey bee, the *complementary sex determiner* (Beye *et al.* 2003 Cell, 114, 419-429). Females are derived from fertilized eggs and have two allelic versions of *csd*. Males result when there is only one version of specificity in either the diploid (fertilized) or haploid (unfertilized) eggs. The diploid homozygous males, however, don't survive which implies a strong diversifying selection regime. The first cDNA *csd* sequences provide us with the unique power to dissect these signatures that occur during the course of evolution. Large differences in *csd* sequences within and between four populations were found. They fall into major groups, haplotype I and II. Within haplotype I several allelic lineages were identified. Long resistance time and an excess of nonsynonymous over synonymous differences suggest that diversifying selection has operated on very confined parts of the protein. Signatures of hitchhiking indicate some functional significance of a hypervariable NY repeat region. The first *csd* sequence data are a notable basis to improve bee selection programs by allele assisted breeding. The results have essential implications to understand the function and evolution of the multi-allelic mechanism that is found in many hymenopteran species (ants, wasps, bees, sawflies). Thus, *csd* provides an elegant system to study adaptive processes directly on the level of nucleotide sequences.

2.4. Signatures of intra- and genomic recombination on a locus under strong balancing selection

M. Hasselmann und M. Beye

Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Institut für Zoologie, Biozentrum
Weinberg Weg 22, 06120 Halle, Germany

Manuskript für: *Genetics*

Abstract

The gene *complementary sex determiner (csd)* in the honey bee is under strong overdominant selection in which homozygotes have zero fitness, heterozygotes develop into females and hemizygotes differentiate into males. To examine the impact of the overdominant locus at linked genomic regions, nucleotide diversity was measured in different distances to *csd*. We found that nucleotide diversity was strongly increased with lowering the distance to *csd*. However, the influence of balancing selection on linked nucleotide polymorphism rapidly decreases due to recombination. Recombination rate in the *csd* adjacent genomic region increases within 43 kb which suggests that recombination has been positively selected to uncouple *csd*-alleles from the rest of its linkage group. Furthermore, we examined if intragenic recombination occurs in *csd* contributing to the observed nucleotide pattern in *csd*-alleles. Our results suggest that recombination had a major role in shaping nucleotide differences of the sex-determining locus.

2.5. Specific developmental gene silencing in the honey bee using a homeobox motif

M. Beye¹, S. Härtel¹, A. Hagen², **M. Hasselmann**¹, und S.W. Omholt²

¹Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Institut für Zoologie, Biozentrum Weinberg Weg 22, 06120 Halle, Germany

²Agricultural University of Norway, Department of Animal Science, P.O. Box 5025, 1432 AAS, Norway

Insect Molecular Biology (2002) **11**(6): 527-532

Abstract

Manipulating the expression of genes in species that are not currently used as genetic models will provide comparative insights into the evolution of gene functions. However the experimental tools in doing so are limited in species that have not served as models for genetic studies. We have examined the effects of double stranded RNA (dsRNA) in the honey bee, an insect with considerably basic scientific interest. dsRNA derived from a 300 bp stretch of the E30 homeobox motif was injected into honey bee embryos at the anterior pole in the preblastoderm stage. We found that the dsRNA fragment successfully disrupted the protein expression of the target gene throughout the whole embryo. The disruption caused deficient phenotypes similar to known loss of function mutants of *Drosophila engrailed*, whereas embryos injected with nonsense dsRNA showed no abnormalities. We show that the large size of the honey bee egg (D: 0.3 mm, L: 1.6 mm) and the long preblastoderm stage (11–12 h) can be exploited to generate embryos with partial disruption of gene function, which may provide an elegant alternative to classical chimeric analyses. This is the first report of targeted disruption of gene function in the honey bee, and the results prove that the chosen target gene is a functional ortholog to *engrailed* in *Drosophila*.

3. Zusammenfassung

Im Verlauf dieser Arbeit wurde das Gen *complementary sex determiner* (*csd*) als primäres Signal der haplo-diploiden Geschlechtsbestimmung bei *Apis mellifera* isoliert und molekular charakterisiert. Damit konnte erstmalig ein Beitrag zum Verständnis der komplementären Geschlechtsbestimmung auf molekularer Ebene geliefert werden.

Die Isolierung erfolgte durch die schrittweise Annäherung an den Sex-Locus auf genomischer DNA-Ebene. Im Verlaufe dieser Positions-Klonierung konnten 70 kb der hoch instabilen Sex-Locus Region isoliert und durch die Etablierung von vier neuen, an den Sex-Locus gekoppelten Markern feinkartiert werden. Es wurde gezeigt, dass die Feinkartierung in der Sex-Locus Region mit einer Auflösung von $5 \text{ kb} \pm 2,5 \text{ kb}$ (95% Konfidenz-Intervall) möglich ist.

csd kodiert ein Arginin-Serin reiches Protein, welches kontinuierlich ab dem frühen Embryonalstadium exprimiert ist. Die funktionelle Analyse von *csd* mit der für die Honigbiene neu etablierten RNAi-Technik belegte den primären Signalcharakter von *csd*. Die Repression von *csd* in weiblichen Bienenembryonen bewirkt die Entwicklung männlicher Gonaden, wohingegen in männlichen Bienenembryonen kein Effekt auf die Gonadenentwicklung zu verzeichnen ist. Damit konnte nachgewiesen werden, dass in *csd*-heterozygoten Individuen ein funktionelles Produkt codiert wird, welches zu weiblicher Differenzierung führt. Der hemizygote Zustand von *csd* in männlichen Individuen resultiert in einem nichtfunktionellen *csd*-Produkt.

Erstmalig wurden geschlechtsbestimmende Allele von *Apis mellifera* isoliert und ihre DNA-Sequenz ermittelt. Dabei konnten über eine Genealogie von *csd*-Allelen und durch die Analyse von synonymen und nichtsynonymen Nukleotidunterschieden Hinweise auf balancierende Selektion gefunden werden. Auffällig war die außerordentlich hohe Aminosäurediversität der *csd*-Allele, die sich in zwei deutlich voneinander abzugrenzenden Gruppen (Haplotyp I und II) unterteilen. Charakteristisch für *csd*-Allele des Haplotyps I ist eine hypervariable Asparagin-Thyrosin reiche Region, die möglicherweise entscheidende Bedeutung für die Allelspezifität besitzt. Einzelne Proteinregionen wurden ermittelt, in denen positive Selektion zu häufigeren Änderungen von Aminosäuren in *csd* führt. Der phänotypisch sichtbare Vorteil der diploiden Individuen, die am Sex-Locus heterozygot sind, ist somit erstmalig auf molekularer Ebene nachgewiesen worden.

Der Einfluß der Selektion an *csd*-Allelen wird auch im angrenzenden genomischen Bereich deutlich. So zeigten an *csd* gekoppelte neutrale Loci eine erhöhte Nukleotid-

diversität, die jedoch mit größerer Distanz zu *csd* stark abnimmt ('hitchhiking'-Effekt). Diese Abnahme ist durch die ungewöhnliche hohe Rekombinationsrate in der Sex- Locus Region erklärbar, welche über die in dieser Arbeit entwickelte Feinkartierungs-Strategie ermittelt wurde. Die Rekombinationsrate in der Sex-Locus Region steigt innerhalb von nur 30 kb um das 3,8-fache der genomweiten Rekombinationsrate auf 50 cM/Mb in 4 kb Distanz zu *csd*. Dies deutet auf eine Entkopplung der *csd*-Allele von dem angrenzenden Chromosomenabschnitt hin. Desweiteren wurden Hinweise gefunden, daß in *csd* auch intragenetische Rekombination stattfindet. Der Nachweis von Rekombination zwischen *csd*-Allelen konnte durch die Detektion von Nukleotidfragmenten erbracht werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Objekte rekombinogener Ereignisse waren. Dadurch wird die Hypothese, dass Rekombination durch Neukombination von Sequenzmotiven zu einer Erhöhung der Alleldiversität beiträgt, unterstützt. Die heterogene Verteilung der Nukleotidpolymorphismen in Haplotyp I *csd*-Allelen ist ein weiterer Hinweis darauf, dass intragenetische Rekombination einen großen Einfluß auf die Evolution von geschlechtsbestimmenden Allelen der Honigbiene besitzt.

Erklärung über den persönlichen Anteil an den Publikationen und Manuskripten

Im folgenden ist der Anteil meiner praktischen Arbeit präsentiert, die zu Ergebnissen in den aufgeführten Publikationen und Manuskripten führte:

- 2.1. Diese von mir verfaßte Veröffentlichung beruht auf Experimenten, die ausschließlich von mir durchgeführt wurden, wobei Dr. Martin Beye beratend zur Seite stand. Die Etablierung der Inzuchtkreuzung erfolgte durch M. K. Fondrk.
- 2.2. Diese Veröffentlichung resultiert aus Experimenten, die von Dr. Martin Beye und mir konzipiert wurden. Der überwiegende Teil der Experimente wurde von mir (chromosomaler 'walk', Entwicklung genetischer Marker, Feinkartierung, Hybridisierungen, RACE-Experimente, dsRNA-Synthesen) bzw. ein Teil zusammen mit Dr. M. Beye (Sequenzannotierungen, Klonierung von *csd*, RNAi-Experimente) durchgeführt.
- 2.3. Diesem von mir geschriebenen Manuskript liegen Experimente zugrunde, die zum Teil von Dr. M. Beye initiiert worden sind. Der wesentliche Anteil (Isolierung verschiedener *csd*-Allele aus vier *A. mellifera* Populationen, Auswertung der Daten) wurde von mir erarbeitet.
- 2.4. Das Manuskript wurde von mir verfaßt und beruht überwiegend auf Experimenten, die ich selbst konzipiert und durchgeführt habe. Einen Teil der zur Nukleotiddiversitäts-Bestimmung verwendeten Loci wurden durch Rayko Becher amplifiziert.
- 2.5 Die Experimente dieser Veröffentlichung wurden von Dr. M. Beye konzipiert. Durch mich erfolgte der Nachweis der unterschiedlichen *engrailed* Proteinexpression in den *ben*-injizierten Bienenembryonen mittels Antikörperfärbungen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt sowie keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und diese als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 25.09. 2003

Martin Hasselmann

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Hasselmann
Geburtstag: 09.07.1972
Geburtsort: Weimar
Nationalität: deutsch

Schulausbildung:

1979 – 1989 Polytechnische Oberschule in Weimar und Schwerin
Abschluß: sehr gut
1989 – 1991 Erweiterte Oberschule Friedrich Schiller Weimar (Abitur)
Abschluß: sehr gut

Zivildienst:

1991 – 1992 Umweltamt der Stadt Weimar

Hochschulausbildung:

1992–1999 Studium Diplom-Biologie an der Friedrich Schiller Universität Jena
1996–1997 Auslandsaufenthalt (ERASMUS-Programm):
Studium an der Universidad Autonoma de Madrid (Spanien)
1998–1999 Diplomarbeit “Molekulare Marker in der Zoogeographie - *Nebria castanea* BONELLI, 1810 (Coleoptera: Carabidae) als ein mögliches Relikt im außeralpinen Mitteleuropa”
Abschluß: sehr gut
seit Okt. 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Zoologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, AG Molekulare Ökologie (Prof. Dr. R. F. A. Moritz),
Promotionsarbeit im DFG-Projekt von Dr. M. Beye
Okt.-Dez. 1999 Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. R. E. Page an der UC Davis (Kalifornien)
Mai-Juni 2002 Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. S. W. Omholt, Agricultural University Norwegen