

**Untersuchungen zur genetischen Grundlage der haplodiploiden  
Geschlechtsbestimmung und des sozialen Verhaltens**

Habilitationsschrift



zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Martin Beye

geb. am 20.04.65 in Bad Kreuznach

Gutachter/in

1. Prof. Dr. Gunter Reuter
2. Prof. Dr. Rolf Nöthiger
3. Prof. Dr. Diethard Tautz

Halle/Salle, den 20.10.2004

**urn:nbn:de:gbv:3-000007945**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007945>]

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einführung.....	1
2. Die komplementäre Geschlechtsbestimmung: Ein historischer Rückblick.....	4
3. Identifizierung der geschlechtsbestimmenden Region in der Honigbiene.....	6
4. Isolierung der geschlechtsbestimmenden Region.....	7
5. Identifizierung und Charakterisierung des <i>complementary sex determiner</i> Gens.....	8
6. Folgerungen für die Evolution von Mechanismen der Geschlechtsbestimmung .....	9
7. Signaturen von Selektion in den Sex-Allelen der Honigbiene.....	10
8. Genetische Komponenten des sozialen Verhaltens.....	11
9. Resümee und Ausblick.....	13
10. Literaturverzeichnis.....	13
11. Der Habilitation zugrundeliegende Veröffentlichungen in chronologischer Reihenfolge...	20
Erklärung über den persönlichen Anteil an den wissenschaftlichen Publikationen zur Habilitationsschrift.....	22
 Lebenslauf	
 Danksagung	
 Eidesstattliche Erklärung	

## 1. Einführung

Unterschiede zwischen den Geschlechtern sind ein elementares Phänomen im Tierreich und faszinieren die Menschheit schon seit den frühesten Zeugnissen menschlicher Kultur. Fast ebenso alt sind Erklärungsversuche für die Ursachen der Geschlechtsausprägung, die schon bei Aristoteles Erwähnung finden. Dabei beschränken sich diese Geschlechtsunterschiede nicht nur auf die äußerlich erkennbaren Merkmale, sondern sie haben für den Organismus weitreichende physiologische, anatomische und verhaltensbiologische Konsequenzen. Die tiefgreifenden Verwandlungen der beiden Geschlechter, die in einem undifferenzierten Ei ihren Anfang nimmt, zeigt, dass hier fundamentale Entwicklungs- und Steuerungsprozesse am Werk sind. Die Entscheidung einer männlichen oder weiblichen Entwicklung wird durch ein geschlechtsspezifisches, initiiertes Signal bestimmt, dessen Wirkungsweise als geschlechtsbestimmender Mechanismus bezeichnet wird.

Die männliche und weibliche Entwicklung ist ein Allgemeines Prinzip im Tierreich, jedoch sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Geschlechtsbestimmung sehr divers. Dies widerspricht zunächst Vorstellungen, dass fundamentale Entwicklungsprozesse über verschiedene phylogenetische Distanzen konserviert sein müssen (Raff, 1996). Umweltbedingte Faktoren wie z.B. die Außentemperatur oder aber genetische Faktoren können das Geschlecht bestimmen (Bull, 1983; Bell, 1982). Bekannte Beispiele für umweltbedingte Geschlechtsbestimmung finden wir in den Tiergruppen der Krokodile und Schildkröten, bei denen die Temperatur in einer kritischen Phase der Embryonalentwicklung das initiale Signal für die Geschlechtsbestimmung ist. Im Fall der genetischen Geschlechtsbestimmung konnten genetische Elemente als Ursache für die unterschiedliche geschlechtliche Differenzierung identifiziert werden. Beispielhaft sind hier die Geschlechtschromosomen zu nennen, die geschlechtsspezifisch vererbt werden. In vielen Organismen ist das Männchen das heterochromatische Geschlecht. Das Männchen vererbt in den meisten Säugern und einigen Insekten ein geschlechtsspezifisches Chromosom, das Y-Chromosom (Goodfellow and Lovell-Badge, 1993; Marin and Baker, 1998). Bei Schmetterlingen und bei Vögeln hat das Weibchen ein zusätzliches heterochromatisches Chromosom, das Z-Chromosom. Ferner gibt es Mechanismen, in denen autosomale und maternale Faktoren das Geschlecht bestimmen (Traut, 1994; Dobson and Tanouye, 1998; Dubendorfer et al., 2002). In ungefähr 20% aller Tierarten entstehen Männchen aus unbefruchteten, Weibchen aus befruchteten Eiern (Crozier and Pamilo, 1996). Dazu zählen Organismen sehr unterschiedlicher Tiergruppen, so u.a. die Milben, (Acarina), Fransenflügler (Thysanoptera), eine Untergruppe von Rädertierchen (Monogononta) und die Insektenordnung der Hautflügler (Hymenoptera) (Bell, 1982; Crozier and Pamilo, 1996).

Die genetische Grundlage der Geschlechtsbestimmung ist in drei Modellsystemen, der Taufliege *Drosophila melanogaster*, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und einigen Säugern verstanden (Goodfellow and Lovell-Badge, 1993; Hodgkin, 1992; Cline and Meyer, 1996; Cline, 1993), die zu Paradigmen molekularer Steuerungsprozesse geworden sind (Schutt and Nothiger, 2000; Raff, 1996). Obwohl alle diese Organismen durch das Auftreten

geschlechtsspezifischer Chromosomen gekennzeichnet sind, ist die Wirkungsweise der Geschlechtschromosomen unterschiedlich. In den Säugern entscheidet die Präsenz oder die Abwesenheit des Y-Chromosoms über das Geschlecht. Im Falle von *D. melanogaster* und *C. elegans* ist das Verhältnis der X-Chromosomen zu den Autosomen das initiale Signal für die geschlechtliche Differenzierung. Das Y-Chromosom spezifische Gen *Sry* der Maus und des Menschen ist das entscheidende Signal für die männliche Entwicklung (Sinclair et al., 1990). Die Wirkungsweise von *Sry* ist die eines dominanten geschlechtsbestimmenden Faktors auf dem Y-Chromosom, der den männlichen Entwicklungsweg über die Testisbildung und der daraus folgenden Hormonproduktion initiiert. Die direkte Wirkungsweise auf nachfolgende Gene ist hier jedoch kaum verstanden. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Insulin-Signal-Reaktionsweg bei der männlichen Differenzierung beteiligt ist (Nef et al., 2003). Das primäre Signal in *D. melanogaster* und *C. elegans* ist sehr komplex, da eine Vielzahl von Genen das X:A-Verhältnis (Geschlechtschromosomen zu Autosomen) bestimmen (Übersicht siehe (Cline und Meyer, 1996)). In *Drosophila* entscheidet das Verhältnis der Numerator-Gene auf dem X-Chromosom und Denominator-Gen(e) auf den Autosomen über die Aktivierung eines einzigen Schlüsselgens *Sexlethal (Sxl)*. Bisher konnten fünf Gene mit numeratorischen Eigenschaften (*sisterless A*, *sisterless B*, *sisterless C*, *runt* und *Sxl*) und ein Denominatorgen, *deadpan*, isoliert werden (Cline, 1993; Cline, 1988; Duffy und Gergen, 1991; Parkhurst et al., 1990; Torres und Sanchez, 1989; Younger-Shepherd et al., 1992) . Die Transkriptionsfaktoren zeigen eine extrem nichtlineare Dosisantwort und einige Forscher befürworten ein Titrationsmodell mit Heterodimerisierung (Parkhurst und Ish-Horowicz, 1992) . Andere schlagen multiple Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren am *Sxl*-Promotor vor (Estes et al., 1995). Im Wurm *C. elegans* konnten bis heute zwei Numerator-Gene auf dem X-Chromosom, *fox-1* und *sex-1*(Hodgkin et al., 1994; Akerib und Meyer, 1994), aber kein Denominator-Gen identifiziert werden. Beide haben eine direkte Wirkung auf ein einziges Schlüssel-Gen *xol-1*. *sex-1* beeinflusst die Transkription von *xol-1*, während *fox-1* *xol-1* über die posttranskriptionelle Ebene reguliert (Goodwin and Ellis, 2002).

Die molekulare Analyse der Geschlechtsbestimmung kann zu zwei grundlegenden biologischen Prozessen einen Beitrag leisten (Graham et al., 2003; Marin und Baker, 1998). Zum einen gibt der Prozess Einsicht, wie Entscheidungsvorgänge zwischen zwei alternativen Reaktionswegen molekular gesteuert werden. Steuerungs- und Entscheidungsprozesse sind entwicklungsbiologische Grundprozesse und sind für die Differenzierung eines Organismus von entscheidender Bedeutung. Die Vielfalt der Mechanismen der Geschlechtsbestimmung eröffnet andererseits die Möglichkeit zu verstehen, wie sich die Steuerungsprozesse und die Regulationskaskaden im Laufe der Evolution differenziert haben (Schutt und Nothiger, 2000). Möglicherweise lassen sich an einem solchen Modellsystem Prinzipien erkennen, die für die Evolution von entwicklungsbiologischen Prozessen und der Vielfalt von Phänotypen von Bedeutung sind. Bisher konnte keine Ähnlichkeit zwischen den initialen Signalen und nachgeschalteten Genen der verschiedenen Modellorganismen gefunden werden, die

Aufschluss über einen molekularen Entstehungsprozess geben könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Geschlechtsbestimmung in einem haplodiploiden Mechanismus untersucht. Bisher war über den molekularen Steuerungsmechanismus in einem solchen System nichts bekannt. Die genetische Grundlage der Haplodiploidie ist bestens in einigen Hymenopterenarten (Bienen, Ameisen, Wespen und Schlupfwespen) verstanden (Cook, 1993). Hier bestimmt ein einzelner geschlechtsbestimmender Locus (Sex-Locus) das Geschlecht (komplementäre Geschlechtsbestimmung). Der Locus liegt in mehreren Allelen in einer Population vor. In den unbefruchteten haploiden Eiern liegt nur ein Allel vor (Hemizygotie) und es entstehen Männchen. Aus den befruchteten Eiern entstehen Weibchen, da zwei unterschiedliche Allele vorliegen. Liegen jedoch in einem befruchteten Ei zwei gleiche Allele vor, wie z.B. in Fällen der Inzucht, entstehen diploide Männchen. Der Nachweis von diploiden Männchen (Whiting, 1943) zeigte, dass nicht der physiologische Vorgang der Befruchtung, sondern die Komposition der Allele geschlechtsbestimmend ist.

In der vorliegenden Arbeit wird die molekulare Basis der komplementären Geschlechtsbestimmung in der Honigbiene, *Apis mellifera*, aufgeklärt. Da die Honigbiene kein genetischer Modellorganismus ist, mussten im Laufe der Arbeit Techniken und Strategien entwickelt werden, die eine Identifizierung und Charakterisierung des geschlechtsbestimmenden Locus ermöglichen. Die Analyse der komplementären Geschlechtsbestimmung ist eine Voraussetzung, um die Funktionsweise und Struktur der zugrundeliegenden genetischen Elemente direkt mit dem genetischen Modellsystem *Drosophila* zu vergleichen. Damit können sehr unterschiedliche Mechanismen (Haplodiploidie versus chromosomale Geschlechtsbestimmung) verglichen werden, die in kürzeren evolutionären Zeiträumen entstanden sind, als die bisher untersuchten Mechanismen.

Entscheidungsprozesse finden nicht nur in entwicklungsbiologischen Prozessen statt, sondern sie sind auch auf der Ebene des instinktiven individuellen Verhaltens zu finden. In sozialen Insekten-Kolonien sind instinktive Entscheidungsprozesse besonders eindrucksvoll. Schließlich ist es nur durch die koordinierte Tätigkeit vieler tausender Individuen möglich, komplexe Aufgaben wie den Nestbau, das Sammeln und Speichern von Nahrung und die Brutpflege zu bewerkstelligen (Wilson, 1971). Ein weit verbreitetes und charakteristisches Phänomen dieser vielfältigen Tätigkeiten in Insektenkolonien ist die Arbeitsteilung. Dabei werden bestimmte Tätigkeiten nur zu einem bestimmten Zeitpunkt von bestimmten Individuen verrichtet. Das Alter der Biene ist eine Komponente für die verschiedenen Tätigkeiten und Verhaltensweisen im Bienenvolk (Winston, 1987). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass es jedoch auch genetische Komponenten für die Arbeitsteilung gibt (Robinson und Page, 1988; Frumhoff und Baker, 1988). Wann und wie viele Individuen eine dauerhafte Sammlertätigkeit aufnehmen, oder ob sie Arbeiten im Stock verrichten, ist für die Homeostase des Bienenvolkes wichtig. In einer ersten umfassenden Analyse habe ich mit anderen Autoren die quantitativ genetischen Komponenten für das Einsetzen des Sammelverhaltens der

Honigbiene bestimmt. Ferner wurde untersucht, wie die einzelnen genetischen Komponenten in unterschiedlichen Kombinationen zusammenwirken können. In weiteren Arbeiten konnte ein Entscheidungsphänomen sozialer Organisation, die Nestgenossenerkennung, untersucht werden. Soziale Insekten sind in Kolonien organisiert und müssen zum Schutz ihrer Ressourcen nesteigene von nestfremden Individuen erkennen und abwehren können (Crozier und Pamilo, 1996). Da Umweltkomponenten, wie Nestmaterial, eine wichtige Einflussgröße auf die Nesterkennung haben (Breed, 1983; Hölldobler und Wilson, 1990; Jutsum et al., 1979), wurden nicht Honigbienen, sondern Waldameisen in ihren natürlichen Habitaten für die Untersuchungen der Nesterkennung eingesetzt. Die vorliegende Arbeit analysiert, ob genetische Komponenten für eine Nesterkennung unter natürlichen Bedingungen der hügelbauenden Waldameise *Formica* wirksam sind.

## **2. Die komplementäre Geschlechtsbestimmung: Ein historischer Rückblick**

Den Erklärungsversuchen für die Geschlechtsbestimmung der Neuzeit fehlten zunächst das zugrundeliegende genetische Konzept und so wurden Umwelteinflüsse, wie Mondphasen, für die Geschlechtsbestimmung verantwortlich gemacht. Den ersten wissenschaftlich fundierten Erklärungsversuch der Geschlechtsbestimmung konnte der schlesische Pfarrer Johann Dzierzon, der ein Zeitgenosse Gregor Mendels war, bereits 1845 liefern (Dzierzon, 1845). Beobachtungen an der Honigbiene und nachfolgende Experimente zeigten, dass aus unbefruchteten Eiern Männchen und aus befruchteten Eiern Weibchen entstehen.

Der erste zytologische Nachweis von Chromosomen führte Anfang des 20. Jahrhunderts in einigen Insekten zur Entdeckung von geschlechtsspezifisch vererbten Chromosomen, den Geschlechtschromosomen (McClung, 1902; Wilson, 1905). Darauf aufbauende Arbeiten konnten die präzise Natur des genetischen Balance-Systems in *Drosophila* aufdecken (Bridges, 1916). Dabei ist das Verhältnis der X-Chromosomen zu den Autosomen, und nicht das Y-Chromosom, das entscheidende geschlechtsspezifische Signal. Zytologische Arbeiten in der Honigbiene konnten zeitgleich zeigen, dass die unbefruchteten Eier haploid sind und 16 Chromosomen haben, während die befruchteten Eier, die sich zu Weibchen entwickeln, diploid sind und 32 Chromosomen besitzen (Nachtsheim, 1916).

Obwohl Geschlechtschromosomen in den folgenden Jahren in verschiedenen Organismen gefunden wurden, konnten sie kein Erklärungsmodell für die haplodiploide Geschlechtsbestimmung sein. Denn die haploiden Männchen haben keinen Vater und erhalten einen zufälligen Anteil des Genoms der Mutter, was mit einer geschlechtsspezifischen Vererbung von Geschlechtschromosomen nicht übereinstimmen kann. Dieser grundlegende Unterschied war bereits Bridges, dem Entdecker des genetischen Balance-Systems der Geschlechtsbestimmung in *Drosophila* bekannt, als er schrieb „To me sex determination in the bee is the outstanding unsolved puzzle ...“ (Bridges, 1925).

Heute wissen wir, dass die haplodiploide Geschlechtsbestimmung nicht nur auf die Honigbiene beschränkt, sondern in ungefähr 20% aller Tierarten verwirklicht ist. Die

Haplodiploidie ist in so unterschiedlichen Tiergruppen wie den Milben (Acarina), Mottenschildläusen (Aleyroidea), einigen Schildläusen (Coccoidea, Margarodidae), Fransenflüglern (Thysanoptera), einigen Borkenkäfern (Scolytidae) und einer Untergruppe von Rädertierchen (Monogononta) verwirklicht und charakterisiert die Insektenordnung der Hautflügler (Hymenoptera) mit über 200.000 Arten (Bull, 1983; Bell, 1982; Crozier und Pamilo, 1996).

Erst Arbeiten von Whiting (Whiting, 1943) entdeckten in der Wespe *Bracon hebetor* in spezifischen Inzuchtkreuzungen diploide Männchen. Entsprechend gekoppelte phänotypische Marker waren ein Beweis dafür, dass die diploiden Männchen homozygot am geschlechtsbestimmenden Locus waren. Es ist aus heutiger Sicht zunächst überraschend, warum der komplementäre Mechanismus nicht zuerst in der Honigbiene nachgewiesen werden konnte, dem gängigsten Hymenopteren-Modell. Entsprechende Kreuzungen in der Honigbiene zeigten einen Anteil von Weibchen, der in Übereinstimmung mit dem komplementären Modell war. Jedoch konnten keine diploiden Männchen nachgewiesen werden und Mackensen nahm an, dass diese lethal sein müssten (Mackensen, 1951). Es wurde für die Honigbiene ein alternatives Modell entworfen (Cunha und Kerr, 1957), welches auf einem genetischen Balance-System basiert. Eine Serie von Genen hat dabei einen nicht additiven männlichen Effekt. Des weiteren gibt es eine Anzahl von Genen, die einen additiven Effekt haben und für die weibliche Entwicklung verantwortlich sind. Die Sex-Allele werden unter diesem Modell als das Hauptgen der weiblichen Entwicklung interpretiert. Spätere Arbeiten von Woyke konnten zeigen, dass die diploiden Männchen auch in der Honigbiene überlebensfähig sind, jedoch von den Arbeiterinnen kurz nach dem Schlupf aus dem Ei gefressen werden (Woyke, 1965a; Woyke, 1965b; Woyke, 1963). Der komplementäre Mechanismus konnte inzwischen in den verschiedensten Gruppen der Hymenopteren nachgewiesen werden und wird als der phylogenetisch ursprüngliche geschlechtsbestimmende Mechanismus in den Hymenopteren angesehen (Cook, 1993). Es gibt jedoch auch Ausnahmen der komplementären Geschlechtsbestimmung in Gruppen, die aufgrund ihres Lebenszyklus dauerhaft Inzucht betreiben (Cook, 1993). Hier werden andere Modelle der Geschlechtsbestimmung diskutiert, so z.B. „genetic imprinting“ Mechanismen (Dobson und Tanouye, 1998; Beukeboom, 1995).

Homozygote Individuen am Sex-Locus können keine fertilen Nachkommen erzeugen (Crozier and Pamilo, 1996). Im Fall der Honigbiene werden die diploiden Männchen direkt nach dem Schlupf aus dem Ei von den Arbeiterinnen aufgefressen. Die Selektion wird im Laufe der Evolution viele Allele an diesem Locus generieren, da sie zu weniger diploiden Männchen in einer Population führen werden. Dieser, als diversifizierende Selektion bezeichneter Vorgang, wurde zuerst am S-Locus von Pflanzen nachgewiesen und zeigt das direkte Wirken von Selektion in Populationen (Wright, 1939). Die geschlechtsbestimmenden Allele sind neben den S-Allelen (Charlesworth, 2002) ein klassisches Beispiel für diversifizierende Selektion, bei der verschiedene funktionelle Allele an einem Locus im Laufe der Evolution erhalten bleiben (Kimura und Crow, 1964; Yokoyama und Nei, 1979). Bis zu 19 Sexallele segregieren in natürlichen Populationen der Honigbiene (Adams et al., 1977; Page, Jr.

et al., 2002).

Die allelische Wirkungsweise und der „Single Locus“-Charakter des Sex-Locus ist ein attraktives System, um molekulare Steuerungsmechanismen und selektive Vorgänge auf molekularer Ebene zu studieren. Es ist überraschend, wenn man allein die über 3000 publizierten wissenschaftlichen Arbeiten zur Geschlechtsbestimmung von *D. melanogaster* zugrundelegt, wie wenig über die komplementäre Form der Geschlechtsbestimmung bekannt ist. Die fehlenden genetischen Techniken, Ressourcen und ein fehlendes Hymenopteren-Modellsystem können nur teilweise diese offensichtliche Wissenslücke erklären.

### **3. Identifizierung der geschlechtsbestimmenden Region in der Honigbiene**

Nach dem Modell der komplementären Geschlechtsbestimmung entstehen Weibchen, wenn der Sex-Locus heterozygot ist. Männchen entwickeln sich aus haploiden Eiern, da sie nur ein Sex-Allel tragen und hemizygot sind. Diploide Männchen entstehen jedoch aus befruchteten Eiern, wenn der Sex-Locus homozygot ist, wie dies z.B. in Fällen von Inzucht auftreten kann. Die diploiden Männchen der Honigbiene können sich nicht reproduzieren, da sie kurz nach dem Schlupf aus dem Ei von Arbeiterinnen aufgefressen werden.

Ich konnte bereits während meiner Promotionsarbeit einen genetischen Marker identifizieren, der mit der diploiden männlichen und weiblichen Entwicklung kosegregiert (Beye et al., 1994). Ausgangspunkt für die Kartierungsanalyse war eine Inzuchtkreuzung, die zu fünfzig Prozent diploide Männchen und Weibchen hervorbrachte (Abb. 1, (Beye et al., 1996)). Der Marker war, in Übereinstimmung mit dem Modell der komplementären Geschlechtsbestimmung, heterozygot in den Weibchen und homozygot in den diploiden Männchen. Durch die Klonierung des Markers (Beye et al., 1996) konnte der Sex-Locus auf dem Chromosom 8 in einer subtelomerischen Region lokalisiert werden (Beye et al., 1996). Dies war die erste Lokalisierung eines Gens auf den Chromosomen der Honigbiene.

Aus den Sequenzen des Z-Markers wurde ein STS („sequence tagged site“) Marker entwickelt (Beye et al., 1998b; Moritz et al., 1998). Eine Inzuchtkreuzung wurde etabliert, in denen zwei verschiedene kosegregierende Marker, Z (Beye et al., 1996) und Q (Hunt und Page, 1994), relativ zueinander kartiert werden konnten. Die Analyse von mehr als 350 meiotischen Ereignissen ergab, dass beide Marker den Sex-Locus flankieren, was den Sex-Locus eindeutig eingrenzt (Beye et al., 1999b). Der physikalische Abstand beider Marker wurde mittels „Pulsed-Field Gel Electrophoresis“-Kartierung ermittelt. Für die Erstellung einer physikalischen Karte wurde eine Methode entwickelt und optimiert, um hochmolekulare DNA (> 1Mb) aus Honigbienen zu isolieren (Beye et al., 1999a), da verschiedene Isolierungsmethoden, die bei *Drosophila* angewendet werden, bei der Honigbiene fehlschlagen. Eine detaillierte Restriktionskarte der geschlechtsbestimmenden Region konnte anhand von fünf Restriktionsenzymen erstellt werden (Beye et al., 1999b). Die Marker Z und Q haben einen Abstand von 360 kb. Daraus ergibt sich ein Verhältnis von physikalischer zu genetischer Distanz von 44kb/cM, welches höher ist als die genomweite Rekombinationsrate (Hunt und Page, Jr., 1995). Diese lokal erhöhte Rekombinationsrate konnte ich auch anhand

der Verteilung von genetischen Abständen zufällig erzeugter Marker der Kopplungsgruppe III nachweisen (Beye et al., 1999b). Die genetischen Abstände der Marker waren in der Sex-Locus Region signifikant gegenüber dem Rest der Kopplungsgruppe erhöht. Aus diesen Ergebnissen habe ich postuliert, dass eine erhöhte Rekombinationsrate in der Sex-Locus Region im Laufe der Evolution positiv selektiert sein könnte, damit benachbarte, kosegregierende Genbereiche von dem Einfluss der diversifizierenden Selektion am Sex-Locus entkoppelt werden. Dies wäre ein direkter Nachweis für das theoretische Modell einer lokal erhöhten Rekombinationsrate, welches von Strobeck und Mitarbeitern entwickelt wurde (Strobeck et al., 1976). Damit könnte die strenge Selektion an einem bestimmten Gen die Rekombinationshäufigkeit beeinflussen. Eine alternative Hypothese ist, dass Rekombination innerhalb des Gens einen selektiven Vorteil hat, da so schneller nachteilige Mutationen im Gen aus einer Population entfernt werden könnten (Beye et al., 1999b). Dies entspricht den aktuellen Modellen, die aus dem „Mullers ratchet“ entwickelt wurden (Kondrashov, 1988). Inzwischen konnte durch direkte Messung nachgewiesen werden, dass die Rekombinationsrate in der benachbarten Region des Sex-Locus extrem ansteigt (Hasselmann & Beye, unpublizierte Ergebnisse). Damit würde vieles für das Modell der Entkopplung sprechen. In der Genomregion des MHC-Komplexes (Hughes, 1999), der auch einer diversifizierenden Selektion unterliegt, konnte im Gegensatz zur Sex-Locus Region eine Reduzierung der Rekombinationsrate nachgewiesen werden (O’Hugin et al., 2000). Möglicherweise ist die deutlich geringere Selektion gegenüber den homozygoten Individuen am MHC-Komplex Ursache für die fehlende Erhöhung einer lokalen Rekombinationsrate. Dieser Vergleich würde demzufolge die Hypothese des starken adaptiven Wertes der erhöhten Rekombination in der Sex-Locus Region der Honigbiene unterstreichen, da hier die diversifizierende Selektion um ein Vielfaches stärker ist.

Die detaillierte genetische und physikalische Kartierung der Sex-Locus Region war die grundlegende Voraussetzung für die Klonierung des geschlechtsbestimmenden Gens.

#### **4. Isolierung der geschlechtsbestimmenden Region**

Die Isolierung der geschlechtsbestimmenden Region erfolgte über einen chromosomalen „Walk“. Zunächst wurde eine genomische Bank in Form des „Reference library“ Systems etabliert. Das „Reference library“ System erlaubt den freien Austausch von biologischem Material und den dazu gehörigen Informationen, da sowohl der genetische Klon als auch die zugehörige Information zentral verwaltet wird (Zehetner und Lehrach, 1994). 110.000 Klone wurden gepickt, in entsprechenden „microplates“ vermehrt und später auf Filtermembranen aufgetragen (Beye et al., 1998c). Die Bank entspricht einer zweiundzwanzigfachen Genomabdeckung, was ich durch eine entsprechende Überprüfung anhand von „single copy“ Sequenzen bestätigen konnte (Beye et al., 1998c). Unsere Bank wurde dem Ressourcenzentrum (Berlin) angegliedert (siehe <http://www.rzpd.de/>). Sie ist damit der wissenschaftlichen Gemeinschaft frei zugänglich gemacht worden. Dies war die erste frei zugängliche Genom-Bank der Honigbiene. Inzwischen konnte ein weiteres Referenzsystem

für die Honigbiene etabliert werden (Whitfield et al., 2002).

Jedoch konnte aus 110.000 Klonen kein Cosmid isoliert werden, das den Q-Marker enthält. Genomische Klone, die den Z-Marker enthielten konnten dreimal identifiziert werden. Q sollte als Ausgangspunkt für den chromosomalen „walk“ dienen, da Q genetisch sehr viel näher am Sex-Locus liegt als der Z-Marker. Damit sind die beiden Marker in der Cosmid-Bank eindeutig unterrepräsentiert (Beye et al., 1998c). Die ersten Klone, die den Q-Marker enthielten, konnten aus einer partiellen Lambda-Bank isoliert werden. Diese Bank wurde aus dem *Sma* I Sex-Locus Fragment (Beye et al., 1999b) erstellt, welches aus dem PFGE-Gel angereichert wurde. Die partielle Bank war Ausgangspunkt für die Isolierung der geschlechtsbestimmenden Region durch einen chromosomalen „walk“ (Beye et al., 2003). Die erfolgreiche Näherung zum Sex-Locus konnten wir anhand von neu etablierten Markern überprüfen (Hasselmann et al., 2001). Es wurde eine genomische Region zwischen zwei Markern identifiziert, die in 1000 Weibchen immer heterozygot war. Die Assoziation von Geschlecht und genetischen Markern konnte ich mit einer Genauigkeit von 5 kb auf Sequenzebene nachweisen. Daraus folgerte ich, dass zumindest ein Teil des Gens in der identifizierten Region liegen sollte. Diese Region wurde vollständig sequenziert.

## **5. Identifizierung und Charakterisierung des *complementary sex determiner* Gens**

Die Aminosäuresequenzen von potentiellen ORFs („open reading frame“) der Nukleotid-Sequenz zeigten keine Ähnlichkeiten zu Proteinen in den verschiedenen Datenbanken. Potentielle Exone wurden anhand der Nukleotidsequenz und entsprechenden Algorithmen vorhergesagt (Baxevanis und Oulette, 2001) und mit Hilfe der RT-PCR überprüft. Das in der Region identifizierte Transkript wurde aufgrund seiner vorhergesagten Wirkung als *complementary sex determiner* (*csd*) bezeichnet. Die *csd* Transkripte treten in mehreren allelischen Varianten auf (Abb. 5, (Beye et al., 2003)). Die vorhergesagte Aminosäuresequenz ist in vier Allelen in nur 40,7% der Positionen im C-terminalen und 70,3% der Positionen im N-terminalen Bereich identisch. Der variable Bereich kodiert dabei für eine Arginin (R)-Serin (S)-reiche und eine prolinreiche Domäne. SR-Domänen haben eine wichtige Funktion in der Spleißregulation (Graveley, 2000), jedoch konnten keine Transkriptionsunterschiede in Männchen und Weibchen nachgewiesen werden. Die Abfolge von einer RS- und einer prolinreichen Domäne zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu dem TRA-Protein von *Drosophila* (Butler et al., 1986). Das *tra*-Gen ist ein wichtiges Glied in der primären geschlechtsbestimmenden Regulationskaskade (Cline und Meyer, 1996) und steuert das alternative Spleißen des untergeordneten *dsx*-Gens (Tian und Maniatis, 1993; Hoshijima et al., 1991). CSD fehlt jedoch eine konservierte Domäne, die alle TRA-orthologen Proteine charakterisiert (Abb. 3B; (Beye et al., 2003; Pane et al., 2002)). *tra*-Transkripte in *Drosophila* zeigen im Gegensatz zu den *csd*-Transkripten ein geschlechtsspezifisches Spleiß-Muster (Boggs et al., 1987).

Funktionelle Analysen des *csd*-Gens wurden mit Hilfe der RNA „interference“ Technik durchgeführt (Fire et al., 1998; Kennerdell und Carthew, 1998). In einem

Pilotexperiment habe ich zunächst die Anwendbarkeit und Effektivität der Methode in der Honigbiene überprüft (Beye et al., 2002). Untersuchungen am orthologen *engrailed*-Gen konnten zeigen, dass die Wirkung der doppelsträngigen RNA (dsRNA) in der Honigbiene spezifisch ist und zu einer reduzierten Expression des entsprechenden EN-Proteins führt. Dies war der erste Nachweis einer gezielten und vollständigen Reprimierung eines Gens in der Honigbiene. Die Reprimierung von *csd* in genotypischen Weibchen führte zu einer vollständigen Verwandlung der Gonaden zu Hodengewebe. Die *csd*-RNAi in haploiden Männchen, die nur ein *csd* Allel tragen, hatte keinen Einfluss auf die männliche Gonadendifferenzierung (Beye et al., 2003). Die Funktion von *csd* wird also für die weibliche Entwicklung, nicht jedoch für die männliche Differenzierung benötigt, wobei allein der allelische Zustand von *csd* über das geschlechtliche Schicksal des Eis entscheidet. Ich habe postuliert, dass dieser molekulare Entscheidungsvorgang auf der Ebene der Post-Translation erfolgt. CSD ist aktiv, wenn Polypeptide von verschiedenen Allelen stammen, was eine weibliche Entwicklung initiiert. CSD ist inaktiv, wenn Polypeptide nur einem Allel oder zwei gleichen Allelen entstammen, was eine männliche Entwicklung initiiert.

Das hier isolierte primäre Signal *csd* unterscheidet sich von den bisher untersuchten primären Signalen (Beye et al., 2003): 1.) Der allelische Zustand von einem Gen entscheidet über das Geschlecht. Andere identifizierte primäre Signale hingegen sind genetische Faktoren, die in den Geschlechtern unterschiedlich vorhanden sind (z.B. Gene auf den Geschlechtschromosomen). 2.) Das primäre Signal *csd* ist zugleich ein „switch“-Gen mit einem aktiven (ON) und inaktiven (OFF) Zustand, der die weibliche und männliche Entwicklung bestimmt. In *Drosophila* und *Caenorhabditis* ist diese Schalterfunktion erst auf der nächsten Ebene der Kaskade zu finden (Cline und Meyer, 1996).

## **6. Folgerungen für die Evolution von Mechanismen der Geschlechtsbestimmung**

Obwohl Geschlechtsbestimmung ein fundamentales Prinzip im Tierreich ist, sind die zugrundeliegenden Mechanismen äußerst vielfältig (Marin und Baker, 1998; Schutt und Nothiger, 2000). Die Isolierung von *csd* kann neben der Aufklärung eines molekularen Entscheidungsprinzips auch Aufschluss über eine Entstehungsgeschichte von geschlechtsbestimmenden Mechanismen geben. Bisher konnte keine Überlappung in den primären Signalen in den drei Modellorganismen, der Taufliege *D. melanogaster*, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und dem *Sry* Gen der Säuger nachgewiesen werden, die Aufschluss über eine evolutionäre Entstehungsgeschichte geben könnte (Marin und Baker, 1998). Möglicherweise sind die phylogentischen Distanzen zu groß für einen solchen Nachweis, da die geschlechtsbestimmenden Mechanismen sich im Laufe der Evolution sehr schnell ändern können.

In zwei grundsätzlich verschiedenen Mechanismen der Geschlechtsbestimmung habe ich überraschend eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem primären Signal (*csd*) in der Honigbiene und dem untergeordneten *tra*-Gen der *Drosophila*-Regulationskaskade festgestellt. Die strukturelle Ähnlichkeit von CSD zu TRA lässt es plausibel erscheinen, dass

CSD die selbe Wirkung wie TRA in *Drosophila* hat und *dsx* alternativ spleißen kann (Beye et al., 2003). Entsprechende *dsx* Transkripte konnten auch für die Honigbiene nachgewiesen werden (Becher & Beye, unpublizierte Ergebnisse). Die Ergebnisse von *csd* bestätigen Vorstellungen, dass Geschlechtsbestimmung in Form einer „bottom up“ Evolution entstehen kann. Konservierte, gemeinsame Gene sind weiter unten in der Regulationskaskade zu finden während neu hinzugekommene regulatorische Elemente weiter oben zu finden sind und dabei in jüngerer Zeit der Evolution rekrutiert wurden („bottum-up“ Model der Evolution der Geschlechtsbestimmung (Wilkins, 1995)). Dabei scheint die Geschlechtsbestimmung auf der Ebene von *dsx* in Insekten konserviert zu sein, denn geschlechtsspezifische Transkripte konnten in einer Vielzahl von Insekten mit unterschiedlichen Mechanismen der Geschlechtsbestimmung nachgewiesen werden, so in verschiedenen Dipteren-Arten (*Ceratitis*, *Megaselia*, *Musca*, *Bactocera*) (Schutt and Nothiger, 2000) und im Seidenspinner *Bombyx* (Ohbayashi et al., 2001).

Oberhalb von *dsx* differenzieren sich die Regulationskaskaden von *Drosophila* und *Apis*, was 270 Millionen Jahre getrennter Evolution entspricht. Ein *tra* orthologes Gen konnte außerhalb der Gattung *Drosophila* bisher nur in einer anderen Diptere, *Ceratitis*, isoliert werden (Pane et al., 2002). *Ceratitis* hat kein genetisches Balance-System wie *Drosophila*, und ein nicht näher identifizierter M-Faktor auf dem Y-Chromosom bestimmt hier das Geschlecht (Willhoefft and Franz, 1996). Aktives TRA Protein wird durch einen anderen Mechanismus als in *Drosophila* bereitgestellt. Vermutlich wird aktives TRA-Protein über einen positiven „feedback loop“ erhalten, der das eigene Spleißen steuert (Pane et al., 2002).

Verschiedene Aktivierungsmechanismen von „SR type proteins“ und ihre postulierte Wirkung auf ein konserviertes Gen der geschlechtlichen Differenzierung sind möglicherweise ein Schlüssel für das Verständnis der Diversität von geschlechtsbestimmenden Mechanismen in Insekten (Beye et al., 2003). CSD wird vermutlich durch die allelischen Polypeptide aktiviert, während aktives TRA-Protein in der Taufliege und in *Ceratitis* durch alternatives Spleißen erzeugt wird. Jedoch werden in den beiden Dipteren-Arten unterschiedliche genetische Elemente genutzt. Die Plastizität der Regulierungsmöglichkeiten ermöglicht „SR-type“ Proteinen im Laufe der Evolution sehr verschiedene geschlechtsspezifische Signale zu rekrutieren, die letztendlich zu unterschiedlichen initialen Signalen und geschlechtsbestimmenden Mechanismen geführt haben (Beye et al., 2003).

## **7. Signaturen von Selektion in den Sex-Allelen der Honigbiene**

Komplementäre Geschlechtsbestimmung ist ein klassisches Beispiel für diversifizierende Selektion, bei der genetische Variation an einem Locus aufrechterhalten wird (Kimura and Crow, 1964; Yokoyama and Nei, 1979). Für das *csd*-Gen sind die diversifizierenden selektiven Kräfte bekannt, da alle homozygoten Individuen das Embryonalstadium nicht überleben. Die Populationsdynamik der Sex-Allele hat eine gewisse Analogie zu den Allelen des *S*-Locus („self-incompatibility locus“) der Pflanzen und der „mating types“ der Pilze (Casselton, 2002; Charlesworth, 2002). Im Unterschied zu diesen Loci können sich jedoch

entsprechend homozygote Zellen formieren und die verschiedenen Zustände aktivieren zwei alternative Reaktionswege der geschlechtlichen Entwicklung.

Die ersten cDNA Nukleotidsequenzen versetzten uns in die Lage, die direkte Auswirkung von Selektion auf die Verteilung und Variation von Nukleotidunterschieden zu untersuchen. Die Analyse von 30 variablen cDNA-Sequenzen aus verschiedenen Populationen zeigte eine große Anzahl von Nukleotidunterschieden (Hasselmann und Beye, 2004). Die *csd*-Sequenzen lassen sich infolge der deutlichen Unterschiede in zwei Hauptgruppen unterteilen. Sequenzen des Typs I haben sich in sehr kurzer Zeit in eine Vielzahl unterschiedlicher Allellinien aufgespalten, wie wir anhand der Verteilung „neutraler“ synonyme Substitutionen nachweisen konnten. Typ II-Sequenzen lassen sich ebenfalls in verschiedenen geographischen Herkünften nachweisen. Diese Sequenzen sind jedoch deutlich ähnlicher und zeigen nicht die in Typ I gefundene Aufspaltung in Allellinien.

Unsere Analysen zeigen, dass die Allele über einen langen Zeitraum in der Population erhalten bleiben. Dies ist ein zusätzlicher Beweis für diversifizierende Selektion. Ein solches Ergebnis entspricht theoretischen Erwartungen (Takahata, 1990) und wurde für den *S*-Locus (Vekemans und Slatkin, 1994), den MHC-Komplex (Salamon et al., 1999) und für die „mating types“ von Pilzen (May et al., 1999) nachgewiesen.

Die nicht-synonymen und synonymen Unterschiede in der Nukleotid-Sequenz wurden verglichen. Diese Analyse ermittelte Bereiche in der Sequenz, in denen Aminosäureänderungen gegenüber den „neutralen“ (synonymen) Änderungen im Laufe der Evolution bevorzugt wurden (Abb. 4, (Hasselmann und Beye, 2004)). Diese positiv selektierten Proteinabschnitte kodieren möglicherweise für die Spezifität und die funktionellen Unterschiede der Allele. Es wurden jedoch auch Abschnitte im Protein identifiziert, in denen „neutrale“, synonyme Unterschiede weitaus häufiger vorkommen als Unterschiede in der aminosäurekodierenden Sequenz. Diese Proteinabschnitte haben möglicherweise eine konservierte Funktion in allen Allelen. Dies könnte z.B. die Aktivierung eines untergeordneten Gens der Regulationskaskade sein.

Die positiv selektierten Proteinabschnitte sind Kandidaten, um den allelischen Mechanismus der Gleich- und Ungleich-Erkennung zu verstehen. Die anstehende funktionelle Aufklärung der Proteine wird über die funktionelle Zuweisung der selektierten Proteinabschnitte Aufschluss geben.

## **8. Genetische Komponenten des sozialen Verhaltens**

Die Entscheidung zwischen den alternativen Reaktionswegen der männlichen und weiblichen Entwicklung ist in der Honigbiene eindeutig genetisch bestimmt. Eine komplexere Form der Entscheidungsfindung finden wir auf der Ebene des Verhaltens in sozialen Insekten. Das instinktive Verhaltensrepertoire ist hier besonders komplex, da Tausende von Individuen die soziale Organisation einer Kolonie bestimmen. Die Analyse der einzelnen Komponenten und ihrer Wechselwirkungen spielt daher eine zentrale Rolle für das Verständnis der sozialen Organisationsform (Page, Jr. und Erber, 2002; Page, Jr. et al., 2002). Welche Verhaltensweise

jeweils zur Ausprägung kommt, wird sowohl von Umwelt- als auch von genetischen Komponenten bestimmt. Ein gut untersuchter Entscheidungsprozess ist der Verhaltenswechsel der Stockbiene zur Sammelbiene (von Frisch, 1965; Robinson et al., 1997; Fewell, 2003; Page, Jr. und Erber, 2002; Robinson und Ben Shahaar, 2002). Es konnten bereits erste Kandidaten-Gene identifiziert werden, die möglicherweise eine kausale Verhaltensänderung bewirken können (Whitfield et al., 2003; Ben Shahaar et al., 2002).

In einer ersten umfassenden quantitativen Analyse haben wir die genetischen Komponenten für das Einsetzen des Sammelverhaltens untersucht (Rueppell et al., 2004). Wir konnten feststellen, dass eine große genetische Komponente und eine große genetische Varianz für das Einsetzen des Sammelns existiert. Die beträchtliche genetische Varianz für das Einsetzen des Sammelverhaltens ist zunächst überraschend, da das Sammeln von Futterressourcen eine so wichtige Tätigkeit für die Kolonie darstellt. Möglicherweise haben die genetischen Unterschiede der einzelnen Bienen einen Vorteil auf der Ebene der Kolonie (Rueppell et al., 2004). Nach diesem Modell könnte die Futterrekrutierung der Kolonie durch die genetischen Unterschiede einzelner Bienen besser reguliert werden.

Das Einsetzen des Sammelverhaltens ist mit bereits identifizierten QTLs („quantitative trait loci“) des Pollensammelns (Hunt et al., 1995) assoziiert. Pleiotropie ist eine naheliegende Erklärung für diesen Zusammenhang. Wahrscheinlich werden durch die QTLs zentrale Komponenten des physiologischen Netzwerks beeinflusst, was zu dem gefundenen pleiotropen Effekt führt. Ein ähnlicher Effekt konnte unlängst für den cAMP-abhängigen „second messenger“ Reaktionsweg nachgewiesen werden (Humphries et al., 2003). Vier weitere QTLs konnten identifiziert werden, die nicht nur aus additiven Komponenten bestehen. Die pleiotropen als auch epistatischen Interaktionen zeigen (Wade, 2002), welche komplexe genetische Architektur das Einsetzen des Sammelverhaltens hat.

Eine andere Art der Entscheidungsfindung im Verhalten findet bei der Nesterkennung statt. Soziale Insekten leben in Kolonien und die dort gespeicherten Ressourcen und Nachkommen müssen vor nestfremden Individuen derselben Art geschützt werden. Nesteigene und nestfremde Artgenossen müssen als solche erkannt und mit einem entsprechenden Aggressionsverhalten aus dem Nest vertrieben werden (Crozier und Pamilo, 1996; Waldmann et al., 1988). Genetische Grundlagen der Nesterkennung lassen sich anhand der hügelbauenden heimischen Wald-Ameisen untersuchen, die, anders als die Honigbiene, in ihren natürlichen Habitaten leben. Bisherige Untersuchungen zeigten den enormen Einfluss von Umweltkomponenten auf die Nesterkennung (Breed, 1983; Hölldobler und Wilson, 1990; Jutsum et al., 1979), doch gab es bereits Hinweise für genetische Komponenten unter Laborbedingungen (Stuart, 1987; Carlin und Hölldobler, 1986). In einem Ansatz unter Feldbedingungen wurde die Aggressionsbereitschaft zwischen Nestern von *Formica pratensis* und *Formica polyctena* gemessen und ihre genetische Verwandtschaft bestimmt. Die Aggressionsbereitschaft nimmt dabei mit geringerer genetischer Verwandtschaft zu (Beye et al., 1997; Beye et al., 1998a). Genetisch nah verwandte Tiere, obwohl sie in verschiedenen Nestern leben, sind seltener zueinander aggressiv als weit entfernt verwandte Tiere. Die

genetischen Komponenten der Nestgenosserkennung sind also bei einer höheren Verwandtschaft weniger wirksam, da diese Nester vermutlich ein ähnlicheres Profil der Erkennungsstoffe haben. Dies ist meines Wissens der erste direkte Nachweis von genetischen Komponenten der Nesterkennung unter Feldbedingungen. Jedoch haben auch Umweltmerkmale auf die Nesterkennung einen Einfluss (Beye et al., 1998a). Genetische als auch umweltbedingte Komponenten spielen bei der Nestgenosserkennung der Wald-Ameisen eine Rolle und beide Komponenten sind für eine möglichst wirkungsvolle Unterscheidung von nesteigen und nestfremd von großer Wichtigkeit.

## 9. Resümee und Ausblick

Entscheidungsfindung ist ein zentrales Thema in der Biologie, sei es zwischen alternativen Reaktionswegen in der Entwicklung, zwischen physiologischen Zuständen oder zwischen verschiedenen Verhaltensweisen. Ein neuartiger Mechanismus der Geschlechtsbestimmung wurde charakterisiert, der aufgrund der allelischen Kompositionen von „SR-type“ Proteinen die weibliche Entwicklung initiiert.

Wie 171 heterozygote Kombinationen der 19 Allele zu einem aktiven Protein führen ist jedoch noch nicht verstanden. Die anstehende funktionelle Aufklärung wird Aufschluss über die Grundlagen der molekularen Spezifität und Wechselwirkungen geben. Die nun folgende Identifizierung eines untergeordneten Zielgens des CSD-Proteins wird grundlegenden Einblick in die Evolution von geschlechtsbestimmenden Regulationskaskaden geben. Dies könnte die besondere Rolle der „SR-type“ Proteine in der evolutionären Dynamik geschlechtsbestimmender Mechanismen bestätigen. Die funktionelle Zuweisung der selektierten Abschnitte wird Einblick geben, wie neue Spezifitäten durch Adaption im Laufe der Evolution entstanden sind.

Die Genomsequenz der Honigbiene, die in einer ersten Version im Internet vorliegt (<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee/>), eröffnet gezielte Wege, die komplexen Mechanismen der Entscheidungsfindung auf der Ebene von Verhalten zu entschlüsseln. Die ersten genetischen Marker für das Einsetzen des Sammelverhaltens sind dabei eine wichtige Ausgangsbasis, um Kandidatengene und die zugrundeliegenden molekularen Grundlagen zu identifizieren.

## 10. Literaturverzeichnis

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.

Akerib, C.C. und Meyer, B.J. (1994). Identification of X chromosome regions in *Caenorhabditis elegans* that contain sex-determination signal elements. *Genetics* 138, 1105-1125.

Baxevanis, A.D. und Oulette, B.F.F. (2001). *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*. (New York: Wiley-Interscience).

- Bell,G. (1982). *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality*. (Los Angeles: University of California Press).
- Ben Shahr, Y., Robichon, A., Sokolowski, M.B. und Robinson, G.E. (2002). Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* 296, 741-744.
- Beukeboom, L.W. (1995). Sex determination in Hymenoptera: A need for genetic and molecular studies. *BioEssays* 17, 813-817.
- Beye, M., Crozier, R.H., Crozier, Y.C. und Moritz, R.F.A. (1996). Mapping the sex locus of the honeybee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 83, 424-426.
- Beye, M., Grohmann, L., Poch, A. und Burgtorf, C. (1999a). A scientific note on preparation of high molecular weight DNA from honeybee *Apis mellifera* L. pupae for PFGE analysis. *Apidologie* 30, 349-350.
- Beye, M., Hartel, 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. und 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.
- Beye, M., Hunt, G.J., Page, R.E., Fondrk, M.K., Grohmann, L. und Moritz, R.F.A. (1999b). Unusually high recombination rate detected in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Genetics* 153, 1701-1708.
- Beye, M., Moritz, R.F.A. und Epplen, C. (1994). Sex linkage in the honeybee *Apis mellifera* detected by multilocus DNA fingerprinting. *Naturwissenschaften* 81, 460-462.
- Beye, M., Neumann, P., Chapuisat, M., Pamilo, P. und Moritz, R.F.A. (1998a). Nestmate recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43, 67-72.
- Beye, M., Neumann, P. und Moritz, R.F.A. (1997). Nestmate recognition and the genetic gestalt in the mound-building ant *Formica polyctena*. *Insectes Soc.* 44, 49-58.
- Beye, M., Neumann, P., Schmitzova, J., Kludiny, J., Albert, S., Simuth, J., Felder, M. und Moritz, R.F.A. (1998b). A simple, non-radioactive DNA fingerprinting method for identifying patrilines in honeybee colonies. *Apidologie* 29, 255-263.
- Beye, M., Poch, A., Burgtorf, C., Moritz, R.F.A. und Lehrach, H. (1998c). A gridded genomic library of the honeybee (*Apis mellifera*): A reference library system for basic and comparative genetic studies of a Hymenopteran Genome. *Genomics* 49, 317-320.
- Boggs, R.T., Gregor, P., Idriss, S., Belote, J.M. und McKeown, M. (1987). Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene. *Cell* 50, 739-747.
- Breed, M. (1983). Nestmate recognition in honey bees. *Anim. Behav.* 31, 86-91.
- Bridges, C.B. (1916). Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. *Genetics* 1, 1-52.
- Bridges, C.B. (1925). Sex in relation to genes and chromosomes. *Am. Nat.* 59, 134.
- Bull, J.J. (1983). *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. (Menlo Park, Calif.: Benjamin/Cummings Publishing Company).
- Butler, B., Pirrotta, V., Irminger-Finger, I. und Nothiger, R. (1986). The sex-determining gene *tra* of *Drosophila*: molecular cloning and transformation studies. *EMBO J.* 5, 3607-3613.

- Carlin,N.F. und Hölldobler,B. (1986). The kin recognition system of carpenter ants (*Camponotus* spp.). I. hierarchical cues in small colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 19, 123-134.
- Casselton,L.A. (2002). Mate recognition in fungi. *Heredity* 88, 142-147.
- Charlesworth,D. (2002). Self-incompatibility: how to stay incompatible. *Curr. Biol.* 12, R424-R426.
- Cline,T.W. (1988). Evidence that sisterless-a and sisterless-b are two of several discrete "numerator elements" of the X/A sex determination signal in *Drosophila* that switch *Sxl* between two alternative stable expression states. *Genetics* 119, 829-862.
- Cline,T.W. (1993). The *Drosophila* sex determination signal: How do flies count to two. *Trends Genet.* 9, 385-390.
- 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 (Edinburgh)* 71, 421-435.
- Crozier,R.H. und Pamilo,P. (1996). Evolution of social insect colonies. (Oxford: Oxford University Press).
- Cunha,A.B. und Kerr,W.E. (1957). A genetical theory to explain sex-determination by arrhenotokous parthenogenesis. *Forma Functio* 1, 33-36.
- Dobson,S.L. und Tanouye,M.A. (1998). Evidence for a genomic imprinting sex determination mechanism in *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera; Chalcidoidea). *Genetics* 149, 233-242.
- Dubendorfer,A., Hediger,M., Burghardt,G. und Bopp,D. (2002). *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* 46, 75-79.
- Duffy,J.B. und Gergen,J.P. (1991). The *Drosophila* segmentation gene runt acts as a position-specific numerator element necessary for the uniform expression of the sex-determining gene *Sex-lethal*. *Genes Dev.* 5, 2176-2187.
- Dzierzon,J. (1845). Gutachten über die von Herrn Direktor Stöhr im ersten und zweiten Kapitel des General-Gutachtens aufgestellten Fragen. *Eichstädter Bienenzeitung* 1, 109-113, 119-121.
- Estes,P.A., Keyes,L.N. und Schedl,P. (1995). Multiple response elements in the *Sex-lethal* early promoter ensure its female-specific expression pattern. *Mol. Cell Biol.* 15, 904-917.
- Fewell,J.H. (2003). Social insect networks. *Science* 301, 1867-1870.
- Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E. und Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Frumhoff,P.C. und Baker,J. (1988). A genetic component to division of labour within honey bee colonies. *Nature* 333, 358-361.
- Goodfellow,P.N. und Lovell-Badge,R. (1993). *Sry* and sex determination in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 27, 71-92.
- Goodwin,E.B. und Ellis,R.E. (2002). Turning Clustering Loops: Sex Determination in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 12, R111-R120.
- Graham,P., Penn,J.K., und Schedl,P. (2003). Masters change, slaves remain. *BioEssays* 25, 1-4.

- Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6, 1197-1211.
- Hasselmann, M. und Beye, M. (2004). Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4888-4893.
- Hasselmann, M., Fondrk, M.K., Page, R.E. und Beye, M. (2001). Fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insect Mol. Biol.* 10, 605-608.
- Hodgkin, J. (1992). Genetic sex determination mechanisms and evolution. *BioEssays* 14, 253-261.
- Hodgkin, J., Zellan, J.D. und Albertson, D.G. (1994). Identification of a candidate primary sex determination locus, *fox-1*, on the X chromosome of *Caenorhabditis elegans*. *Development* 120, 3681-3689.
- Hoshijima, K., Inoue, K., Higuchi, I., Sakamoto, H., und Shimura, Y. (1991). Control of doublesex alternative splicing by *transformer* and *transformer-2* in *Drosophila*. *Science* 252, 833-836.
- Hölldobler, B. und Wilson, E.O. (1990). *The Ants*. (Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press).
- Hughes, A.L. (1999). *Adaptive Evolution of Genes and Genomes*. (Oxford: Oxford University Press).
- Humphries, M.A., Muller, U., Fondrk, M.K. und Page, R.E., Jr. (2003). PKA and PKC content in the honey bee central brain differs in genotypic strains with distinct foraging behavior. *J. Comp Physiol A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol* 189, 555-562.
- 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.
- Hunt, G.J., Page, R.E., Fondrk, M.K. und Dullum, C.J. (1995). Major quantitative trait loci affecting honey bee foraging behavior. *Genetics* 141, 1537-1545.
- Hunt, G.J. und Page, R.E., Jr. (1995). Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* 139, 1371-1382.
- Jutsum, A.R., Saunders, T.S. und Cherrett, J.M. (1979). Intraspecific aggression in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. *Anim. Behav.* 27, 839-844.
- 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.
- Kimura, M. und Crow, J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49, 725-738.
- Kondrashov, A.S. (1988). Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature* 336, 435-440.
- Mackensen, O. (1951). Viability and sex determination in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Genetics* 36, 500-509.
- Marin, I. und Baker, B.S. (1998). The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* 281, 1990-1994.
- May, G., Shaw, F., Badrane, H. und Vekemans, X. (1999). The signature of balancing selection: fungal mating compatibility gene evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9172-9177.
- McClung, C.E. (1902). The accessory chromosome - sex determinant? *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, Woods Hole 3, 43-84.

- Moritz,R.F.A., Beye,M. und Hepburn,H.R. (1998). Estimating the contribution of laying workers to population fitness in African honeybees (*Apis mellifera*) with molecular markers. *Insectes Soc.* 45, 277-287.
- Nachtsheim,H. (1916). Zytologische Studien über die Geschlechtsbestimmung bei der Honigbiene (*Apis mellifera*). *Arch. Zellforsch.* 11, 169-241.
- Nef,S., Verma-Kurvari,S., Merenmies,J., Vassalli,J.D., Efstratiadis,A., Accili,D. und Parada,L.F. (2003). Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 426, 291-295.
- O'hUigin,C., Satta,Y., Hausmann,A., Dawkins,R.L. und Klein,J. (2000). The Implications of Intergenic Polymorphism for Major Histocompatibility Complex Evolution. *Genetics* 156, 867-877.
- Ohbayashi,F., Suzuki,M.G., Mita,K., Okano,K. und Shimada,T. (2001). A homologue of the *Drosophila doublesex* gene is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol Genet Metab* 128, 145-158.
- Page,R.E., Jr. und Erber,J. (2002). Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* 89, 91-106.
- Page,R.E., Jr., Gadau,J. und Beye,M. (2002). The emergence of hymenopteran genetics. *Genetics* 160, 375-379.
- Pane,A., Salvemini,M., Bovi,P.D., Polito,C. und Saccone,G. (2002). The *transformer* gene in *Ceratitidis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development* 129, 3715-3725.
- Parkhurst,S.M., Bopp,D. und Ish-Horowicz,D. (1990). X:A ratio, the primary sex-determining signal in *Drosophila*, is transduced by helix-loop-helix proteins. *Cell* 63, 1179-1191.
- Parkhurst,S.M. und Ish-Horowicz,D. (1992). Sex determination: Common denominators for sex. *Curr. Biol.* 2, 629-631.
- Raff,R.A. (1996). *The Shape of Life. Genes, Development and the Evolution of Animal Form.* (Chicago, IL: Univ of Chicago Press).
- Robinson,G.E. und Ben Shahr,Y. (2002). Social behavior and comparative genomics: new genes or new gene regulation? *Genes Brain Behav.* 1, 197-203.
- Robinson,G.E., Fahrbach,S.E. und Winston,M.L. (1997). Insect societies and the molecular biology of social behavior. *BioEssays* 19, 1099-1108.
- Robinson,G.E. und Page,R.E. (1988). Genetic determination of guarding and undertaking in honeybee colonies. *Nature* 333, 356-358.
- Rueppell,O., Pankiw,T., Nielsen,D., Fondrk,M.K., Beye,M. und Page,R.E. (2004). The genetic architecture of the behavioral ontogeny of foraging in honey bee workers. *Genetics in press.*
- Salamon,H., Klitz,W., Easteal,S., Gao,X., Erlich,H.A., Fernandez-Vina,M., Trachtenberg,E.A., McWeeney,S.K., Nelson,M.P. und Thomson,G. (1999). Evolution of HLA class II molecules: Allelic and amino acid site variability across populations. *Genetics* 152, 393-400.
- Schutt,C. und Nothiger,R. (2000). Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* 127, 667-677.
- Sinclair,A.H., Berta,P., Palmer,M.S., Hawkins,J.R., Griffiths,B.L., Smith,M.J., Foster,J.W., Frischauf,A.M., Lovell-Badge,R. und Goodfellow,P.N. (1990). A gene from the human sex-

- determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346, 240-244.
- Strobeck,C., Maynard Smith,J. und Charlesworth,B. (1976). The effect of hitchhiking on a gene for recombination. *Genetics* 82, 547-558.
- Stuart,R.J. (1987). Transient nestmate recognition cues contribute to a multicolonial population structure in the ant, *Leptothorax curvispinosus*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 21, 229-235.
- 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.
- Tian,M. und Maniatis,T. (1993). A splicing enhancer complex controls alternative splicing of doublesex pre-mRNA. *Cell* 74, 105-114.
- Torres,M. und Sanchez,L. (1989). The scute (T4) gene acts as a numerator element of the X:A signal that determines the state of activity of *sex-lethal* in *Drosophila*. *EMBO J.* 8, 3079-3086.
- Traut,W. (1994). Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. *Genetics* 136, 1097-1104.
- Vekemans,X. und Slatkin,M. (1994). Gene and allelic genealogies at a gametophytic self-incompatibility locus. *Genetics* 137, 1157-1165.
- von Frisch (1965). *Tanzsprache und Orientierung der Bienen*. (Berlin/Heidelberg/New York: Springer-Verlag).
- Wade,M.J. (2002). A gene's eye view of epistasis, selection and speciation. *J. Evol. Biol.* 15, 337-346.
- Waldmann,B., Frumhoff,P.C. und Sherman,P.W. (1988). Problems of kin recognition. *Trends Ecol. Evol.* 3, 8-13.
- Whitfield,C.W., Band,M.R., Bonaldo,M.F., Kumar,C.G., Liu,L., Pardinas,J.R., Robertson,H.M., Soares,M.B. und Robinson,G.E. (2002). Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behavior in the honey bee. *Genome Res.* 12, 555-566.
- Whitfield,C.W., Cziko,A.M. und Robinson,G.E. (2003). Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* 302, 296-299.
- Whiting,P.W. (1943). Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics* 28, 365-382.
- Wilkins,A.S. (1995). Moving up the hierarchy: A hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays* 17, 71-77.
- Willhoeft,U. und Franz,G. (1996). Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144, 737-745.
- Wilson,E.B. (1905). The chromosomes in relation to determination of sex in insects. *Science* 22, 500-502.
- Wilson,E.O. (1971). *The Insect Societies*. (Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press).
- Winston,M.L. (1987). *The biology of the honey bee*. (Cambridge, Mass.: Harvard University Press).
- Woyke,J. (1963). What happens to diploid drone larvae in a honey bee colony. *J. Apic. Res.* 2, 73-75.

- Woyke,J. (1965a). Genetic proof of the origin of drones from fertilized eggs of the honeybee. *J. Apic. Res.* 4, 7-11.
- Woyke,J. (1965b). Study on the comparative viability of diploid and haploid larval drone honeybees. *J. Apic. Res.* 4, 12-16.
- Wright,S. (1939). The distribution of self-sterility alleles in populations. *Genetics* 24, 538-552.
- Yokoyama,S. und Nei,M. (1979). Population dynamics of sex-determining alleles in honey bees and self-incompatibility in plants. *Genetics* 91, 609-626.
- Younger-Shepherd,S., Vaessin,H., Bier,E., Jan,L.Y. und Jan,Y.N. (1992). *deadpan*, an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator in *Drosophila* sex determination. *Cell* 70, 911-922.
- Zehetner,G. und Lehrach,H. (1994). The reference library system - Sharing biological material and experimental data. *Nature* 367, 489-491.

## 11. Der Habilitation zugrundeliegende Veröffentlichungen in chronologischer Reihenfolge

- 1.) Beye,M., Crozier,R.H., Crozier,Y.C. und Moritz,R.F.A. (1996). Mapping the sex locus of the honeybee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* 83, 424-426.
- 2.) Beye,M., Neumann,P. und Moritz,R.F.A. (1997). Nestmate recognition and the genetic gestalt in the mound-building ant *Formica polyctena*. *Insectes Soc.* 44, 49-58.
- 3.) Beye,M., Neumann,P., Chapuisat,M., Pamilo,P. und Moritz,R.F.A. (1998a). Nestmate recognition and the genetic relatedness of nests in the ant *Formica pratensis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 43, 67-72.
- 4.) Beye,M., Neumann,P., Schmitzova,J., Klaudiny,J., Albert,S., Simuth,J., Felder,M. und Moritz,R.F.A. (1998b). A simple, non-radioactive DNA fingerprinting method for identifying patriline in honeybee colonies. *Apidologie* 29, 255-263.
- 5.) Beye,M., Poch,A., Burgtorf,C., Moritz,R.F.A. und Lehrach,H. (1998c). A gridded genomic library of the honeybee (*Apis mellifera*): A reference library system for basic and comparative genetic studies of a Hymenopteran Genome. *Genomics* 49, 317-320.
- 6.) Moritz,R.F.A., Beye,M., und Hepburn,H.R. (1998). Estimating the contribution of laying workers to population fitness in African honeybees (*Apis mellifera*) with molecular markers. *Insectes Soc.* 45, 277-287.
- 7.) Beye,M., Grohmann,L., Poch,A. und Burgtorf,C. (1999a). A scientific note on preparation of high molecular weight DNA from honeybee *Apis mellifera* L. pupae for PFGE analysis. *Apidologie* 30, 349-350.
- 8.) Beye,M., Hunt,G.J., Page,R.E., Fondrk,M.K., Grohmann,L. und Moritz,R.F.A. (1999b). Unusually high recombination rate detected in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Genetics* 153, 1701-1708.
- 9.) Hasselmann,M., Fondrk,M.K., Page,R.E. und Beye,M. (2001). Fine scale mapping in the sex locus region of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insect Mol. Biol.* 10, 605-608.
- 10.) Beye,M., Hartel,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.

- 11.) Page,R.E., Jr., Gadau,J. und Beye,M. (2002). The emergence of hymenopteran genetics. *Genetics* *160*, 375-379.
- 12.) Beye,M., Hasselmann,M., Fondrk,M.K., Page,R.E. und 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.
- 13.) Rueppell,O., Pankiw,T., Nielsen,D., Fondrk,M.K., Beye,M. und Page,R.E. (2004). The genetic architecture of the behavioral ontogeny of foraging in honey bee workers. *Genetics*, *in press*.
- 14.) Hasselmann,M. und Beye,M. (2004). Signatures of selection among sex-determining alleles of the honey bee. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 4888-4893.

## **Erklärung über den persönlichen Anteil an den wissenschaftlichen Publikationen zur Habilitationsthematik**

Die Nummerierung folgt der chronologischen Nummerierung der unter Punkt 11.) aufgeführten Veröffentlichungen.

zu 1.) Die Veröffentlichung resultiert aus Experimenten, die von mir konzipiert und ausschließlich von mir durchgeführt wurden.

Unterschied zur Promotionsschrift: Wir konnten in dieser Veröffentlichung erstmals den geschlechtsbestimmenden Locus, auf den Chromosomen der Honigbiene darstellen und dem Chromosom 8 zuweisen. In der Promotion wurde ein ähnliches Vorhaben gestartet jedoch war weder die Identifizierung des Chromosoms korrekt noch wurde die richtige Sequenz für die Hybridisierung genutzt, da der in der Promotionsarbeit verwendete Q-Lambda Klon nicht die korrekte Sequenz enthielt. Nach der Promotion wurde eine neue Untersuchung mit einem alternativen Klon und alternativen Marker gestartet (Z-Klon). Dazu wurde ein größerer Klon (15 kb) aus einer Lambda-Bank isoliert, da die Größe des 1,7 kb Fragments des Z-Klons für eine Detektion in der *in situ* Hybridisierung wohl zu klein war. Der entsprechende Klon wurde anhand einer Southern-Hybridisierung verifiziert (s. Veröffentlichung). Für die Unterscheidung der Chromosomen wurden neben der „single-copy“ Sequenz weitere Sonden eingesetzt, die unterschiedlich markiert und mit einem anderen Farbstoff detektiert wurden. Dieses Verfahren der Chromosomenidentifizierung wurde bereits im Laufe meiner Promotionszeit entwickelt und etabliert (Beye M, Moritz RFA, 1995, *J Hered*, 86: 145-150) und ist nicht Gegenstand, sondern Hilfsmittel dieser Veröffentlichung.

zu 2.) Die Experimente wurden von mir konzipiert und ausgewertet. Die Durchführung erfolgte durch mich und die Staatsexamens-Kandidatin Katja Joyeux. Herr Prof. Dr. Robin Moritz und Dr. Peter Neumann unterstützten die statistische Auswertung.

zu 3.) Die Experimente wurden von mir konzipiert und zusammen mit Diplom-Biologen Peter Neumann und Prof. Dr. Robin Moritz ausgeführt. Die Auswertung wurde von mir durchgeführt.

zu 4.) Die Veröffentlichung resultiert aus Experimenten, die von mir konzipiert und von mir, Peter Neumann und Jana Schmitzova durchgeführt wurden. Die anderen Koautoren stellten Primer und unveröffentlichte Sequenzen zur Verfügung und standen den

Experimenten beratend zur Seite. Das Manuskript wurde von mir erstellt.

- zu 5.) Die Veröffentlichung beruht auf Konzepten, die ich zusammen mit Prof. Dr. Hans Lehrach entworfen habe. Die Erstellung der Genom-Bank wurde von mir, der technischen Mitarbeiterin Annette Poch und Diplom-Biologin Carola Burgtorf durchgeführt.
- zu 6.) Von mir wurde der diagnostische Z-Marker entwickelt, der die beiden Rassen unterscheiden kann. Das Manuskript wurde von mir und Prof. Robin Moritz erstellt. Herr Prof. Dr. Hepburn stellte die Bienenproben zur Verfügung.
- zu 7.) Die Veröffentlichung resultiert aus Experimenten, die von mir konzipiert und von mir und Diplom-Biologin Lore Grohmann durchgeführt wurden. Die initialen „puls-field“ Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Diplom-Biologin Carola Burgtorf und der technischen Mitarbeiterin Annette Poch durchgeführt.
- zu 8.) Die Veröffentlichung wurde von mir und Prof. Dr. Robert Page konzipiert. Die Analyse der gekoppelten Marker und die Erstellung der physikalischen Karte wurde von mir und Frau Diplom-Biologin Lore Grohmann durchgeführt. Die Erstellung der Kopplungsgruppe III erfolgte durch Dr. Greg Hunt und Prof. Dr. Robert Page. Die Auswertung dieser Daten wurde von mir vorgenommen.
- zu 9.) Die Veröffentlichung resultiert aus Experimenten, die ausschließlich von mir konzipiert wurden. Die Durchführung der Experimente erfolgte zu gleichen Teilen durch mich und Diplom-Biologen Martin Hasselmann. Die Kartierungspopulation wurde von dem technischen Mitarbeiter Kim Fondrk und Prof. Dr. Robert Page speziell für die Versuche zur Verfügung gestellt.
- zu 10.) Die beschriebenen Experimente wurden von mir entworfen und im wesentlichen von mir und Prof. Dr. Stig Omholt an der Universität Aas in Norwegen durchgeführt. Diplom-Biologe Stephan Härtel generierte die doppelsträngige RNA und Diplom-Biologe Martin Hasselmann führte die Antikörperfärbung durch.
- zu 11.) Dieses Manuskript wurde in gleichen Teilen von mir, Dr. Jürgen Gadau und Prof. Dr. Robert Page geschrieben und konzipiert.
- zu 12.) Die Experimente wurden von mir konzipiert und im wesentlichen von mir und dem Diplom-Biologen Martin Hasselmann durchgeführt. Die Auswertung und die

Erstellung des Manuskripts wurde ausschließlich von mir vorgenommen. Prof. Dr. Robert Page und der technische Mitarbeiter Kim Fondrk stellten verschiedene Kreuzungen und Königinnen für einzelne Experimente zur Verfügung. Prof. Dr. Stig Omholt unterstützte die RNAi-Arbeiten.

zu 13.) Die Experimente entstammen Konzepten, die von Dr. Olav Rüppell, Prof. Dr. Robert Page, Dr. Tanya Pankiw und von mir konzipiert wurden. Ich führte die Kartierung der Kandidatengene und der etablierten Marker durch. Dr. Olav Rüppell erstellte die AFLP-Karten und Dr. Tanya Pankiw bestimmte Phänotypen. Der technische Mitarbeiter Kim Fondrk stellte die nötigen Kreuzungen zur Verfügung.

zu 14.) Die Experimente und Auswertung wurden von mir konzipiert und von mir und Diplom-Biologen Martin Hasselmann ausgeführt.

## **Lebenslauf**

Name: Martin Beye  
Geburt: 20.04. 1965  
Staatsbürgerschaft: deutsch  
verheiratet: Angela Kühl-Beye  
Kinder: Justus Beye  
Adresse:

Institut  
Institut für Zoologie  
Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg  
Biozentrum  
Weinberg Weg 22, 06120 Halle, Germany  
phone (++49) (0345) 5521627/21631  
FAX (++49) (0345) 5527230  
e-mail: beye@zoologie.uni-halle.de

Wohnort:  
Herwegh. Str. 95  
06114 Halle

## **Ausbildung**

Gymnasium: 1975-1985 Alfred-Delp Schule Bad Kreuznach  
Abitur: 14. Juni 1985  
Pflicht-Dienst: 1985-1986  
Studium der Biologie: 1986-1992 Universität Kaiserslautern  
Promotion: 16. Aug.1995 grade: mit Auszeichnung (summa cum laude)

## **Beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang**

Tutor an der TU Berlin Feb.- 31. Mai 1992  
Forschungsstipendium an der Universität Berlin 1. Juni- 31. Dez. 1992  
Doktorand an dem 1993-1995  
Department of Biology/Genetics, Technische Universität Berlin  
(DFG-Projekte)  
Post-Doc 1995-1996  
Department of Biology/Genetics, Technische Universität Berlin  
Forschungsassistent 1996-1998  
Department of Ecology & Biology/Genetics, Technische Universität Berlin  
Habitationsstipendium des Kultusministeriums von Sachsen-Anhalt Sept. 1998

Hochschul-Assistent  
Institut für Zoologie, Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg

Okt. 1998-

Lynen Stipendium der Alexander von Humboldt Stiftung  
im Department of Entomology, UC Davis, CA  
(Prof. Dr. Page)

Juli 1999-Juli 2000

### **Bewilligte Drittmittel**

Molecular characterization of the sex determining locus of the honey bee (*Apis mellifera*), DFG-Projekt (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (BE 2194/3-1, 1999-2001).

Habilitationsforschungsstipendium von der Landesregierung von Sachsen-Anhalt (1998).

Evolution and Genetics of haplodiploid sex determination: Kultusministerium Sachsen-Anhalt (FKZ: 3266A, 2000-2003).

Molecular characterization of the sex determining locus of the honey bee (*Apis mellifera*) DFG-Folgeprojekt (BE 2194/3-3, 2001-2003).

Mechanisms and genes of complementary sex determination, DFG-Projekt (BE 2194/5-1, 5-2, 2003-2006).

### **Auszeichnungen**

Lynen-Stipendium der Alexander von Humboldt Stiftung  
Prof. Dr. R.E. Page, UC Davis, CA

Juli 1999-Juli 2000

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt den vielen Kollegen und Freunden, die meine Forschungsarbeit über Jahre hinweg ermöglicht und gefördert haben. An dieser Stelle möchte ich besonders Prof. Dr. Robert Page, Dr. Martin Hasselmann, Prof. Dr. Stig Omholt, Kim Fondrk, Dr. Greg Hunt, Prof. Dr. Rolf Nöthiger, Dr. Daniel Bopp, Prof. Dr. Hans Lehrach, Dr. Carola Burgtorf und Annette Poch danken. Die stete Diskussionsbereitschaft der Kollegen war stets ein Quell neuer Ideen und Projekte. Angela Kühl-Beye danke ich besonders für ihre engagierte Unterstützung meiner Arbeit und für ihren fachlichen Meinungs austausch. Den Mitarbeitern des Biozentrums möchte ich danken für die vorzügliche logistische Unterstützung der experimentellen Arbeit, ohne die ein so exzellentes Arbeiten nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin möchte ich mich bei den forschungsfördernden Institutionen der DFG, der Humboldt-Stiftung und des Kultusministeriums von Sachsen-Anhalt bedanken, die mich und meine Arbeit großzügig unterstützt haben. Herrn Prof. Dr. R.F.A. Moritz von der Martin-Luther Universität danke ich für die Bereitstellung einer Assistentenstelle und für die bereitwillige Unterstützung des Habilitationsverfahrens.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 15.4. 2004

Martin Beye