

# Funktionale Genomik bei *Drosophila*:

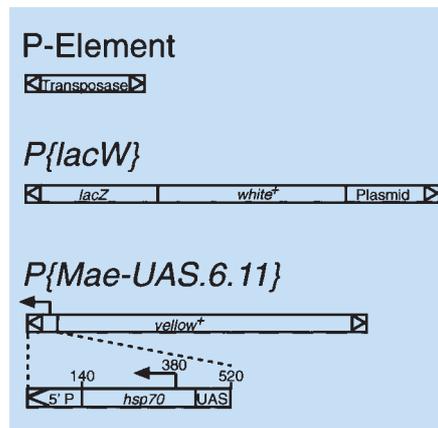
## Das Göttingen X-Chromosomen-Projekt

Ulrich Schäfer, Nicole Beinert, Meike Werner, Gordon Dowe und Herbert Jäckle

Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abt. Molekulare Entwicklungsbiologie, D-37070 Göttingen

*Drosophila melanogaster* ist wahrscheinlich der genetisch am besten charakterisierte Vielzeller. Dennoch ist selbst bei diesem Modellorganismus nur etwa jedes zehnte der 13.500 annotierten Gene molekular und funktional charakterisiert. Um nach der strukturellen Aufklärung des *Drosophila*-Genoms auch die funktionelle Aufklärung voranzubringen, hat sich das Göttingen X-Chromosomen-Projekt (GXP) das Ziel gesetzt, das X-Chromosom von *Drosophila* systematisch mit Transposon-Insertionen abzusättigen. Die daraus isolierten Einzelinsertionslinien stellen ein ausgezeichnetes Material dar für eine funktionale Analyse X-chromosomaler Gene. Die so gewonnenen Erkenntnisse werden nicht nur für „Drosophilisten“ von Bedeutung sein, sondern auch eine wichtige Mittlerrolle für das Verständnis des humanen Genoms spielen.

► In März 2000 wurde die erste Version der vollständigen Sequenzierung vom euchromatischen Anteil des Genoms von *Drosophila melanogaster* publiziert (ADAMS *et al.*, 2000). Eine verbesserte zweite Version folgte im Oktober desselben Jahres und die endgültige, lückenlose Version dieser 120 Megabasen (Mb) wird in Kürze vom „Berkeley *Drosophila* Genome Project „(BDGP) bereitgestellt werden. Damit wäre dann die strukturelle Analyse des *Drosophila*-Genoms abgeschlossen, wenn man von den etwa 60 Mb großen heterochromatischen Bereichen absieht, die zumeist aus schwer klonier- und sequenzierbaren mittel- und hochrepetitiven Sequenzen bestehen. Als Ergebnis der Genomsequenzierung sind zur Zeit etwa 13.500 Gene annotiert, die für ein Protein kodieren. Überraschenderweise ist davon nur eine Minderheit von etwa 10% genetisch und molekular charakterisiert (RUBIN und LEWIS, 2000), obwohl *Drosophila* mit seiner nun 90-jährigen Tradition als Modellorganismus als der genetisch best untersuchte Vielzeller gilt. Um entsprechende Daten für die restlichen 90% der Gene bereitzustellen und damit das gesamte *Drosophila*-Genom



**Abb. 1:** Schematische Darstellung verschiedener P-Elemente. Oben das natürlich vorkommende, vollständige P-Element mit 2907 bp Länge. Mitte der „enhancer trap“-Vektor  $P\{lacW\}$  von etwa 10 kb Länge. Unten der zur Misexpression von benachbarten Genen geeignete Vektor  $P\{Mae-UAS.6.11\}$  mit einer Länge von 8,7 kb, wobei das 5'-Ende mit dem UAS-vermittelten Transkriptionsstart bei Nukleotid 380 vergrößert dargestellt ist. Die Dreiecke stehen für die 31 bp langen invertierten Wiederholungen an den P-Enden; weitere Erklärungen im Text.

auch funktional zu analysieren, gibt es weltweit verschiedene systematische Ansätze (Übersicht in SCHÄFER und JÄCKLE, 2001). Hiervon erhofft sich nicht nur die „*Drosophila* community“ ein besseres Verständnis „ihres“ Organismus“, sondern die evolutionäre Konserviertheit von vielen Genen in Struktur und Funktion verspricht auch, Hilfestellung bei der Analyse der menschlichen Genfunktionen zu erbringen.

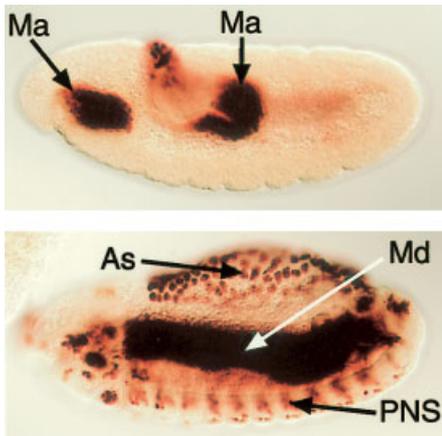
### Suche nach Mutationen in essenziellen X-chromosomalen Genen

Unsere Arbeitsgruppe hat sich die funktionale Analyse der X-chromosomalen Gene zum Ziel gesetzt und ergänzt damit die Anstrengungen von BDGP, die autosomalen Gene zu charakterisieren (SPRADLING *et al.*, 1999). Nach der aktuellen Annotierung kodieren die knapp 22 Mb X-chromosomalen Euchromatins für 2290 Gene, von denen etwa 800 als essenziell eingestuft werden. Dar-

unter versteht man solche Gene, die nach Totalausfall (Nullmutation, „knock out“) Letalität oder seltener Sterilität bzw. einen anderen deutlich erkennbaren Phänotyp bewirken (s.a. unten). Da X-chromosomale Mutationen, die zu Letalität oder Sterilität führen, in den hemizygoten Männchen direkt zur Wirkung kommen, ist eine genetische Analyse nur dann möglich, wenn sie durch eine Duplikation an anderer Stelle im Genom abgedeckt sind. Da brauchbare Duplikationen nur für bestimmte Abschnitte existieren, ist eine funktionale Charakterisierung X-chromosomaler Gene von Natur aus komplizierter. Es verwundert daher nicht, dass analoge Untersuchungen an autosomalen Genen weiter fortgeschritten sind.

Das Göttingen X-Chromosomen-Projekt (GXP) ist eine der vom Deutschen Humangenom-Projekt (DHGP) geförderten Studien, Gene bei Modellorganismen funktional zu charakterisieren. Der vom GXP eingeschlagene Weg besteht darin, systematisch Linien von *Drosophila* zu erzeugen, die ein transponierbares Element an unterschiedlichen Positionen im X-Chromosom inseriert haben, so dass letztendlich jedes Gen mit diesem molekularen Marker versehen wird. Als Transposons haben wir dabei in vitro veränderte Derivate des bei *Drosophila* natürlich vorkommenden P-Elementes eingesetzt (s. Abb.1). Das P-Element ist das am besten analysierte der vielen *Drosophila*-Transposons und aus der Molekulargenetik mit der Fliege nicht mehr wegzudenken. Das beruht vor allem auf der Möglichkeit des Gentransfers mittels der stabilen Transformation von Keimzellen. Ein anderer häufig genutzter Aspekt der P-Technologie ist die Erzeugung von Einzelinsertionslinien durch erneute Mobilisierung eines bereits vorhandenen P-Elementes nach Einkreuzen einer stabilen Transposasequelle, wiederum in Form eines speziellen P-Elementes. Genau diese Technik kommt auch bei dem GXP zum Einsatz.

In einem ersten Ansatz, bei dem wir nur nach P-Insertionen gesucht haben, die eine erkennbare Mutation verursacht und damit ein essenzielles Gen getroffen haben, wurde das  $P\{lacW\}$ -Element (BIER *et al.*, 1989; s.a. Abb. 1) eingesetzt. Dieses P-Element verfügt



**Abb. 2:** *lacZ*-Expressionsmuster einer letalen Insertionslinie. Der histochemische Nachweis der *lacZ*-Genaktivität erfolgt über einen primären  $\beta$ -Galaktosidase-Antikörper und einen sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper. Oben ist ein frühes Embryonalstadium (verlängerter Keimstreif, Gastrulation) und unten ein spätes Stadium (Ende der Keimstreifverkürzung) dargestellt. Die Abkürzungen stehen für Amnioserosa (As), Mitteldarmanlagen (Ma), Mitteldarm (Md) und peripheres Nervensystem (PNS). Die Embryonen sind so orientiert, dass anterior links und dorsal oben liegt. Vergleichbare Bilder liegen von allen Insertionslinien mit *lacZ*-Expression in der FlyView-Datenbank vor (Janning, 1997; <http://flyview.uni-muenster.de/>).

über die so genannte „enhancer trap“-Funktion. Das bedeutet, dass das bakterielle *lacZ*-Gen im *P{lacW}*, das unter der Kontrolle des extrem schwachen P-Promotors steht, nur dann transkribiert wird, wenn Enhancer-Sequenzen aus der Nähe auf den Promotor einwirken. Die dann resultierende Aktivität ist leicht über einen histochemischen oder immunologischen Nachweis des *lacZ*-Genproduktes, der  $\beta$ -Galaktosidase, zu erkennen (s. Abb. 2). Inseriert z. B. das *P{lacW}* in der Nähe eines muskelspezifischen Enhancers, so wird das *lacZ*-Gen entsprechend nur im Muskel exprimiert. Umgekehrt gilt dann auch, dass eine auf die Muskeln beschränkte *lacZ*-Expression auf einen muskelspezifischen Enhancer in der Nähe des *P{lacW}* hinweist (= „enhancer trap“). Das wiederum spricht dafür, dass in der Nähe ein *Drosophila*-Gen liegt, welches im Muskel exprimiert wird und welches durch die P-Insertion mutiert wurde. Damit kann die räumliche und zeitliche Verteilung der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression einen ersten Hinweis auf die Funktion des betroffenen Gens geben. Als Beispiel zeigt Abb. 2 die *lacZ*-Genaktivität einer Insertionslinie, die wegen Störungen der Gastrulation embryonal letal ist.  $\beta$ -Galaktosidase ist in den Mitteldarmanlagen in frühen Embryonen und in einem späteren Stadium im Mitteldarm, dem peripheren Nervensystem und der Amnioserosa, dem extraembryonalen Gewebe, nachweisbar. Die Integration von *P{lacW}* konnte in dieser Linie auf die Position 340 bp vor dem Transkriptionsstart von *pebbled* kartiert werden, einem X-chromosomalen Gen, von dem bekannt ist, dass es ein identisches Expressionsmuster hat und dass ein Ausfall zu Gastrulationsdefekten führt. Derartige gute Übereinstimmungen zwischen „enhancer trap“-Muster und Expressionsdomänen des betroffenen Gens sind in unseren Linien sehr häufig gefunden worden und sprechen damit für den diagnostischen Wert dieser Methode.

Insgesamt wurden in dieser Versuchsreihe aus mehr als 50.000 Einzelpaarzuchten mit einer zufallsgemäßen Neuinsertion des *P{lacW}* im gesamten Genom über 500 Linien isoliert, die in einem essenziellen Gen mutiert sind (PETER *et al.*, 2002). In gut 90% der Linien liegt nur eine einzige *P{lacW}*-Integration auf dem X-Chromosom vor, was eine Voraussetzung für die funktionale Analyse des betroffenen Gens ist. Die molekulare Analyse der Insertionsstellen hat weiterhin gezeigt, dass in dieser Kollektion etwa 200 verschiedene Gene und damit ein Viertel der essenziellen X-chromosomalen Gene betroffen sind. Noch wichtiger ist aber, dass in über 130 dieser Fälle zum ersten Male ein Phänotyp mit einer molekular definierten Mutation in einem Gen korreliert werden konnte. Damit sind diese Linien ein idealer Einstieg in die funktionale Analyse der betroffenen essenziellen Gene.

#### Phänotyp-unabhängige Isolierung X-chromosomaler Transposon-Insertionen

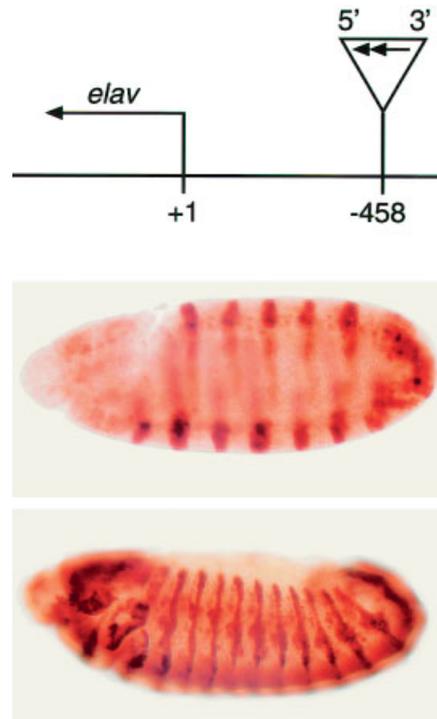
Nun ist aber bekannt, dass die Mehrzahl aller Gene gar nicht essenziell ist. Schätzungen gehen bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* von etwa 60% der Gene aus (MIKLOS und RUBIN, 1996), und ein ähnlicher Wert dürfte auch für Säugergenome gelten. Das heißt, dass ein Totalausfall in all diesen Genen in den üblichen „loss-of-function-screens“ nicht zu einem erkennbaren Phänotyp führt. Einer der Gründe könnte darin liegen, dass im Genom ein weiteres, verwandtes Gen existiert, das den Ausfall des einen Gens zumindest weitestgehend kompensiert. Damit sind die einzeln für sich genommen nicht-essenziellen Gene nur dann funktional analysierbar, wenn beide Gene gleichzeitig ausgeschaltet sind. Die hierzu nötigen Informationen liegen dank der abgeschlossenen Genomprojekte ja vor. Ein anderer Weg zu einer funktionalen Analyse

dieser „phänotypisch stillen“ Gene könnte ein Suche nach „gain-of-function“-Mutationen bringen. Solche „Zugewinn-Mutationen“ können z. B. nach Über- oder Misexpression eines Gens auftreten. Das hierzu bevorzugte System für *Drosophila* basiert auf der Genaktivierung mittels des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 (BRAND und PERRIMON, 1993). Hierzu benötigt man zum einen ein Transgen, das GAL4 exprimiert, und zum anderen ein zweites Transgen, das Bindungsstellen für GAL4, die so genannten UAS-Stellen („upstream activating sequences“), vor einem Minimalpromotor enthält. Werden beide Komponenten in eine Fliege gebracht, so wird das den UAS-Stellen nachgeschaltete Gen unter der Kontrolle von GAL4 reguliert. Hierauf und auf der Präferenz der P-Elemente, bevorzugt in die Region um den Transkriptionsstart zu inserieren, basierend hat P. Rørth (1996) eine Methode für einen „gain-of-function screen“ entwickelt, bei dem ein UAS-gesteuerter Promotor in einem P-Element so positioniert ist, dass ein der zufälligen Insertion benachbartes Gen mit transkribiert wird (s.u.).

Wir haben dieses Schema modifiziert, um unseren Mutagenese-Ansatz mit dem Transposon *P{Mae-UAS.6.11}* (CRISP und MERRIAM, 1997; s. Abb. 1) durchzuführen. Für diesen Vektor haben wir uns entschieden, da er mit dem *yellow*<sup>+</sup>-Gen einen anderen selektierbaren Marker als das sonst übliche *white*<sup>+</sup>-Gen trägt. Damit halten wir uns die Möglichkeit offen, das *P{Mae-UAS.6.11}* im Bedarfsfalle relativ einfach gegen andere P-Vektoren austauschen zu können (SEPP und AULD, 1999). Das Kreuzungsschema ist vergleichbar mit dem, das bei der Suche nach Mutationen in essenziellen X-chromosomalen Genen benutzt wurde (PETER *et al.*, 2002). Ausgehend von einer Insertion auf einem genetisch dominant markierten Autosom wird das *P{Mae-UAS.6.11}*-Element durch das Einkreuzen einer P-Transposase-Quelle remobilisiert. Weibchen, die das Transposon, nicht aber den dominanten Marker tragen und daher eine Neuinsertion anzeigen, werden einzeln weitergekreuzt. Anhand von entsprechend angelegten Kreuzungen kann dann in der F3-Generation eine X-chromosomale Integration erkannt werden. Weitere Kreuzungen gewährleisten dann, dass die jeweilige Insertionslinie stabil gehalten werden kann, sei es als homozygote oder als heterozygote, balanzierte Linie. Bis jetzt haben wir in diesem neuen Ansatz aus über 11.000 Einzelpaarzuchten etwa 1.000 X-chromosomale Insertionslinien isoliert.

Welche dieser Linien wir endgültig behalten, hängt allein von der Position und Orientierung des *P{Mae-UAS.6.11}* im X-Chromosom ab. Da bekannt ist, dass es be-

vorzuzugte Insertionsstellen, so genannte „hot spots“, für P-Elemente im Genom gibt (SPRADLING *et al.*, 1999; PETERS *et al.*, 2002), sollen frühzeitig Insertionen in der Nähe der Integrationsstelle einer bereits isolierten Linie erkannt werden, um einen möglichst niedrigen Aufwand zum Halten der Kollektion zu haben. Dementsprechend wird als erstes die Insertionsstelle per inverser PCR (OCHMAN *et al.*, 1988) amplifiziert und anschließend die Sequenz bestimmt. Mit dieser Sequenz wird anschließend durch eine Suche in der gesamten *Drosophila*-Sequenzdatenbank des BDGP die Insertionsstelle auf das Nukleotid genau bestimmt. Dabei sind im allgemeinen Sequenzen von 20 und mehr Nukleotiden ausreichend, um die Position eindeutig zu bestimmen. Ausnahmen hiervon sind Insertionen in repetitiver DNA oder in anderen, natürlich vorkommenden Transposons; derartige Linien werden nicht weiter gehalten. Das gleiche gilt auch für Linien, deren Integrationsstelle nahe bei einer bereits isolierten liegt. Als hauptsächliches Kriterium der Nähe und damit des Verwerfens der neuen Linie haben wir eine Distanz von maximal 10 kb definiert, da das in etwa dem durchschnittlichen Abstand von Gen zu Gen in *Drosophila* entspricht (ADAMS *et al.*,



2000). Als Resultat der molekularen Analyse von unter 900 Linien haben wir zur Zeit knapp 500 dem Kriterium entsprechende,

**Abb. 3: Nachweis der GAL4-kontrollierten Genaktivität in einer  $P\{Mae-UAS.6.11\}$ -Insertionslinie. Oben ist schematisch die Position und Orientierung des P-Vektors (Dreieck) vor dem *elav*-Gen dargestellt; damit ist eine Überexpression von *elav* nach Einkreuzen eines Treibers möglich. Darunter ist der histochemische Nachweis der *elav*-Genaktivität in Embryonen unterschiedlichen Alters über einen primären *elav*-Antikörper und einen sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper gezeigt; die GAL4-Aktivität ist durch die Auswahl des Treibers auf die Expressionsdomänen von *engrailed* beschränkt, d.h. auf einen Teil jedes Segmentes. Orientierung und Alter der Embryonen wie in Abb. 2; weitere Erklärungen im Text.**

unterschiedliche Linien etabliert. Darunter befindet sich eine Vielzahl von Insertionen, die – auch im Vergleich zu dem ersten Mutagenese-Ansatz – neue, noch nicht analysierte Gene molekular markieren. Da nach Remobilisierung eines P-Elementes häufig kleinere Deletionen als Folge eines „unpräzisen Ausschneidens“ entstehen, kann man in all diesen Fällen Funktionsverlust-Mutationen induzieren, die zur funktionalen Analyse eingesetzt werden können, sofern sie auch einen erkennbaren Phänotyp aufweisen.

Von den Insertionslinien zeigt nur ein geringer Anteil (etwa 3%) einen direkt durch die Insertion selbst hervorgerufenen Phänotyp. Um neben diesen vermutlichen Funktionsverlust-Mutationen die Häufigkeit von „Zugewinn-Mutation“ in unseren Linien bestimmen zu können, haben wir in über 400 dieser etablierten Linien einen „Treiber“, d.h. ein P-Element mit einem GAL4-Gen eingekreuzt, das unter der Kontrolle des *Drosophila Actin5C*-Promotors steht und damit ubiquitär exprimiert wird. In knapp 70% der Linien wurde dadurch kein erkennbarer Phänotyp hervorgerufen. In etwa jeder sechsten Linie waren aber die Nachkommen, die beide P-Elemente hatten, letal. Weitere gut 10% der Linien waren semiletal, d.h. sie traten zu weniger als der Hälfte der Nachkommen auf, die nur das *P{Mae-UAS.6.11}*-Element hatten. Daneben wurden auch wenige Fälle mit phänotypisch erkennbaren Veränderungen beobachtet, die zumeist die Borstenbildung oder die Flügelentwicklung betrafen. Insgesamt hat demnach nahezu jede dritte Insertionsstelle durch falsche Expression des benachbarten Gens eine „Zugewinn-Mutation“ verursacht.

Dass diese „Zugewinn-Mutation“ kein unspezifischer Effekt des Systems ist, sondern direkt von der Position des *P{Mae-UAS.6.11}*-Elementes im Genom abhängt, haben wir vielfach überprüft. So erbringen Integrationen an nahezu identischen genomischen Stellen stets den gleichen Phänotyp nach Einkreuzen desselben Treibers, sofern die gleiche Orientierung gewahrt bleibt. Letzteres muss auch sein, da das *P{Mae-UAS.6.11}*-Element nur in einer Richtung, nämlich seinem 5'-Ende aktivieren kann. Wird statt eines ubiquitären Treibers ein Treiber genommen, der nur in bestimmten Geweben und/oder zu bestimmten Entwicklungszeiten GAL4 produziert, so werden nur in relativ wenigen Linien Phänotypen erzeugt. Wie zu erwarten gehören aber all diese Linien zu denen, die eine zumindest gleich starke „Zugewinn-Mutation“ nach Einkreuzen des generellen Treibers aufweisen.

Ein weiterer Beweis für die kontrollierte Aktivität, die in diesem System auf benachbarte Gene ausgeübt werden kann, ist in *Abb. 3* dargestellt. In einer Linie ist das *P{Mae-UAS.6.11}*-Element zufällig 458 bp vor dem gut untersuchten *elav*-Gen inseriert und zwar so, dass die GAL4-vermittelte Transkriptionsaktivität zu einer *elav*-Überexpression führt. Wird in diesem Fall der oben erwähnte ubiquitäre Treiber eingekreuzt, so ist das letal für die Fliege. Das ist nicht überraschend, da schon eine erhöhte Kopienzahl des *elav*-Gens zu schweren Störungen führt. Interessanter ist aber die Mög-

lichkeit, die *elav*-Expression in Abhängigkeit vom eingesetzten Treiber zeigen zu können, da ein Antikörper gegen das *elav*-Protein zur Verfügung stand. Wird in dieser Linie GAL4 in den Domänen von *engrailed* synthetisiert, so ist auch das *elav*-Protein in diesen Abschnitten, die den posterioren Kompartimenten jedes einzelnen Segmentes entsprechen, nachzuweisen und zwar schon zu einem Zeitpunkt, wenn das endogene *elav*-Gen noch lange nicht aktiv ist (*Abb. 3*). Dieses zeigt, dass das benachbarte Gen ekto- pisch in Zeit und Raum in Abhängigkeit von dem Expressionsprofil aktiviert werden kann, das durch das transgene GAL4-Gen bestimmt wird. Da eine Vielzahl unterschiedlicher GAL4-Treiber zur Verfügung steht, kann man jedes Gen, das „richtig“ zu einer *P{Mae-UAS.6.11}*-Insertion liegt, entsprechend den Erfordernissen gezielt überexprimieren. Von Vorteil ist besonders eine Überexpression im Auge, wenn sie zu einer gestörten Anordnung der Ommatidien im Komplexauge führt, dem so genannten rauen Auge. Verstärkung oder Verbesserung des Phänotyps nach Einkreuzung anderer Mutationen führt nämlich direkt zur Identifizierung von Enhancern bzw. Suppressoren und damit zu interagierenden Partnern des überexprimierten Genproduktes (THOMAS und WASSARMAN, 1999).

### Ausblick

Es soll allerdings nicht verschwiegen werden, dass bei allen Möglichkeiten, die das System bietet, die Linien nur das Rohmaterial für eine funktionale Analyse darstellen. Erst der Einsatz all der genetischen und molekularen Werkzeuge, die als Folge der langen Erfahrung mit *Drosophila* zur Verfügung stehen, wird zum Erfolg führen. Darüberhinaus muss bezweifelt werden, dass wirklich alle X-chromosomalen Gene mit diesem Ansatz erfasst werden können. Bei der bekannten Präferenz der P-Elemente für bestimmte DNA-Regionen (LIAO *et al.*, 2000) wird dieses schon ökonomisch nicht sinnvoll sein. Abhilfe könnte der Wechsel zu anderen Transposons sein, die schon erfolgreich in *Drosophila* eingesetzt werden (z. B. HORN *et al.*, 2000), aber noch für die hier angesprochenen Ziele modifiziert werden müssten. Als „ultima ratio“ zur Mutagenese der letzten verbliebenen noch nicht getroffenen Gene wäre dann noch die kürzlich für *Drosophila* etablierte homologe Rekombination (RONG und GOLIC, 2000) einzusetzen. Welche Wege auch beschritten werden, es ist davon auszugehen, dass in wenigen Jahren jedes *Drosophila*-Gen für eine funktionale Analyse zur Verfügung stehen wird. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse werden dann auch mehr als hilfreich bei der

funktionalen Analyse der homologen Gene des Säuger-genoms sein.

### Literatur

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D. *et al.* (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195.
- Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T., Grell, E., Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1989): Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a *P-lacZ* vector. *Genes Dev.* 3: 1273–1287.
- Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993): Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401–415.
- Crisp, J. and Merriam, J. (1997): Efficiency of an F1 selection screen in a pilot two-component mutagenesis involving *Drosophila melanogaster* misexpression phenotypes. *Dros. Inf. Serv.* 80: 90–92.
- Horn, C., Jaunich, B. and Wimmer, E.A. (2000): Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev. Genet. Evol.* 210: 623–629.
- Janning, W. (1997): FlyView, a *Drosophila* image database, and other *Drosophila* databases. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 8: 469–475.
- Liao, G.C., Rehm, E.J. and Rubin, G.M. (2000): Insertion site preferences of the P transposable element in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3347–3351.
- Miklos, G.L.G. and Rubin, G.M. (1996): The role of the genome project in determining gene function: insights from model organisms. *Cell* 86: 521–529.
- Ochman, H., Gerber, A.S. and Hartl, D.L. (1988): Genetic application of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120: 621–623.
- Peter, A., Schöttler, P., Werner, M., Beinert, N., Dowe, G. *et al.* (2002): Mapping and identification of essential genes on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep.* 3: 34–38.
- Rong, Y.S. and Golic, K.G. (2000): Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* 288: 2013–2018.
- Rorth, P. (1996): A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12418–12422.
- Rubin, G.M. and Lewis, E.B. (2000): A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. *Science* 287: 2216–2218.
- Schäfer, U. and Jäckle, H. (2001): *Drosophila*-Genomprojekte: Vergangenheit, Gegenwart und Zukunft. *BIOspektrum* 7: 219–221.
- Sepp, K.J. and Auld, V.J. (1999): Conversion of *lacZ* enhancer trap lines to GAL4 lines using targeted repositioning in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151: 1093–1101.
- Spradling, A.C., Stern, D., Beaton, A., Rhem, E.J., Laverty, T. *et al.* (1999): The BDGP Gene disruption project: single P element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics* 153: 135–177.
- Thomas, B.I. and Wassarman, D.A. (1999): A fly's eye view of biology. *Trends Genet.* 15: 184–190.

### Korrespondenzadresse

PD Dr. Ulrich Schäfer  
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie  
Abt. Molekulare Entwicklungsbiologie  
D-37070 Göttingen  
Tel.: (0551) 201 1798  
Fax: (0551) 201 1755  
e-mail: uschaef@gwdg.de  
URL: <http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/170/>