

Regulation der Transkription und
Translation von *Mst77F* und der
Protamine und die Funktion der Protamine
während der Spermio-genese von
Drosophila

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bridlin Barckmann
aus Büdingen

Marburg/Lahn 2009

Philipps



Universität
Marburg

Vom Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

1	ZUSAMMENFASSUNG	- 1 -
2	EINLEITUNG.....	- 2 -
2.1	<i>Drosophila</i> Spermatogenese als Modellsystem.....	- 2 -
2.2	Die Spermatogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	- 2 -
2.3	Die transkriptionelle und translationale Genregulation während der Spermatogenese von <i>Drosophila</i>	- 4 -
2.3.1	Die transkriptionelle Regulierung translational reprimierter mRNAs durch tTAFs.....	- 7 -
2.3.1.1	Gewebespezifische TAFs in anderen Geweben und Modellorganismen	- 9 -
2.4	Chromatinreorganisation während der Spermiogenese von <i>Drosophila</i>	- 10 -
2.5	Verschiedene Hypothesen für die Notwendigkeit der Protamine	- 12 -
2.6	Nachweis von mRNA Lokalisation <i>in vivo</i>	- 14 -
2.6.1	Das MS2/MS2cp-System	- 17 -
2.6.2	Das λ N-System	- 18 -
3	ERGEBNISSE.....	- 19 -
3.1	Transkriptionale Regulation der <i>Protamine</i> und <i>Mst77F</i>	- 19 -
3.1.1	Der Promotor von <i>Mst77F</i> ist kurz, wie es für Promotoren in der <i>Drosophila</i> Spermatogenese typischen ist.....	- 19 -
3.1.2	Der Transkriptionsstart von <i>Mst77F</i>	- 20 -
3.1.3	Translationale Repression der <i>Mst77F</i> mRNA ist abhängig von der 5'UTR.....	- 20 -
3.1.3.1	Die mRNA des Y-Box Protein Yps ist während der Spermatogenese von <i>Drosophila</i> nachweisbar	- 23 -
3.1.4	Die Transkription von <i>Mst77F</i> und den <i>Protaminen</i> ist von tTAFs abhängig	- 24 -
3.1.5	Chromatin Immunpräzipitationen (ChIPs) identifiziert <i>protamin B</i> und <i>Mst77F</i> Gene als direkte Targets der tTAFs	- 25 -
3.2	Erzeugung einer Protamin Null-Mutante in <i>Drosophila</i>	- 28 -
3.2.1	Analyse der genomischen Region der Protamin Deletion	- 29 -
3.2.2	Trotz der Protamin-Deletion <i>protΔ</i> sind <i>Drosophila</i> -Männchen fertil.....	- 30 -
3.2.3	Die meisten Spermatidenkerne homozygoter <i>protΔ</i> -Männchen sind korrekt geformt und schlank	- 33 -
3.2.4	Alle untersuchten Spermatogenese-Charakteristika sind von der Protaminsynthese unabhängig.....	- 35 -
3.2.5	Protamin-eGFP, aber nicht <i>Mst77F</i> -eGFP oder <i>Mst99C</i> -eGFP, rettet die missförmigen Spermatidenkerne von <i>protΔ</i> Männchen.....	- 38 -

3.2.6	Protamin A- und Protamin B-defiziente Spermien sind sensitiver gegenüber Röntgenstrahlung als Wildtyp-Spermien.....	39 -
3.3	Etablierung zweier Systeme zur <i>in vivo</i> Lokalisation translational reprimierter mRNAs in der Spermatogenese von <i>Drosophila</i>.....	41 -
3.3.1	Die Komponenten des MS2cp/MS2sl-Systems in der Fliege	43 -
3.3.1.1	<i>MS2cp-mCherry</i> unter der Kontrolle des <i>β2tubulin</i> -Promotors zeigt eine zeitlich korrekte Expression in Testis	43 -
3.3.1.2	Die Expression eGFP-Fusionsproteine mittels MS2-Stemloop-markierter mRNA entspricht der der eGFP-Fusionsproteine ohne MS2-Stemloops	44 -
3.3.2	Die Komponenten des λN/BoxB-Systems in der Fliege	46 -
3.3.2.1	Das λN-Peptid-mCherry unter Kontrolle des <i>β2t</i> -Promotors zeigt eine zeitlich korrekte Expression im Testis	46 -
3.3.2.2	Die Expression eGFP-Fusionsproteinen mittels BoxB-markierter mRNA entspricht der der normalen eGFP-Fusionsproteinen	47 -
3.3.3	Etablierung der doppeltransgenen Fliegenlinien für das MS2cp/MS2sl-System und das λN/BoxB-System	50 -
3.3.3.1	Doppeltransgene Fliegen für das MS2cp/MS2sl-Sytem	50 -
3.3.3.2	Doppeltransgene Fliegen für das λN/BoxB-System.....	51 -
4	DISKUSSION	58 -
4.1	Die transkriptionelle Regulation der Expression von <i>Mst77F</i> während des Spermatozyten-Stadiums	58 -
4.1.1	Die Transkription von <i>Mst77F</i> wird durch eine kurze <i>cis</i> -regulatorische Regionen gesteuert	58 -
4.1.2	Der Transkriptionsstart von <i>Mst77F</i> liegt einige Basen unterhalb des vorhergesagten Transkriptionsstarts.....	60 -
4.1.3	Translationale Repression der <i>Mst77F</i> mRNA wird über die 5'UTR vermittelt	61 -
4.2	Die Transkription von <i>Mst35Bb</i> und <i>Mst77F</i> ist abhängig von testisspezifischen TAFs	63 -
4.3	Im Gegensatz zu Protaminmutanten in Säugern sind <i>Drosophila</i> Protamin-Null-Mutanten fertil.....	65 -
4.3.1	Die missgeformten späten Spermatischen Kerne der <i>protΔ</i> Mutante weisen auf eine verminderte strukturelle Integrität der Kerne hin.....	66 -
4.3.2	<i>Mst77F</i> und <i>Mst99C</i> haben wahrscheinlich keine redundante Funktion zu <i>ProtA</i> und <i>ProtB</i>	68 -
4.3.3	Protamine schützen das paternale Genom gegenüber Röntgenstrahlung.....	69 -
4.3.4	Ausblick: mögliche nächste Schritte um mehr über den Chromatinwechsel während der Spermatogenese zu erfahren.....	71 -

4.4	Das MS2cp/MS2sl-System und das λN/BoxB-System zur <i>in vivo</i> mRNA-Lokalisation in der Spermatogenese von <i>Drosophila</i>.....	- 72 -
4.4.1	Die einzelnen Komponenten des λ N/BoxB-Systems und des MS2cp/MS2sl-Systems werden in der Fliege exprimiert.....	- 73 -
4.4.2	Eine mögliche Lokalisation von mRNA an den Spermatidenkernen zum Zeitpunkt der Translation der markierten mRNA.....	- 75 -
4.4.3	Probleme und mögliche Verbesserungen bei der Auswertung der doppeltransgenen Fliegen des λ N/BoxB-Systems und des MS2cp/MS2sl-Systems	- 76 -
4.4.4	Ausblick: mögliche Fragestellungen und Experimente mit dem λ N/BoxB-System und dem MS2cp/MS2sl-System in Zukunft.....	- 78 -
5	MATERIAL UND METHODEN.....	- 80 -
5.1	Material	- 80 -
5.1.1	Oligonukleotide	- 80 -
5.1.2	Geräte	- 81 -
5.1.3	Chemikalien.....	- 82 -
5.1.4	Enzyme	- 84 -
5.1.5	Fertige Reagenziensätze	- 85 -
5.1.6	Sonstiges Material.....	- 85 -
5.1.7	Lösungen, Medien und Puffer	- 85 -
5.1.8	<i>Drosophila melanogaster</i> Fliegenstämme	- 87 -
5.1.9	Antikörper	- 89 -
5.1.10	Bakterienstamm	- 89 -
5.1.11	Computer-Software.....	- 89 -
5.2	Methoden.....	- 90 -
5.2.1	Allgemeine Fliegenarbeiten.....	- 90 -
5.2.1.1	Haltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	- 90 -
5.2.1.2	Kreuzungen von <i>Drosophila melanogaster</i>	- 90 -
5.2.1.3	P-Element vermittelte Keimbahntransformation in <i>Drosophila melanogaster</i>	- 91 -
5.2.1.4	Sammeln und Entchorionisierung von Fliegenembryonen.....	- 91 -
5.2.1.5	Mikroinjektion der Embryonen.....	- 92 -
5.2.1.6	Selektion der transgenen Fliegen.....	- 93 -
5.2.2	Erzeugung einer präzisen Deletion des Protamin Lokuses	- 93 -
5.2.3	Muller5-Test zur Bestimmung der Mutationsrate auf dem X-Chromosom	- 94 -
5.2.4	Präparation und Analyse von DNA und RNA.....	- 96 -
5.2.4.1	Erzeugung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i>	- 96 -
5.2.4.2	Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i>	- 97 -
5.2.4.3	Plasmid-Mini-Präparation (analytischer Maßstab)	- 97 -
5.2.4.4	Plasmid-Midi-Präparation (präparativer Maßstab)	- 98 -
5.2.4.5	Präparation von genomischer DNA aus <i>Drosophila melanogaster</i>	- 98 -

5.2.4.6	„Single Fly“ DNA Präparation	- 98 -
5.2.4.7	Isolation von Gesamt-RNA und mRNA aus <i>Drosophila melanogaster</i> Testes	- 99 -
5.2.4.8	Agarosegelelektrophorese	- 99 -
5.2.4.9	Isolation von DNA aus Agarosegel.....	- 100 -
5.2.4.10	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	- 100 -
5.2.4.11	Ethanol-fällung von DNA	- 100 -
5.2.5	Southern Blot Analyse.....	- 100 -
5.2.6	Enzymatische Manipulationen von DNA-Molekülen	- 103 -
5.2.6.1	Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	- 103 -
5.2.6.2	Dephosphorylierung von 5' Enden zur Prävention der Religation des Vektors.....	- 103 -
5.2.6.3	Ligation von DNA-Fragmenten.....	- 104 -
5.2.6.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	- 104 -
5.2.6.5	Klonieren mit dem TOPO™-TA-Vektor-Kit.....	- 105 -
5.2.7	Histologische Methoden.....	- 105 -
5.2.7.1	Immunfluoreszenzfärbungen an Testesquetschpräparaten.....	- 105 -
5.2.7.2	Terminal transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) zur Detektion von DNA Brüchen	- 106 -
5.2.7.3	X-Gal-Färbung an <i>Drosophila melanogaster</i> Testes.....	- 107 -
5.2.7.4	RNA <i>in situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila melanogaster</i> Testes	- 107 -
5.2.7.5	Chromatin Immunoprezipitation (ChIPs) an <i>Drosophila melanogaster</i> Testes.....	- 110 -
6	ANHANG.....	- 112 -
6.1	Liste der im Rahmen dieser Arbeit generierten Klone	- 112 -
6.2	Liste von Genen für RNA-binde-Proteine mit vorhergesagter Expression in der männlichen Keimbahn.....	- 114 -
7	LITERATUR	- 117 -
8	ABKÜRZUNGEN	- 126 -
9	CV BRIDLIN BARCKMANN	- 128 -
10	DANKSAGUNG.....	- 133 -
11	ERKLÄRUNG.....	- 134 -

1 Zusammenfassung

1 Zusammenfassung

Während der Spermatogenese werden aus diploiden Zellen hochspezialisierte, bewegliche, haploide Spermien zur Fertilisation der Eizelle gebildet. Die grundlegenden Merkmale des Prozesses sind dabei zwischen *Drosophila* und Säugern konserviert. Im Spermatozyten-Stadium der Spermatogenese wird ein hochspezialisiertes Transkriptionsprogramm gestartet, wobei viele Gene einmalig in der Entwicklung abgelesen werden. Zusätzlich werden alle postmeiotisch in der Spermio-genese benötigten Gene transkribiert, da nach der Meiose die Transkription nahezu stoppt. Die mRNA dieser Gene wird über den 5'UTR translational reprimiert. Jene mRNAs werden in *Drosophila* von einem paralogen TFIID-Komplex transkribiert, der testisspezifische TAFs, die tTAF, enthält. Es konnte mit Anti-Sa-ChIPs gezeigt werden, dass die Transkription von *ProtA*, *ProtB*, und *Mst77F*, den Hauptkomponenten des Chromatins im reifen Spermium, direkt von den tTAFs abhängig ist.

Wo die translational reprimierten mRNAs in der Zelle gespeichert werden, ist in *Drosophila* noch völlig unbekannt, deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Systeme, das MS2cp/MS2sl-System und das λ N/BoxB-System, zur *in vivo* Lokalisation von mRNAs etabliert.

Während der Bildung der Spermien kommt es zur Reorganisation des Chromatins. Dabei werden in *Drosophila* und in Säugern die Histone zuerst durch Transitionsproteine, und in einem weiteren Schritt durch Protamine ersetzt. Der Sinn dieser Umorganisation ist noch unklar, und die haploinsuffizienten Protamingene in Mäusen und Menschen können hier keine Antwort geben. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Deletion der Protamingene *ProtA* und *ProtB* in *Drosophila* erzeugt (*protΔ*), *protΔ*-Männchen sind überraschenderweise fertil. Nur etwa 20% der späten Spermatischen Kerne weisen einen morphologischen Defekt auf, die Kerne sind korrekt geformt, aber verkrumpelt oder verbogen. Charakteristika der Spermatogenese, wie die Bildung weitere chromatinorganisierender Proteine und das Auftreten der DNA-Brüche während der Chromatinreorganisation, sind von der Synthese der Protamine unabhängig. Jedoch sind protamindefiziente Spermien um 20% sensitiver gegenüber Röntgenstrahlung. Das unterstützt die Hypothese, dass die Protamine das exponierte Genom in Spermium vor mutagenen Einflüssen schützt.

2 Einleitung

2 Einleitung

2.1 *Drosophila* Spermatogenese als Modellsystem

Die *Drosophila* Spermatogenese ist ein ideales Modellsystem um die verschiedensten entwicklungsbiologischen Fragestellungen zu untersuchen. Die Entwicklung von diploiden, runden Zellen zu hochspezialisierten beweglichen Spermien erfordert das genaue Zusammenspiel unterschiedlichster Genprodukte. Diese Genprodukte müssen also zeitlich und gewebespezifisch genauestens reguliert sein. Viele dieser Gene werden nur während der Spermienmorphogenese benötigt und besitzen eine spezielle Transkriptionsregulation für die Expression in der männlichen Keimbahn. Die Spermatogenese in *Drosophila* ist also zum Beispiel ein gutes System um etwa die gewebespezifische und zeitliche Regulation von Genen zu untersuchen, und ist darüber hinaus ist der Prozess der Spermatogenese zwischen *Drosophila* und Säugetieren hochkonserviert und zur Fortpflanzung absolut notwendig.

2.2 Die Spermatogenese in *Drosophila melanogaster*

Die Testes in adulten *Drosophilae* sind paarige schlauchförmige Organe gefüllt mit Keimzellen und somatischen Zellen, die die Entwicklung der Keimzellen unterstützen (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). In einem Testisschlauch liegen alle Entwicklungsstadien der Keimzellen von apikal nach distal nacheinander angeordnet. An der apikalen Spitze befindet sich das Stammzellzentrum (germinal proliferation center), die sogenannte Hub (Abb. 1, gelb markiert), in der die somatischen Hubzellen die Stammzellnische für zwei Arten von Stammzellen bilden; das sind die somatischen Zyst Vorläufer Zellen (Cyst progenitor Cells, CPC), die die Zystzellen hervorbringen (Abb. 1, orange markiert), und die Keimbahnstammzellen (Germline stem cells, GSC) (Abb. 1, türkis markiert), die die Keimzellpopulation ausbilden. Zystzellen sind funktionelle Analoga zu den Sertolizellen in Säugern. Zwei Zystzellen umschließen ein Spermatogonium und bilden zusammen mit diesem eine Zyste.

2 Einleitung

Dieser Zystverband bleibt bestehen bis sich die reifen Spermatiden individualisieren. Die Keimbahn Stammzellen teilen sich asymmetrisch um eine Stammzelle zu regenerieren und um ein primäres Spermatogonium hervor zu bringen. Das Spermatogonium durchläuft eine Amplifikationsphase von vier Mitosen mit unvollständiger Cytokinese, die in einen Zystverband von 16 miteinander verbundenen Spermatozyten resultiert (Abb. 1, blau markiert), (Übersichtsartikel: Fuller, 1993; Renkawitz-Pohl et al., 2005). Die Spermatozyten treten dann synchron in eine verlängerte, etwa 3,5 Tage dauernde, G₂ Zellzyklusphase ein, die sich durch ein starkes Zellwachstum und eine hohe Transkriptionsrate auszeichnet. Am Ende dieser Phase durchlaufen die Spermatozyten die meiotischen Teilungen, wieder mit unvollständiger Cytokinese, die einen Zystverband mit 64 verbundenen Spermatiden (Abb. 1, dunkelrot markiert) ergeben. Die Spermatiden starten dann den Morphogeneseprozess, auch Spermiogenese genannt, in der die noch runden Zellen in hochspezialisierte Spermien umgewandelt werden. Dabei werden ein Großteil der Zellstrukturen und Organellen um- oder neugebildet, um diese auf Bewegung und Fertilisation zu spezialisieren, unter anderem wird das Axonem gebildet und die Mitochondrien werden umgeformt. Von besonderem Interesse ist dabei die Umgestaltung des Kerns; dabei verändert sich die Kernform drastisch (Abb. 3) und die Chromatinkonformation wird neu organisiert. Am Ende der Spermiogenese steht die Individualisierung, der sogenannte Individualisierungskomplex trennt die einzelnen Spermien voneinander und streift überschüssiges Cytoplasma ab, das in den Waste Bags (Abb. 1, braun markiert) aufgenommen wird. Die Cytoplasmabrücken zwischen den einzelnen Keimzellen werden dabei aufgelöst, die Zystzellen kollabieren, bzw. werden von einer Terminalen Epithelzellen aufgenommen (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Die nun freien Spermien wickeln sich auf und werden in das Testislumen und dann in die Samenblase abgegeben (Abb. 1, orange markiert, Terminal epithelium).

2 Einleitung

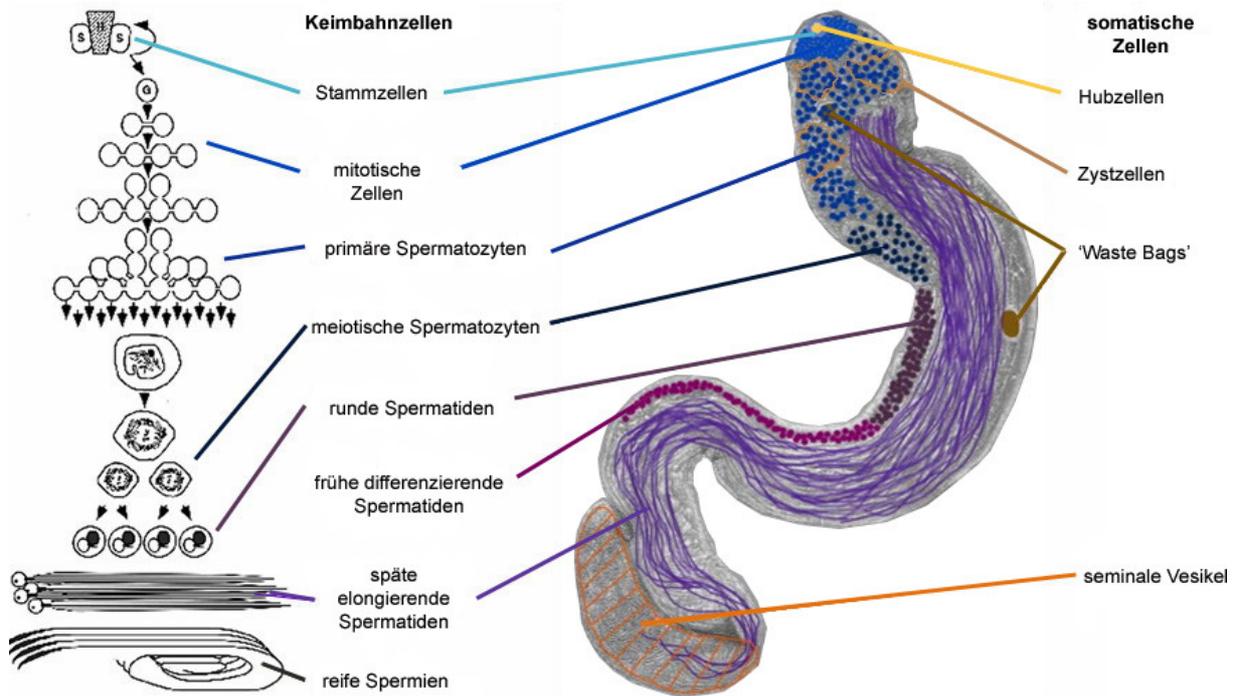


Abb. 1: Übersicht über die Entwicklungsstadien der Spermatogenese in *Drosophila*. Links ist eine schematische Darstellung der Entwicklungsstadien der Spermatogenese in *Drosophila* gezeigt, von oben mit den Stammzellen beginnend, und unten mit reifen Spermien endend. Rechts ist eine Durchlichtaufnahme eines adulten Testis gezeigt, die die Lage der einzelnen Stadien und der verschiedenen Zelltypen farblich markiert.

Die Abbildung wurde im Labor von Dr. Helen White-Cooper kreiert, copyright © Helen White-Cooper, und wurde zuerst auf FlyTED publiziert, der „*Drosophila* Testis Gene expression Database“ <http://www.fly-ted.org/> von woraus sie kopiert wurde (Zhao et al., in Druck).

2.3 Die transkriptionelle und translationale Genregulation während der Spermatogenese von *Drosophila*

Die tiefgreifenden morphologischen Umformungsprozesse der Zellen während der Spermatogenese erfordern eine präzise räumliche und zeitliche Regulierung der benötigten Proteine. Mit Eintritt ins Spermatozyten-Stadium starten die Zellen ein enormes, im Leben der Fliege einzigartiges, Genexpressionsprogramm. Es werden große Mengen testisspezifisch exprimierter Gene transkribiert. Microarray Daten, die verschiedene adulte Gewebe vergleichen (Andrews et al., 2000; Parisi et al., 2004; Chintapalli et al., 2007) zeigen, dass etwa 50 % aller Gene des Genoms im Testis

2 Einleitung

exprimiert sind, rund 8 % aller Gene sind testisspezifisch und etwa 5 % im Testis erhöht exprimiert (Übersichtsartikel: White-Cooper, 2009). Das vermittelt einen Eindruck welche regulatorische Leistung im Spermatozyten-Stadium während der Spermatogenese stattfinden muss. Viele Gene, die in der Spermatogenese exprimiert werden, sind entweder testisspezifisch exprimiert, mit Testis typischen Promotoren, oder die Expression im Testis wird über alternative Promotoren gesteuert. Dabei zeichnen sich Promotoren die Expression während der Spermatogenese vermitteln sich durch sehr kurze regulatorische Sequenzen aus (Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl et al., 2005). Einer der ersten analysierten Testis Promotoren war der Promotor des *β2Tubulin* Gens. Für die zeitliche und räumliche korrekte Expression sind hier nur 53 bp der Promotorregion in Verbindung mit 71 bp der 5'UTR notwendig. In der Promotorregion konnte ein 14 bp großes Motiv identifiziert werden, β 2UE1, das kritisch für die testisspezifische Transkription ist (Michiels et al., 1989). Sequenzen die mit dem β 2UE1-Motiv verwandt sind konnten in einigen weiteren Testis Promotoren gefunden werden, aber in zu wenigen um es als generelles testisspezifisches Promotormotiv anzusehen (Yang et al., 1995; Nurminsky et al., 1998). Ein weiteres Beispiel für ein Gen das durch einen kurzen testisspezifischen Promotoren reguliert wird ist das *juan like (djl)*. Hier sind für die zeitlich und räumlich korrekte Expression nur 106 bp nötig, von denen nur 11 bp vor den Transkriptionsstart liegen (Hempel et al., 2006).

In Mäusen reichen 113 bp aus um eine gewebespezifische Expression von *protamin 1* zu treiben, für ein hohes Transkriptionslevel sind allerdings noch Regionen weiter 5', insgesamt etwa 200 bp, nötig (Zambrowicz et al., 1993).

Anders als bei Säugern, bei denen Transkription bis ins runde Spermatozyten-Stadium stattfindet (Kierszenbaum und Tres, 1975), findet man in *Drosophila* nahezu keine postmeiotische Transkription. Das bedeutet das die Gene aller Proteine die während der Spermiogenese aktiv sind, im Spermatozyten-Stadium transkribiert werden, und die mRNAs translational reprimiert werden müssen, bis der korrekte Zeitpunkt für die Proteinexpression gekommen ist (Abb. 2). Ähnliches findet man auch in Vertebraten, obwohl dort postmeiotische Transkription stattfindet, wird diese mit der Kompaktierung der Chromosomen beendet, und alle Proteine die später gebraucht werden, werden auch von translational reprimierten mRNAs gebildet (Übersichtsartikel: Steger, 2001). Elemente die die translationale Reprimierung von mRNAs in der *Drosophila* Spermatogenese vermitteln sind bis jetzt nur in der 5'UTR

2 Einleitung

gefunden worden (z.B. *don juan like (djl)* und *don juan (dj)* (Hempel et al., 2006), *β -Tubulin* (Michiels et al., 1989), *Mst87F* (Kempe et al., 1993). Das steht im Kontrast zu translational reprimierten mRNAs in der Spermatogenese von Mammaliern, wo translationale Repression über die 3'UTR vermittelt wird, beschrieben für die Protamin Gene *protamine 1* und *protamine 2* (Hecht, 1998; Steger, 1999), und zur Regulierung translationaler Repression in Keimplasma in der Oogenese von *Drosophila* wo die translationale Repression auch über die 3'UTR vermittelt wird (Rangan et al., 2009).

Obwohl es eine große Menge translational reprimierter mRNAs während der Spermatogenese von *Drosophila* gibt, konnten erst für sehr wenige mRNAs Mechanismen gefunden werden, die für die translationale Repression verantwortlich sind. Es wurden testisexprimierte RNA-bindende Proteine gefunden; die RNA-bindenden Proteine Boule, Rb97D, Tsr und Arrest und Mutationen in den zugehörigen Genen führen zu männlicher Sterilität. Es konnten aber noch keine Ziel-mRNAs für diese Proteine gefunden werden.

Es konnte auch noch nicht geklärt werden wie diese Menge an translational reprimierten mRNAs in den Zellen gespeichert und stabilisiert wird. Diese Fragen näher zu beleuchten wird Teil dieser Arbeit sein.

2 Einleitung

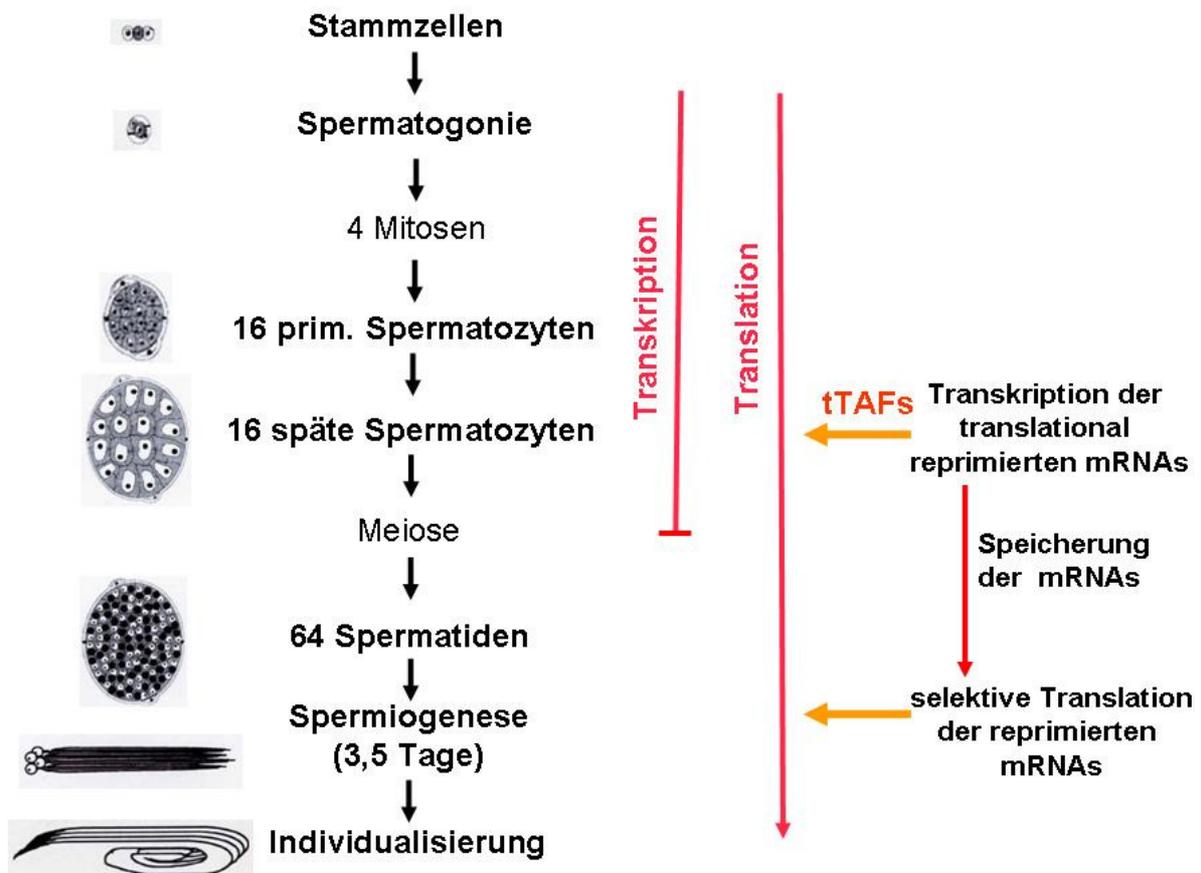


Abb. 2: Transkription und Translation während der Spermatogenese von *Drosophila*. Links sind schematische Zeichnungen der verschiedenen Entwicklungsstadien (Fuller, 1998) von oben nach unten laufend dargestellt, rechts daneben deren Bezeichnungen und Bezeichnungen der Prozesse die sie durchlaufen. Rechts in der Abbildung sind mit roten Linien und Pfeilen die Stadien markiert in denen Transkription bzw. Translation stattfindet. Daneben ist mit Pfeilen dargestellt in welchen Stadien translational reprimierte mRNAs gebildet werden, und wann sie selektiv aus der Reprimierung entlassen werden können.

2.3.1 Die transkriptionelle Regulierung translational reprimierter mRNAs durch tTAFs

Genexpression ist ein stark regulierter komplexer Prozess, der durch das Zusammenspiel verschiedener Multiproteinkomplexe an einem gegebenen Promotor erreicht wird. Der Transkriptionsfaktor TFIID ist zentraler Bestandteil der Maschinerie, die die mRNA Produktion durch die RNA-Polymerase II reguliert. Dieser große

2 Einleitung

Multiproteinkomplex setzt sich aus dem TATA box Bindeprotein (TBP) und verschiedenen TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) zusammen.

In der Spermatogenese von *Drosophila* gibt es testisspezifische TBP-assoziierte Faktoren (TAF), die tTAFs, die durch die *can*-Klasse der meiotic-arrest Gene kodiert werden (Hiller et al., 2004; Chen et al., 2005). Diese tTAFs sind *can* (*cannonball*), *mia* (*meiotic I arrest*), *sa* (*spermatocyte arrest*), *nht* (*no hitter*) und *rye* (*ryan express*). Bei Mutationen dieser Gene stoppt die Spermatogenese vor dem Eintritt in die Meiose (deshalb der Name meiotic-arrest Gene). Das bedeutet, dass die Testes gefüllt sind mit prämeiotischen Stadien (Übersichtsartikel: White-Cooper, 2009). Bei der Untersuchung der Expressionsprofile einiger bekannter Spermatogenese-relevanter Gene in tTAF Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Mutanten keinen generellen Defekt in der Transkription während Spermatogenese aufweisen, sondern nur einen Defekt in der Expression von Genen, die in der Spermiogenese eine Rolle spielen und deren mRNAs deshalb translational reprimiert sind (White-Cooper et al., 1998). Dies führte zur Hypothese, dass es in der Spermatogenese von *Drosophila* eine testisspezifische Version des ubiquitären TFIID Komplexes gibt, der wichtig für die Transkription der translational reprimierten mRNA ist. Dieser Testis-TFIID Komplex beinhaltet wahrscheinlich ein Set aus testisspezifischen TBP-assoziierten Faktoren (TAF) den tTAFs (Hiller et al., 2004; Chen et al., 2005) und einer Spleißvariante des TAF1, dem TAF1-2 (Metcalf und Wassarman, 2007). Die Existenz eines solchen Komplexes würde bedeuten, dass translational reprimierte mRNAs schon durch die Verwendung eines distinkten Transkriptionsinitiationskomplexes von den direkt translatierten mRNAs unterschieden werden.

Die Existenz eines solchen Testis-TFIID Komplexes wird von den existierenden Daten gestützt (Chen et al., 2005; Metcalf und Wassarman, 2007), aber es ist auch wichtig zu überdenken, dass manche der TAFs nicht nur Komponenten eines solchen TFIID Komplexes sind, sondern auch mit HAT- (Histon Acetyltransferasen) oder PcG- (Polycomb Gruppe) (Struhl et al., 1998; Saurin et al., 2001) Komplexen assoziieren, was eine funktionelle Interpretation komplizierter macht (Übersichtsartikel: White-Cooper, 2009).

2 Einleitung

2.3.1.1 Gewebespezifische TAFs in anderen Geweben und Modellorganismen

Gewebespezifische TAFs sind nicht nur in der Spermatogenese von *Drosophila* bekannt, sondern in einer ganzen Reihe anderer Modellorganismen und anderen Geweben.

In der Spermatogenese von Mäusen gibt es etwa eine keimzellspezifische Variante des generellen TAF7, TAF7L, der von frühen Spermatogonien bis zu runden Spermatiden exprimiert ist. Er ist dynamisch lokalisiert und ist in Spermatogonien und frühen Spermatozyten im Cytoplasma lokalisiert und ist in allen späteren Stadien in Nukleus. TAF7L bindet in pachytänen Spermatozyten und haploiden Zellen an TBP und interagiert mit TFIID (Pointud et al., 2003).

Ein weiterer gonadenspezifischer und b-zellspezifischer (Dikstein et al., 1996) TAF ist TAF4b in Mäusen. Er ist in Testes und Ovarien exprimiert. *Taf4b*-null Männchen sind anfänglich fertil, werden aber, mit etwa 11 Wochen, durch den Verlust der Stammzellpopulation steril. In diesen Mäusen ist die Expression von spermatogonialen Stammzellmarkern reduziert (Falender et al., 2005). *Taf4b*-null Weibchen sind steril durch eine abnormale Follikelentwicklung, diese fußt auf eine abträgliche Veränderung in der gewebespezifischen Genexpression (Geles et al., 2006).

Ein weiteres Beispiel für eine gewebespezifische Genaktivierung durch eine TAF-Variante ist die Aktivierung des Myogeninpromotors in der Muskelentwicklung durch einen TAF3/TRF3 Komplex. Ein TAF3/TRF3 Komplex ersetzt am Myogeninpromotor während der MyoD-abhängigen Aktivierung den kanonischen TFIID Komplex (Deato et al., 2008).

Zusammen genommen deuten diese Daten darauf hin, dass zelltypspezifische TAF-Homologe in verschiedenen Geweben in *Drosophila*, Maus und Mensch (Hiller et al., 2004; Hochheimer und Tjian, 2003) einen alternativen Mechanismus zur Aktivierung selektiver, gewebespezifischer Genexpressions-Programme bieten könnten.

2 Einleitung

2.4 Chromatinreorganisation während der Spermiogenese von *Drosophila*

Gegen Ende der Spermatogenese, während der Spermiogenese kommt es zu einer Kompaktierung und Umformung des Nukleus, gleichzeitig wird auch die Organisation des Chromatins grundlegend verändert. Am Ende dieses Prozesses ist der Kern nadelförmig und sein Volumen um das 200fache reduziert (Tates, 1971; zitiert in Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Von Säugern ist bekannt, dass im Laufe dieses Prozesses die somatischen Histone von der DNA gelöst werden, und vorübergehend durch Transitionsproteine (TP1 und TP2) ersetzt werden. Transitionsproteine sind kleine basische Proteine, deren Funktion noch nicht genau geklärt ist. Transitionsproteine verschiedener Spezies sind sehr variabel in ihrer Größe und Aminosäurezusammensetzung. Generell lässt sich sagen, dass Transitionsproteine basischer als Histone sind. Es scheinen Spezies- oder Klassen-spezifische Proteine zu sein (Übersichtsartikel: Wouters-Tyrou et al., 1998). Die Transitionsproteine werden dann wiederum durch Protamine ersetzt, dies sind kleine hochbasische cystein- und argininreiche Proteine, die das Chromatin in die hochkondensierte, transkriptionell inaktive Konformation versetzen, in der es in den reifen Spermien vorliegt (Übersichtsartikel: Sassone-Corsi, 2002). Die Konformation des Chromatins unterscheidet sich im Spermium grundlegend von der nukleosomalen Konformation in somatischen Zellen. Die Protamine bringen die DNA in eine deutlich kompaktere Form in der sie doughnutartig zu Stapeln aufgerollt ist (Übersichtsartikel: Braun, 2001). Der biologische Sinn dieser drastischen Neuorganisation des Chromatins ist noch nicht bekannt (Übersichtsartikel: Hennig, 2003).

Protamine und SNBPs (sperm nuclear basic proteins) sind sehr schnell evolvierenden Proteine (Übersichtsartikel: Lewis et al., 2003), und man findet in verschiedenen Tierarten höchst unterschiedliche Arten von Protaminen und anderen SNBPs, die die Chromatin-Neuorganisation in Spermien bewirken. In Mäusen und Menschen findet man zwei Protamingene, *protamine 1* und *protamine 2*, während in den meisten anderen Säugern nur ein Protamingen zu finden ist (Cho et al., 2001). In Fischen und Vögeln finden sich nur Protamine, die die Histone direkt ersetzen, in Anneliden und Echinodermaten bleibt die auf Histonen basierende nukleosomale Konfiguration des Chromatins auch in den Spermien erhalten (Wouters-Tyrou et al., 1998).

2 Einleitung

Vor einigen Jahren konnten in *Drosophila* auch zwei Protamingene gefunden werden *Mst35Ba* (*Protamin A* oder *ProtA*) und *Mst35Bb* (*Protamin B* oder *ProtB*). Die Protamine in *Drosophila* sind etwas größer als die Protamine der Säuger. Sie besitzen weniger Argininreste, aber die für Protamine typischen Cysteinereste, die in der Lage sind Disulfid-Brücken auszubilden. Zusätzlich tragen die *Drosophila* Protamine je eine HMG-Box (high mobility group) (Dorus et al., 2008), dies sind Domänen die Protein-DNA Interaktionen ermöglichen (Stros et al., 2007). *ProtA* und *ProtB* liegen in reifen Spermien mit dem Chromatin assoziiert vor (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Zusätzlich zu den Protaminen gibt es noch zwei weitere HMG-Box Proteine, *Mst77F* und *Mst99C*, die mit dem Chromatin im reifen Spermium assoziiert vorliegen (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke und Renkawitz-Pohl unveröffentlicht). *Mst77F* ist ein Histon H1 ähnliches Protein, dass Ähnlichkeiten zu Hils1 aus Mäusen (Iguchi et al., 2004; Yan et al., 2003) aufweist. *Mst99C* hat zwar das gleiche Expressionsmuster wie die Protamine ist aber größer und ähnelt ihnen in der Sequenz nur innerhalb der HMG-Box. Ansonsten hat *Mst99C* wie die Protamine auch einen relativ hohen Anteil an Argininen, hat aber im Vergleich zu den Protaminen einen relativ geringen Anteil von Cysteinen (Rathke und Renkawitz-Pohl unveröffentlicht). Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, das *Drosophila* auch Proteine besitzt, die das Expressionsmuster eines Transitionsproteins besitzen. *Tpl^{94D}* ist genau während des Übergangs von Histonen zu Protaminen mit dem Chromatin assoziiert. Es weist allerdings keine Sequenzhomologien zu den Transitionsproteinen der Säuger auf (Rathke et al., 2007) ist also eher ein funktionelles Homolog.

Bei Säugern findet man in reifen Spermien immer noch einen relativ hohen Anteil an Histonen am Chromatin, der sehr variabel ist und je nach Spezies zwischen 5% und 20% liegt. In Menschen verbleiben etwa 10- 20% der Histone am Chromatin; die Protamine bilden aber mit etwa 70% den größten Anteil an basischen Proteinen im Kern (Wouters-Tyrou et al., 1998). In *Drosophila* konnte bis jetzt noch nicht gezeigt werden, ob im Kern reifer Spermien noch Histone vorhanden sind. Mit Immunfluoreszenz konnten sie nicht nachgewiesen werden (Rathke et al., 2007), sie wurden allerdings in Proteomics-Analysen von reifen Spermien in *Drosophila* gefunden (Dorus et al., 2006).

Das Stadium in dem es zum Wechsel von Histon- zu Protamin-basierender Chromatinorganisation kommt nennt sich in *Drosophila* das Kanu-Stadium (benannt

2 Einleitung

nach der typischen Kernform). In diesem Stadium kommt es bei *Drosophila* zum Auftreten von DNA Brüchen, die mit der Expression von Tpl^{94D} überlappen. Die Brüche treten im frühen Kanu-Stadium auf, verstärken sich bis ins späte Kanu-Stadium und sind in vollständig elongierten Spermamid Kernen wieder verschwunden (Abb. 3), (Rathke et al., 2007). Wie diese Brüche eingefügt werden, und wie sie wieder repariert werden ist noch nicht geklärt. Aber sie sind wahrscheinlich notwendig, um den beim Entfernen der Histone auftretenden Supercoil in der DNA Doppelhelix wieder auszugleichen. In Menschen und Mäusen kommt während des Wechsels von Histonen zu Protaminen auch zu einem starken Auftreten von DNA Brüchen (Marcon und Boissonneault, 2004). Hier ist es Topoisomerase II, die als Kandidat für das Einfügen und Entfernen der Brüchen ins Chromatin gilt (Laberge und Boissonneault, 2005).

protamine 1 und *protamine 2* aus Mäusen sind haploinsuffizient, das heißt der Verlust einer Genkopie führt zu männlicher Sterilität (Braun, 2001; Cho et al., 2001; Kimmins und Sassone-Corsi, 2005; Sassone-Corsi, 2005). Und auch in Menschen korreliert die Reduktion in der Protaminmenge zu männlicher Unfruchtbarkeit (Aoki et al., 2005; Carrell et al., 2007; Iguchi et al., 2006; Oliva, 2006; Torregrosa et al., 2006). Säuger sind also nur bedingt dazu geeignet, die Rolle der Protamine näher zu untersuchen, deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Nullmutante für beide Protamine in *Drosophila* erzeugt.

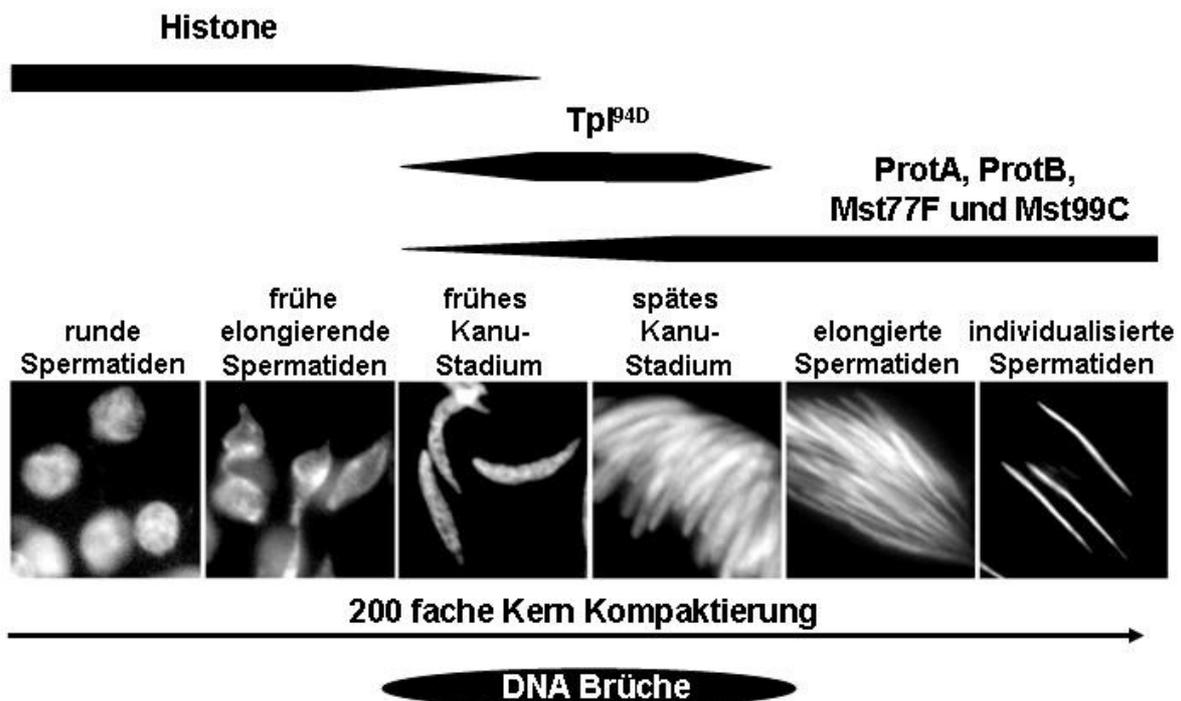
2.5 Verschiedene Hypothesen für die Notwendigkeit der Protamine

Die biologischen Gründe für die ungewöhnliche Chromatinstruktur in der männlichen Keimzelle sind noch immer unklar. Es gibt aber verschiedene Hypothesen. Erstens könnte die Kompaktierung des Chromatins dazu nötig sein, den Spermien einen kleinen, hydrodynamischen Kopf zu geben. Dabei ist generell anerkannt, dass die Chromatinkondensation in Spermienköpfen keinen direkten Einfluss auf die Kernformung hat. Aber die Bindung der basischen Protamine an die DNA führt zu einem Ausgleich der negativen Ladung der DNA und ermöglicht es somit, das Chromatin wesentlich enger zu packen (Übersichtsartikel: Oliva, 2006; Balhorn, 2007).

2 Einleitung

Zweitens wird spekuliert, dass die protamin-basierende Chromatinstruktur notwendig ist, um die Histone mit all ihren Modifikationen vom Chromatin zu entfernen. Während der Spermatogenese ist das Genom auf die Expression von Spermatogenese-genen programmiert. Diese Programmierung des Genoms muss aufgehoben werden, um dem Embryo die Möglichkeit zu geben die Entwicklung mit einem unmodifizierten paternalen Chromatin, ohne epigenetische Informationen, zu starten (Rathke et al., 2007; Übersichtsartikel: Oliva, 2006; Balhorn, 2007).

Drittens gibt es die These, dass die Organisation des Chromatins mit Protaminen nötig ist, um das Chromatin im Spermium vor mutagenen Einflüssen zu schützen (Übersichtsartikel: Hennig, 2003; Oliva, 2006). Dafür spricht zum Beispiel, dass im Menschen bei zu niedrigen Protamin Konzentration oder verschobenem P1/P2 Verhältnis ein höherer Anteil fragmentierter DNA im Spermium auftritt (Aoki et al., 2005). Ähnliches lässt sich bei Mäusen beobachten, hier führt eine *protamine 2* Defizienz zu einem erhöhten Anteil an geschädigter DNA im Spermium (Cho et al., 2003). Ein Hinweis für die Wichtigkeit von Protaminen in diesem Zusammenhang ist in dieser Arbeit gegeben.



2 Einleitung

Abb. 3: Der Wechsel von Histonen zu Protaminen während der Spermiogenese in *Drosophila*.

Die Bilder zeigen eine Hoechstfärbung, zur Visualisierung der DNA, an wildtyp Spermatiden Kernen an Testis-Quetschpräparaten. Von links nach rechts kann man die Umformung der Kerne verfolgen, von den runden Spermatidenkernen ganz links, bis zu den völlig elongierten individualisierten Spermatidenkernen ganz rechts. Die beiden Stadien in der Mitte zeigen das frühe und späte Kanu-Stadium in dem der Wechsel in der Chromatinorganisation von Histonen zu Protaminen stattfindet. Dargestellt als schwarze Blockpfeile über den Spermatidenkernen ist die Expression von Histonen, Tpl^{94D} und ProtA, ProtB und Mst77F während dieser Stadien. Die Histone sind in frühen Spermatiden exprimiert, und werden mit dem Eintritt ins Kanu-Stadium abgebaut. Mit dem Abbau der Histone startet die Expression von Tpl^{94D} und ProtA, ProtB und Mst77F. Die Expression von Tpl^{94D} endet im späten Kanu-Stadium. ProtA, ProtB und Mst77F sind auch in den reifen Spermien noch exprimiert. Unterhalb der Bilder ist als schwarze Ellipse der Zeitraum markiert, nämlich frühes und spätes Kanu-Stadium, in dem es während des Wechsels von Histonen zu Protaminen am Chromatin zu DNA Brüchen kommt. (Die Hoechst Färbungen der Wildtyp Spermatidenkerne sind Rathke und Barckmann et al. 2010 in Druck entnommen)

2.6 Nachweis von mRNA Lokalisation *in vivo*

In der Spermatogenese von *Drosophila* ist, wie in Abschnitt 3 bereits erwähnt, die translationale Repression einer großen Menge von verschiedenen mRNA Molekülen von essentieller Bedeutung. Da die Transkription mit Eintritt in die meiotischen Teilungen beinahe vollständig stoppt, müssen alle Gene deren Proteine während der Spermiogenese benötigt werden im Spermatozyten-Stadium transkribiert werden, und dann zum Teil über mehrere Tagen hinweg translational reprimiert werden (Abb. 2). Um eine Vorstellung für die Mengen an mRNAs zu erhalten, die in Spermatozyten und in den sich differenzierenden Spermatiden stabilisiert und gespeichert werden müssen, muss man sich vor Augen führen, dass etwa 8 % aller Gene testisspezifisch transkribiert sind und nochmal etwa 5 % alle Gene im Testis erhöht exprimiert sind (White-Cooper, 2009). Es wurden außerdem etwa 350 verschiedene Proteine im Spermien-Proteom gefunden (Dorus et al., 2006), die ja nur die Gene repräsentieren, die nicht nur transient während der Spermiogenese exprimiert werden. Wo und wie diese Mengen an mRNAs in der Zelle gespeichert werden, ist noch nicht bekannt. Auch über die Mechanismen der translationalen Repression in Säugern ist noch nicht viel bekannt (Kleene, 2003). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die mRNA von *Tnp1* mit den sogenannten „chromatoid bodies“ lokalisiert (Morales et al., 1991),

2 Einleitung

jedoch konnte die mRNA von *Tnp2* oder *Prm1* in den „chromatoid bodies“ nicht nachgewiesen werden (Morales und Hecht, 1994).

Um mehr über die translational reprimierten mRNAs zu erfahren, wurde in dieser Arbeit versucht ausgewählte mRNAs *in vivo* zu verfolgen. Dazu wurde das MS2/MS2cp-System und das λ N/BoxB-System genutzt. Beide Systeme funktionieren nach dem gleichen Prinzip. Man benötigt zwei Komponenten, RNA-Haarnadelstrukturen (ab hier Stemloops genannt) und spezifisch an diese Stemloops bindende Proteine. Die RNA-Stemloops werden mit der zu untersuchenden RNA fusioniert. Die Bindeproteine werden mit einem Reporter fusioniert (z.B. mCherry), beide Elemente müssen dann in derselben Zelle exprimiert werden. Wenn die markierten Bindeproteine dann spezifisch an die in die mRNA integrierten Stemloops binden, machen sie so die mRNA in der lebenden Zelle sichtbar (Abb 4). Das MS2cp/MS2sl-System wird schon länger erfolgreich für die *in vivo* Verfolgung von mRNA genutzt z.B. für die Verfolgung der *Ash1* mRNA während der Knospung bei Hefe (Bertrand et al., 1998). Es ist auch schon erfolgreich in *Drosophila* genutzt worden um z.B. die Lokalisation der *nanos* mRNA in der Oogenese zu klären (Forrest und Gavis, 2003).

Das λ N/BoxB-System wurde erstmals von Daigle et al. zur *in vivo* Verfolgung von mRNA beschrieben (Daigle und Ellenberg, 2007). In *Drosophila* wurde es noch nicht zur Verfolgung von mRNAs genutzt, es wurde aber erfolgreich in Embryoextrakten aus *Drosophila* genutzt um die translationalrepressorische Wirkung von dSXL auf die *msl2* mRNA zu untersuchen (Grskovic et al., 2003). Es wurde bis jetzt aber noch nicht *in vivo* in *Drosophila* Geweben genutzt.

Im Folgenden wird genauer auf die einzelnen Systeme eingegangen.

2 Einleitung

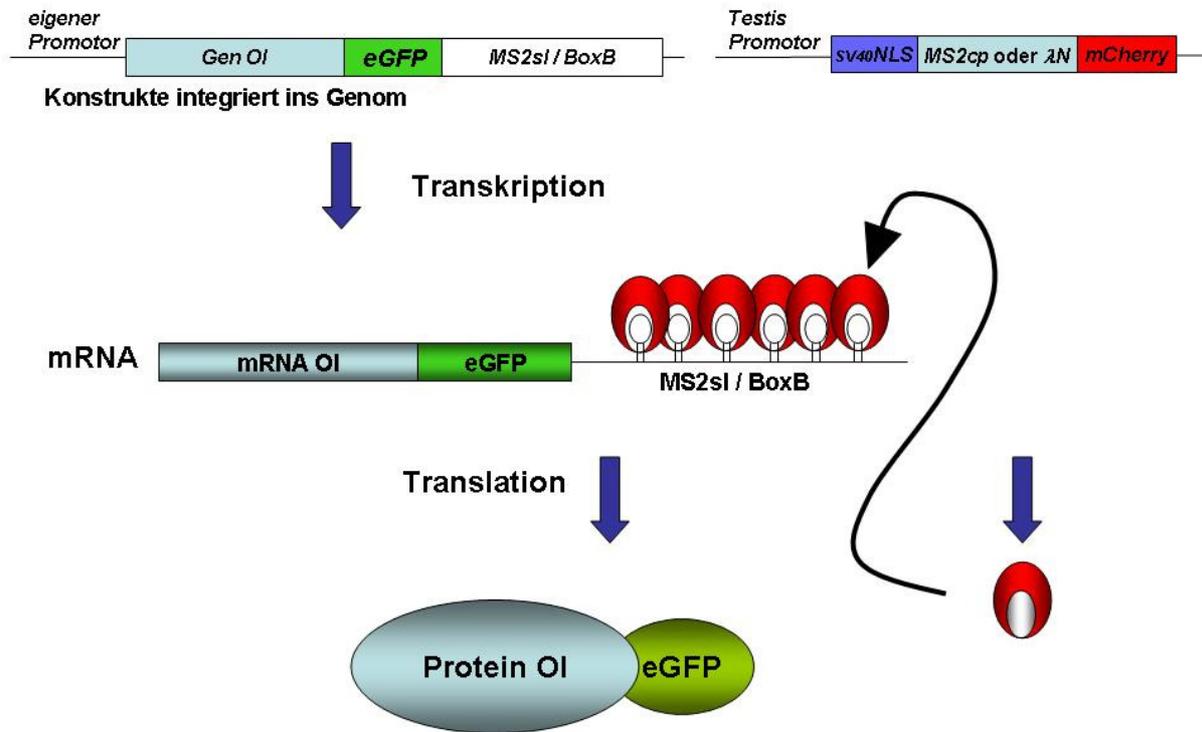


Abb 4: Prinzip der *in vivo* mRNA-Verfolgung mit Hilfe des MS2/MS2cp-Systems oder des λ N/BoxB-Systems während der Spermatogenese von *Drosophila*. Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Komponenten und des Prinzips der mRNA-Verfolgung mit Hilfe des MS2cp/MS2sl-Systems und des λ N/BoxB-Systems. In der obersten Reihe sind die zu klonierenden Konstrukte der beiden nötigen Komponenten dargestellt. Links ist das Konstrukt des zu untersuchenden Gen (Gen of interest, Gen OI) dargestellt, unter Kontrolle des eigenen Promotors und der 5'UTR, fusioniert mit dem Reporter gen eGFP und den Stemloops des jeweiligen Systems. Rechts ist das Konstrukt des jeweiligen RNA-Bindeprotein dargestellt, unter Kontrolle eines Testis-Promotors und versehen mit einer NLS fusioniert mit dem Reporter gen mCherry. Werden beide Konstrukte in derselben Zelle exprimiert, dann bindet das Bindeprotein an die Stemloops in der zu untersuchenden RNA (RNA of interest, RNA OI) und markiert die mRNA so indirekt mittels des mCherry. Wird die RNA OI translatiert kann man in derselben Zelle die Lokalisation des Proteins mittels des eGFP beobachten.

2 Einleitung

2.6.1 Das MS2/MS2cp-System

Der MS2-Bakteriophage ist ein RNA-Bakteriophage der *E.coli* befällt. Während der letzten Phase der Infektion von *E.coli* durch diesen Bakteriophagen wird die Translation der mRNA des *replicase* Gens durch die Bindung des MS2 coat proteins (MS2cp) an MS2-Stemloops in der mRNA blockiert. Das MS2cp und die MS2-Stemloops werden für *in vivo* Assays z.B. zur Verfolgung von mRNAs genutzt (Forrest und Gavis, 2003; Bertrand et al., 1998) (Abb. 5). Das MS2cp ist 129 AS groß (13,7 kDa) und bindet als Dimer. Wenn es in Konzentrationen höher als $1\mu\text{M}$ vorliegt, fängt es an zu Capsiden zu aggregieren. Es ist dann nicht mehr in der Lage an RNA zu binden. Um dies im experimentellen Hintergrund zu verhindern, wurde eine Mutante generiert, die zwar noch in der Lage ist Dimere zu bilden, aber keine Aggregate mehr bilden kann. In dieser Mutante, der *d1FG*-Mutante, ist die FG-Schleife deletiert (LeCuyer et al., 1995) (Abb. 5 B).

Die MS2-Stemloops bestehen aus 21 Nukleotiden und existieren in einer Wildtyp-Variante und einer high-affinity-Mutante, bei der ein Nukleotid (A \rightarrow C) im Kopfbereich des Stemloops ausgetauscht ist (Übersichtsartikel: Keryer-Bibens et al., 2008), (Abb. 5 A), in den mRNA-Verfolgungs-Assays wird die high-affinity-Mutante eingesetzt. An die high-affinity Mutante der MS2-Stemloops bindet das MS2cp mit einer Affinität von $K_d = 1-3 \cdot 10^{-9}$ M.

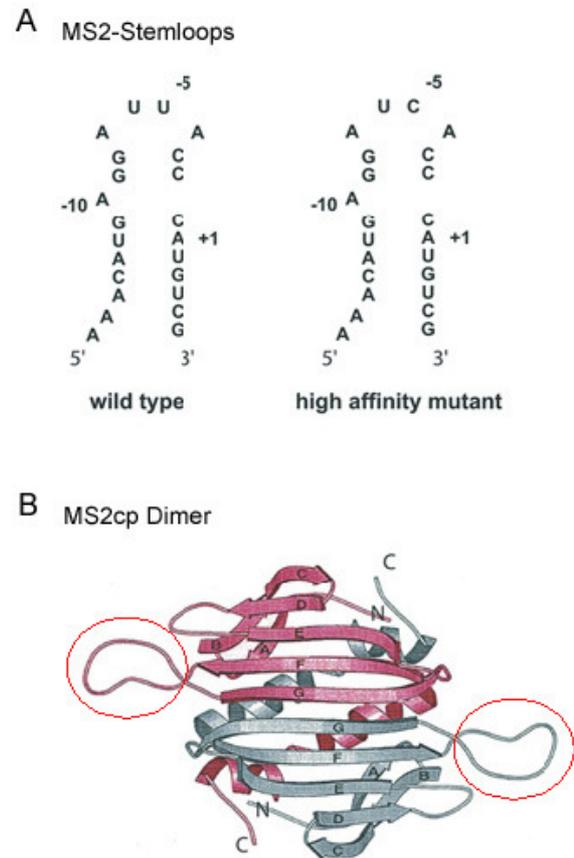


Abb. 5: Komponenten des MS2/MS2cp-Systems. (A) Wildtyp und high affinity Mutante des MS2-Stemloops. (B) MS2cp Dimer. Mit roten Kreisen markiert sind die FG-Schleifen, die in der *d1FG*-Mutante deletiert sind. Abbildung übernommen aus ((2008))

2 Einleitung

2.6.2 Das λ N-System

Der λ N-Bakteriophage ist ein DNA Virus der Klasse „Lamdoid Phagen“. Das N-Protein ist ein Antiterminator und bindet in dieser Funktion an bestimmte Sequenzen in der RNA, die *nut_L* und *nut_R* Elemente. Diese Elemente enthalten eine konservierte Sequenz, das BoxB-Element, ein 15 bp großer Stemloop, an den das N-Protein spezifisch bindet (Abb. 6 A). Für die Bindung des N-Proteins an die BoxB-Elemente sind 22 Nukleotide nötig, das N-Peptid (Tan und Frankel, 1995), (Abb. 6 B). Diese 22 Nukleotide werden in *in vivo* Assays, z. B. zur mRNA Verfolgung, zusammen mit den BoxB-Stemloops genutzt. Das N-Peptid bindet als Monomer mit einer Affinität von $K_d = 1,3 \pm 0,4 \cdot 10^{-9}$ M an die BoxB-Stemloops (Übersichtsartikel: Keryer-Bibens et al., 2008).

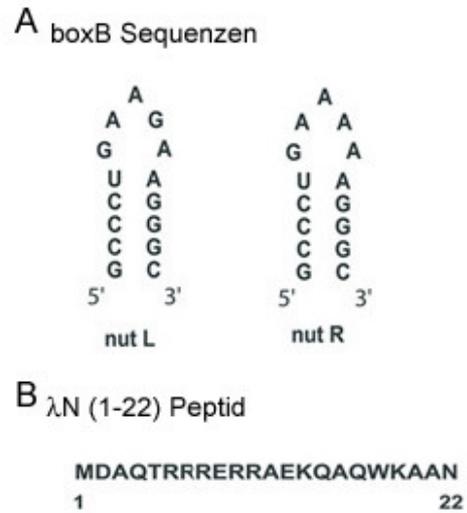


Abb. 6: Komponenten des λ N/boxB-Systems. (A) BoxB-Stemloops der *nut L* und *nut R* Elemente. (B) Sequenz des λ N-Peptids. Abbildung übernommen aus Keyer-Bibens (2008).

3 Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Transkriptionale Regulation der *Protamine* und *Mst77F*

Die in früheren Arbeiten begonnene Analyse der regulatorischen Elemente von *Mst77F* (Diplomarbeit Barckmann, 2005) soll in dieser Arbeit vervollständigt werden. Es wurde die *cis* regulatorische Region identifiziert, die für die translationale Repression nötig ist. Außerdem wurde die Abhängigkeit der Transkription von *Mst77F* und *Protamin B* von einem der tTAF, *can*¹², geprüft.

3.1.1 Der Promotor von *Mst77F* ist kurz, wie es für Promotoren in der *Drosophila* Spermatogenese typischen ist

Mit *Promotor-LacZ*-Konstrukten konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass für *Mst77F* 89 bp vor dem vorhergesagten Transkriptionsstart, bzw. 261 bp vor dem ATG ausreichend sind, um eine hohe Menge an β -Galaktosidase in räumlich und zeitlich korrekter Weise zu exprimieren (Abb. 7 B b). Die Menge an β -Galaktosidase nimmt deutlich ab, wenn das *Promotor-LacZ*-Konstrukte mit der gleichen Promotorlänge aber ohne die 5'UTR nutzt (Abb. 7 B b+c). Die für die translationale Repression von *Mst77F* verantwortlichen Elemente konnten noch nicht bestimmt werden (Diplomarbeit Barckmann, 2005).

Ein neu generiertes *Promotor-LacZ*-Konstrukt für *Mst77F pc77F3- Δ 5'UTR-29bp* hat im Vergleich zu *Promotor-LacZ*-Konstrukt *pc77F3- Δ 5'UTR* zusätzlich 29bp der 5'UTR deletiert und so endet das *Promotor-LacZ*-Konstrukt sehr knapp hinter dem vorhergesagten Transkriptionsstart von *Mst77F* (Abb. 7 A). Dieses Konstrukt zeigt keinerlei β -Galaktosidase Expression mehr (Daten nicht gezeigt). Entweder wurde der Transkriptionsstart, oder essentielle Promotor Elemente in der 5'UTR wurden entfernt.

Der Promotor von *Mst77F* besitzt keine TATA-Box oder andere konservierten klassischen Promotorelemente und auch keine bekannten

3 Ergebnisse

Transkriptionsfaktorbindestellen. Vergleich mit *Drosophila simulans* und *D. sechellia* zeigten, dass der Promotor (148 bp vor der 5'UTR) von *Mst77F*, genau wie der ORF, in den drei Spezies vollständig konserviert ist.

3.1.2 Der Transkriptionsstart von *Mst77F*

Der Transkriptionsstart für *Mst77F* konnte noch nicht genau bestimmt werden, sowohl, die Versuche den Transkriptionsstart für *Mst77F* mittels Primer Extension Experimente zu bestimmen, führten noch nicht zum Erfolg. Der vorhergesagte Transkriptionsstart ist in der Schemazeichnung von Abb. 7 eingezeichnet. Wahrscheinlich liegt er aber etwas weiter unterhalb, zwischen den Reverse-Primern, die für die Erzeugung der Konstrukte *pc77F3Δ5'UTR* und *pc77F3Δ5'UTR-29bp* genutzt wurden, da Konstrukt *pc77F3Δ5'UTR* noch Transkription vermittelt (Abb. 7 B c) das Konstrukt *pc77F3Δ5'UTR-29bp* aber gar keine Expression mehr zeigt. Zwischen diesen beiden Konstrukten liegen 29 bp, innerhalb dieser Sequenz startet eine Testis-cDNA und liegt ein Initiator Sequenzmotiv. Es ist also wahrscheinlich, dass der Transkriptionsstart von *Mst77F* innerhalb dieser 29 bp liegt.

3.1.3 Translationale Repression der *Mst77F* mRNA ist abhängig von der 5'UTR

Die mRNA von *Mst77F* ist vom Spermatozyten-Stadium bis ins Kanu-Stadium translational reprimiert (Abb. 9). Um die für die translationale Repression nötigen Elemente zu identifizieren, wurden *Promotor-LacZ*-Konstrukte etabliert, die Deletionen der 5'UTR tragen (Abb. 7 A), (Diplomarbeit Barckmann, 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass die 5'UTR von *Mst77F* für die translationale Repression der mRNA nötig ist (anders als in meiner Diplomarbeit Barckmann, 2005 postuliert). In *Promotor-LacZ*-Konstrukten, denen 134 bp der 5'UTR fehlt, *pc77F2-Δ5'UTR* und *pc77F3-Δ5'UTR*, startet die Expression des Reporterproteins β -Glaktosidase bereits in Spermatozyten (Abb. 7 Pfeilkopf exemplarisch gezeigt für

3 Ergebnisse

pc77F3-Δ5'UTR). Die translationale Repression von *Mst77F* liegt also wie bei *protamin B* (Barckmann et al., in Vorbereitung), *dj* (Blumer et al., 2002) und *djl* (Hempel et al., 2006) in der 5'UTR der mRNA und nicht wie bei den Protaminen der Säuger in der 3'UTR (Übersichtsartikel: Hecht, 1998; Steger, 1999).

Überraschenderweise zeigte die *LacZ*-Färbung an larvalen Testes β -Galaktosidaseaktivität in Spermatozyten für alle *Mst77F Promotor-LacZ*-Konstrukte außer *pc77F3-Δ5'UTR-29bp*, das aber auch in adulten Testes keine β -Galaktosidaseaktivität mehr zeigt. Larvale Testes beherbergen nur prämeiotische Stadien und keine Spermatiden-Stadien, bei translationaler Repression der mRNA würde man also keine Färbung erwarten. Die *LacZ*-Färbung an *Promotor-LacZ*-Konstrukten ohne 5'UTR zeigt aber auch eine wesentlich stärkere Expression im larvalen Testis (Abb. 7 B c und c') als *Promotor-LacZ*-Konstrukte mit 5'UTR (Abb. 7 B a, b und a', b'), wenn man sie mit dem genrellen Expressionsniveau des jeweiligen Konstrukts vergleicht.

Die Expression von β -Galaktosidase in *Promotor-LacZ*-Konstrukten mit 5'UTR, ist in Färbungen an larvalen Testes offensichtlich ist (Abb. 7 B a'+ b'), aber auch in adulten Testes ist eine schwache Färbung in den Spermatozyten zu erkennen. Diese verfrühte Expression von β -Galaktosidase muss durch Durchlässigkeit, d.h. eine generelle basale Transkription des Promotors in den *Promotor-LacZ*-Konstrukten zustande kommen. Das gleiche Phänomen konnte abgeschwächt in *Promotor-LacZ*-Konstrukten für *protamin B* (Dissertation Jayaramaiah Raja, 2005) gesehen werden (Daten nicht gezeigt), aber es konnte nicht bei *Promotor-LacZ*-Konstrukten für *djl* (Hempel et al., 2006) beobachtet werden, die Beide als Kontrolle mitanalysiert wurden. Die *Promotor-LacZ*-Konstrukte für *Mst77F*, *protamin B*, *dj* und *djl* wurden alle mit demselben Vektor kloniert, die Durchlässigkeit kann also nicht am Experiment an sich liegen. In *Mst77F*-eGFP Fliegen kann man diese verfrühte Expression nicht beobachten (Diplomarbeit Barckmann, 2005), wahrscheinlich weil hier keine enzymatische Amplifikation des Signals wie bei der *LacZ*-Färbung stattfindet.

3 Ergebnisse

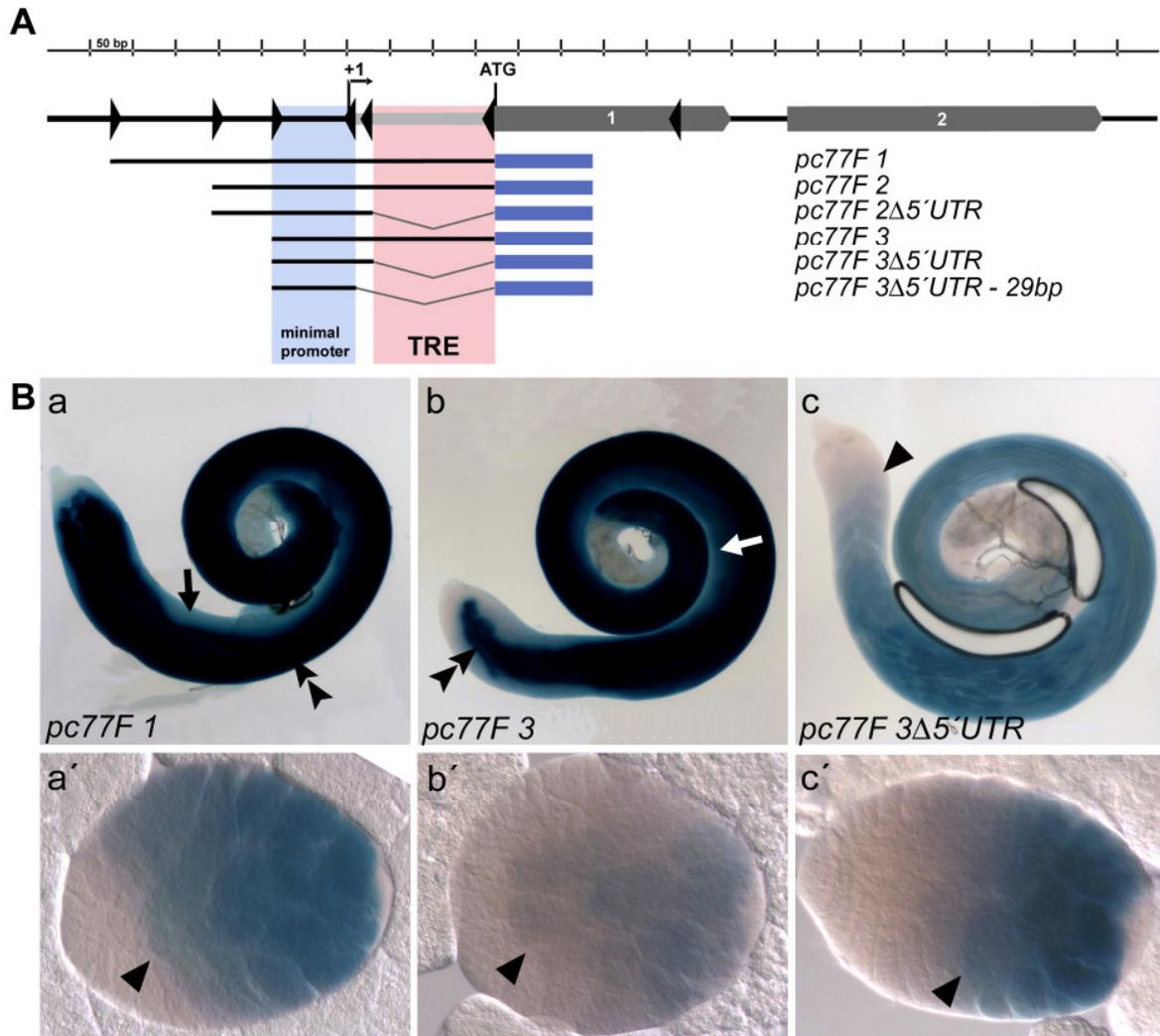


Abb. 7: Cis regulatorische Elemente für *Mst77F*. In (A) schematische Darstellung der genomischen Region und der *Promotor-LacZ*-Konstrukte für *Mst77F*. Dargestellt sind Exons als graue Blockpfeile, die 5'UTR als hellgrauer Bereich und Primer als schwarze Dreiecke. Der Transkriptionsstart ist als Pfeil markiert und das Startcodon mit ATG markiert. In hellblau ist der minimale Promoter eingezeichnet und in rosa der Bereich der translationale Repression der mRNA vermittelt. Darunter sind die getesteten *Promotor-LacZ*-Konstrukte schematisch eingezeichnet. Als schwarze Linie sind die im Konstrukt enthaltenen Bereiche und als dünnere Linie dazwischen deletierte Bereiche gekennzeichnet, das Reportergen *LacZ* ist als blaues Rechteck dargestellt. In (B) sind β -Galaktosidase-Färbungen adulter und lavalter Testes der *Promotor-LacZ*-Konstrukte *pc77F1* (a, a'), *pc77F3* (b, b') und *pc77F3Δ5'UTR* (c, c') gezeigt. Die Pfeile in (a) und (b) markieren Spermatiden ohne β -Galaktosidase-Färbung und der Peilkopf in (c) markiert Spermatozyten mit β -Galaktosidase-Färbung. Die Doppelpfeilköpfe in (a) und (b) markieren elongierte Spermatiden mit starker β -Galaktosidase-Färbung. Die Pfeilköpfe in (a') (b') und (c') markieren Spermatozyten mit β -Galaktosidase-Färbung.

3 Ergebnisse

3.1.3.1 Die mRNA des Y-Box Protein Yps ist während der Spermatogenese von *Drosophila* nachweisbar

Es ist wahrscheinlich, dass für die translationale Repression RNA-bindende-Proteine an die für die translationale Repression identifizierten Bereiche in der mRNA binden. Es gibt eine ganze Reihe von RNA-bindenden Proteinen, die während der Spermatogenese von *Drosophila* exprimiert sind (siehe Anhang Kap.6.2). Eines davon ist das RNA-Bindeproteine Ypsilon Schachtel (*yps*). Yps ist ein Y-Box-Protein, dass eine Untereinheit des RNA-Protein-Komplexes ist, der in der Oogenese von *Drosophila* eine wichtige Rolle in der Lokalisation und Translationsregulation der *oskar* mRNA spielt (Wilhelm et al., 2000). Yps wirkt wahrscheinlich antagonistisch zu Orb, einem positiven Regulator der *oskar* mRNA Translation. Das Modell schlägt vor, dass Yps und Orb kompetitiv an die *oskar* mRNA binden und mit antagonistischen Effekten die Lokalisation und Translation der *oskar* mRNA regulieren (Mansfield et al., 2002). Mit *in situ* Hybridisierungen konnte gezeigt werden, dass *yps* mRNA auch in der Spermatogenese von *Drosophila* exprimiert wird (Abb. 8). Y-Box-Proteine werden häufig genutzt, um mRNAs translational zu reprimieren, z.B. sind die Y-Box-Proteine FRGY2 in *Xenopus* (Kwon et al., 1993) und MSY2 und MSY4 in Mäusen für die translationale Repression von mRNA in der Oogenese und der Spermatogenese nötig (Yang et al., 2006).

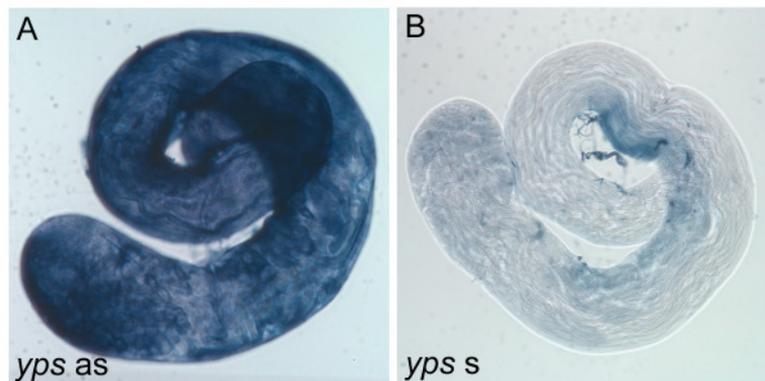


Abb. 8: Die mRNA des RNA-bindendenden Proteins Yps ist im Testis exprimiert. RNA *in situ* Hybridisierungen an Wildtyp Testes mit einer antisense (A) und sense (B) Sonde gegen *yps*. *Yps* mRNA ist in allen Stadien der Spermatogenese mit der antisense Sonde zu detektieren, wohingegen mit der sense Sonde keine Signal zu detektieren war.

3 Ergebnisse

3.1.4 Die Transkription von *Mst77F* und den *Protaminen* ist von tTAFs abhängig

In situ Hybridisierungen zeigen, dass die Transkripte für die *Protamine* und *Mst77F* früh in der meiotischen Prophase gebildet werden und bis ins späte Spermatiden-Stadium hin detektierbar sind (Abb. 9 A+B, linke Spalte). Die eGFP-Fusionsproteine dieser Gene zeigen allerdings, dass die Proteine erst im späten Spermatiden-Stadium gebildet werden (Abb. 9 A+B, rechte Spalte). ProtB-eGFP ist in den elongierten Kernen der Spermatiden und Spermien zu detektieren, genauso wie *Mst77F*-eGFP, das aber zusätzlich noch schwach in den Flagellen exprimiert ist (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Die mRNAs der *Protamine* und von *Mst77F* sind also für mehrere Tage unter translationaler Repression, und damit ist es denkbar, dass ihre Transkription abhängig von den tTAFs ist. Es wurde die Expression von *Mst77F* und den *Protaminen* in tTAF Mutanten, in denen der gesamte tTAF Komplex nicht gebildet wird (Hiller et al., 2004, Xin Chen persönliche Mitteilung), untersucht. In tTAF-Mutanten, hier gezeigt für *can¹²*, ist die Expression der Protamin-mRNA nicht mehr detektierbar wie mit *in situ* Hybridisierungen gezeigt werden konnte (Abb. 10 A, a+b). Das Expressionslevel von *Mst77F*-mRNA dagegen ist zwar drastisch reduziert, aber es ist noch ein Signal zu detektieren (Abb. 10 A, c+d). Daraus lässt sich schließen, dass die Transkription der Protamine komplett von den tTAFs abhängig ist, *Mst77F* aber in geringem Maße unabhängig von den tTAFs transkribiert wird.

3 Ergebnisse

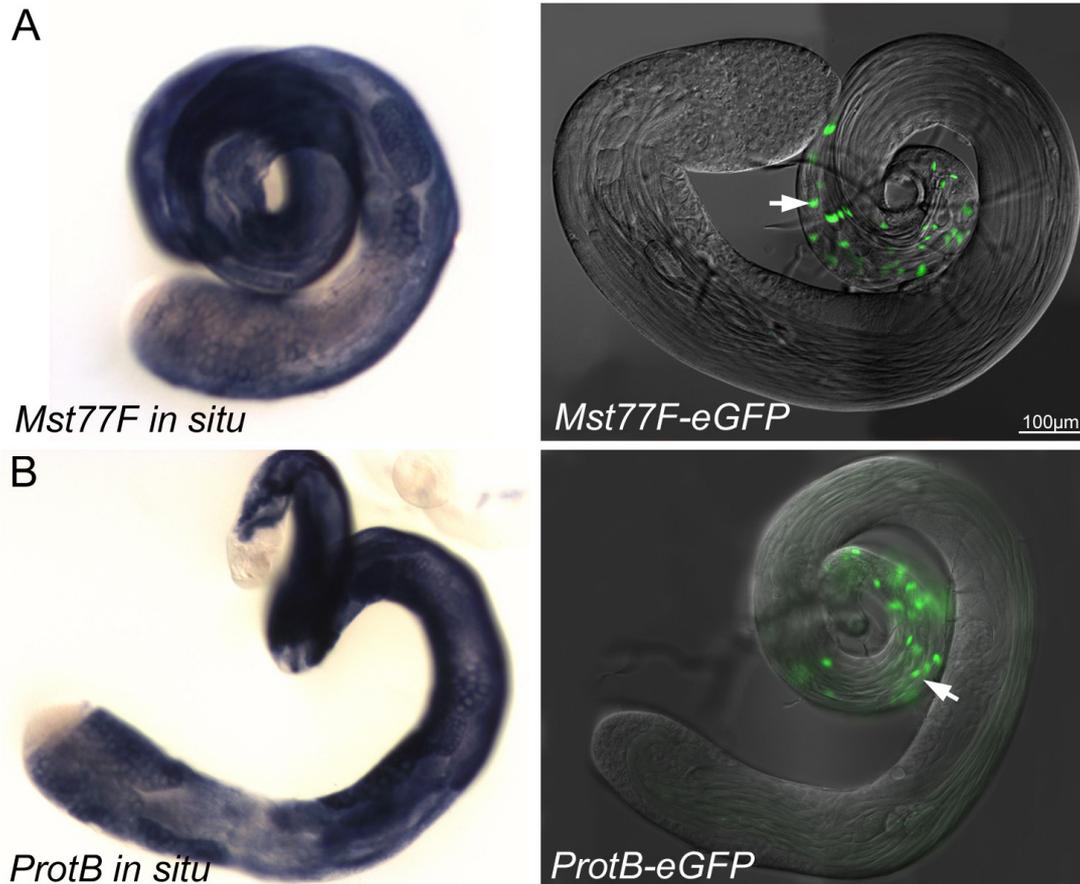


Abb. 9 Die mRNA von *Mst77F* und *ProtB* unterliegt einer translationalen Repression. Gezeigt sind in der ersten Spalte RNA *in situ* Hybridisierungen an Wildtyp Testes mit einer Sonde gegen *Mst77F* (A) und *ProtB* (B) und in der zweiten Spalte Frischpräparate von Testes die *Mst77F*-eGFP (A) oder *ProtB*-eGFP (B) exprimieren. Die mRNA von *Mst77F* und *ProtB* ist ab dem frühen Spermatozyten-Stadium zu detektieren und bleibt in allen späteren Stadien erhalten. Die eGFP-Fusionsproteine für *Mst77F* und *ProtB* werden erst im späten Spermatiden-Stadium translatiert. Der Pfeil in (A) und (B) markieren jeweils ein Bündel von 64 elongierten Spermatidenkernen in Zystverband, die *Mst77F*-eGFP bzw. *ProtB*-eGFP exprimieren. Die mRNA von *Mst77F* und *ProtB* unterliegt also vom frühen Spermatozyten-Stadium bis ins späte Spermatiden-Stadium einer translationalen Repression. Der Maßstabsbalken im oberen Bild der rechten Spalte markiert 100 µm und gilt für alle Abbildungen.

3.1.5 Chromatin Immunpräzipitationen (ChIPs) identifiziert *protamin B* und *Mst77F* Gene als direkte Targets der tAFs

Mit *in situ* Hybridisierungen an Testes von Wildtyp und *can*¹² Mutanten konnte klar gezeigt werden, dass die Transkription der mRNA der *Protamine* und *Mst77F* von

3 Ergebnisse

den tTAFs abhängig ist (Abb. 10 A). *In situ* Hybridisierungen erlauben es aber nicht, zwischen direkter oder indirekter Kontrolle zu unterscheiden. Deshalb wurde Chromatin Immunoprecipitationen (ChIPs) mit anti-Sa Antikörpern (Sa ist einer der tTAFs) an Testesextrakten durchgeführt. Die Analysen wurden an Wildtyp und *can*¹² Testesextrakten als negativ Kontrolle durchgeführt, da in allen tTAF Mutanten der gesamte tTAF-Komplex nicht mehr gebildet wird, und die Transkripte der untersuchten Gene drastisch reduziert sind. Das präzipitierte Chromatin wurde mit quantitativer real-time PCR auf die Anreicherung des *Mst77F* Promotors und der *Protamin* Promotoren getestet. Außerdem wurde auf die Anreicherung von Sa an einer Positivkontrolle, *Mst87F* einem bekannten Target der tTAFs, und einer Negativkontrolle, *Cyclin A (CycA)* das nicht durch die tTAFs transkribiert wird, getestet (Hiller et al., 2004; Chen et al., 2005).

Mst35Bb und *Mst77F* sind in Anti-Sa ChIPs an Wildtyp DNA angereichert im Vergleich zu ChIPs an *can*¹² DNA, *CycA* ist nicht angereichert. Die Anreicherung von *Mst35Bb* (2,5fach) ist deutlich, auch wenn sie ein wenig geringer ist als die Anreicherung der Positivkontrolle *Mst87F* (3,5fach). *Mst77F* ist jedoch weniger stark angereichert (1,8fach). Die Negativkontrolle *CycA* zeigt keinerlei Anreicherung und zeigt damit, dass das Experiment verlässlich funktioniert hat (Abb. 10 B). Es konnte also gezeigt werden, dass die *Protamingene* und *Mst77F* direkt von den tTAFs reguliert werden.

3 Ergebnisse

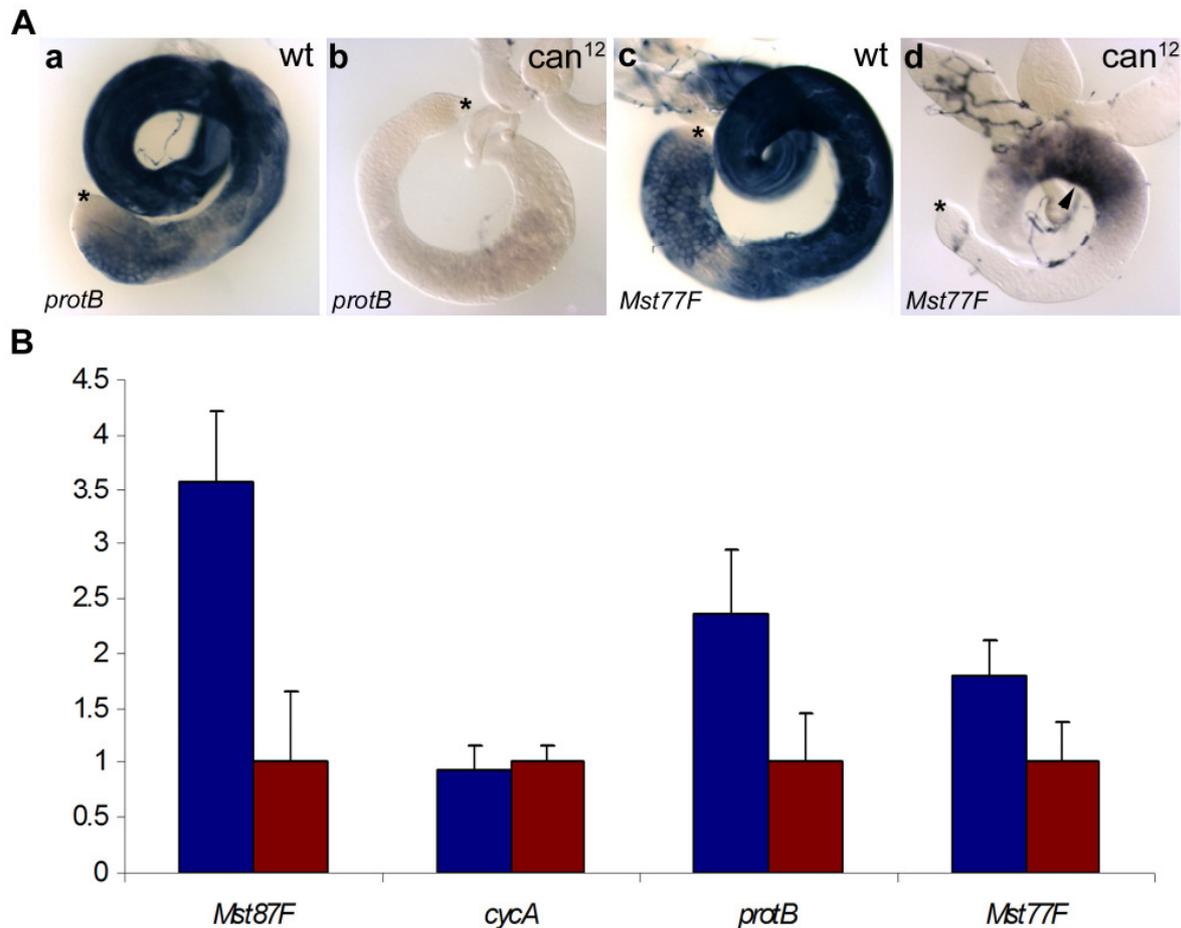


Abb. 10: Protamin B und Mst77F sind direkte Targets der tTAFs. In A sind *in situ* Hybridisierungen von *protamin B*- und *Mst77F*-Sonden an adulten Wildtyp Testes (a+c) und der tTAF Mutante *can*¹² (b+d) gezeigt. *Protamin B* mRNA ist im Wildtyp (a) ab den frühen Spermatozyten bis zu späten, voll elongierten Spermatischen detektierbar, in *can*¹² Mutanten (b) ist kein Transkript detektierbar. *Mst77F* mRNA ist im Wildtyp von frühen Spermatozyten-Stadium bis ins späte Spermatischen-Stadium detektierbar, in *can*¹² mutanten Testes ist anders als für *protamin B* ein Rest Transkript nachweisbar (d Pfeilkopf). Der Hub ist jeweils mit einem Stern markiert. In (B) sind Anti-Sa Chromatin Immunpräzipitationen (ChIPs) an Chromatinextrakten aus Wildtyp Testes (blaue Balken) und *can*¹² Testes (rote Balken) gezeigt. Die X-Achse zeigt die Anreicherung von Wildtyp DNA im Vergleich zur Anreicherung in *can*¹² Mutanten, die auf 1 normalisiert wurde. Analysiert wurde die Anreicherung von Sa an den Promotoren von *Mst87F* (pos. Kontrolle), *Cyclin A* (neg. Kontrolle) und *protamin B* und *Mst77F*. *Mst87F* zeigt eine 3,5fache Anreicherung im Wildtyp im Gegensatz zur *can*¹² Mutante, *cycA* zeigt keine Anreicherung, *protamin B* zeigt eine 2,5fache Anreicherung und *Mst77F* zeigt eine 1,8fache Anreicherung. Die ChIPs wurden in dreifacher Wiederholung ausgeführt.

3 Ergebnisse

3.2 Erzeugung einer Protamin Null-Mutante in *Drosophila*

Für Säugern und *Drosophila* ist gut bekannt, dass in der Spermiogenese die histonbasierende Chromatinorganisation gegen eine protaminbasierende Chromatinorganisation ausgetauscht wird (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Übersichtsartikel: Braun, 2001). *Protamine 1* und *protamine 2* Gene in Mäusen sind haploinsuffizient; der Verlust eine Genkopie führt zu Sterilität (Cho et al., 2001; Übersichtsartikel: Braun, 2001; Sassone-Corsi, 2002; Kimmins und Sassone-Corsi, 2005). Auch beim Menschen führt eine Reduktion des Protamingehalts zu Sterilität (Iguchi et al., 2006; Torregrosa et al., 2006; Oliva, 2006; Carrell et al., 2007). Daher können Protaminmutanten in Maus und Mensch keinen direkten Aufschluss über den biologischen Sinn der Protamine geben. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Protaminmutante in *Drosophila* zu erzeugen. Frühere Versuche Mutanten für *ProtA* und *ProtB* in einer Kollektion EMS-induzierter Mutanten (Koundakjian et al., 2004; Wakimoto et al., 2004) zu finden schlugen fehl (Dissertation Jayaramaiah Raja, 2005), vermutlich weil die Protamingene *Mst35Ba* und *Mst35Bb* in *Drosophila* beide sehr klein sind und daher keine Läsion durch die EMS-Mutagenese aufwiesen. Außerdem ist eine funktionelle Redundanz sehr wahrscheinlich, da beide Gene zu 94% identisch sind und wahrscheinlich aus einer noch nicht lange zurückliegenden Genduplikation stammen (Dorus et al., 2006). Aus diesem Grund haben wir uns entschlossen, eine präzise Deletion mit Hilfe des *Flp/FRT* Rekombinase-Systems (Parks et al., 2004) zu generieren. Über die DrosDel Webseite (<http://www.drosdel.org.uk/>) (Ryder et al., 2007) konnten passende FRT Insertionsstämme ausgewählt werden, die den genomischen Bereich der Protamin Gene flankieren. Mit den Insertionen *pBac{WH}f04398* und *pBac{WH}f04303* (Thibault et al., 2004) kann eine Deletion erzeugt werden (Df(2L)FDD-0338164), die beide Protamin Gene, *Mst35Ba* und *Mst35Bb* sowie drei weitere Gene *CG15279*, *CG4480* und *CG15278*) deletiert.

3 Ergebnisse

3.2.1 Analyse der genomischen Region der Protamin Deletion

Die drei zusätzlich in der Deletion enthaltenen Gene kodieren für vorhergesagte Transmembranproteine (Abb. 11 Spalte 4). Das WH-Element *pBac{WH}f04398*, das die vordere FRT-site trägt, ist außerdem im letzten Intron des Gens *CG33309* integriert. *CG33309* kodiert für ein vorhergesagtes zytoplasmatisches Protein. Eine Übersicht über die genomische Region der Protamine ist in Abb. 12 A zu sehen. Microarray Daten zeigen, dass die Protamingene in einer für testisexprimierte Gene angereicherten genomischen Region liegen (Chintapalli et al., 2007; Parisi et al., 2004). Diese Microarray Daten und cDNA Daten zeigen, dass auch die Gene *CG33309*, *CG4498* und *CG15278* im Testis exprimiert sind (Chintapalli et al., 2007; FlyBase: Tweedie et al., 2009). Für *CG15279* gibt es keine Hinweise für eine Expression in der männlichen Keimbahn. Diese Daten konnten auch in RT-PCRs an aus Testes isolierter RNA verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Von den sechs Genen, die von der Protamin-Deletion betroffen wären, wird nur für die Protamine eine Kernexpression vorhergesagt (Abb. 11, Spalte 5), (Nakai und Horton, 1999). Die postmeiotische Spermatogenese, die Spermio-genese, hängt von der Speicherung translational reprimierter mRNAs ab (Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl et al., 2005). Von Proteinen, die eine Rolle in der Chromatinreorganisation spielen würde man also annehmen, dass ihre mRNAs bis kurz vor der Chromatinreorganisation zu detektieren sind. Deshalb wurde mit *in situ* Hybridisierungen getestet, ob die mRNA der Gene *CG33309*, *CG4480* und *CG15278* bis ins späte Spermato-den-Stadium erhalten ist. Außerdem wurde überprüft, ob das Gen *CG15279* überhaupt in der männlichen Keimbahn exprimiert ist. Für *CG15279* konnte mit *in situ* Hybridisierungen kein detektierbares Transkript nachgewiesen werden. Die Transkripte von *CG33309*, *CG4480* und *CG15278* sind auf prämeiotische und frühe postmeiotische Stadien beschränkt. Nur die mRNA von *ProtB* und *ProtA* ist in späten elongierten Spermato-den zu detektieren. (Abb. 11, Spalte 2). Auf Grundlage dieser *in situ* Hybridisierungen, der Proteinvorhersagen und der vorhergesagten subzellulären Lokalisation der Proteine ist es unwahrscheinlich, dass die vier von der Protamin-Deletion zusätzlich betroffenen Gene eine direkte Rolle in der Chromatinreorganisation spielen. Die potentielle Protamin-Deletion *Df(2L)FDD-0338164* ist also geeignet, um die Rolle der Protamine zu analysieren.

3 Ergebnisse

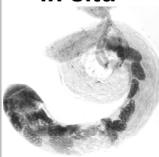
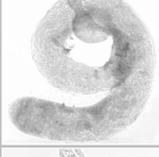
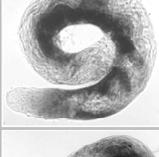
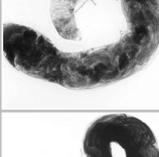
ORF	in situ	Verteilung des Transkripts	Vorhergesagte Protein Eigenschaften	erw. subzell. Lokalisation
CG33309		frühe Spermatozyten späte Spermatozyten frühe Spermatiden	PA 572as molekulare Funktion unbekannt biologischer Prozess unbekannt (FlyBase)	26.1% Cytoplasma 21.7% Nukleus 13.0% ER (PSORTII Nakai et al., 1990)
CG15279		keine	PA 639as, PB 639as, PD 633as Natrium Symporter Aktivität Liganden-Signaling (Ashburner et al., 1999; FlyBase) 12 transmembran Domänen (Ensembl)	82.6% Plas. memb. 17.4% ER for PA, PB, and PD (PSORTII)
CG4480		frühe Spermatozyten späte Spermatozyten frühe Spermatiden	PA 219as molekulare Funktion unbekannt biologischer Prozess unbekannt (FlyBase) 5 transmembran Domänen (Ensembl)	44.4% ER 11.1% Vakuole (PSORTII)
CG15278		frühe Spermatozyten späte Spermatozyten frühe elongierende Spermatiden	PA 157as molekulare Funktion unbekannt biologischer Prozess unbekannt (FlyBase) 3 transmembran Domänen (Ensembl)	44.4% ER 11.1% Vakuole (PSORTII)
Mst35Ba Mst35Bb		frühe Spermatozyten späte Spermatozyten frühe Spermatiden	PA 144as / PA 146as DNA-bindendes Protein (Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005)	82.6% Nukleus (PSORTII) Nukleus (Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005)

Abb. 11: *Mst35Ba* und *Mst35Bb* werden von Genen flankiert, die in der männlichen Keimbahn exprimiert sind. Die Gennamen oder korrespondierenden CGs sind in der ersten Spalte notiert. Die zweite Spalte zeigt RNA *in situ* Hybridisierungen der ORFs, die in der *protA* Deletion liegen an *Drosophila* Testis. In der dritten Spalte ist das Expressionsmuster beschrieben. In Spalte vier werden die vorhergesagten Proteineigenschaften erläutert (Tweedie et al., 2009; Hubbard et al., 2009). Die subzelluläre Verteilung der Proteine wurde mit PSORT II (Nakai und Horton, 1999), wie in der letzte Spalte beschrieben, vorhergesagt.

3.2.2 Trotz der Protamin-Deletion *protA* sind *Drosophila*-Männchen fertil

Zur Erzeugung der Protamin-Deletion wurden die beiden FRT Insertionen *pBac{WH}f04398* und *pBac{WH}f04303* genutzt und dem Protokoll in Parks (2004) gefolgt. Diese FRT-Insertionen tragen zusätzlich das *white*-Gen (*w*) das für die rote Augenfarbe notwendig ist, wohingegen die Fliegen einen gentischen *w⁻*-Hintergrund haben. Liegen die FRT-Insertionen in der richtigen Orientierung zueinander, wird bei der Rekombination das *white*-Gen mit deletiert, und Fliegen mit entstandener

3 Ergebnisse

Deletionen können über den Verlust der Augenfarbe erkannt werden. Die Erzeugung der Protamin-Deletion konnte nicht über den Verlust der roten Augenfarbe verfolgt werden, deshalb wurden die 144 potentiell deletionstragenden Fliegenstämme mit der two-sided PCR Methode (Parks et al., 2004) überprüft und 13 Deletionen positiv getestet (Daten nicht gezeigt).

Diese 13 Deletionen wurden *protΔ1-13* genannt. Eine Linie, *protΔ38.1*, stammt aus einem früheren Versuch, bei dem die potentiellen Deletionen über Fertilität gescreent wurden (zur Verfügung gestellt von Sunil Raja Jayaramaiah). Genetische Tests zeigten das 12 dieser Linien männlich und weiblich fertil sind. Eine Linie *protΔ5* ist embryonal letal und eine Linie *protΔ38.1* ist männlich deutlich vermindert steril. Um sicher zu gehen, dass die Flip-Rekombination präzise funktioniert hat und um die two-sided PCR Ergebnisse zu verifizieren wurden die *protΔ*-Linien zusätzlich per Southern Blot Analyse getestet. In den Test wurden zusätzlich zwei Defizienzen *in trans* zur Linie *protΔ38.1* eingeschlossen, und zwar *Df(2L)TE35D-5 / protΔ38.1* und *Df(2L)TE35B-9 / protΔ38.1* (Sawamura et al., 2004). Aus dem Southern Blot wird klar, dass die Protamingene im Wildtyp vorhanden sind, aber in allen *protΔ*-Deletionslinien fehlen. Das Gleiche gilt auch für die Gene *CG15279*, *CG4480* und *CG15278*. Das zeigt, dass keines der fünf deletierten Gene für Lebensfähigkeit oder Fertilität in *Drosophila* benötigt wird. *ProtΔ* mutante Männchen sind fertil, zeigen aber in wiederholten Fertilitätstest von jeweils 50 ausgezählten Kreuzungen, eine sehr variable Nachkommenzahl von 50% bis 100% der Wildtyp Nachkommenzahlen. Mit zwei, die genomische Region der Protamingene überspannenden Defizienzen (Sawamura et al., 2004), konnte gezeigt werden, dass die Sterilität der Linie *protΔ38.1* auf eine zweite Läsion außerhalb der Protamin-Region zurückzuführen ist. Denn *protΔ38.1* ist steril *in trans* zur Defizienz *Df(2L)TE35D-5*, aber nicht *in trans* zur Defizienz *Df(2L)TE35B-9* (in Zusammenarbeit mit Sunil Raja Jayaramaiah). Daraus lässt sich schließen, dass die Protamingene *Mst35Bb* und *Mst35Ba* in *Drosophila*, im Gegensatz zu *protamine 1* und *protamine 2* aus Mäusen und Menschen, nicht für die männliche Fertilität essentiell sind.

3 Ergebnisse

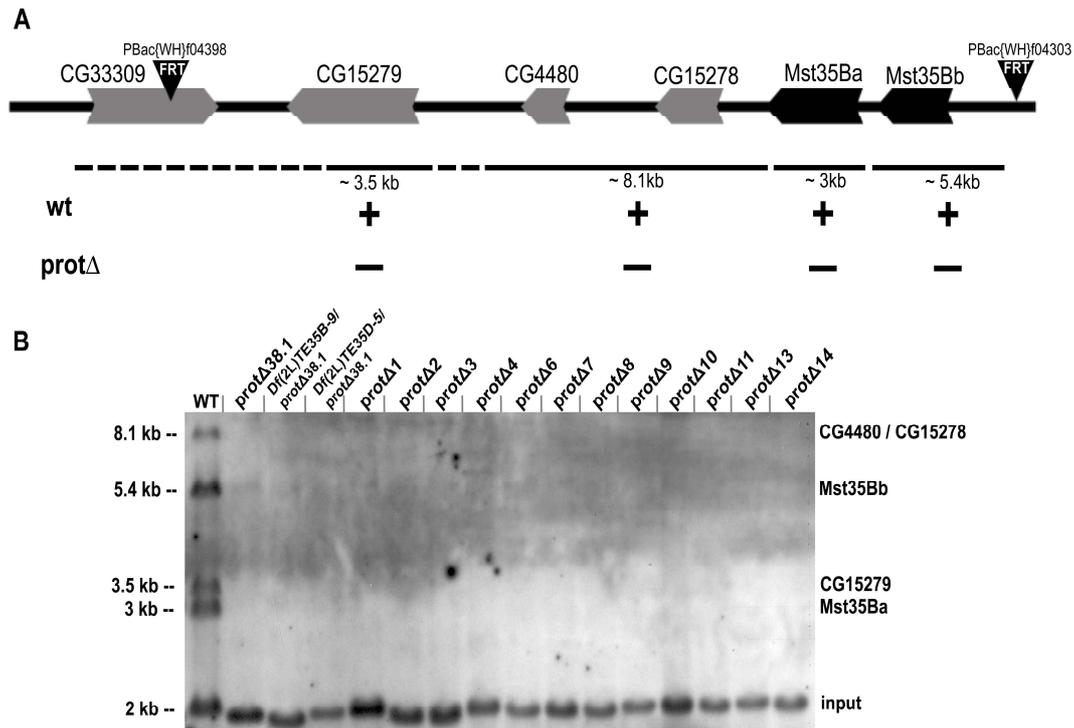


Abb. 12: Genetische und molekulare Analyse des Protaminlokuses in den *protΔ* Deletionen und im Wildtyp. (A) Schematische Übersicht der genomischen Region von *Mst35Ba* und *Mst35Bb*. Graue und schwarze Blockpfeile stellen die vorhergesagten Leserahmen der Region dar, Namen oder CG-Nummern sind darüber notiert. Die schwarzen Dreiecke repräsentieren die Insertionsstellen der WH-Elemente *PBac{WH}f04398* und *PBac{WH}f04303*, die genutzt wurden um die *protΔ* Deletion zu erstellen. Die schwarzen horizontalen Balken unterhalb des Schemas verkörpern die *EcoRI* Fragmente die im Southern Blot im Wildtyp detektiert wurden. Darunter ist durch (+) oder (-) die Anwesenheit oder Abwesenheit der Fragmente im Wildtyp und in *protΔ* markiert. (B) Southern Blot Analyse der fünf Gene (*CG15279*, *CG4480*, *CG15278*, *Mst35Ba* und *Mst35Bb*) aus der *protΔ*-Deletion. Analysiert wurde genomische DNA aus Wildtyp Fliegen, allen vitalen *protΔ*-Linien und *Df(2L)TE35B-9/protΔ38.1* oder *Df(2L)TE35D-5/protΔ38.1* transheterozygoten Fliegen. Die Membran wurde mit Sonden gegen *CG15279*, *CG4480*, *CG15278*, *Mst35Ba*, *Mst35Bb* und *rols* (Rau et al., 2001) als Inputkontrolle hybridisiert. Im Wildtyp konnten alle fünf Gene detektiert werden, in allen *protΔ*-Linien und den transheterozygoten Linien konnte keines der fünf Genen detektiert werden, die Input Kontrolle gab überall ein deutliches Signal.

3 Ergebnisse

3.2.3 Die meisten Spermatidenkerne homozygoter *prot1*-Männchen sind korrekt geformt und schlank

Eine histologische Analyse der Testes homozygoter *prot1* Männchen zeigte keine augenscheinlichen Veränderungen zum Wildtyp, was bei der gegebenen Fertilität nicht anders zu erwarten war. Eine genauere Untersuchung postmeiotischer Spermatidenkerne zeigte, dass der größte Anteil der Spermatidenkerne korrekt geformt ist und dass die Spermatiden individualisiert werden (Abb. 13. D). Ein geringerer Anteil, nämlich etwa 20% der Spermatidenkerne sind zwar schlank geformt, aber stark verbogen oder verkrumpelt (Abb. 13. E, Pfeil und Pfeilkopf). Außerdem zeigt die DNA Färbung, dass die DNA oft an den verkrumpelten Enden angereichert ist (Abb. 13. E, Doppelpfeil). Diese missgeformten Spermatidenkerne wurden nie im Wildtyp beobachtet. Alle 64 Spermatiden einer Zyste zeigen den gleichen Phänotyp.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die *prot1* Männchen fertil sind, aber die Chromatinorganisation scheint in einem bestimmten Anteil der Spermatiden fehlerhaft zu sein. In den seminalen Vesikeln, den Speicherorganen der Männchen für reife Spermien, sind die Spermien abundant und beweglich und es sind nur die wildtypisch aussehenden Spermien zu beobachten (Abb. 13 G+H).

3 Ergebnisse

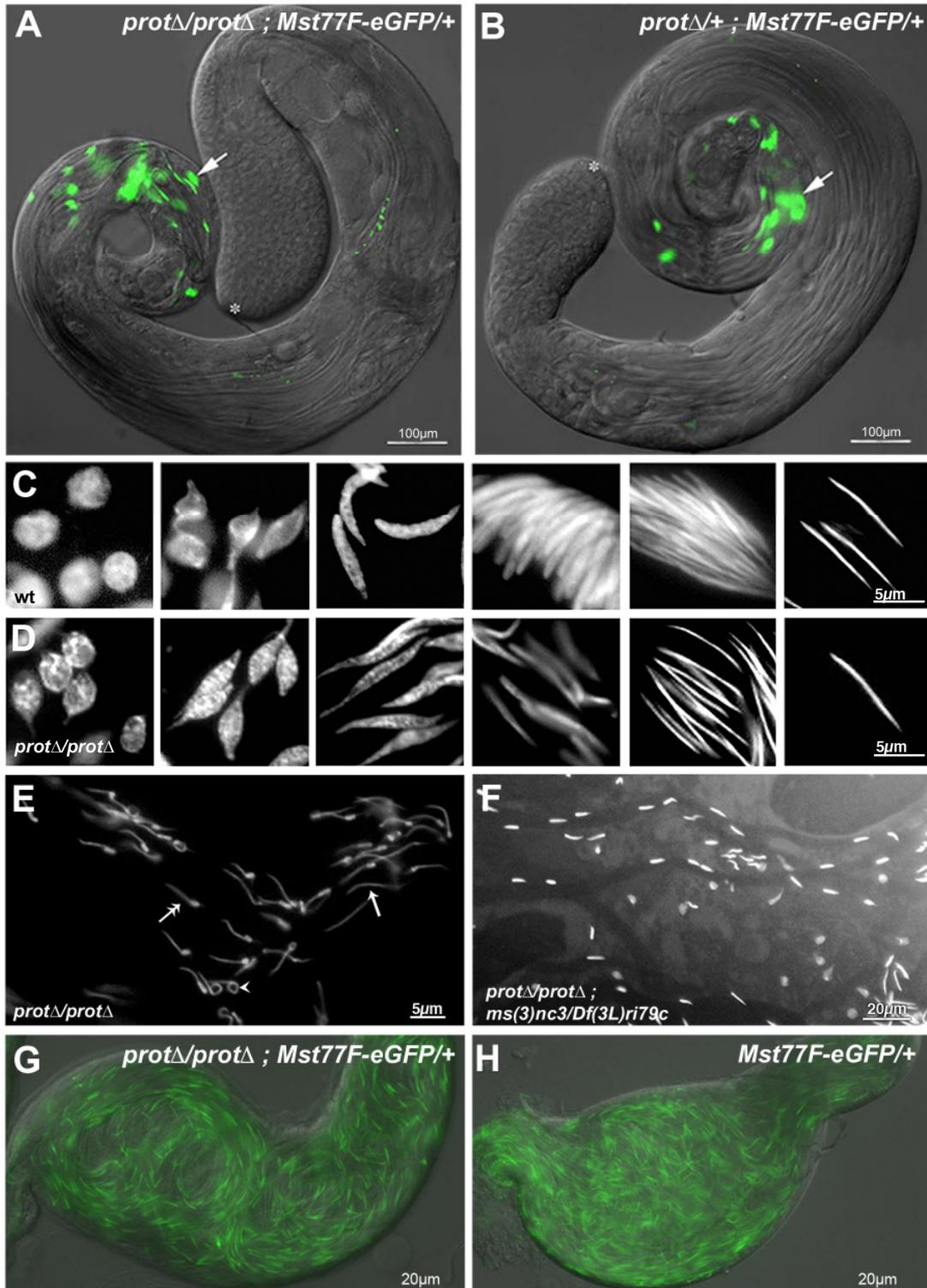


Abb. 13: Phänotypische Analyse der *protΔ* Mutante. (A) zeigt ein Frischpräparat eines *protΔ/protΔ; Mst77F-eGFP/+* Testis. Der Pfeil markiert ein Bündel Spermatidenkerne, die Mst77F-eGFP exprimieren. (B) zeigt ein Frischpräparat eines *protΔ/+; Mst77F-eGFP/+* Testis. Der Pfeil markiert ein Bündel elongierter Spermatidenkerne, das Mst77F-eGFP exprimiert. In (C+D) sind Testesquetschpräparate in höherer Auflösung gezeigt. Sie sind mit Hoechst gefärbt, um das Chromatin im Wildtyp (C) und in der *protΔ* Mutante (D) zu visualisieren. Von rechts nach links sind

3 Ergebnisse

Spermatidenkerne während der Kernformung von runden bis zu nadelförmigen Kernen gezeigt. (E) zeigt ein Testisquetschpräparat der *protΔ* Mutante mit Spermatidenkerne mit verkumpelter Form. (F) zeigt Quetschpräparate von Tripelmutanten (homozygote *protΔ* mit dem mutanten *Mst77F*-Allel *nc3* über einer entsprechenden Defizienz) gefärbt mit Hoechst. In (G+H) sind unfixierte seminale Vesikel von *eGFP/+* und *Mst77F-eGFP/+* Fliegen gezeigt. Der Maßstabsbalken markiert 5 µm in (C-E), 20 µm in (F-H) und 100 µm in (A, B). Bild F aus dieser Abbildung wurde freundlicherweise von Sunil Jayaramaiah Raja, zu Verfügung gestellt.

3.2.4 Alle untersuchten Spermatogenese-Charakteristika sind von der Protaminsynthese unabhängig

Die *protΔ*-Männchen wurden histologisch analysiert. Als erstes wurde die Expression von *Mst77F* untersucht. *Mst77F* ist ein u.a. mit dem Chromatin in Spermien assoziiertes Protein das Ähnlichkeiten zu Hils1, einem testisspezifischem Linker Histone-H1 ähnlichem Protein, in Säugern aufweist (Iguchi et al., 2003; Iguchi et al., 2004; Yan et al., 2003).

In *Drosophila* startet die *Mst77F-eGFP* Expression im Kanu-Stadium und bleibt bis in die reifen Spermien bestehen, vergleichbar mit dem Expressionsmuster von *ProtA-eGFP* und *ProtB-eGFP*. In homozygoten *protΔ* Männchen zeigt sich keine Abweichung in der *Mst77F-eGFP*-Expression vom Wildtyp (Abb. 13, A+B; Abb. 15 F) Im Wildtyp werden die Histone mit Beginn des Kanu-Stadiums abgebaut und sind im späten Kanu-Stadium und in reifen Spermien nicht mehr detektierbar. Während des Wechsels von Histonen zu Protaminen am Chromatin kommt es gleichzeitig im Kanu-Stadium zur vorübergehenden Expression von Tpl^{94D} und zum Auftreten von DNA-Brüchen. Nach der Degradation von Tpl^{94D} sind Protamin A, Protamin B und *Mst77F* die hauptsächlichlichen chromatinorganisierenden Komponenten am Chromatin der Spermien.

Diese Spermatogenese-Charakteristika wurden im protamindefizienten Hintergrund getestet. Es konnte von unserer Arbeitsgruppe schon gezeigt werden, dass die Histone auch im protamindefizienten Hintergrund entfernt werden (Rathke et al., 2007). Was nicht überraschend ist, da die Histone erst transient von Tpl^{94D} ersetzt werden. Die Tpl^{94D} -eGFP Expression wurde in *protΔ*-mutanten Testes getestet, hier wird Tpl^{94D} -eGFP im frühen Kanu-Stadium exprimiert und bleibt bis ins späte Kanu-

3 Ergebnisse

Stadium bestehen (Abb. 15 C). In reifen Spermien ist Tpl^{94D} -eGFP nicht zu finden. Das entspricht dem Expressionsmuster im Wildtyp und zeigt, dass auch die Expression von Tpl^{94D} -eGFP von den Protaminen unabhängig ist. Des Weiteren wurde die Expression von $Mst99C$ -eGFP in der $prot\Delta$ Mutante untersucht. $Mst99C$ -eGFP wird im späten Spermatiden-Stadium exprimiert und bleibt bis in die individualisierten Spermien mit dem Chromatin assoziiert (Abb. 14). Damit unterscheidet sich das Expressionsmuster nicht von dem im Wildtyp (Dissertation Rathke, 2007). Um das Entstehen und die Reparatur der im Kanu-Stadium typischerweise auftretenden DNA-Brüche zu testen wurden TUNEL-Färbungen an $prot\Delta/prot\Delta$; $Mst77F$ -eGFP/ $Mst77F$ -eGFP Testes durchgeführt. Die DNA-Brüche traten im frühen Kanu-Stadium auf, verstärkten sich bis ins späte Kanu-Stadium und waren in individualisierten Kernen vollständig verschwunden (Abb. 15 E). Es konnte kein Unterschied zwischen den normal geformten (Daten nicht gezeigt) und den verkumpelten Kernen gefunden werden, in beiden Fällen entstanden und verschwanden die Brüche wie im Wildtyp, die verkumpeltem Spermatidenkerne der $prot\Delta$ Mutante besitzen also intaktes Chromatin. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Reparatur der Doppelstrangbrüche von der Expression der Protamine unabhängig ist.

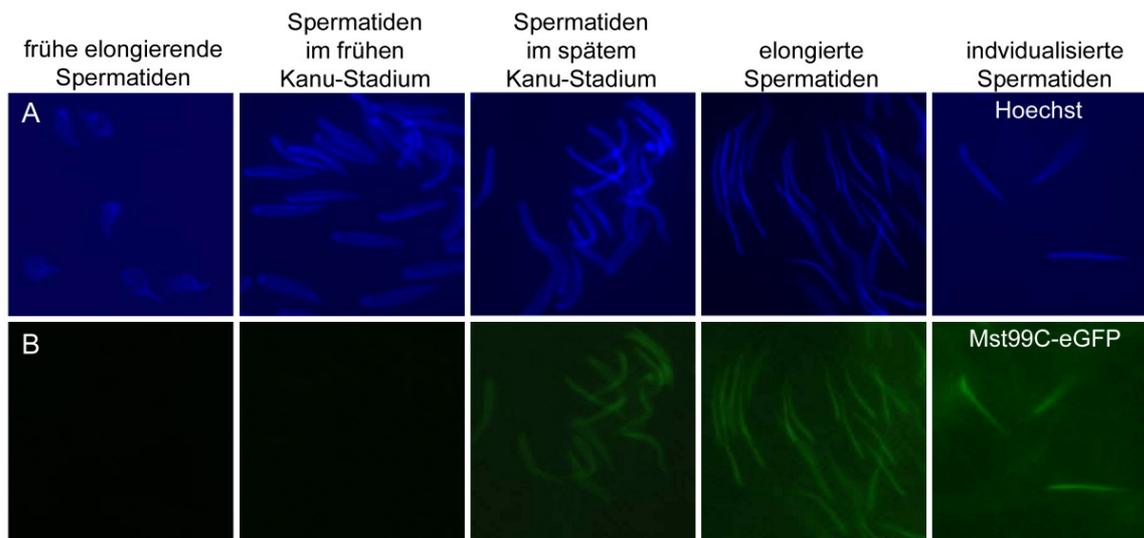


Abb. 14: Die Expression von $Mst99C$ -eGFP ist unabhängig von der Synthese der Protamine. (A) zeigt eine Hoechstfärbung, zur Visualisierung der DNA, an $prot\Delta/prot\Delta$; $Mst99C$ -eGFP/ $Mst99C$ -eGFP Testesquetschpräparaten. Von links nach rechts sind Entwicklungsstufen von frühen elongierenden Spermatiden bis zu individualisierten Spermien zu sehen. In (B) sind die

3 Ergebnisse

korrespondierenden eGFP-Signale gezeigt. Mst99C-eGFP wird im späten Kanu-Stadium exprimiert und verbleibt bis in die reifen Spermien am Chromatin.

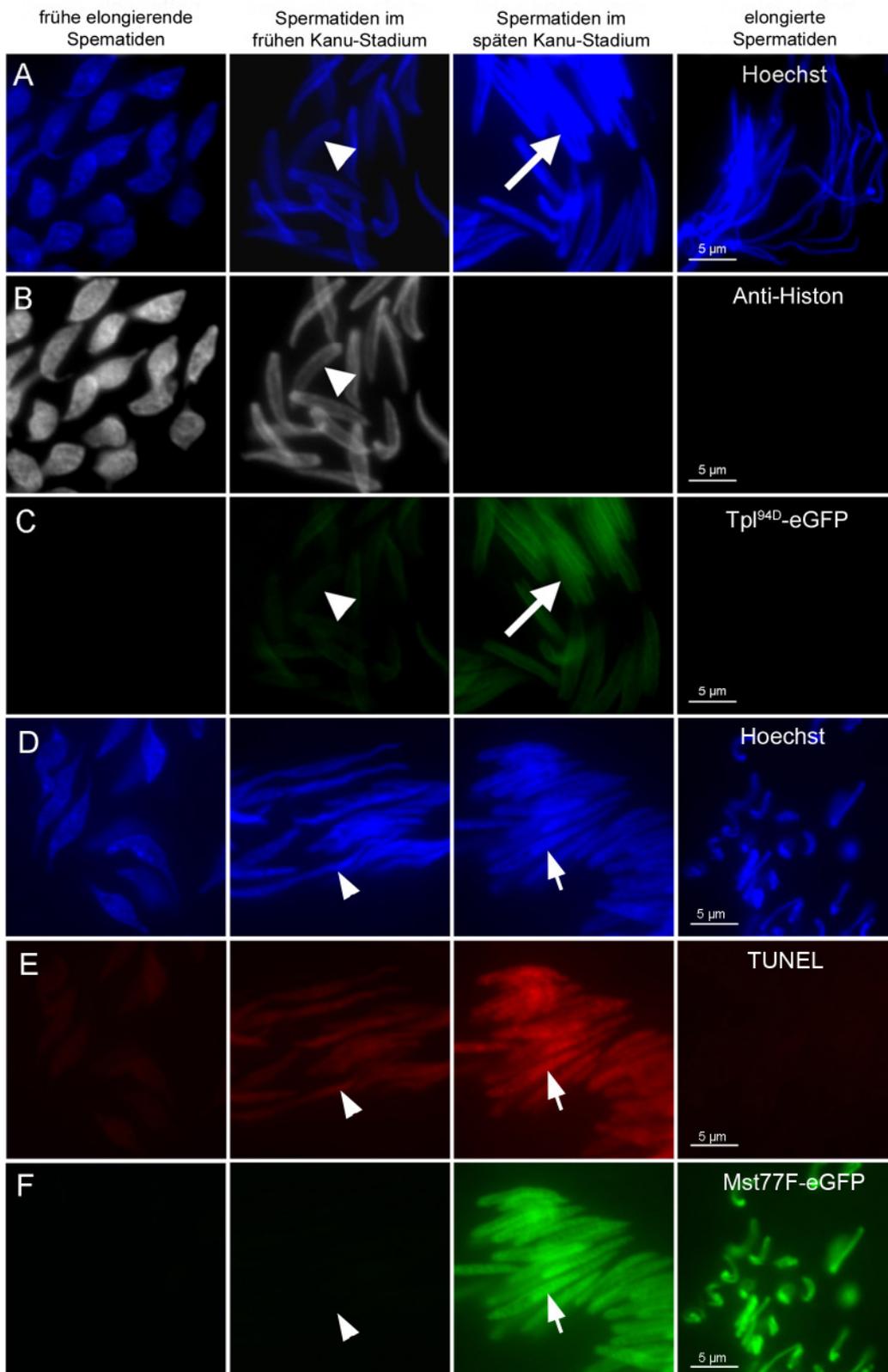


Abb. 15: Tpl^{94D}-eGFP Expression und Abbau, Mst77F-eGFP Expression und das Einführen von DNA-Brüchen und deren Reparatur sind von der Synthese von Protamin A und B unabhängig. (A-C) Anti-Core-Histon Antikörperfärbung an Tpl^{94D}-eGFP exprimierenden Fliegen. (A) Hoechst

3 Ergebnisse

Färbung zur Visualisierung der DNA. (B) Core Histone sind bis ins frühe Kanu-Stadium detektierbar (Pfeilkopf), aber nicht mehr in späteren Stadien. (C) Tpl^{94D}-eGFP ist ab dem frühen Kanu-Stadium (Pfeilkopf) detektierbar und bis ins späte Kanu-Stadium exprimiert (Pfeil). (D-F) TUNEL Färbung an *protΔ/protΔ; Mst77F-eGFP* Fliegen. (D) zeigt die Hoechst Färbung. Die in (E) gezeigte TUNEL Färbung zeigt viele DNA Brüche im frühen Kanu-Stadium (Pfeilkopf), die sich bis ins späte Kanu-Stadium (Pfeil) noch verstärken. *Mst77F-eGFP* ist ab dem späten Kanu-Stadium exprimiert (Pfeil) und bleibt in den späten Spermatiden bestehen. Hier verkrummelte Spermatiden der *protΔ/protΔ* Form gezeigt. Maßstabsbalken in 5 μ m.

3.2.5 Protamin-eGFP, aber nicht *Mst77F-eGFP* oder *Mst99C-eGFP*, rettet die missförmigen Spermatidenkerne von *protΔ* Männchen

Wie im Abschnitt 3.2.3 erwähnt zeigen etwa 20 % der späten Spermatidenkerne in homozygoten *protΔ* Testes einen verkrummelten oder verbogenen Phänotyp. Um zu testen, ob die HMG-Box-Proteine Protamin A, Protamin B, *Mst77F* und *Mst99C* (siehe Einleitung Kap 2.4) sich gegenseitig ersetzen können wurden Rettungsexperimente durchgeführt. Das Einbringen einer Kopie von *ProtA-eGFP* oder *ProtB-eGFP* in die *protΔ* Mutante ergab schon eine deutliche Reduktion der Anzahl missförmigen Spermatidenkerne (Daten nicht gezeigt), wohingegen das Einbringen von zwei Kopien ein komplette Rettung des Spermatidenkern-Phänotyps zeigte (Abb. 16 A+B, gezeigt für *ProtB-eGFP*). Es wurden jeweils eine (Daten nicht gezeigt) oder zwei Kopien von *Mst77F-eGFP* oder *Mst99C-eGFP* in homozygote *protΔ* Fliegen eingekreuzt. Aber weder *Mst77F-eGFP* noch *Mst99C-eGFP* zeigten sowohl heterozygot als auch homozygot eine Rettung des Phänotyps in späten Spermatidenkernen (Abb. 16 C+D) Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die *Protamine*, *Mst77F* und *Mst99C* unterschiedliche Funktionen im Spermienchromatin haben.

3 Ergebnisse

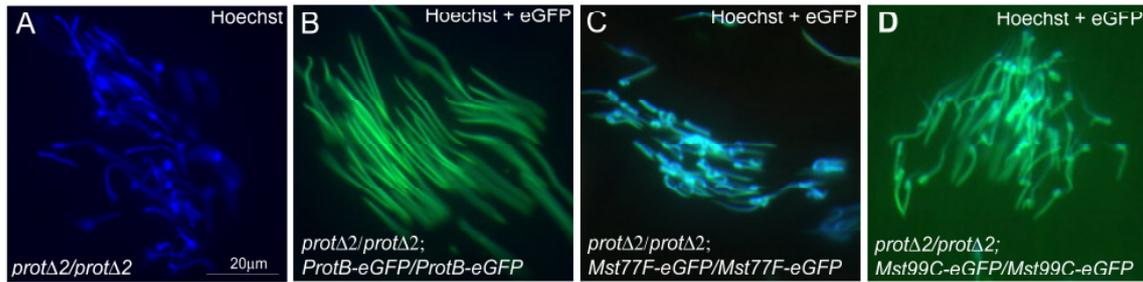


Abb. 16: *ProtB-eGFP* rettet die missgeformten Spermatidenkerne der *protΔ* Mutanten, *Mst77F-eGFP* und *Mst99C-eGFP* aber nicht. Testesquetschpräparate mit Hoechst gefärbt. (A) Ein Bündel elongierter Spermatidenkerne, die missgeformt sind. (B) Ein Bündel *protΔ/protΔ; ProtB-eGFP/ProtB-eGFP* wildtypisch aussehender Spermatidenkerne. In *protΔ/protΔ* Testes, die *ProtB-eGFP* homozygot exprimieren sind keine missgeformten Spermatidenkerne zu finden. (C) Ein Bündel *protΔ/protΔ; Mst77F-eGFP/Mst77F-eGFP*-Spermatidenkerne, die keine Reduktion des Verformungs-Phänotyps der *protΔ* Mutante zeigen. (D) Ein Bündel *protΔ/protΔ; Mst99C-eGFP/Mst99C-eGFP*-Spermatidenkerne die auch keine Reduktion des Verformungs-Phänotyps der *protΔ*-Mutante zeigen. Der Maßstabsbalken in (A) markiert 20 μm und gilt für (A-D).

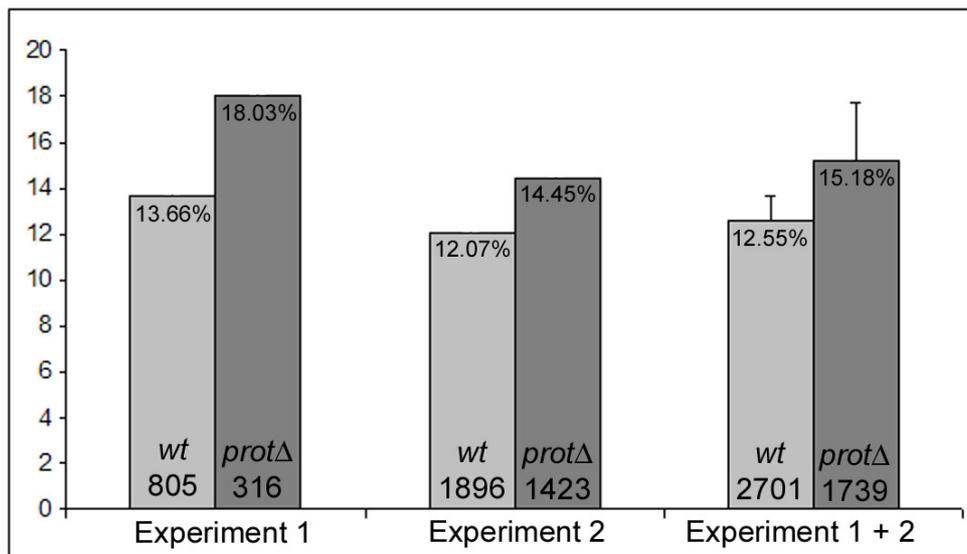
3.2.6 Protamin A- und Protamin B-defiziente Spermien sind sensitiver gegenüber Röntgenstrahlung als Wildtyp-Spermien

Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob Protamine eine Funktion im Schutz des paternalen Genoms im Spermium übernehmen könnten, wie es für Säuger postuliert wurde (Übersichtsartikel: Braun, 2001; Oliva, 2006). Die Fertilität der *protΔ*-Mutante war sehr überraschend im Vergleich zur haploinsuffizienten Situation in Säugern. Es wurde spekuliert, dass *protΔ*-mutante Spermien sensitiver gegenüber mutagenen Einflüssen sein könnten als Spermien des Wildtyps. Die Fertilität der *protΔ*-Mutante ergab die Möglichkeit dies hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlung direkt zu testen. Da beide FRT-Insertions-Linien fertil sind, und die drei zusätzlichen Gene der *protΔ*-Deletion mutmaßlich keine chromatingebundenen Proteine kodieren, kann die *protΔ*-Deletion genutzt werden, um Sensitivität gegenüber Mutagenen zu testen. Es wurde ein Muller5-Test (Muller und Altenburg, 1919) in Kooperation mit Silja Burkhard (Bachelorarbeit Burkhard, 2008) durchgeführt, um die Rate rezessiver letaler Mutationen auf dem X-Chromosom nach

3 Ergebnisse

einer Röntgenbestrahlung zu ermitteln (Tab. 1) (Bachelorarbeit Burkhard, 2008). Für das Verständnis des Experiments ist es von Bedeutung zu wissen, dass in späten Stadien der Spermatogenese keine oder nur sehr wenig DNA-Reparatur stattfindet (Vogel und Natarajan, 1995). Die Reparatur der DNA findet nach der Fertilisation im Weibchen statt, und hängt von maternal bereitgestellten Reparaturproteinen und damit von der Fitness der Weibchen ab (Agrawal und Wang, 2008). Es wurden Wildtyp und *protA* Männchen mit Röntgenstrahlung (45 Gray) behandelt und für acht Stunden mit Muller5 Weibchen verpaart. Die Kreuzungsdauer wurde limitiert, um sicher zu gehen, dass zur Befruchtung nur Spermien kamen, die im Protamin-Stadium bzw. dem entsprechendem Stadium in der *protA*-Mutante bestrahlt wurden. Das bestrahlte X-Chromosom konnte durch die runde, wildtypische Augenform verfolgt werden, das Muller5 X-Chromosom durch die Marker *Bar* (B^1) und *whiteapricot* (*wa*,) die zu schmalen gelben Augen führen. Die Männchen in der F2-Generation wurden ausgewertet, sie konnten entweder ein bestrahltes X-Chromosom über dem Y-Chromosom tragen, oder ein Muller5 X-Chromosom. Wenn keine Männchen mit runden Augen in der Einzelpaarkreuzung vorhanden waren, dann trug das korrespondierende bestrahlte X-Chromosom eine rezessive letale Mutation (Kreuzungsschema in Material und Methoden Kap. 5.2.3). Es wurden zwei unabhängige Tests durchgeführt und es wurden im Wildtyp eine Mutationsrate von 12,55% ermittelt und für die *protA*-Mutante ein signifikanter (p-Wert = 0,0125) Anstieg dieser Mutationsrate auf 15,18% (Tab. 1). Das entspricht einem Anstieg von 20,9% wenn die Wildtyprate als 100% betrachtet wird. Der Verlust von *protamin A* und *protamin B* führt also zu einem signifikanten Anstieg der Sensitivität der Spermien gegenüber Röntgenstrahlen.

3 Ergebnisse



	<i>Wildtype</i>	<i>protΔ</i>
F1-Kreuzungen Exp.1+2	2701	1739
lethal Mut. Exp.1+2	339	264
% lethaler Mut. Exp. 1+2	12.55 %	15.18 %
	p-Wert = 0.0125	

Tab. 1: Sensitivität der *protΔ* Mutante gegenüber Röntgenstrahlen im Vergleich zum Wildtyp.

Der Muller5 Mutagenesetest (Muller und Altenburg, 1919) ermöglicht es rezessive letale Mutationen durch Röntgenstrahlen auf dem X-Chromosom der Männchen zu erfassen. Der Test wurde in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt (Experiment 1 und Experiment 2). Das Balkendiagramm zeigt die letale Mutationsrate des X-Chromosoms im Wildtyp und in der *protΔ* Mutante, für beide Experimente einzeln und zusammengefasst, die Standardabweichung ist eingezeichnet. Die Stichprobenmenge ist für jedes Experiment jeweils am unteren Ende der Balken verzeichnet. Der p-Wert für die zusammengefassten Daten wurde mit einem χ^2 -Test ermittelt.

3.3 Etablierung zweier Systeme zur *in vivo* Lokalisation translational reprimierter mRNAs in der Spermatogenese von *Drosophila*

Wie in der Einleitung (Kap. 2.3 und 2.6) erwähnt, spielen sowohl in der Entwicklung der Spermien in *Drosophila*, als auch bei der Entwicklung der Spermien in Menschen und Mäusen translational reprimierte mRNAs eine entscheidende Rolle. Da in

3 Ergebnisse

Drosophila mit Eintritt in die Meiose, und in Menschen und Mäusen im runden Spermatiden-Stadium, nahezu keine Transkription mehr stattfindet, muss für alle später benötigten mRNAs die Translation von der Transkription entkoppelt werden. Die mRNAs werden in *Drosophila* bis zu drei Tage (Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl et al., 2005) und in Säugern bis zu 10 Tage (Übersichtsartikel: Steger, 2001) translational reprimiert und gespeichert. Wo und wie die translational reprimierten mRNAs in *Drosophila* in der Zelle gespeichert werden ist noch nicht bekannt.

Um heraus zu finden wo in der Zelle diese mRNAs gespeichert werden, wurde in dieser Arbeit erstmals in der Spermatogenese von *Drosophila* das MS2cp/MS2sl- und das λ N/BoxB-System (siehe Einleitung Kap. 2.6) etabliert um translational reprimierte mRNA zu lokalisieren. In beiden Fällen nutzt man jeweils eine Kombination aus RNA-Stemloops und für diese Stemloops spezifische Bindeproteine. Die Stemloops werden in die zu untersuchende mRNA integriert, und die Bindeproteine mit einem Reporterprotein, in diesem Fall mCherry (Shaner et al., 2004), fusioniert. Werden beide Komponenten in einer Zelle exprimiert, kann man durch die Bindung des markierten Bindeproteins an die Stemloops die mRNA *in vivo* verfolgen. In die Untersuchungen eingeschlossen wurden dabei die mRNAs von *ProtA*, *Mst77F* und *Tp1^{94D}*.

Es wurden beide Systeme etabliert, da noch keines der Systeme für die Spermatogenese in *Drosophila* getestet war und somit die Möglichkeit eines Erfolgs erhöht wurde. Außerdem haben beide Systeme Vor- und Nachteile. So ist der Vorteil des λ N/BoxB-Systems, die geringe Größe des λ N-Peptids, dass damit weniger störend bei der Bindung an die mRNA sein sollte. Andererseits ist das MS2cp/MS2sl-System schon wesentlich häufiger genutzt und auch für die *in vivo* Verfolgung von mRNA in *Drosophila* etabliert.

3 Ergebnisse

3.3.1 Die Komponenten des MS2cp/MS2sl-Systems in der Fliege

3.3.1.1 *MS2cp-mCherry* unter der Kontrolle des *β2tubulin*-Promotors zeigt eine zeitlich korrekte Expression in Testis

Um das MS2cp/MS2sl-System zur mRNA Lokalisation während der Spermatogenese von *Drosophila* zu nutzen, wurde das MS2cp (MS2coat protein, bindet spez. an MS2-Stemloops (MS2sl)) unter die Kontrolle verschiedener testisspezifischer Promotoren gebracht. Es wurde der *β2Tubulin*-Promotor (*β2tpro*) genutzt, der in allen Keimzellstadien der Spermatogenese Expression vermittelt, außer in den Keimzellstammzellen und den Spermatogonien (Michiels et al., 1989). Zusätzlich wurde der Promotor von *CG3473* genutzt. *CG3473* kodiert für eine im Testis exprimierte E2-Ubiquitin-Ligase. Der *CG3473*-Promotor vermittelt ab den frühen Spermatozyten bis in späte Spermatiden-Stadien Expression, aber mit einer geringeren Expressionshöhe als der *β2tubulin*-Promotor. Als Reporter gen, zur Visualisierung des MS2cp, wurde *mCherry* verwendet (Shaner et al., 2004). Um das Fusionsprotein MS2cp-mCherry im Kern zu lokalisieren, wenn es keine Ziel-mRNA zum binden hat wurde eine SV40-NLS (NLS nuclear localization sequence) an das N-terminale Ende des Fusionsproteins kloniert. Auf diese Weise soll das ungebundene MS2cp-mCherry in der Zelle im Kern gehalten werden, um so den Hintergrund im Zytoplasma zu verringern, und nur aus dem Kern gezogen werden, wenn es an eine Ziel-mRNA bindet (Forrest und Gavis, 2003). Die SV40-NLS ist eine klassische wurde schon in der Spermatogenese von *Drosophila* eingesetzt (Vazquez et al., 2001).

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit transgene Fliegenlinien für das Konstrukt *β2tpro-SV40-NLS-MS2cp-mCherry* etabliert und dessen Expression von MS2cp-mCherry überprüft. Das Fusionskonstrukt unter Kontrolle des *CG3473*-Promotors konnte zwar noch fertig kloniert und in Fliegen injiziert werden, im Rahmen dieser Arbeit aber nicht mehr analysiert werden.

Für MS2cp-mCherry unter Kontrolle des *β2t*-Promotors konnte eine zeitlich korrekte Expression festgestellt werden. Das Fusionsprotein wurde ab den frühen Spermatozyten in allen Stadien der Spermatogenese exprimiert, das entspricht dem erwarteten Expressionsmuster eines vom *β2t*-Promotor gesteuerten Gens. Allerdings

3 Ergebnisse

war das Protein, trotz der SV40-NLS, in keinem der verschiedenen Entwicklungsstadien im Kern lokalisiert (Abb. 17 A+B).

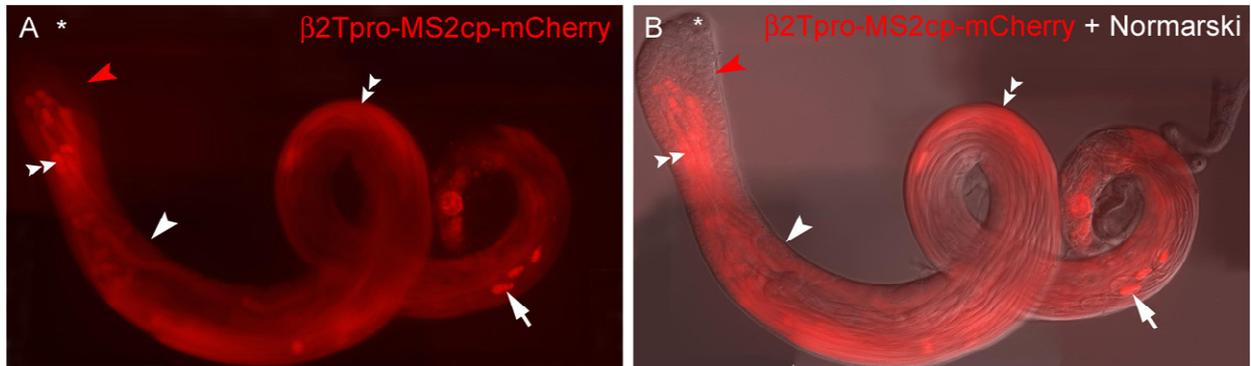


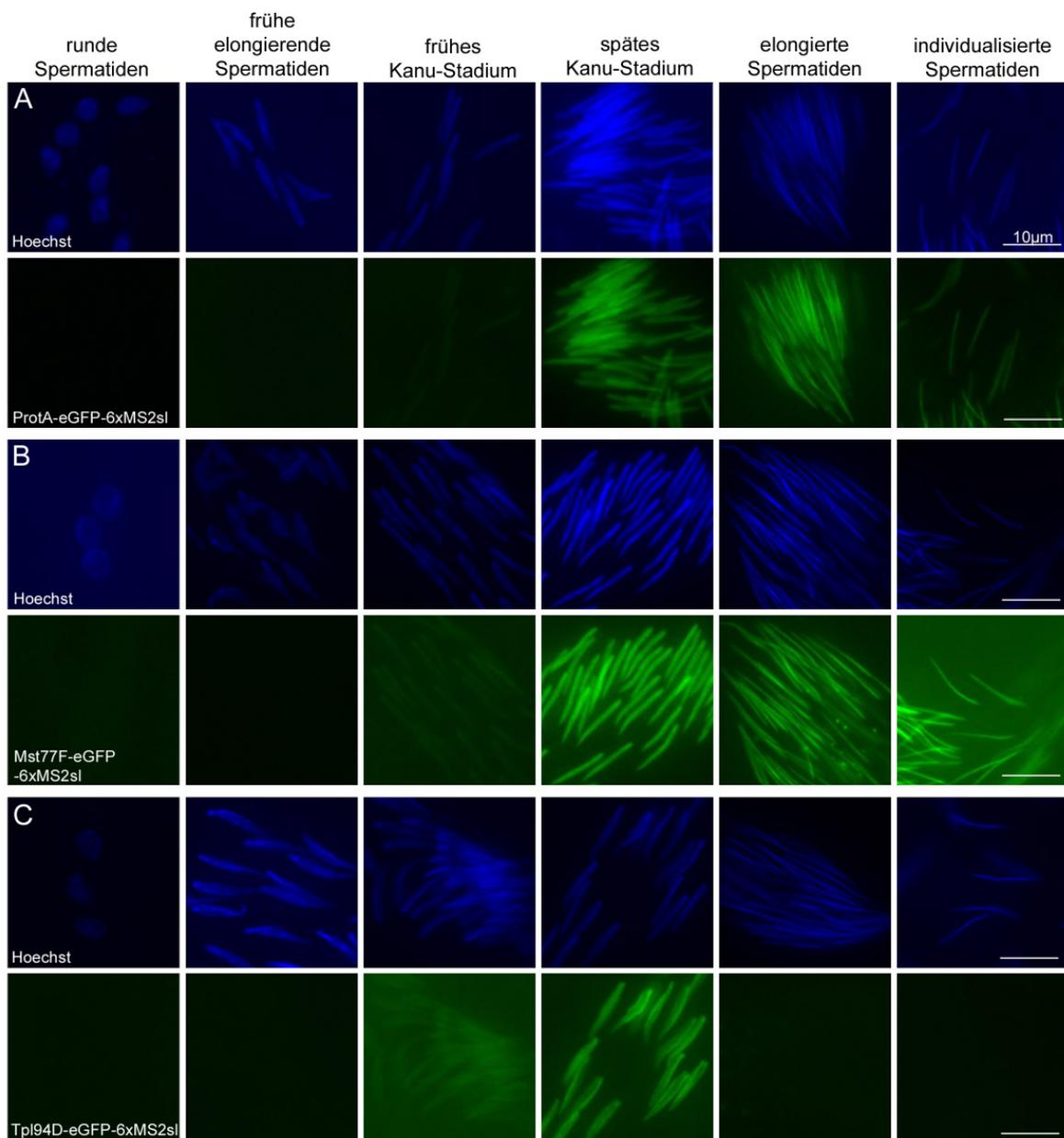
Abb. 17: Die Expression von MS2cp-mCherry unter Kontrolle des $\beta 2tubulin$ -Promotors im Testis von *Drosophila*. Testes Frischpräparate von Fliegen, die das *MS2cp-mCherry*-Konstrukt unter Kontrolle des $\beta 2tubulin$ -Promotors tragen. In (A) ist das mCherry-Signal zu sehen und in (B) das mCherry-Signal unterlegt mit der Durchlichtaufnahme. Der Stern markiert den Hub. Die MS2cp-mCherry-Expression startet in frühen Spermatozyten (roter Pfeilkopf) und ist in allen späteren Stadien zu detektieren, in frühen Spermatiden (weißer Pfeilkopf) bis in vollständig elongierte Spermatiden (doppelter Pfeilkopf). Es ist auch in den Waste bags zu detektieren, die bei der Individualisierung das überschüssige Zytoplasma aufnehmen (Pfeil).

3.3.1.2 Die Expression eGFP-Fusionsproteine mittels MS2-Stemloop-markierter mRNA entspricht der der eGFP-Fusionsproteine ohne MS2-Stemloops

Die MS2-Stemloops (MS2sl) wurden in Kassetten mit je sechs Stemloops kloniert. Je eine dieser Kassetten wurden jeweils 3' an die *ProtA*-eGFP, *tpl^{94D}*-eGFP und *Mst77F*-eGFP Fusionskonstrukte kloniert, so dass sie in der mRNA, aber nicht im Protein enthalten sind. Das Polyadenylierungssignal wird vom Transformationsvektor pChab Δ sal geliefert. Es wurden transgene Fliegenlinien etabliert. Die Expression der eGFP-Fusionsproteine mittels der MS2-Stemloop-Konstrukte, die dadurch in ihrer mRNA die MS2-Stemloops tragen, wurde analysiert. Die Expression unterscheidet sich nicht von der der eGFP-Fusionsproteine mittels eGFP-Konstrukte ohne MS2-Stemloops. Die Expression von *Tpl^{94D}*-eGFP des MS2sl-Konstrukts startet im frühen Kanu-Stadium und bleibt bis ins späte Kanu-Stadium bestehen (Abb. 20 C), genau

3 Ergebnisse

wie mit dem *Tpl^{94D}-eGFP*-Konstrukt zu beobachten (Dissertation Rathke, 2007). Die Expression von ProtA-eGFP und Mst77F-eGFP der MS2sl-Konstrukte startet im späten Kanu-Stadium und bleibt bis in die reifen Spermien am Chromatin (Abb. 18 A+B), auch wie für die Fusionproteine der ProtA-eGFP- und Mst77F-eGFP-Konstrukt ohne MS2-Stemloops zu beobachten (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Die mRNA der Stemloop-Konstrukte wird also trotz der integrierten MS2-Stemloops völlig normal prozessiert und bleibt stabil, die MS2-Stemloops stören auch die translationale Repression der mRNA nicht.



3 Ergebnisse

Abb. 18: Lokalisation der eGFP-Fusionsproteine der *MS2sl*-markierten mRNAs für *ProtA*, *Mst77F* und *Tpl^{94D}*. Gezeigt sind Testesquetschpräparate mit Hoechstfärbungen zur Visualisierung der DNA, an Fliegen, die transgen für *ProtA*-, *Mst77F*-, oder *Tpl^{94D}-6xMS2-Stemloop-Konstrukt* sind. Für jedes Konstrukt ist jeweils in der oberen Reihe die Hoechstfärbung gezeigt und darunter das korrespondierende eGFP-Signal. Von rechts nach links sind die Stadien der Kernformung von runden Spermatiden bis zu individualisierten Spermatiden zu sehen. In (A) ist die Expression von ProtA-eGFP mittels des *ProtA-eGFP-6xMS2sl* Konstrukts zu sehen. Die Expression startet im späten Kanu-Stadium, und bleibt bis in individualisierte Spermien bestehen. In (B) ist die Expression von Mst77F-eGFP mittels des *Mst77F-eGFP-6xMS2sl-Konstrukts* gezeigt. Die Expression startet im späten Kanu-Stadium und bleibt bis in individualisierte Spermien bestehen. (C) zeigt die Expression von Tpl^{94D}-eGFP mittels des *Tpl^{94D}-eGFP-6xMS2sl-Konstrukts*. Tpl^{94D}-eGFP wird im frühen Kanu-Stadium schwach exprimiert und verstärkt sich in seiner Expression bis ins späte Kanu-Stadium. In späteren Stadien ist keine Expression mehr zu detektieren. Die Maßstabsbalken, jeweils im letzten Bild einer Reihe, markieren 10 µm.

3.3.2 Die Komponenten des λ N/BoxB-Systems in der Fliege

3.3.2.1 Das λ N-Peptid-mCherry unter Kontrolle des β 2t-Promotors zeigt eine zeitlich korrekte Expression im Testis

Mit der Klonierung des λ N-Peptids (das Peptid, das die BoxB-Elemente bindet) wurde genauso verfahren wie für die Konstrukte des MS2cp (Kap. 3.3.1.1). Es wurden Fusionskonstrukte mit *mCherry* unter Kontrolle des β 2*tubulin*-Promotors (β 2*tpro*) und *CG3473*-Promotors kloniert. Die Konstrukte wurden mit einer N-Terminalen SV40-NLS versehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene Fliegenlinien für das Konstrukt β 2*tpro*-_{SV40}NLS- λ N-*Cherry* etabliert und dessen Expression von λ N-mCherry überprüft. Das Fusionskonstrukt unter der Kontrolle des *CG3473*-Promotors konnte zwar noch fertig kloniert und in Fliegen injiziert werden, im Rahmen dieser Arbeit aber nicht mehr analysiert werden.

Für das β 2*tpro*-_{SV40}NLS- λ N-*Cherry* Konstrukt konnte eine zeitlich korrekte Expression des Fusionsproteins beobachtet werden. Es ist von frühen Spermatozyten bis in späte Spermatiden exprimiert, nur der Hub ist frei von Expression (Abb. 19). Das

3 Ergebnisse

entspricht der zu erwartenden Expression für ein vom *β2tubulin*-Promotor gesteuertes Gen. Allerdings war das Fusionsprotein nur in prämeiotischen Stadien im Kern lokalisiert, und dort auch nicht komplett, ein Teil des Proteins ist im Zytoplasma exprimiert. Im Kern konnte man sehen, dass im Nukleolus eine höhere Konzentration von λ N-Cherry zu finden ist als im Rest des Kerns (Abb. 19 A+B). In allen postmeiotischen Stadien ist es komplett zytoplasmatisch exprimiert (Abb. 19 C+D).

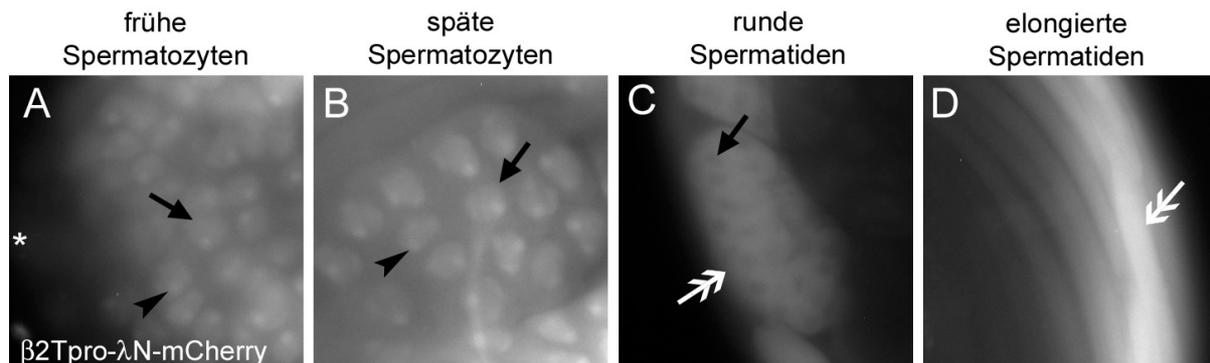


Abb. 19: Expression des Fusionsproteins NLS_{SV40} λ N-mCherry unter Kontrolle des $\beta 2t$ -Promotors. Frischpräparate von Testes die das *β2tpro-λN-mCherry* Konstrukt tragen. (A) zeigt frühe Spermatozyten direkt nach den Mitosen, sie exprimieren λ N-mCherry im Kern (Pfeil) und dort angereichert im Nukleolus (Pfeilkopf), und in geringeren Mengen im Zytoplasma. Der Hub ist mit einem Stern markiert. Für späte Spermatozyten kann man in (B) die gleiche Verteilung sehen. In runden Spermatisden (C) ist λ N-mCherry nur noch im Zytoplasma zu beobachten (Doppelpfeil). Der Kern ist frei von λ N-mCherry (Pfeil) und auch in elongierten Spermatisden (D) ist λ N-mCherry nur noch im Zytoplasma zu finden (Doppelpfeil).

3.3.2.2 Die Expression eGFP-Fusionsproteinen mittels BoxB-markierter mRNA entspricht der der normalen eGFP-Fusionsproteinen

Mit den *BoxB*-Elementen (RNA-Stemloops, die von λ N-Peptid gebunden werden) wurde verfahren wie mit den MS2-Stemloop-Kassetten (Kap. 3.3.1.2). Es wurden Kassetten mit 8facher und 12facher Wiederholung der *BoxB*-Elemente eingesetzt, die wie im Falle der MS2sl hinter den Leserahmen der eGFP-Fusionsproteine von *Tpl^{94D}*, *ProtA* und *Mst77F* kloniert wurden, so dass die Stemloops in der mRNA enthalten sind, nicht aber im translatierten Protein. Das Polyadenylierungssignal ist

3 Ergebnisse

im Transformationsvektor pChab Δ sal enthalten. Es wurden transgene Fliegenlinien etabliert und das Expressionsmuster der eGFP-Fusionsproteine analysiert. Für das *Mst77F-eGFP-16xBoxB*- und das *Tpl^{94D}-eGFP-16xBoxB-Konstrukt* konnten bis jetzt jeweils nur eine transgene Fliegenlinie erzeugt werden. Wie bei den MS2sl-Konstrukten konnte auch bei den *BoxB*-Element-Konstrukten kein Unterschied in der Expression zwischen eGFP-Fusionskonstrukten mit und ohne *BoxB*-Elementen in der mRNA festgestellt werden. *Tpl^{94D}-eGFP* des *BoxB*-Konstrukts wird im frühen und späten Kanu-Stadium zum Zeitpunkt des Histon zu Protamin Wechsels exprimiert (Abb. 20 C). *Mst77F-eGFP* und *ProtA-eGFP* der *BoxB*-Konstrukte werden ab dem späten Kanu-Stadium und in allen folgenden Stadien bis in die reifen Spermien exprimiert (Abb. 20 A+B). Die Prozessierung und Lagerung der translational reprimierten mRNA wird also auch nicht durch die in der mRNA enthaltenen *BoxB*-Elemente gestört.

3 Ergebnisse

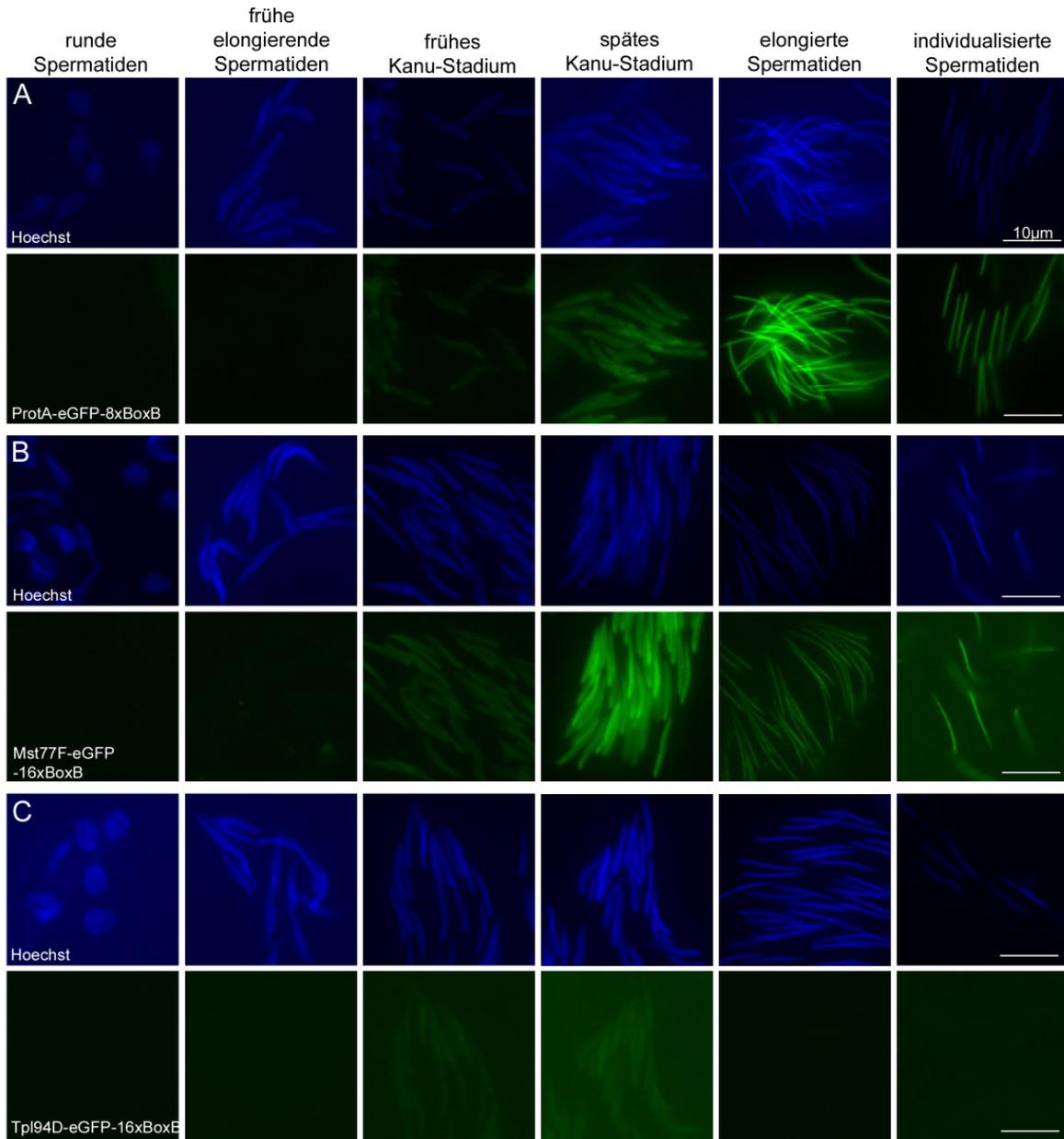


Abb. 20: Lokalisation der eGFP-Fusionsproteine der *BoxB*-markierten mRNAs für *ProtA*, *Mst77F* und *Tpl^{94D}*. Gezeigt sind Hoechstfärbungen, zur Visualisierung der DNA, an Testesquetschpräparaten von Fliegen transgen für *ProtA*-, *Mst77F*- und *Tpl^{94D}*-*BoxB*-Konstrukte. Die Hoechstfärbungen sind jeweils in der oberen Reihe jedes Abschnittes (A, B und C) gezeigt und darunter das korrespondierende eGFP-Signal. In (A) ist die Expression von ProtA-eGFP des *ProtA-eGFP-8xBoxB*-Konstrukts zu sehen. Die Expression von ProtA-eGFP des *ProtA-eGFP-8xBoxB*-Konstrukts startet im frühen Kanu-Stadium, verstärkt sich bis ins späte Kanu-Stadium und bleibt bis in individualisierte Spermatozoen bestehen. Die *Mst77F*-eGFP-Expression des *Mst77F-eGFP-16xBoxB*-Konstrukts ist in (B) gezeigt. Wie für ProtA-eGFP startet die Expression schwach im frühen Kanu-Stadium und verstärkt sich bis ins späte Kanu-Stadium und bleibt bis in die individualisierten Spermatozoen bestehen. In (C) ist die Expression von *Tpl^{94D}*-eGFP des *Tpl^{94D}*-eGFP-16xBoxB-Konstrukts gezeigt. Die Expression startet im frühen Kanu-Stadium, verstärkt sich bis ins späte Kanu-

3 Ergebnisse

Stadium und ist in allen späteren Stadien nicht mehr zu detektieren. Die Maßstabsbalken, jeweils im letzten Bild einer Reihe, markieren 10 μm .

3.3.3 Etablierung der doppeltransgenen Fliegenlinien für das MS2cp/MS2sl-System und das $\lambda\text{N/BoxB}$ -System

Um die Bindeproteine und die mit Stemloops markierten mRNAs in einer Fliege zu exprimieren und eine mögliche Lokalisation der markierten mRNA untersuchen zu können, müssen die Fliegen, die die jeweiligen entsprechenden Konstrukte tragen, d.h. Bindeprotein bzw. markierte mRNA eines System, zusammen gekreuzt werden. Integrationen auf dem zweiten Chromosom konnten mit Integrationen auf dem dritten Chromosom kombiniert werden. Es konnten noch nicht alle möglichen Kombinationen an doppeltransgenen Fliegen erzeugt werden. Die ersten Auswertungen der erzeugten doppeltransgenen Fliegen anhand von Frischpräparaten zeigten einige Probleme auf, auf die in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen wird.

3.3.3.1 Doppeltransgene Fliegen für das MS2cp/MS2sl-System

Es konnten doppeltransgene Linien für die Konstrukte der MS2sl-markierten mRNAs von *Mst77F-eGFP*, *ProtA-eGFP* und *Tpl^{94D}-eGFP* mit dem Konstrukt für *MS2cp-mCherry* unter Kontrolle des *$\beta\text{2tubulin}$* -Promotors erzeugt werden. Die entstandenen Fliegenlinien wurden in Frischpräparaten untersucht. Dabei trat eine Reihe von Problemen auf, die die Auswertung der erzeugten Fliegenlinien sehr erschweren.

Zum einen ist die zytoplasmatische Expression von MS2cp-mCherry, trotz des ins Konstrukt integrierten NLS sehr störend. Dieses Hintergrundsignal ist so stark, dass es eine mögliche Verstärkung des mCherry-Signals durch Bindung an stemloopmarkierte mRNA im Zytoplasma überdeckt.

Es wurde ein neues Konstrukt kloniert, das ein weiteres SV40-NLS im C-terminalen Teil des MS2cp-mCherry-Proteins trägt, das durch eine möglicherweise exponierter Lage im gefalteten Protein vielleicht besser erkannt wird. Die Erzeugung transgenen

3 Ergebnisse

Fliegen mit diesem Konstrukt ist noch in Arbeit. Die transgenen Fliegenlinien können im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr ausgewertet werden.

Ein weiteres Problem ist von ganz anderer Natur. Bei der Auswertung der Frischpräparate am Fluoreszenzmikroskop zeigte sich, dass ein starkes Signal im Kanal mit Rotfilter zu finden ist, wenn Präparate mit eGFP-Signal untersucht wurden. Dieses Signal ist wahrscheinlich ein „durchbluten“ des eGFP-Signals in den Rotfilter. Dieses Phänomen zeigte sich bei den eGFP-Stemloop Fliegen beider Systeme, aber auch bei anderen eGFP-tragenden Fliegenlinien, z.B. bei *Mst77F-eGFP* und *ProtB-eGFP* tragenden Fliegen (Abb. 15, gezeigt für *Mst77F-eGFP* und *ProtB-eGFP*).

Es konnten in den doppeltransgenen Fliegen des MS2cp/MS2sl-System keine mCherry-Signale beobachtet werden, die in den einzeltransgenen MS2cp-mCherry Fliegen nicht zu sehen waren.

3.3.3.2 Doppeltransgene Fliegen für das λ N/BoxB-System

Es konnten doppeltransgene Fliegenlinien für die Konstrukte der BoxB-markierten mRNA für *Mst77F-eGFP* und *ProtA-eGFP* mit dem Konstrukt des λ N-mCherry unter der Kontrolle des β 2tubulin-Promotors erzeugt werden. Die erzeugten doppeltransgenen Fliegen wurden bislang in Frischpräparaten untersucht.

Bei der Auswertung der doppeltransgenen Fliegen des λ N/BoxB-Systems traten die gleichen Probleme auf, wie schon bei der Auswertung der doppeltransgenen Fliegen des MS2cp/MS2sl-Systems.

Erstens, war auch hier durch das ungebundene λ N-mCherry ein starker Hintergrund im Zytoplasma, wo man ein Signal gespeicherter mRNAs erwarten würde. Zwar ist das freie MS2cp-mCherry in den prämeiotischen Stadien zum Teil im Kern lokalisiert (Abb. 19 A+B), aber der im Zytoplasma verbleibende Anteil des freien λ N-mCherrys reicht aus um einen starken Hintergrund im Zytoplasma zu erzeugen, der die Auswertungen erschwert. Wie für das MS2cp/MS2sl-System konnte auch hier in den doppeltransgenen Fliegen im Zytoplasma von Spermatozyten und Spermatiden kein mCherry-Signal gesehen werden, das sich von denen der nur λ N-mCherry exprimierenden Fliegen unterschied.

3 Ergebnisse

Auch für das λ N-mCherry wurde ein neues Konstrukt kloniert, das die SV40-NLS C-terminal trägt. Das Konstrukt konnte fertig kloniert werden und zurzeit werden transgene Fliegenlinien erzeugt. Die Auswertung dieser Linien konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr stattfinden.

Im Gegensatz zu den doppeltransgenen Fliegen des MS2cp/MS2sl-Systems konnte in doppeltransgenen Fliegen des λ N/BoxB-Systems ein Unterschied im mCherry-Signal zum mCherry-Signal der einzeltransgenen λ N-mCherry Fliegen gesehen werden.

Das Signal ist an den elongierenden Spermatidenkernen zu sehen, wenn die Expression der Proteine der BoxB-markierten mRNAs, also Mst77F-eGFP (Abb. 22) bzw. ProtA-eGFP (Abb. 23) startet. Schaut man sich die doppeltransgenen Fliegen des λ N/BoxB-System an, dann kann man ein Signal im Rotkanal im frühen Kanu-Stadium detektieren, wenn das eGFP-Signal noch kaum zu detektieren ist (Abb. 22 A Zyste 1 und C Zyste 1; Abb. 23 B Zyste 1). Wenn sich das eGFP-Signal verstärkt in elongierten Spermatidenkernen verstärkt sich auch des Signal im Rotkanal (Abb. 22 B, Zyste 2; Abb. 23 D, Zyste 2 + 3). Und man sieht ein nur noch schwaches Signal im Rotkanal, wenn die eGFP-Fusionsproteine in späten Spermatiden stark exprimiert sind (Abb. 22 A Zyste 4, C Zyste 4, D; Abb. 23 C Zyste 4). Frühe Stadien mit wenig eGFP-Signal zeigen ein starkes Signal im Rotkanal, und späte Stadien mit starkem eGFP-Signal zeigen ein schwaches mCherry-Signal. Man sieht ein starkes Signal im Rotkanal (jedenfalls im Fall von Mst77F-BoxB) in Vesikeln um die vollständig elongierte Spermatidenkerne (Abb. 22 B Zyste 3, C Zyste 4, D). Dies sind wahrscheinlich Vesikel in denen das überschüssige Kernplasma, das im Rahmen der Kernumformung abgeschürt wird, abtransportiert wird.

Schaut man sich das Signal im Rotkanal in Fliegenlinien mit eGFP-Fusionsproteinen alleine an, hier gezeigt für ProtB-, Mst77F-eGFP (Abb. 15), kann man z.t. ähnliche Muster erkennen. Dieses detektierbare Signal im Rotkanal bei Fliegenlinien mit ProtB-, Mst77F-eGFP-Fusionsproteinen zeigt Unterschiede in der Intensität des Rotsignals im Vergleich zu eGFP-Signal wenn vielleicht auch weniger stark als bei den doppeltransgenen Fliegen des λ N/BoxB-Systems (Abb. 22 B). Das bedeutet auch in Testes mit den ProtB-, Mst77F-eGFP-Konstrukten ist das Signal im Rotkanal in den späten Stadien mit starkem eGFP-Signal, weniger intensiv als in den frühen Stadien, wenn das eGFP-Signal schwächer ist (Abb. 15 B gefüllter und ungefüllter Pfeil). Die Vesikel, die bei der Kernumformung abgeschnürt werden, sind in Fliegen

3 Ergebnisse

die eGFP-Fusionsproteine exprimieren auch zu sehen, im Grün-Kanal als auch im Rot-Kanal (Abb. 15 B), aber in einer wesentlich schwächeren Intensität als im Rotkanal der doppeltransgenen Fliegen des Mst77F-Boxb-Konstrukts (Abb. 22 D Zyste 4).

Man sieht in den doppeltransgenen Fliegen beider Systeme keine Akkumulation der Bindeproteine im Zytoplasma von Spermatozyten und Spermatischen, was wahrscheinlich am hohen mCherry-Hintergrund liegt. Für das λ N/BoxB-System lässt sich in den späten Spermatischen eine Akkumulation des mCherry-Signal beobachten wenn die BoxB-markierten mRNAs translatiert werden.

Es ist sehr schwierig zu beurteilen, ob das Signal eine echte Lokalisation der mRNA ist, oder ein Artefakt, das durch das „Durchbluten“ des eGFP-Signal in den Rotkanal zustande kommt, beides wäre möglich. Auf dieses Problem wird in der Diskussion genauer eingegangen.

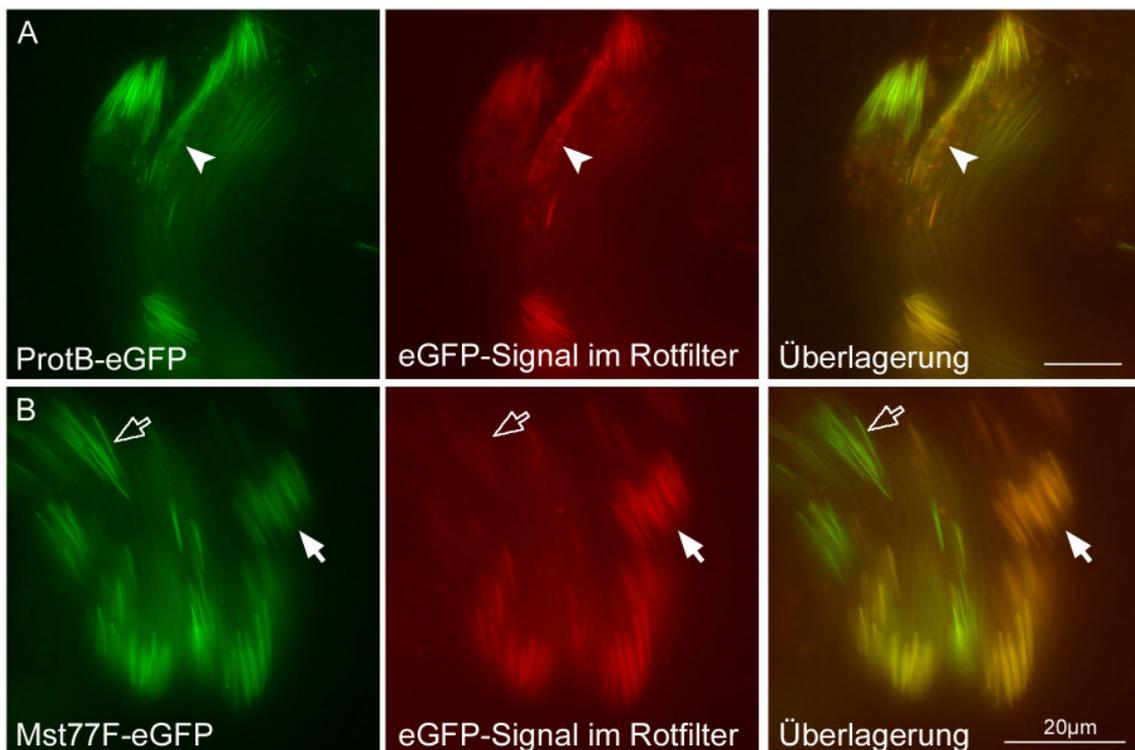
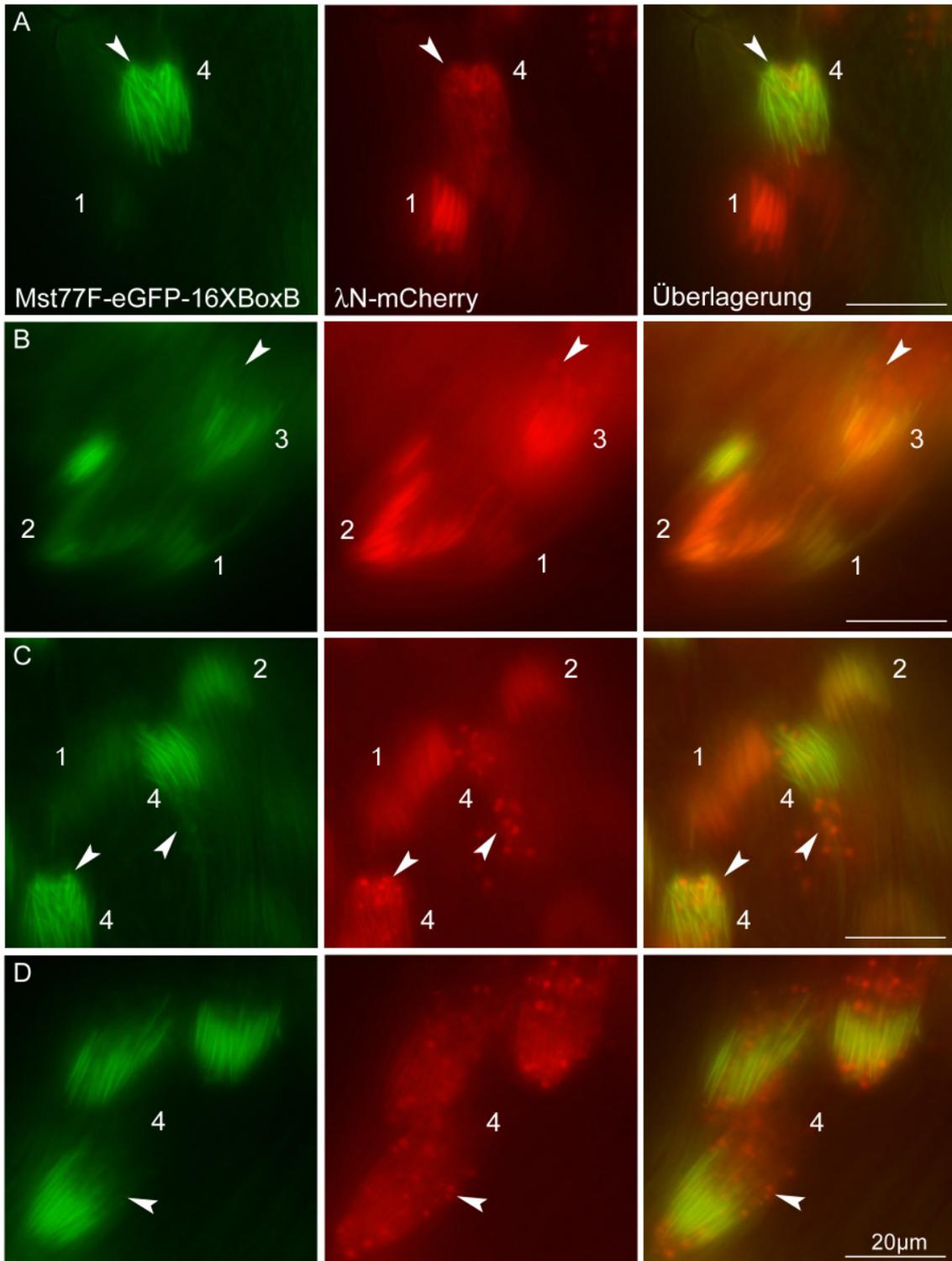


Abb. 21: Problem bei der Auswertung der doppeltransgenen Fliegen: eGFP-Signale zeigen ein starkes Signal im Rotfilter. Testisfrischpräparate von ProtB-eGFP (A), bzw. Mst77F-eGFP (B) tragenden Fliegen. In der ersten Spalte ist jeweils das eGFP-Signal zu sehen (etwa 10 ms Belichtungszeit), daneben das Signal, das im Kanal mit Rotfilter zu detektieren war (etwa 200 ms Belichtungszeit), ohne dass ein rotes Fluorophor zugegen gewesen wäre. In der dritten Spalte ist die Überlagerung beider Bilder zu sehen. Der Pfeilkopf in (A) markiert Vesikel in denen überschüssiges

3 Ergebnisse

Zytoplasma abgestreift wird. Der gefüllte Pfeil in (B) markiert Spermatisden im Kanu-Stadium, die ein starkes Signal im Rot-Kanal haben und ein schwächeres Mst77F-eGFP-Signal, und der ungefüllte Pfeil in (B) markiert elongierte Spermatisdenkerne, die ein starkes Mst77F-eGFP-Signal zeigen und ein schwaches Signal im Rot-Kanal. Die Maßstabsbalken in den äußeren Bildern entsprechen jeweils 20 μm .



3 Ergebnisse

Abb. 22: mCherry-Signal an den Mst77F-eGFP-16xBoxB exprimierenden Spermatidenkernen.

Testisfrischpräparate von doppeltransgenen Fliegen, die ein *β2tpro-λN-mCherry-Konstrukt* und ein *Mst77F-eGFP-16xBoxB-Konstrukt* tragen. In der ersten Spalte ist das eGFP-Signal zu sehen, in der zweiten Spalte das korrespondierende mCherry-Signal und in der dritten Spalte die Überlagerung der jeweiligen Bilder. Zysten die mit (1) markiert sind Zysten im frühen Kanu-Stadium. Hier ist wenig eGFP-Signal zu detektieren, aber ein relativ starkes Signal im Rotkanal. Mit (2) markierte Zysten sind im späten Kanu-Stadium. Es ist ein eGFP-Signal und ein Signal im Rotkanal zu sehen. Die mit (3) markierte Zyste zeigt elongierte Spermatidenkerne, die gerade anfangen Vesikel abzuschneiden, und die mit (4) markierten Zysten sind fertig elongierte Spermatiden. Hier ist das eGFP-Signal stark zu detektieren, das Signal im Rotkanal ist aber weniger an den Kernen zu sehen, als vielmehr in den sich abschneidenden Vesikeln. Der Maßstabsbalken jeweils im Bild der dritten Spalte markiert 20 µm.

3 Ergebnisse

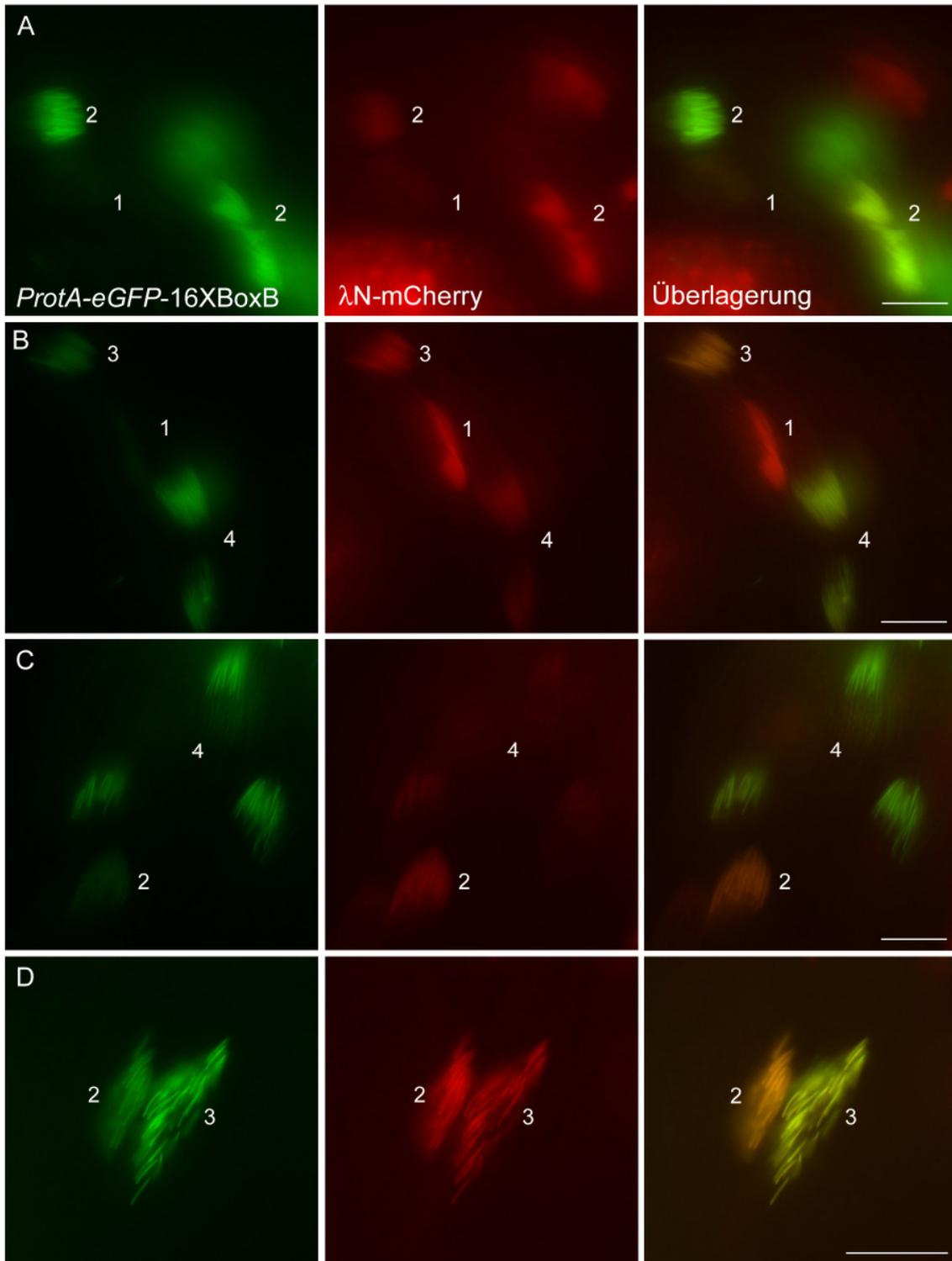


Abb. 23: mCherry-Signal an den ProtA-eGFP-8xBoxB exprimierenden Spermatidenkernen. Testisfrischpräparate von doppeltransgenen Fliegen, die ein $\beta 2pro-\lambda N-mCherry$ -Konstrukt und ein $ProtA-eGFP-16xBoxB$ -Konstrukt tragen. In der ersten Spalte ist das eGFP-Signal zu sehen, in der zweiten Spalte das korrespondierende mCherry-Signal und in der dritten Spalte die Überlagerung der jeweiligen Bilder. Mit (1) markierte Zysten sind Spermatidenkerne im frühen Kanu-Stadium mit schwachem eGFP-Signal und mehr oder weniger starkem Signal im Rotkanal. Zysten die mit (2) markiert sind, sind im späten Kanu-Stadium mit eGFP-Signal und Signal im Rotkanal. Mit (3) markierte

3 Ergebnisse

Zysten sind fast fertig elongierte Spermatiden, auch mit eGFP-Signal und Signal im Rotkanal. Und mit (4) markierte Zysten sind vollständig elongiert mit starken eGFP-Signal und schwachen Signal im Rotkanal. Im Gegensatz zu den doppeltransgenen Fliegen mit BoxB-markierter *Mst77F* mRNA (Abb. 16) sind hier die sich abschnürenden Vesikel nicht so stark zu sehen. Der Maßstabsbalken jeweils im Bild der dritten Spalte markiert 20 μm .

4 Diskussion

4.1 Die transkriptionelle Regulation der Expression von *Mst77F* während des Spermatozyten-Stadiums

Kurze Promotoren von 20 bp - 100 bp sind typisch für die transkriptionelle Kontrolle während der Spermatogenese von *Drosophila* (Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl et al., 2005).

Die Promotoren von *ProtA* und *ProtB*, die nahezu identisch sind, umfassen 109 bp vor dem vorhergesagten Transkriptionsstart, und sind zusammen mit 90 bp der 5'UTR für eine zeitlich und räumlich korrekte Transkription der Protamingene ausreichend (Dissertation Jayaramaiah Raja, 2005; Barckmann et al., in Vorbereitung).

Ähnlich kurze Promotoren haben auch *don juan* und *don juan like*, zwei Gene die für potentielle Linker-Histon-Varianten kodieren, die zusammen mit den Histonen vom Chromatin entfernt werden (Blumer et al., 2002; Hempel et al., 2006).

4.1.1 Die Transkription von *Mst77F* wird durch eine kurze *cis*-regulatorische Regionen gesteuert

Für die korrekte zeitliche und räumliche Expression von *Mst77F* sind 89 bp vor dem vorhergesagten Transkriptionsstart, bzw. 261 bp vor dem ATG ausreichend. Das Expressionslevel nimmt aber deutlich ab, wenn die 5'UTR deletiert ist, was dafür spricht, dass es Promotorelemente nach dem Transkriptionsstart gibt (Diplomarbeit Barckmann, 2005). Der Promotor besitzt keine bekannten klassischen Promotorelemente oder Transkriptionsfaktor-Bindestellen. Auch das ist typisch für testisspezifische Promotoren, sie besitzen keine klassischen Promotorelemente. Und obwohl z. B. das β 2UE1-Element aus dem *β 2tubulin*-Promotor (Michiels et al., 1989) in ähnlicher Form noch in anderen testisspezifischen Promotoren gefunden wurde,

4 Diskussion

konnte noch kein generelles Testispromotormotiv gefunden werden (Nurminsky et al., 1998).

Testisspezifische Promotoren sind nur vor und während der meiotischen Prophase in der männlichen Keimbahn aktiv und in allen anderen Geweben inaktiv. Es ist erstaunlich, dass alle bisher gefundenen Promotoren, die diese Gewebespezifität gewähren, so klein sind. Diese kurzen Promotoren und das Fehlen klassischer Promotorelemente deuten auf eine spezielle Form der Genregulation hin, die von der in anderen Geweben abweicht, z. B. durch den tTAF-enthaltenden paralogen TFIIID-Komplex, der wahrscheinlich die Transkription der translational reprimierten mRNAs im Spermatozyten-Stadium initiiert (siehe Einleitung Kap. 2.3.1; Übersichtsartikel: White-Cooper, 2009).

In Mäusen ist die transkriptionelle Regulation der Protamingene schon wesentlich besser untersucht. Die Promotoren von *protamine 1* und *protamine 2* enthalten eine TATA-Box und eine Reihe von Transkriptionsfaktor-Bindestellen, wie z. B. ein ‚cAMP responsive element‘ (CRE) und Y-box-Bindeelemente, wie viele im Spermatiden-Stadium exprimierte Gene in Mäusen (Übersichtsartikel: Steger, 1999; Sassone-Corsi, 2005). Verschiedene Klassen von regulatorischen Elementen, wie z.B. ‚Boundary‘-Elemente und ‚locus control regions‘ und ‚matrix attachment sites‘ (MARs) sind bekannt dafür, dass sie die Transkription beeinflussen, indem sie die Chromatinstruktur verändern. Die 5´ und 3´ Region um die Gengruppe *protamine 1*, *protamine 2* und *transion protein 2* enthält je eine haploid-spezifische MAR, die den in somatischen Zellen stillgelegten Gengruppe in haploiden Spermatiden potentiert, d. h. für die Transkription zugänglich macht (Martins et al., 2004).

Um das Protamincluster in *Drosophila* findet man zwar eine Reihe potentieller CTCF-Bindestellen (persönliche Kommunikation Marek Bartkuhn, Justus-Liebig-Universität Gießen), ob sie aber wirklich funktionell sind, und was für eine Funktion sie haben könnten, wurde noch nicht erforscht. Es ist aber vorstellbar, dass durch sie die Genregion um die Protamingene ähnlich wie bei Mäusen organisiert wird, da sich hier testisexprimierte Gene häufen, die in allen anderen Geweben ausgeschaltet sein müssen (Tweedie et al., 2009).

Durch die deutlichen Unterschiede der typischen Testispromotoren, d.h. ihre Kürze und das Fehlen bekannter Promotorelemente oder Transkriptionsfaktorbindestellen, zu anderen Promotoren in *Drosophila* ist ein gewebespezifischer Regulierungsmechanismus der Transkription sehr wahrscheinlich. In wie weit es

4 Diskussion

außerdem eine Regulierung der testisspezifischen Gengruppen auf Ebene der Chromatinstruktur gibt z. B. durch die vorhandenen CTCF-Bindestellen bleibt zu erforschen.

4.1.2 Der Transkriptionsstart von *Mst77F* liegt einige Basen unterhalb des vorhergesagten Transkriptionsstarts

Der Transkriptionsstart von *Mst77F* war bisher unbekannt, es gab nur Computervorhersagen. In dieser Arbeit konnte der Transkriptionsstart von *Mst77F* mit Hilfe des *Promotor-LacZ*-Konstrukts *pc77F3-Δ5'UTR-29bp* auf 29 bp eingegrenzt werden (Kap. 3.1.2). Dieses *Promotor-LacZ*-Konstrukt hat im Vergleich zu *pc77F3-Δ5'UTR* am vorderen Ende der 5'UTR 29 bp zusätzlich deletiert. Dadurch endet das *Promotor-LacZ*-Konstrukt sehr kurz hinter dem vorhergesagten Transkriptionsstart (Tweedie et al., 2009).

Da das *Promotor-LacZ*-Konstrukts *pc77F3-Δ5'UTR-29bp* gar keine Expression mehr aufweist, das 29 bp längere *Promotor-LacZ*-Konstrukt *pc77F3-Δ5'UTR* aber eine starke Expression vermittelt, deutet dies stark darauf hin, dass der Transkriptionsstart bei diesem Konstrukt deletiert wurde (Kap. 3.1.2). Es könnte natürlich auch ein essentielles Promotorelement in der 5'UTR entfernt worden sein, da aber die Expression durch die Deletion der 29 bp komplett unterbunden wird, und nicht nur vermindert, und eine testisspezifische cDNA innerhalb dieser Sequenz startet und auch eine Initiator-Sequenz zu finden ist, ist es wahrscheinlicher, dass der Transkriptionsstart entfernt wurde.

Es ist dabei nicht auszuschließen, dass *Mst77F* mehrere Transkriptionsstarts besitzt. Die Daten der ‚Machibase‘ (Ahsan et al., 2009), einer Datenbank für Transkriptionsstarts in *Drosophila*, als auch die sehr unterschiedlichen Starts der vollständigen cDNAs (Tweedie et al., 2009), legen diese Vermutung nahe.

Der Transkriptionsstart von *Mst77F* wurden auf einen Bereich von 29 bp eingeschränkt, der konkrete Start und den Beweis von möglichen anderen Transkriptionsstarts steht aber noch aus. Dazu durchgeführte Primer Extension Experimente führten bis jetzt nicht zum Erfolg.

4 Diskussion

4.1.3 Translationale Repression der *Mst77F* mRNA wird über die 5'UTR vermittelt

Der Morphogeneseprozess während der Spermiogenese ist im großen Maße von translational reprimierten mRNAs abhängig, da in der Spermatogenese von *Drosophila* keine fast keine postmeiotische Transkription stattfindet (Barreau et al., 2008a).

Innerhalb einer translational reprimierten mRNA muss die Information enthalten sein, dass die mRNA nicht direkt translatiert werden soll, sondern translational reprimiert wird und gespeichert werden muss. Meist übernehmen diese Aufgabe Sequenzmotive oder Stemloop-Elemente (Hempel et al., 2006) in der RNA an die dann möglicherweise RNA-Bindeproteine binden, die diese Aufgaben vermitteln.

In *Drosophila* liegen die Elemente, die für die translationale Repression der mRNA während der Spermatogenese verantwortlich sind, in allen bis jetzt gefunden Fällen in der 5'UTR. Für die Protamine ist das der Fall (Jayaramaiah Raja, 2005; Barckmann et al., in Vorbereitung), genauso wie für *dj*, *djl* und *Mst87F* (Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl et al., 2005). Bei der Analyse von *Promotor-LacZ*-Konstrukten mit und ohne 5'UTR konnte in dieser Arbeit auch für *Mst77F* die 5'UTR für die translationale Repression verantwortlich gemacht werden (Kap. 3.1.3). Das steht im Kontrast zu der translationalen Repression der Protamin mRNA in Säugern, die dort über die 3'UTR reguliert wird (Hecht, 1998; Steger, 1999), und zur translationalen Repression der mRNAs in der *Drosophila* Oogenese, wo die Repression der mRNAs auch über die 3'UTR erfolgt (Rangan et al., 2008).

Die unterschiedliche Lage der translational reprimierenden Elemente in der Spermatogenese von *Drosophila*, und in der Oogenese von *Drosophila* oder der Spermatogenese von Mäusen, und deutet darauf hin, dass die Repression hier über einen anderen Mechanismus funktioniert.

Ein Beispiel für ein Translations-Repressionselement in der 5'UTR ist das ‚iron-response-element‘ (IRE), das in der 5'UTR der *ferritin* mRNA liegt. Das ‚iron-response-protein‘ (IRP) bindet an das IRE und verhindert so wahrscheinlich die Anlagerung der Ribosomen an die mRNA. Für eine Stabilisierung der translational reprimierten *ferritin* mRNA ist es aber zusätzlich noch notwendig, dass IR-Proteine

4 Diskussion

an IR-Elemente in der 3'UTR binden (Rouault et al., 1988; Dickey et al., 1988; Übersichtsartikel: Hentze et al., 2004).

Bei der translationalen Repression über die 5'UTR ist es denkbar, dass die Zugänglichkeit der mRNA für die Ribosomen blockiert wird, die Ribosomen an der mRNA am Weiterlaufen gehindert werden, oder dass das Startcodon verdeckt wird.

Mit *in vitro* Translationsexperimenten wurde in Mäusen gezeigt, dass sich *Protamine 1* mRNA aus runden Spermatozyten, also eigentlich translationsreprimierte mRNA, wenn sie deproteiniert wird, genauso effektiv translatieren lässt, wie *Protamine 1* mRNA aus elongierten Spermatozyten. Das unterstützt die Theorie, dass für die translationale Repression dieser mRNAs die Bindung von Proteinen an die mRNA wichtig ist (Fajardo et al., 1994).

Für *protamine 1* in Mäusen wurden sechs RNA-Bindeproteine gefunden, die in der 3'UTR binden und wahrscheinlich für die translationale Repression nötig sind. Für vier von ihnen konnte auch eine Bindung an die 3'UTR von *protamine 2* gezeigt werden (Übersichtsartikel: Steger, 2001).

Für *transition protein 1* in Mäusen konnte zudem gezeigt werden, dass die Kontrolle der Translation der mRNA über die Länge des PolyA-Schwanzes reguliert wird (Übersichtsartikel: Hennig, 2003).

Es gibt zwar in *Drosophila* eine Reihe an RNA-Bindeproteinen, die im Testis exprimiert sind, aber es konnte noch für keine mRNA ein passendes RNA-Bindeprotein gefunden werden, dass für die translationale Repression verantwortlich ist.

Auch Y-Box Proteine spielen auch bei der translationalen Repression von mRNA in der Spermatogenese der Maus eine wichtige Rolle. Der Verlust des MSY2-Protein in Mäusen führt zur Instabilität translational reprimierter mRNAs in der Spermatogenese, u.a. auch der mRNAs der Protamine *protamine 1* und *2* und des Transitionsproteins *transition protein1* (Yang et al., 2007). Ein passender Kandidat für translationale Repression an mRNAs in der *Drosophila* Spermatogenese könnte Yps sein. Yps ist ein Y-Box Protein, das während der Oogenese von *Drosophila* für die Lokalisation und translationale Repression von *oskar* mRNA notwendig ist. Es konnte hier gezeigt werden, dass *Yps* mRNA im Testis von *Drosophila* exprimiert ist (Kap. 3.1.3.1). Es wäre also interessant zu untersuchen, ob Yps eine Rolle in der translationalen Repression der mRNAs in der Spermatogenese von *Drosophila* spielt.

4 Diskussion

4.2 Die Transkription von *Mst35Bb* und *Mst77F* ist abhängig von testisspezifischen TAFs

In den Spermatozyten-Stadien werden eine große Menge an Genen transkribiert, um das enorme Wachstum der Zellen, die meiotischen Teilungen und die folgende Spermien-Morphogenese zu ermöglichen (siehe auch Kap. 2.3 Einleitung).

Die Präinitiationskomplexe (PIC, preinitiation complex) an PolII-Core-Promotoren scheinen an unterschiedlichen Promotoren aus unterschiedlichen Kombinationen von Faktoren zusammengesetzt zu sein, abhängig vom gewebespezifischen und zeitlichen Profil der Expression des jeweiligen Gens (Übersichtsartikel: Muller und Tora, 2004). Dies bietet eine zusätzliche Ebene zur Regulation der Transkription.

In den unterschiedlichsten Spezies sind neben den generellen TAFs gewebespezifisch exprimierte TAFs bekannt, die gewebespezifische Expressionsprogramme etablieren (Übersichtsartikel: Muller und Tora, 2004) (siehe Einleitung Kap. 2.3.1.1).

In Spermatozyten von *Drosophila* gibt es neben den generellen TAFs testisspezifische TAFs, die auf der Ebene der Transkriptionsinitiation zwischen direkt translatierten mRNAs und translational reprimierten mRNA zu unterscheiden scheinen, wahrscheinlich durch die Bildung eines alternativen TFIID-Komplexes, der die tTAFs (Chen et al., 2005) und TAF1-2 enthält (Metcalf und Wassarman, 2007). Dies ist notwendig, da abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen (Barreau et al., 2008b), die Transkription mit dem Eintritt in die meiotischen Teilungen stoppt, so dass die Spermienmorphogenese allein von gespeicherten mRNAs abhängt. Alle bisher analysierten, translational reprimierten mRNAs stehen unter Kontrolle der tTAFs, wie Expressionsanalysen in tTAF-Mutanten zeigen (White-Cooper et al., 1998). Für einige dieser mRNAs (*dj*, *fzo* und *Mst87F*) konnte eine direkte Regulation durch die tTAFs gezeigt werden (Chen et al., 2005).

In dieser Arbeit konnte mit Anti-Sa-CHIPs gezeigt werden, dass *ProtB* und *Mst77F* direkte Zielgene der tTAFs sind (Kap. 3.1.4).

Die tTAFs scheinen an den Promotoren ihrer Zielgene die repressiven Polycompgroup Proteine zu verdrängen und sie dann im Nukleolus zu halten, was

4 Diskussion

der Sinn dieser Lagerung im Nukleolus konnte noch nicht geklärt werden (Chen et al., 2005).

Die Transkription durch die tTAFs scheint die entstehenden mRNAs als translations-reprimiert von den direkt translatierten mRNAs zu trennen. Wie ein solcher Mechanismus funktionieren könnte ist noch völlig unklar.

Die bisher bekannten direkten Zielgene der tTAFs sind allesamt Gene, die direkt am Morphogeneseprozess der Spermatogenese beteiligt sind und zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus der translationalen Repression entlassen werden müssen. Fzo (fuzzy onion) ist an der Bildung des mitochondrialen Derivats des Nebenkerns beteiligt und ist somit schon im Nebenkernstadium, in relativ frühen Spermatiden exprimiert (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Dj ist von runden Spermatidenkernen bis ins Kanu-Stadium mit dem Chromatin assoziiert und wird dann vom Chromatin mit den Histonen entfernt und ist später im Flagellum exprimiert (Hempel et al., 2006). *Mst87F* kodiert für ein Strukturprotein des Flagellums, und ist in den elongierenden Spermatiden exprimiert (Kempe et al., 1993). ProtB und Mst77F sind chromatinorganisierende Proteine und werden ab dem späten Kanu-Stadium exprimiert (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005) und sind damit, zusammen mit *Mst87F* die am spätesten exprimierten Zielgene die bis jetzt gefunden wurden.

Die drei neuen gefundenen direkten Zielgene der tTAFs bestärken die Hypothese, dass Spermatozyten einen Mechanismus haben, die im Spermatozyten-Stadium exprimierten Gene in zwei Klassen einzuteilen, die direkt translatierten mRNAs und mRNAs bei denen Transkription und Translation entkoppelt sind. Wie die Entlassung aus der Repression und die Rekrutierung der Ribosomen an die mRNA zum richtigen Zeitpunkt in der Spermiogenese reguliert werden, ist noch völlig ungeklärt. Sekundäre Polyadenylierung könnte eine Rolle bei dem Prozess spielen, da für *Mst87F* mRNA gezeigt werden konnte, dass sie zum Zeitpunkt der Translation einen längeren PolyA-Schwanz hat. (Kuhn et al., 1991).

Mst77F scheint eine duale Regulation während der Spermatogenese zu haben. Wenn man sich die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung an tTAF Mutanten und der *Promotor-LacZ*-Konstrukte für *Mst77F* ansieht, ist es anzunehmen, dass ein geringer Teil der *Mst77F* mRNA unabhängig von den tTAFs exprimiert wird.

Die *in situ* Hybridisierungen an *can*¹²-mutanten Testes zeigten tatsächlich, dass ein kleiner Teil der mRNA unabhängig von den tTAFs transkribiert wird (Kap. 3.1.5). In den *Promotor-LacZ*-Konstrukten konnte immer eine basale Transkription in

4 Diskussion

Spermatozyten beobachtet werden, deren mRNA nicht unter translationaler Kontrolle zu steht (Kap. 3.1.3). Es könnte sein, dass diese schwache Expression, die mit den *Promotor-LacZ*-Konstrukten in Spermatozyten beobachtet wurde, von mRNA translatiert wird, die von den tTAFs unabhängig transkribiert wird. So wäre mit *Mst77F* zum ersten Mal ein Gen gefunden, das unter einer dualen Regulation während der Spermatogenese steht. Wenn *Mst77F* über eine weitere, von den tTAFs unabhängige Regulation verfügt, könnte das auch erklären, warum *Mst77F* bei den Anti-Sa-ChIPs (Kap. 3.1.5) eine etwas weniger deutliche Anreicherung zeigte als *protamin B* oder *Mst87F*.

4.3 Im Gegensatz zu Protaminmutanten in Säugern sind *Drosophila* Protamin-Null-Mutanten fertil

Mit der Erzeugung der Protaminmutante *protΔ* für *Drosophila* in dieser Arbeit (Kap. 3.2.2) konnte gezeigt werden, dass die Protamingene überraschenderweise nicht für die Fertilität essentiell sind. Wohingegen die Protamingene in Menschen und Mäusen haploinsuffizient sind (Übersichtsartikel: Oliva, 2006; Carrell et al., 2007). Die Protamine in *Drosophila* sind weniger argininhaltig als Protamine in Säugern, aber sie tragen die für Protamine typischen Cysteinreste, mit denen Protamine Disulfid-Brücken ausbilden, um das Chromatin noch dichter zu packen (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Nach der Degradation der Histone und Tpl^{94D} bilden Protamin A und Protamin B neben *Mst77F* die bisher bekannten chromatinorganisierenden Komponenten in *Drosophila* Spermien (Rathke et al., 2007).

Von Oliva (2006) wurde vorgeschlagen, dass die Protamine ein Art Checkpointfunktion in der Bildung der Spermien erfüllen könnten. Zumindest für *Drosophila*-Protamine *ProtA* und *ProtB* kann dies nicht zutreffen, da auch bei einem Verlust der Protamine fertile Spermien gebildet werden.

Es wurden in der *protΔ*-Mutante die Charakteristika der Chromatinreorganisation in der Abwesenheit der Protamine zu untersucht. In homozygoten *protΔ*-Männchen verläuft der Abbau der Histone, der Einbau und Abbau von Tpl^{94D}, das Einfügen und die Reparatur der DNA-Brüche, der Einbau von *Mst77F* und *Mst99C* genau wie im

4 Diskussion

Wildtyp (Kap. 3.2.4). All diese Prozesse verlaufen also unabhängig von der Synthese der Protamine. Es ist demnach wahrscheinlich, dass es sich um unabhängige Prozesse handelt, die unterschiedlich reguliert werden. Ähnliches konnte in der Spermatogenese von protamindefizienten Menschen beobachtet werden. Hier werden die Transitionsproteine von der DNA gelöst, auch wenn keine Protamine gebildet werden (Fuentes-Mascorro et al., 2000, Aoki et al., 2006).

Zumindest für die Spermatogenese von *Drosophila* ist die Unabhängigkeit der einzelnen Prozesse konsistent mit früheren Daten, da genetische Analysen schon öfter gezeigt haben, dass die meisten Mutanten in der Spermatogenese von *Drosophila* nur einen Entwicklungsprozess betreffen, wovon die meisten anderen Prozesse die, parallel ablaufen, unberührt bleiben (Übersichtsartikel: Fuller, 1998).

Die Fertilität der *protΔ*-Mutante wäre, besonders im Vergleich zur Haploinsuffizienz der Protamingene in Säugern, schwer zu verstehen, wenn man nicht die Existenz weiterer chromatinorganisierender Proteine im Spermium von *Drosophila* fordern würde, die die Organisation der DNA im Spermium und damit deren Fertilität garantieren. Da die SNBPs (sperm nuclear basic proteins) über die verschiedenen Spezies hinweg eine hochdiverse Gruppe an Proteinen bilden (Übersichtsartikel: Balhorn, 2007), ist es wahrscheinlich, dass bei der Suche nach chromatinorganisierenden Proteinen bis jetzt Gene übersehen wurden, weil potentiell interessante Gene bisher über ‚intelligent guess‘ und über die Ähnlichkeit zu Proteinen in anderen Spezies gefunden wurden.

4.3.1 Die missgeformten späten Spermatidenkerne der *protΔ* Mutante weisen auf eine verminderte strukturelle Integrität der Kerne hin

Ein relativ großer Anteil, etwa ein Viertel der elongierten Spermatidenkerne in der *protΔ*-Mutante ist abnorm geformt; die Kerne sind zwar vollständig elongiert, aber sie wirken verkrumpelt oder verbogen (Kap. 3.2.3). Bei Mäusen konnte etwas Ähnliches beobachtet werden. Da die Protamingene in Mäusen haploinsuffizient sind, konnten nur chimäre Mäuse untersucht werden. Hier wurden in chimären Mäusen mit 70 % - 90 % *protamine 2* defizienten Spermien ein Anteil von etwa 30 % deformierten Spermien beobachtet (Cho et al., 2003).

4 Diskussion

Disulfidbrücken, die zwischen den Protaminen gebildet werden, sollen das Chromatin stabilisieren. Cho et al. (2001) postulieren, dass bei einer Reduktion des Protamingehalts im Spermienkern die Chromatinanordnung verändert würde und damit auch die strukturelle Integrität des Kerns. Das Gleiche ist auch für die Protaminmutante *protΔ* in *Drosophila* anzunehmen. Es ist erkennbar, dass die Kernformung in der *protΔ*-Mutante an sich nicht gestört ist, aber ein Teil der Spermatidenkerne scheinen fragiler als Wildtyp Spermatidenkerne zu sein. Auch die Protamine in *Drosophila* haben die typischen Cysteinreste und bilden deshalb wahrscheinlich auch Disulfidbrücken aus.

Der Defekt der verkumpelten Spermatidenkerne betrifft immer entweder alle oder keine Spermatiden einer Zyste. In den seminalen Vesikeln, dem männlichen Speicherorganen für reife Spermien, sind immer nur normal aussehende Spermien zu beobachten. Das ist verständlich, da abnormale Spermatiden es gewöhnlich nicht schaffen zu individualisieren (Tokuyasu et al., 1972 zitiert in Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Aber es könnte erklären, warum die *protΔ*-Mutanten generell eine geringere Anzahl an Nachkommen haben (Kap. 3.2.2). Es werden einfach weniger funktionstüchtige Spermien gebildet, da ein Teil der Spermatiden nicht individualisiert. Es konnten in der *protΔ*-Mutante etwa 20-25 % missgeformte Spermatidenkerne beobachtet werden, aber ein sehr variierender Anteil von und 0 bis 50 % weniger Nachkommen. Es könnte aber zusätzlich sein, dass nicht alle defekten Spermatidenkerne eindeutig durch ihre Morphologie als gestört zu erkennen sind. Es könnte sein, dass Spermatidenkernen mit leichterem Defekt individualisieren und so zu einer verringerten Nachkommenzahl führen.

Dass immer alle Spermatiden einer Zyste den gleichen Phänotyp haben ist nachvollziehbar, da jede Zyste durch die zytoplasmatischen Brücken eine synzytiale Einheit bildet. Warum aber nicht alle Zysten den gleichen Phänotyp haben ist schwieriger zu verstehen. Denkbar wäre, dass dies mit einem Dosiseffekt zusammenhängt. Vorstellbar wäre, dass eine Varianz in der Expression eines weiteren chromatinorganisierenden Proteins diesen Effekt auslöst. In Spermien der *protamine 2*-Mutanten in Mäusen kommt es auch zu einer sehr variablen Ausprägung der auftretenden Defekte, wie z. B. der Veränderung in der Morphologie des Spermienkopfes und der Fragmentierung der DNA im Spermienkern (Cho et al., 2003). In Menschen konnte mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass innerhalb der Spermienpopulationen einzelner Individuen signifikante Schwankungen

4 Diskussion

im Protamingehalt der einzelnen Spermien auftreten. Spermien mit geringem Protamingehalt zeigen ein erhöhtes Auftreten von DNA-Schäden und eine verringerte Lebensfähigkeit (Aoki et al., 2006). Es herrscht also innerhalb einer wildtypischen Spermienpopulation eine Varianz in Bezug auf den Protamingehalt. Wenn spekuliert wird, dass es neben Protamin A und B noch weitere chromatinorganisierende Proteine im Spermium von *Drosophila* gibt, dann könnte es sein, dass der Phänotyp der missgestalteten späten Spermatidenkerne deshalb nur in einem gewissen Anteil der Spermatiden auftritt, weil er von der Dosis eines oder mehrerer weiterer chromatinorganisierender Proteine abhängt, welche selbst gewissen Schwankungen in der Expression unterliegen.

4.3.2 Mst77F und Mst99C haben wahrscheinlich keine redundante Funktion zu ProtA und ProtB

Eine interessante Beobachtung ist, dass ein relativ großer Anteil der elongierten Spermatiden zwar einen völlig elongierten Kern hat, dieser aber verkrumpelt oder verbogen ist. Um zu testen, ob die HMG-Box tragenden Proteine ProtA, ProtB, Mst77F und Mst99C sich gegenseitig ersetzen können, wurden Rettungsversuche durchgeführt. Der Phänotyp der späten missgestalteten Spermatidenköpfe kann durch das Einbringen von einer oder zwei Kopien *ProtA-eGFP* oder *ProtB-eGFP* gerettet werden, was zeigt dass die Protamine in der Tat redundant in ihrer Funktion sind. Der Phänotyp wird aber nicht durch das Einbringen von *Mst77F-eGFP* oder *Mst99C-eGFP* gerettet. Was zeigt, dass die Protamine und Mst77F und Mst99C nicht funktionell redundant sind (Kap. 3.2.5). Beide Proteine haben strukturell abgesehen von der HMG-Box auch nicht viel Ähnlichkeit mit den Protaminen. Mst77F (215 As) ist ein H1-ähnliches Protein, das entfernt verwandt mit Hils1 aus Mäusen ist. Mst99C ist mit seinen 240 As wesentlich größer als die Protamine (ProtA 146 As, ProtB 144 As). Mst99C ist zwar ebenfalls relativ argininreich, was ein Charakteristika für Protamine der Säugetiere ist (Übersichtsartikel: Balhorn, 2007), trägt aber nicht die konservierten Cysteine zum Ausbilden der Disulfidbrücken (Rathke und Renkawitz-Pohl unveröffentlicht). Es ist also anzunehmen, dass beide Proteine Funktionen übernehmen, die sich von der Funktion der Protamine unterscheidet.

4 Diskussion

Das Mst77F-eGFP in der *prot1*-Mutante nicht rettet passt dazu, dass der Verlust von *protamin A* und *protamin B* in der *prot1*-Mutante den *ms(3)nc3* Phänotyp von *Mst77F* nicht verstärkt (Rathke und Barckmann et al., in Druck). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass Mst77F neben seiner Assoziation mit dem Chromatin auch eine Funktion in der Mikrotubulin-basierenden Kernformung hat, also eine deutlich von den Protaminen abzugrenzende Funktion hat (Rathke und Barckmann et al. in Druck).

Auch dies bestärkt die Hypothese, dass es neben den Protaminen Mst77F und Mst99C noch weitere Proteine mit einer chromatinorganisierenden Funktion geben muss, die in dem anscheinend sehr fein aufeinander abgestimmten und abgesicherten Prozess mitwirken, und in der *prot1* Mutante die Fertilität garantiert. Eine wichtige Funktion der Protamine besteht aber anscheinend darin das Chromatin vor mutagenen Einflüssen zu schützen, wie im nächsten Abschnitt diskutiert wird.

4.3.3 Protamine schützen das paternale Genom gegenüber Röntgenstrahlung

Die prinzipiellen Abläufe des Histon zu Protamin Wechsels während der Spermio-genese sind zwischen *Drosophila* und Säugern konserviert (Rathke et al., 2007). Der Grund, warum es Protamine gibt, ist bis jetzt aber noch nicht geklärt. Es gibt verschiedene Hypothesen, die sich gegenseitig nicht ausschließen müssen. Eine der Geläufigsten ist, dass die Protaminorganisation des Chromatins den hydrodynamischen Kopf der Spermien ermöglicht, weil das Chromatin weit kompakter organisiert ist als in der Histon-basierenden Konformation. Da die Spermienköpfe, auch die abnorm geformten, in der *prot1*-Mutante von *Drosophila* noch nadelförmig sind, scheint dies für die *prot1*-Mutante in *Drosophila* noch gewährleistet zu sein zu sein. Die generelle Meinung, dass die Kernformung und die Chromatinkondensation keine voneinander direkt abhängigen Prozesse sind (Übersichtsartikel: Balhorn, 2007) wird dadurch weiter bestätigt.

Eine weitere Hypothese ist, dass die Umorganisation des Chromatins notwendig ist, um alle Histone inklusive ihrer Modifikationen und eventuellen epigenetischen Informationen zu entfernen, um die embryonale Entwicklung mit einem

4 Diskussion

unmodifizierten paternalen Genom und maternal bereitgestellten Histonen zu starten (Rathke et al., 2007; Übersichtsartikel: Oliva, 2006). Über diese Hypothese kann keine Aussage getroffen werden, da die Histone auch in der *protA*-Mutante noch korrekt entfernt werden.

Außerdem gibt es die Hypothese, dass es die protaminbasierende Chromatinorganisation gibt, um das Genom in der relativ exponierten Situation im Spermium vor mutagenen Einflüssen zu schützen (Übersichtsartikel: Oliva, 2006; Carrell et al., 2007).

Die Fertilität der *protA*-Mutante gab die bisher einzigartige Möglichkeit, diese Hypothese genauer zu testen. Es wurde analysiert, ob Spermien der *protA*-Mutante sensitiver gegenüber Röntgenstrahlung sind als Wildtyp-Spermien. In der Tat zeigten die protamindefizienten Spermien eine um 21 % signifikant erhöhte Mutationsrate im Vergleich zur Mutationsrate von Wildtyp-Spermien (Kap. 3.2.6).

Das Ergebnis korreliert gut mit den Beobachtungen, dass Spermien haploinsuffizienter *protamine 2*-defizienter Mäuse eine erhöhte Sensitivität gegenüber Nukleasen zeigen und ein höherer Anteil fragmentierter DNA im Spermium auftritt (Cho et al., 2003). In Menschen mit reduziertem Protaminpegel kommt es auch zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Nukleasen und einem erhöhten Anteil geschädigter DNA in Spermien (Aoki et al., 2005; Übersichtsartikel: Carrell et al., 2007).

Zusammengenommen unterstützen diese Daten die alte Hypothese, dass der Wechsel zu einer protaminbasierenden Chromatinstruktur tatsächlich nötig ist, um das paternale Genom in Säugern und *Drosophila* vor Mutationen zu schützen.

Aber auch hier deutet die relativ milde Erhöhung der Mutationsrate darauf hin, dass es wahrscheinlich auch in der Protaminmutante noch weitere Proteine gibt, die das Chromatin organisieren und so der DNA Schutz gegenüber Röntgenstrahlung gewähren. Das könnte Mst77F oder Mst99C sein, und / oder aber noch nicht bekannte Proteine, die keine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu den Protaminen aufweisen, da die SNBPs (sperm nuclear basic proteins) in den verschiedenen Spezies ein höchst diverse Mischung an Proteinen zeigen (Übersichtsartikel: Balhorn, 2007).

4 Diskussion

4.3.4 Ausblick: mögliche nächste Schritte um mehr über den Chromatinwechsel während der Spermatogenese zu erfahren

Es gibt interessante Ansatzpunkte für die weitere Forschung am Wechsel in der Chromatinorganisation während der Spermatogenese von *Drosophila*, bezüglich der späten chromatinorganisierenden Proteine.

Zum einen die funktionale Untersuchung der Proteine die schon als weitere chromatinorganisierende Proteine identifiziert wurden, wie z. B. Mst77F oder Mst99C und die funktionale Untersuchung der Proteine die nur transient während des Wechsels exprimiert werden, wie z. B. Tpl^{94D}. Außerdem gibt es einige interessante Kandidatenproteine, für die eine Beteiligung am Chromatinwechsel aber noch verifiziert werden muss. Auf längere Sicht ist es natürlich wichtig für diese Gene Mutanten zu etablieren, diese könnten dann in Tripelmutante zusammen mit den in dieser Arbeit generierten Protaminmutanten analysiert werden.

Für eine weitere Untersuchung der Protaminmutante und natürlich auch potentieller Tripelmutanten wäre die Etablierung des ‚comet assays‘ (Einzelzell-DNA Elektrophorese (comet) Assay) sehr interessant, um die Integrität des Chromatins zu überprüfen wie es z.B. für Protaminmutanten in Mäusen schon getan wurde (Cho et al., 2003).

Um noch mehr über die missgeformten Spermatidenkerne der *prot1*-Mutante zu erfahren, und zu testen ob die Kerne wirklich fragiler d. h. weicher sind, könnten Spermatidenkerne der Protaminmutane und möglicher Triplelmutanten mit einer AFM (atomic force microscopy, Rasterkraftmikroskopie) Nadel getestet werden. Dabei kann mit der Nadel des AFMs die Festigkeit von Oberflächen bestimmt werden. Hierfür könnte man sich die bereits etablierten markierten Stämme der an der Chromatinorganisation beteiligten Proteine wie z. B. tpl^{94D}-eGFP Prot-eGFP; Mst77F-eGFP/mCherry, zunutze machen, um die Kerne richtig zeitlich einordnen zu können. Es wäre interessant zu sehen ob die scheinbare Fragilität der Spermatidenkerne in der *prot1*-Mutante sich messen ließe.

4 Diskussion

4.4 Das MS2cp/MS2sl-System und das λ N/BoxB-System zur *in vivo* mRNA-Lokalisation in der Spermatogenese von *Drosophila*

Wie bereits erwähnt, spielt in der Spermatogenese von *Drosophila* und von Säugern die Speicherung translational reprimierter mRNAs eine wichtige Rolle. Einerseits ist sie notwendig, da in *Drosophila* die Transkription mit Eintritt in die Meiose stoppt und bei Säugern im runden Spermatiden-Stadium, was es erfordert, dass mRNAs die während der Spermiogenese benötigt werden, über mehrere Tage hinweg gespeichert und translational reprimiert werden müssen. Andererseits gibt es zumindest für Säuger Hinweise dafür, dass die translationale Repression von mRNAs auch als Regulationsmechanismus genutzt wird, da hier auch einige mRNAs zu einer Zeit reprimiert und aus der Repression entlassen werden, zu der noch Transkription stattfindet. Welchen Sinn dies hat ist noch nicht verstanden (Schumacher et al., 1995; Gold et al., 1983).

Für Säugern konnte gezeigt werden, dass viele gespeicherte mRNAs, u. a. auch die mRNA der Protamine, in der Spermatogenese in translational reprimierten freien mRNPs gespeichert werden (Übersichtsartikel: Kleene, 2003). Viele dieser mRNP scheinen mit Partikeln zu assoziieren (Schmidt et al., 1999). Mittels *in situ* Hybridisierung konnte in Ratten die mRNA von *transition protein2* in ‚chromatoid bodys‘ nachgewiesen werden (Saunders et al., 1992). Die mRNAs von *transition protein1* und *protamine 1* konnten allerdings im ‚chromatoid body‘ nicht nachgewiesen werden und auch in keinen anderen membranösen Organellen wie z. B. dem ER oder Mitochondrien. Das weist darauf hin, dass die translationale Reprimierung der *transition protein1* und *protamine 1* mRNA nicht von der Lagerung in speziellen Kompartimenten abhängt (Morales et al., 1991).

Lecuyer (2007) zeigt bei *in situ* Hybridisierungen von mehr als 3000 Genen in der Embryonalentwicklung von *Drosophila*, dass mehr als 70 % aller mRNAs subzellulär lokalisiert sind. Es ist also zu einfach zu glauben, dass die Mehrheit aller mRNAs direkt nach der Transkription translatiert werden. mRNAs werden, nicht nur in der Spermatogenese, lokalisiert und gespeichert und die Zellen verfügen dadurch über eine weitere Ebene zur Regulation der Proteinexpression.

Bei Untersuchungen an ‚P-Bodies‘ (processing bodies) in Hefen konnte gezeigt werden, dass hier nicht nur mRNA-Degradation stattfindet, sondern dass in ‚P-Bodies‘ gespeicherte mRNAs dem Pool der aktiv translatierten mRNAs wieder

4 Diskussion

zugefügt werden können (Bregues et al., 2005). P-Body-ähnliche Strukturen könnten also ein Ort zur mRNA-Speicherung und -Repression sein.

Um zu untersuchen wie und wo die translational reprimierten mRNAs von *Mst77F*, *protamin A* und *tpl^{94D}* im Zytoplasma der Spermatozyten und Spermatiden gespeichert werden und wie sich die mRNA in den sehr langen Spermatiden verhält, wenn die Proteine dieser drei Gene benötigt werden, sollten zwei System zur *in vivo*-Lokalisation der mRNA etabliert werden: das λ N/BoxB-System und das MS2cp/MS2sl-System. Beide Systeme beruhen darauf, dass eine mRNA von Interesse mit RNA-Stemloops markiert wird, die von spezifischen Bindeproteinen gebunden werden kann. Diese Bindeproteine werden mit einem Reporter gen markiert und in den gleichen Zelle exprimiert wie die markierte RNA. Das Bindeprotein kann dann an die mit Stemloops fusionierte mRNA binden und diese dann indirekt sichtbar machen.

4.4.1 Die einzelnen Komponenten des λ N/BoxB-Systems und des MS2cp/MS2sl-Systems werden in der Fliege exprimiert

Es wurden für beide Systeme Konstrukte etabliert, mit denen die mRNA der eGFP-Fusionsproteine von *Mst77F*, *protamin A* und *tpl^{94D}* 3' des Leserahmens mit Stemloopkassetten fusioniert wurde. Mit Ausnahme des *tpl^{94D}-eGFP-16xBoxB*-Konstrukts für das λ N/BoxB-System, konnten für alle Konstrukte beider Systeme, transgene Fliegenlinien etabliert und untersucht werden. Alle eGFP-Fusionsproteine die von stemloopmarkierter mRNA exprimiert wurden, hatten exakt das gleiche Expressionsmuster wie die eGFP-Fusionproteine, der schon etablierten eGFP-Fusionskonstrukte ohne Stemloops. Weder die MS2-Stemloops, noch die BoxB-Elemente haben einen Einfluss auf die Expression der Proteine. Die mRNA scheint normal prozessiert und gespeichert zu werden, die translationale Repression wird nicht gestört. Die Konstrukte konnten also für die Erzeugung doppeltransgener Fliegen genutzt werden.

Für die Bindeproteine des λ N/BoxB-System und des MS2cp/MS2sl-System, also das λ N-Peptid und das MS2-coatprotein, wurden mCherry-Fusionskonstrukte kloniert jeweils, unter der Kontrolle des $\beta 2t$ -Promotors und des *CG3473*-Promotors. Dabei

4 Diskussion

wurden die Fusionsproteine mit einem N-terminalen SV40-NLS versehen um die ungebundenen Bindeproteine möglichst im Kern zu halten, was den mCherry-Hintergrund im Zytoplasma möglichst gering halten sollte. Für die Bindeprotein-Konstrukte beider Systeme unter der Kontrolle des *CG3473*-Promotors konnten zwar schon transgene Fliegenlinien etabliert werden, diese konnten aber noch nicht analysiert werden. Die Bindeprotein-Konstrukte beider Systeme unter Kontrolle des *β2t*-Promotors wurden transgene Fliegenlinien etabliert und analysiert.

MS2cp-mCherry und λ N-mCherry werden im korrekten zeitlichen Rahmen exprimiert, d. h. ab den frühen Spermatozyten und in allen folgenden späteren Stadien. Allerdings verhalten sich die Fusionsproteine in puncto ihrer zellulären Lokalisation unterschiedlich. MS2cp-mCherry ist zu keiner Zeit im Kern lokalisiert und liegt homogen verteilt im Zytoplasma vor. λ N-mCherry ist zwar prämeiotisch in den Spermatozyten zum Teil auch im Kern lokalisiert und dort angereichert im Nukleolus, allerdings verbleibt auch hier ein großer Teil des Proteins im Zytoplasma. In postmeiotischen Stadien ist λ N-mCherry nur noch homogen im Zytoplasma lokalisiert. In beiden Fällen wird also das SV40-NLS entweder nicht erkannt oder kann nicht bearbeitet werden.

Von Vazquez et al. (2001) wurde das SV40-NLS schon zur Kernlokalisierung in der Spermatogenese von *Drosophila* genutzt, allerdings wurden hier nur prämeiotische Stadien also Spermatozyten analysiert. Das SV40-NLS ist ein klassisches Kernlokalisierungssignal das α - und β -Importine benötigt um erkannt und lokalisiert zu werden. Im Testis von *Drosophila* werden drei verschiedene α -Importine exprimiert, Imp α 1, Imp α 2 und Imp α 3. Imp α 2 ist in Spermatozyten und während der Meiose exprimiert, Imp α 1 während der Meiose und in frühen Spermatischen und Imp α 3 in den postmeiotischen Stadien (Giarre et al., 2002). Es könnte also sein, dass die SV40-NLS nur von Imp α 2 erkannt wird und nicht von Imp α 1 sowie Imp α 3 und deshalb, im Fall von λ N-mCherry, nur in Spermatozyten funktioniert. Da es aber bei λ N-mCherry nur zum Teil zu einer Kernlokalisierung führt und bei MS2cp-mCherry gar nicht funktioniert, ist es auch wahrscheinlich, dass das SV40-NLS nicht zugänglich ist, vielleicht aufgrund einer ungünstigen Lage im Protein. Es wurden deshalb neue Konstrukte kloniert, die sich von den ursprünglichen dadurch unterscheiden, dass sie ein zusätzliches SV40-NLS C-terminal tragen. Es werden gerade transgene Linien für die Konstrukte etabliert, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr analysiert werden können.

4 Diskussion

Die Lokalisation der Bindeproteine im Zytoplasma ist für die Analyse der späteren doppeltransgenen Fliegen ungünstig, da dadurch ein starker mCherry-Hintergrund im Zytoplasma verursacht wird, der es schwer machen wird, Akkumulationen oder Konzentrationsveränderungen des mCherry-Signals zu erkennen, die aufgrund der Bindung an stemloop-markierte mRNAs zustande kommt.

4.4.2 Eine mögliche Lokalisation von mRNA an den Spermatidenkernen zum Zeitpunkt der Translation der markierten mRNA

Für beide Systeme wurden doppeltransgene Fliegen etabliert. Für das MS2cp/MS2sl-System das Bindeprotein MS2cp-mCherry unter Kontrolle des $\beta 2t$ -Promotors in Kombination mit den MS2sl-markierten eGFP-Fusions-Konstrukten für *Mst77F*, *protamin A* und *tp^{94D}* und für das λ N/BoxB-System das λ N-mCherry unter Kontrolle des $\beta 2t$ -Promotors in Kombination mit BoxB-markierten eGFP-Fusions-Konstrukten für *Mst77F* und *protamin A*.

Für doppeltransgene Fliegen des λ N/BoxB-Systems kann in späten Spermatiden ein mCherry-Signal beobachtet werden, dass in den λ N-mCherry einzeltransgenen Fliegen nicht zu beobachten ist. Dabei handelt es sich um ein mCherry-Signal an den elongierten Spermatidenkernen ab dem frühen Kanu-Stadium, wenn die entsprechenden eGFP-Fusionsproteine d. h. *Mst77F-eGFP* und *ProtA-eGFP*, der stemloopmarkierten-mRNA translatiert werden. Die Schwierigkeit bei diesem Signal liegt darin zu beurteilen, ob es ein echtes Signal ist, das durch Akkumulation der mRNA hervorgerufen wird oder ob es lediglich ein „Durchbluten“ des eGFP-Signals ist.

Ein Argumente, dass es sich bei dem detektierten Signal um ein mikroskopisches Artefakt handelt ist, dass man ein ähnliches Signal im Rotkanal in Fliegenlinien mit eGFP-Fusionsproteinen alleine sieht, bei dem auch deutliche Unterschiede in der Intensität des Rotsignals im Vergleich zu eGFP-Signal zu beobachten sind.

Es gibt aber auch Argumente, die dafür sprechen, dass das Signal, das man sieht eine Akkumulation der mRNA widerspiegelt.

Man kann ein Signal im Rotkanal im frühen Kanu-Stadium detektieren, wenn das eGFP-Signal noch kaum zu detektieren ist. Das eGFP-Signal ist hier so schwach,

4 Diskussion

dass es kaum vorstellbar ist, dass es das Signal im Rotkanal hervorruft. Frühe Stadien mit wenig eGFP-Signal zeigen ein starkes Signal im Rotkanal und späte Stadien mit starkem eGFP-Signal zeigen ein schwaches Signal im Rotkanal. Das passt zu der Annahme, dass in frühen Stadien mehr mRNA benötigt wird als in späten, wo die benötigte Menge an Protein schon gebildet wurde. Außerdem ist es sinnvoll anzunehmen, dass die mRNA in den extrem langen Spermatischen, mit einer Länge von bis zu 2 mm, die mRNA vor der Translation dort lokalisiert wird, wo das Protein benötigt wird, und das wäre in diesem Fall in Kern nähe.

Endgültig entscheiden, ob es sich um ein echtes Signal oder ein Artefakt handelt, kann man zu diesem Zeitpunkt noch nicht. Eine endgültige Aussage darüber ob die Systeme zu *in vivo* mRNA-Verfolgung wirklich funktionieren, kann auch erst getroffen werden, wenn die Probleme bei der Analyse der doppeltransgenen Fliegen behoben sind, auf die im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird.

4.4.3 Probleme und mögliche Verbesserungen bei der Auswertung der doppeltransgenen Fliegen des λ N/BoxB-Systems und des MS2cp/MS2sl-Systems

Bei der Auswertung der doppeltransgenen Fliegen kam es bei beiden Systemen zu Problemen die die Beurteilung der Ergebnisse bis jetzt sehr erschweren.

Erstens der in beiden Systemen den bereits erwähnten starken zytoplasmatischen Hintergrund durch das ungebundene Bindeprotein-mCherry, das trotz NLS nicht im Kern lokalisiert (Kap.4.4.1).

In beiden Systemen konnte in den doppeltransgenen Fliegen im Zytoplasma von Spermatozyten und Spermatischen kein mCherry-Signal beobachtet werden, das nicht in den einzeltransgenen Fliegen für das Bindeprotein-mCherry zu sehen gewesen wäre. Das kann einerseits bedeuten, dass die Systeme zur mRNA *in vivo*-Verfolgung in der Spermatogenese von *Drosophila* nicht funktionieren. Andererseits wären durch den Hintergrund nur starke Akkumulationen von Bindeprotein-mCherry sichtbar. Solche Akkumulationen sind jedoch nicht zu beobachten. Das könnte bedeuten, vorausgesetzt das System funktioniert generell, dass die mRNA wahrscheinlich nicht in größeren Vesikeln oder Partikeln gespeichert wird. Eine mögliche homogene

4 Diskussion

Verteilung der mRNA im Zytoplasma oder eine Speicherung in kleineren Partikeln kann aber nicht ausgeschlossen werden, da diese bei dem starken mCherry-Hintergrund nicht zu sehen wären. Hier werden hoffentlich die neuen Bindeprotein-mCherry-Konstrukte mit der zusätzlichen C-terminalen SV40-NLS hilfreich sein.

Bisher wurden die doppeltransgenen Fliegen nur in frischen, ganzen Testispräparaten analysiert. Es würde vielleicht das Problem des starken Hintergrunds des ungebundenen Bindeprotein-mCherry im Zytoplasma verringern, wenn man Einzelzysten der doppeltransgenen Fliegen untersucht. Wie in der Einleitung erwähnt, entwickeln sich alle Tochterzellen eines Spermatogoniums in einem syncytialen Zystverband, genannt Zyste, hier sind die sich entwickelnden Keinzellen von zwei somatischen Zystzellen umschlossen. Diese Zysten lassen sich frei präparieren, dadurch könnte man die Einzelzysten klarer sehen, und die Fluoreszenz benachbarter Zysten würde weniger stören, als bei Analysen des kompletten Testis.

Wenn sich das Problem des starken mCherry-Hintergrunds mit den neuen Bindeprotein-mCherry-Konstrukten nicht lösen lässt, muss darüber nachgedacht werden, eine andere NLS zu nutzen, die in einem im *Drosophila*-Testis exprimierten Protein enthalten ist. Das Problem ist, dass noch keine NLS für testisexprimierte Proteine in *Drosophila* wirklich charakterisiert ist. Es gibt nur Computervorhersagen, aber noch keine *in vivo* getesteten Sequenzen.

Das zweite Problem, das die Auswertung der doppeltransgenen Fliegen erheblich erschwert, ist das Signal, das im Rotkanal zu beobachten ist, wenn Frischpräparate eGFP-transgener Fliegen analysiert werden. Dieses Signal entsteht wahrscheinlich durch ein „Durchbluten“ des eGFP-Signals in den Rotfilter und ist schwer zu erklären, da eGFP eine Emission von 507 nm (Shaner et al., 2005) hat und der genutzte Rotfilter ein Emissionsspektrum von 575-640 nm hat. Selbst wenn man eine Streuung der Emission von eGFP und der Bandbreite des Filters von etwa 20 nm annimmt, sollte der Rotfilter das eGFP-Signal nicht in der beobachteten Stärke durchlassen. Außerdem ist zu beobachten, dass das mutmaßliche eGFP-Signal im Rotfilter in seiner Intensität nicht proportional zum beobachteten eGFP-Signal ist. Eine Verunreinigung des Fliegenstocks mit einem mCherry-Transgen kann ausgeschlossen werden, da das Phänomen in sieben unterschiedlichen eGFP-transgenen Fliegenlinien unterschiedlichster Konstrukte und unterschiedlichster Verweildauer im Labor zu beobachten ist. Eine Autofluoreszenz kann auch

4 Diskussion

ausgeschlossen werde, da in Wildtypfliegen keine Autofluoreszenz in den betroffenen Zellen beobachtet werden kann.

Das Problem des starken „Durchblutens“ des eGFP-Signals in den Rotfilter könnte vielleicht dadurch gemindert werden, speziell für eGFP und mCherry passende Filtersets zu nutzen (eGFP: Anregungsspektrum: 450-480 nm, Emissionsspektrum: 500-540 nm; mCherry: Anregungsspektrum: 540-580 nm, Emissionsspektrum 600-680 nm). Bisher haben wir für unsere Anwendungen mit eGFP und mCherry bzw. RFP Filterset passend für FITC und TRITC genutzt (FITC: Anregungsspektrum: 450-490 nm, Emissionsspektrum: 515-565 nm; TRITC: Anregungsspektrum: 546-560 nm, Emissionsspektrum 575-640 nm). Diese besitzen aber nicht die optimale Bandbreite für das eGFP-, bzw. mCherry-Signal. Ob dadurch das Problem des „Durchblutens“ des eGFP-Signals in den Rotkanal verringert werden kann, muss allerdings getestet werden.

4.4.4 Ausblick: mögliche Fragestellungen und Experimente mit dem λ N/BoxB-System und dem MS2cp/MS2sl-System in Zukunft

Wenn die anstehenden Probleme mit der Auswertung der doppeltransgenen Fliegen der beiden mRNA *in vivo*-Verfolgungs-Systemen geklärt sind, könnten eine Reihe interessanter Experimente gemacht werden.

Zum einen wäre es bei einer homogenen zytoplasmatischen Verteilung der mRNA interessant, Bleaching-Experimente kombiniert mit ‚in vivo imaging‘ mit den doppeltransgenen Fliegen im Vergleich zu den einzeltransgenen Bindeprotein-mCherry Fliegen zu machen. Mit Hilfe solcher Experimente und der beobachteten Regenerationsrate der Fluoreszenz könnte die Partikelgröße und die Diffusionsrate, d. h. die Bewegungsfreiheit der translational reprimierten mRNAs im Zytoplasma, ermittelt werden. Dabei muss aber beachtet werden, dass die Bindung des jeweiligen Bindeproteins an die Stemloop-markierte mRNA auch einer gewissen Dissoziationskonstante unterliegt.

Zur wirklichen *in vivo*-Verfolgung der mRNA und der Beobachtung, ob sich die gespeicherte mRNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Spermatozyten- und Spermatidenentwicklung unterschiedlich verhält, wäre es interessant die

4 Diskussion

doppeltransgenen Fliegen des λ N/BoxB-Systems und des MS2cp/MS2sl-Systems in Einzelzstkulturen zu beobachten. Damit ist es möglich einzelne, individuelle Zysten über eine bestimmte Entwicklungsphase hin zu beobachten (Awe und Renkawitz-Pohl, 2010, in Druck).

Wenn beide Systeme einwandfrei funktionieren würden, könnte man sie kombinieren, um die Speicherung translational reprimierter mRNAs zu vergleichen, die zu unterschiedlichen Zeiten aus der translationalen Repression entlassen werden. So könnte man z.B. die mRNA von *protamin A* mit dem MS2sl/MS1cp-System in RNA-rot/Protein-grün verfolgen und gleichzeitig die mRNA von *tp^{94D}* mit dem λ N/BoxB-System in RNA-grün/Protein-rot. Das würde vielleicht interessante Einsichten in die unterschiedliche Aufhebung der translationalen Repression verschiedener mRNAs bringen. Über den Mechanismus dieser differenzierten Entlassung aus der translationalen Repression ist bis heute noch nichts bekannt.

5 Material und Methoden

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Oligonukleotide

((# XY) → Laborinterne Nummerierung)

Für two-sided PCR

- | | |
|-----------------------|-----------------------------|
| 1.) WH+gen-rev (# 6) | CCCGCATTGATCGCCAAACTGACAACC |
| 2.) WH+gen-forw (# 7) | TTCCACCCGGAAACCACACCGCACCTA |

Für RT-PCR und Sonden

- | | |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| 3.) Fw-ATG-CG4480 (# 20) | ATGTTTCGTTTGTGGCCGG |
| 4.) Rev-CG4480-NcoI (# S61) | GCGGCCATGGAGTTACGACCGCCCAGG
GCATAG |
| 5.) FW-ATG-CG15278 (# 19) | ATGCTGCTTATTTTGCACAAC |
| 6.) Rev-CG15278-XbaI (# 3) | GGCGTCTAGAAACAAGAATCCACTGACT
GAGC |
| 7.) F-35Bb,Ba-ATG (# S24) | GGCGGATCCATGAGTTCAAATAATGTAAAT |
| 8.) Ba-rev-NcoI (# S48) | GCCGCCATGGATTGCTGGCAAATCCGTCGG |
| 9.) Bebe-Rev-NcoI (# S51) | GCCGCCATGGTGCAAATCCGTCGGCGCT
TGTGG |
| 10.) Rev-CG15279 (# 9) | CGGGGTCAACTCATTCTCGAT |
| 11.) Fw-CG15279 (#10) | CGGAGTGAAGAGTTCGGGAAAG |
| 12.) CG33309-Fw1-Ex2 (# 30) | TCTGACAGGGTATGAATCGG |
| 13.) CG33309-Rv1-Ex2 (# 32) | CTGTTCGATGTATTGCGATTC |

Zur Klonierung der mRNA-Verfolgung mit dem MS2cp/MS2sl-System und dem λ N/BoxB-System

- | | |
|----------------------------|--------------------------------|
| 14.) Fw-boxb-Spe (# 80) | GACTAGTCTAGATGGCCGCAGAATTCC |
| 15.) Rev-boxb-BamHI (# 76) | CGCGAATCCCGCCTTAATTAAGCATCGATG |

5 Material und Methoden

- 16.) Fw-Spe-NLS-LN-Bam (# Si1) ACTAGTTTAATGCCAAAAAAGAAAAGAAA
AGTTATGGCCAGATCTGACGCCCAGACGCGT
CGTCGCGAGCGTCTGTGCCGAGAAGCAGGCG
CAGTGGAAAGGCCGCCAACGGATCCGCG
- 17.) Rev-Spe-NLS-LN-Bam (# Si2) CGCGGATCCGTTGGCGGCCTTCCACTGC
GCCTGCTTCTCGGCACGACGCTCGCGACGA
CGCGTCTGGGCGTCAGATCTGGCCATAACTT
TTCTTTTCTTTTTTGGCATTAAACTAGT
- 18.) MF821-Spel (#69) ACTAGTACATGAGGATCACCCATGTTTCAA
CCAT
- 19.) MF822-BamHI (# 70) GGATCCACATGGGTGATCCTCATGTAAG
CTCTTCC
- 20.) Fw-Spel-NLS-MS2cp (# 123) ACTAGTATGCCAAAAAAGAAAAGAAAAGT
TATGGCTTCCAACTTCACCCAGTTTGTG
- 21.) Rev-BamHI-MS2cp (# 122) GCGGATCCGTAGATGCCGGAGTTTGCTGC
- 22.) Fw-EcoRI-ProtBpro (# 78) CCGGAATTCAAAGGGTCGCAATTTATGGC
- 23.) RevProtBPro-Spe2 (# 85) ACTAGTCGTAGAAAATTTTTACAACTCTG
- 24.) Fw-EcoRI-b2t-Pro (# 79) CCGGAATTCTCATTGTAGGAGCCAGAGCC
- 25.) Rev-b2t-Pro-Spel (# 77) ACTAGTTTTGATAGTAAAGTTAGGGCCC
- 26.) FwCG3473proEcoRI (# S96) CCGGAATTCAACATTGCCAGTTCACCCGGG
- 27.) Rev-CG3473pro-Spel (# 124) CACTAGTCCTCTGTCTACCACTTCTTGTG
AATTGC

Für das *Promotor-LacZ*-Konstrukt *pc77F3-Δ5'UTR-29bp*

- 28.) 77f-rev-5'-BamHI (# 8) GGCGGGATCCTTCAGCGTGGAGACCTGGAA

5.1.2 Geräte

Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2 imaging, Zeiss
Fluoreszenzlampe	FluoArc, Zeiss
Digitale Fluoreszenzmikroskopkamera	AxioCam MR.Zeiss
Fotomikroskop	Axiophot, Zeiss

5 Material und Methoden

Digitale Fotomikroskopkamera	AxioCamCc1, Zeiss
Stereomikroskop	Stemi SV 6
Elektrophoreseapparaturen	Werkstatt Universität Marburg
Kühlzentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R; Biofuge fresco, Heraeus
Magnetrührer Mono	Variomag; Monotherm, Variomag
pH-Meter	GPRT 1400 A, Greising electronic
PCR-Maschine	Personal Cyclor, Biometra
Photometer	Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech
Pipettenset 1µl-1000µl	Transferpette S, Brand
Reaktionsgefäßschüttler	Reax 2000, Heidolph
Schüttler Rocky 3D	Horizontalschüttler
Spannungsquelle	Power Pac 300, Biorad
Tischzentrifugen	Biofuge pico, Heraeus
Thermoblock	HBT 130, HCL
UV-Crosslinker	UV Stratalinker™ 2400, Stratagene
Vakuum-Heizzentrifuge	Univapo 100 H
Vortex-Gerät	MAGV, Rabenau, Londorf
Wasserbad	Haake 5P; Haake C1
Kapillarziehgerät	Vertical Pipette Puller 720, Kopf
Mikroinjektionsapparatur	5242 Hermle ZK401, Eppendorf
Mikromanipulator	Leitz
Hybridisierungsöfen	Unitherm Hybridisationöfen, UniEquip

5.1.3 Chemikalien

Acrylamid	Fluka
Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer
Agarose	Invitrogen
Albumin Fraktion V	Roth
Ampicillin	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
Bacto-Agar	Difco

5 Material und Methoden

Bacto-Trypton	Difco
β -Mercaptoethanol	Roth
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (X-Phosphat)	Boehringer
5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-b-D- thiogalactosid (X-Gal)	Roth
Borsäure	Fluka
Bromphenolblau	Merck
Desoxycholsäure Natriumsalz	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Diethylether	Roth
Digoxygenin	Boehringer
1,4-Dithio-L-threitol (DTT)	Fluka
DNAzol	Invitrogen
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Roth
Ficoll	Sigma
Formaldehyd (37% Lösung)	Sigma
Formamid	Merck
Glukose	Merck
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Glykogen	Fluka
Harnstoff	Roth
Heparin	Roth
Heptan	Roth
Heringssperma DNA	Fluka
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumhydroxid	Merck
Levamisol	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Roth
Natriumacetat	Roth

5 Material und Methoden

Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid	Roth
4-Nitrotetrazoliumchlorid (NBT)	Roche
Octylphenolpolyethylenglycolether (Triton X-100)	Roth
Phenol	Merck
Poly-L-Lysin solution	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Roth
Polyvinylpyrrolidon	Roth
Propionsäure	Sigma-Aldrich
Ribonukleotide	Boehringer
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
Salzsäure	Roth
Tris	Roth
TRizol	Invitrogen

Weitere, hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Invitrogen/Gibco, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich bezogen.

5.1.4 Enzyme

Klenow Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech
ProteinaseK	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	Amersham Pharmacia Biotech, Roche, Mannheim New England Biolabs
RNase A	Boehringer
Taq DNA Polymerase	Peqlab, Qiagen
T4-DNA-Ligase	Fermentas
RnaseOut	Invitrogen
SuperScript RT-Polymerase	Invitrogen

5 Material und Methoden

5.1.5 Fertige Reagenziensätze

DIG-RNA-Labeling-Kit	Boehringer
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Pharmacia
Jetstar Plasmid Kit 2.0	Genomed
Mass Ruler DNA-Ladder, Mix MBI	Fermentas
Mass Ruler DNA-Ladder, Low Range MBI	Fermentas
Oligotex® mRNA Mini Kit	Qiagen
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning-Kit	Invitrogen
In Situ Cell Death Detection Kit, TMR Red	Roche
Prime-it® II Random Primer Labeling Kit	Stratagene
Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit	Upstate
PCR Purification Kit	Quiagen

5.1.6 Sonstiges Material

Präparier-Pinzetten (Inox 5)	Dumont & Fils
Objektträger	Roth
Deckgläschen	Roth
Hybond N-Membran	Amersham, Braunschweig
Whatman Papier	Schleicher und Schütt

5.1.7 Lösungen, Medien und Puffer

Gelladepuffer (10x):	0,1 % Bromphenolblau
	0,9 % Borsäure
	40 % Glycerin in TAE, TBE oder MOPS
	0,1 % Xylencyanol

5 Material und Methoden

PBS:	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄
PBT:	0,1 % Tween 20 in PBS
PBSTD:	0,3 % Triton X-100 und 0,3 % Natriumdeoxycholat in PBS
LB-Agar:	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 85,5 mM NaCl 1,5 % Bacto-Agar
LB-Medium:	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 85,5 mM NaCl
TAE (10x):	2000 mM Tris/Acetat (pH 7,7) 100 mM EDTA (pH 7,7)
TBE (10x):	900 mM Tris 900 mM Borsäure 20 mM EDTA
TE-Puffer	1 mM Tris HCl 10 mM EDTA
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat*2H ₂ O In ddH ₂ O pH 7,0 einstellen mit HCl

5 Material und Methoden

5.1.8 *Drosophila melanogaster* Fliegenstämme

<i>White</i>	w ¹ , +; Transformationsstamm, (Klemenz, 1987)
<i>CSTM</i>	w ⁻ ; Sp/CyO; MKRS/TM2; balancierter Multimarkerstamm zur chromosomalen Lokalisation von Insertionen.
<i>djl Pr650-lacZ</i>	Transgener, P-Element tragender Fliegenstamm, der auf dem Transformationsvektor <i>pChabΔsal</i> basiert. Dabei wurden 650 bp, stromaufwärts des AUG-translationsstarts gelegene, genomische <i>djl</i> -Sequenzen vor das <i>lacZ</i> -Reporter gen kloniert (Hempel et al., 2006). Die Zahlen geben die dem AUG vorgelagerten Basenpaare an.
<i>dj like D52-lacZ</i>	Transgener, P-Element tragender Fliegenstamm, der auf dem Transformationsvektor <i>pChabΔsal</i> basiert. Dabei wurden die ersten 52, stromaufwärts des AUG-Translationsstarts gelegenen Basenpaare der <i>djl</i> -Sequenz deletiert und 598, stromaufwärts der Deletion gelegene Basenpaare vor das <i>lacZ</i> -Reporter gen kloniert (Hempel et al., 2006).
<i>protB-eGFP</i>	Transgener, P-Element tragender Fliegenstamm, der auf dem Transformationsvektor <i>pChabΔsal</i> basiert. Das transgene Konstrukt trägt ein Fusionsgen aus dem <i>protB</i> -ORF unter Kontrolle des eigenen Promotors und eigener 5' UTR und einem c-terminalen <i>eGFP</i> (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005).
<i>protA-eGFP</i>	Transgener, P-Element tragender Fliegenstamm, der auf dem Transformationsvektor <i>pChabΔsal</i> basiert. Das transgene Konstrukt trägt ein Fusionsgen aus dem <i>protA</i> -ORF unter Kontrolle des eigenen Promotors und eigener

5 Material und Methoden

5` UTR und einem c-terminalen *eGFP*. (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005)

- Mst77F-eGFP* Transgener, P-Element tragender Fliegenstamm, der auf dem Transformationsvektor *pChabΔsal* basiert. Das transgene Konstrukt trägt ein Fusionsgen aus dem *Mst77F*-ORF unter Kontrolle des eigenen Promotors und eigener 5` UTR und einem c-terminalen *eGFP* (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005).
- protΔ38.1* Fliegenstamm mit einer mit dem Flp-FRT-System erzeugten Deletion. Zur Erzeugung der Deletion genutzte WH-Elemente: *PBac{WH}f04398* und *PBac{WH}f04303*. Zusätzlich trägt der Stamm eine zweite unkartierte Läsion der zu männlicher Semisterilität führt.
- can¹²* *can¹²/TM3*; männlich sterile Mutante mit einer P-Element-Insertion in dem Gen *cannonball* (Hiller et al., 2001) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. T. Fuller.
- BL-6 *P{hsFLP}¹, w¹¹¹⁸; Adv¹/CyO*; Fliegenlinie mit Hitzeschock induzierbarer FLP-Rekombinase auf dem X-Chromosom.
- f04398* *pBac{WH}f04398*; FRT Insertions Stamm der zur Erzeugung der Protamin Deletion genutzt wurde Intergrationsort ist im letzten Intron des Gens *CG33309*. Stamm erhalten von der Exelixis Collection an der Harvard Medical School (Thibault et al., 2004).
- f04303* *pBac{WH}f04303*; FRT Insertions Stamm der zur Erzeugung der Protamin Deletion genutzt wurde Intergrationsort ist unterhalb von *Mst35Bb*. Stamm

5 Material und Methoden

erhalten von der Exelixis Collection an der Harvard Medical School (Thibault et al., 2004).

5.1.9 Antikörper

Anti-sa (Chen et al., 2005)
Anti Digoxigenin-AP Fab Fragment Roche

5.1.10 Bakterienstamm

Folgender Stamm des Bakteriums *Escherichia coli* K12 wurde verwendet:

DH5 α *supE44*, Δ *lacU169*, F⁻, Φ 80 Δ *lacZ*, Δ M15, Lamda⁻,
hsdR17, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*.

5.1.11 Computer-Software

Textverarbeitungsprogramm: Microsoft Word XP
Bildbearbeitungsprogramm: Adobe Photoshop 7.0
ImageJ
DNA-Analyseprogramme: ApE

5 Material und Methoden

5.2 Methoden

5.2.1 Allgemeine Fliegenarbeiten

5.2.1.1 Haltung von *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster Nährmedium Mais-Grieß-Agar: 60 % Maisgrieß
7,15 % Fruktose
1,2 % Trockenhefe
0,14 % Nipagin
0,6 % Propionsäure
0,7 % Agar

Die Fliegenzucht erfolgt in Kulturröhrchen in drei verschiedenen Größen (2,5 cm; 3cm; 4 cm), die mit milbensicheren Stopfen verschlossen werden. Die Röhrchen sind zu 1/4 mit Nährmedium befüllt. Das Nährmedium wird zusätzlich mit Trockenhefe bestreut, um die Eiablage zu stimulieren. Die Fliegen werden bei 25°C oder bei 18°C gehalten. Betäubt werden die Fliegen mit CO₂ oder Diethylether.

5.2.1.2 Kreuzungen von *Drosophila melanogaster*

Zur Kreuzung von *Drosophila melanogaster* werden jungfräuliche Weibchen und Männchen zusammen in ein kleines Zuchtröhrchen gegeben. Um jungfräuliche Weibchen zu erhalten werden die Flaschen aus denen die Weibchen abgesammelt werden sollen leer geklopft, alle Weibchen die dann innerhalb der nächsten vier bis sechs Stunden schlüpfen sind jungfräulich, da die Männchen erst sechs Stunden nach dem Schlüpfen fertil werden.

5 Material und Methoden

5.2.1.3 P-Element vermittelte Keimbahntransformation in *Drosophila melanogaster*

(Rubin und Spradling, 1983)

Zur Herstellung transgener Fliegen nutzt man Transformationsvektoren diese sind Derivate natürlich vorkommender P-Elemente. Sie integrieren keimbahnspezifisch mittels konservativer Transposition ins Genom. Die Transformationsvektoren können nur in Verbindung mit einem Helferplasmid transponieren, da sie kein funktionsfähiges Transposasegen tragen.

Das Transposasegen wird von dem Helferplasmid zu Verfügung gestellt. Das Helferplasmid selber kann nicht integrieren, weil seine Erkennungssequenzen für die Transposase zerstört wurden. Der Transformationsvektor und das Helferplasmid werden dann zusammen vor der Keimzellbildung in den posterioren Pol der Embryonen injiziert. Dort befindet sich das Polplasma, aus dem sich die Polzellen bilden. Entstehen Polzellen, in die der Vektor integriert ist, können in der nächsten Generation transgene Fliegen entstehen.

5.2.1.4 Sammeln und Entchorionisierung von Fliegenembryonen

Apfelsaftagar	25 % Apfelsaft
	1,25 % Saccharose
	2,5 % Trockenhefe
	0,2 % Nipagin
	2,7 % Agar

Zwei bis drei Tage alte Fliegen werden zur Eiablage auf Apfelsaftagarschalen gesetzt (5 cm), die zur Stimulation der Eiablage mit etwas Hefe bestrichen sind. Zur Injektion werden die Embryonen alle 30 Minuten abgesammelt. Die ersten zwei bis drei Ablagen werden verworfen. Die Embryonen werden dann in ein feinmaschiges Stahlnetz Körbchen überführt und mehrmals mit 0,7 % NaCl (+ 0,02 % Triton X-100) gewaschen, um Heferückstände zu entfernen. Die Embryonen werden dann durch Zugabe von einer 1:1 Mischung von Klorix (Chlorreiniger, Natriumhypochlorid) und

5 Material und Methoden

Wasser für zwei bis drei Minuten entchlorionisiert. Anschließend werden die Embryonen nochmal gründlich mit 0,7 % NaCl (+ 0,02 % Triton X-100) gewaschen. Die entchlorionisierten Embryonen werden dann auf einen Apfelsaftagarblock zur Injektion aufgereiht und auf ein Deckgläschen geklebt. Um den inneren Druck der Embryonen zu vermindern, werden sie etwa acht Minuten getrocknet und anschließend mit Mineralöl abgedeckt.

5.2.1.5 Mikroinjektion der Embryonen

10x Injektionspuffer	1 mM NaHPO ₄ (pH 7,4) 10 mM KCl
Injektionsmischung	10 ng Transformationsvektor 2,5 ng p π 25.7wc Helferplasmid 2,5 μ l 10x Injektionspuffer mit ddH ₂ O auf 25 μ l auffüllen

Der Injektionsansatz wird direkt vor der Injektion für 30 Minuten bei 13.000 upm und 4°C zentrifugiert, um Partikel zu sedimentieren, die die Injektionsnadel verstopfen könnten. 1 μ l der Injektionsmischung wird in eine Glaskapillare gefüllt, die mit dem Drucksystem des Injektionsapparates verbunden ist und mit Hilfe eines Mikromanipulators bewegt werden kann. Die Glaskapillare wird unter dem Mikroskop aufgebrochen. Mit der entstandenen Nadel wird die DNA in den posterioren Pol der Embryonen injiziert. Die injizierten Embryonen werden nochmals mit Mineralöl überschichtet bevor das Deckgläschen mit den Embryonen in eine Apfelsaftagarpetrischale gelegt wird. Aus den Embryonen, die die Injektion überstanden haben entwickeln sich Larven, die dann in Röhrchen mit Nährmedium transferiert werden.

5 Material und Methoden

5.2.1.6 Selektion der transgenen Fliegen

Die Selektion der transgenen Fliegen ist möglich durch den dominanten Selektionsmarker *white w¹* (Klemenz et al., 1987). Da die Transposition des Vektors nur in der Keimbahn stattfinden kann, sind die ersten transgenen Fliegen erst nach einer Kreuzung mit dem Injektionsstamm *w¹* in der F1-Generation zu finden. Die transgenen Fliegen sind durch die rote Augenfarbe von denen des Injektionsstamms, die weiße Augen haben, zu unterscheiden. Um Mehrfach-Insertionen des Vektors zu verringern werden 2-3 Generationen lang transgene Weibchen gegen *dw¹* Männchen gekreuzt. Die heterozygoten transgenen Fliegen werden dann untereinander verkreuzt, um homozygote Fliegen zu erhalten, diese sind an der dunkleren Augenfarbe zu erkennen

5.2.2 Erzeugung einer präzisen Deletion des Protamin Lokuses

Zur Erzeugung der Deletion wurden die beiden *pBac{WH}* Insertionen (*pBac{WH}f04398* und *pBac{WH}f04303*) in Kombination mit einer Hitzeschock induzierbaren FLP-Rekombinase genutzt (Parks et al., 2004; Thibault et al., 2004). Die Kreuzungen und die Hitzeschockprozedur wurden wie bei Parks (2004) angegeben durchgeführt. Die erzeugten Deletionen konnte nicht über den Verlust der Augenfarben selektioniert werden. 144 putative Deletionlinien wurden deshalb mit der "twosided PCR" analysiert wie in Parks (2004) beschreiben. Dabei wurden die Primer (1) und (2) (Kap. 5.1.1), aus der genischen Region abgeleitet, in Kombination der in Parks (2004) angegebenen Primern genutzt. 14 Linien wurden positiv getestet.

5 Material und Methoden

5.2.3 Muller5-Test zur Bestimmung der Mutationsrate auf dem X-Chromosom

Mit Hilfe des Muller5 Tests (Muller und Altenburg, 1919) kann die durch Röntgenstrahlung induzierte Mutationsrate für letale Mutationen auf dem X-Chromosom bestimmt werden. Zu Beginn des Muller5 Tests werden männliche Fliegen der Protaminmutante *protΔ*, sowie der Wildtyp Kontrolllinie *w*¹ mit Röntgenstrahlung (45 Gy) bestrahlt. Die bestrahlten Männchen wurden anschließend mit jungfräulichen Muller5 Weibchen in Einzelpaarkreuzungen verkreuzt (Parentalgeneration, P). Nach fünf bis acht Stunden bei 25°C wurden die männlichen Fliegen aus den Kulturröhrchen entfernt. Durch die relativ kurze Begattungszeit wird sicher gestellt, dass die zur Befruchtung eingesetzten Spermien in der protaminbasierten Struktur bestrahlt wurden. Schon etwa 12 h nach der Bestrahlung gelangen Spermien zur Befruchtung die noch im Histonstadium bestrahlt wurden und somit für diesen Test nicht relevant sind. Die Weibchen der 1. Filialgeneration (F₁) werden mit Muller5 Männchen verkreuzt. Die männlichen Nachkommen dieser Kreuzung (2. Filialgeneration, F₂) wurden dann auf ihren Augenphänotyp hin ausgewertet. Einmal können die Männchen das Muller5 X-Chromosom tragen oder das bestrahlte X-Chromosom. Das X-Chromosom des Muller-5 Stamms trägt die Marker *bar*¹ und *apricot*, diese verursachen schmale, orangefarbene Augen, die leicht von den Augen der Wildtype Kontrolle *w*¹ und der *Protamin* Mutante *protΔ* zu unterscheiden sind, die in beiden Fällen rund sind. Sollten in einem Kulturröhrchen keine männlichen Fliegen mit runden Augen zu finden sein, so ist von einer durch die Röntgenstrahlung induzierten Letalmutation auf dem X-Chromosom des Spermiums auszugehen. Die erhaltenen Daten wurden mit einem χ^2 -Test auf Signifikanz geprüft.

5 Material und Methoden

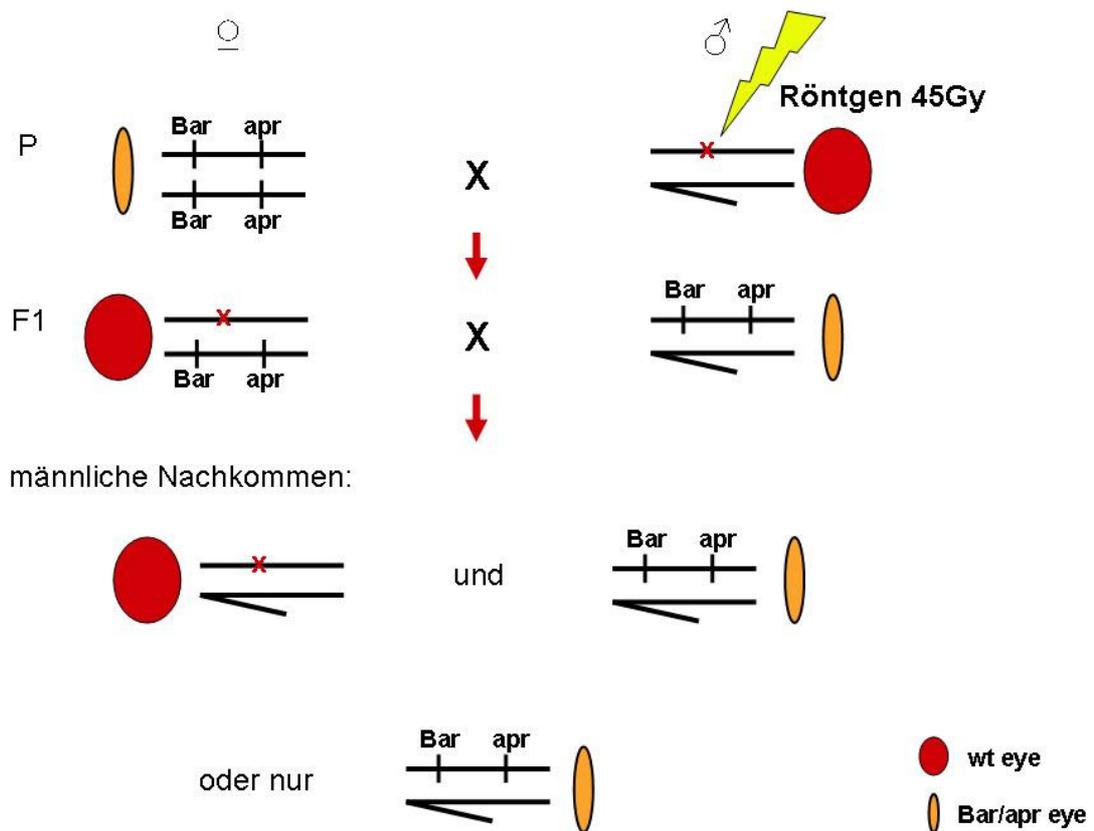


Abb. 24: Kreuzungsschema des Muller5-Tests. Betrachtet werden die X-Chromosomen, jeweils auf der linken Seite, bzw. X und Y-Chromosom der Männchen auf der rechten Seite des Schemas. Die Männchen der P-Generation werden bestrahlt und mit Muller5-Weibchen verheiratet. In der F1-Generation werden Weibchen die ein bestrahltes X-Chromosom über einem Muller5 X-Chromosom tragen mit Muller5-Männchen verkreuzt. Die Nachkommen der F1-Kreuzung werden ausgewertet, hier werden nur die Männchen betrachtet. Es gibt zwei mögliche Situationen. Erstens das X-Chromosom trug durch die Bestrahlung eine rezessive letale Mutation, dann gibt es nur Männchen mit Muller5 X-Chromosom, d.h. mit gelben schmalen Augen. Zweites das Bestrahlte X-Chromosom trägt keine Letalmutation, dann haben die Männchen der Kreuzung zwei mögliche Genotypen, entweder ein bestrahltes X-Chromosom über dem Y-Chromosom, das zu runden roten Augen führt, oder ein Muller5 X-Chromosom über dem Y-Chromosom, das zu schmalen gelben Augen führt. So kann die Rate der rezessiven letalen Mutationen in den Männchen ausgezählt werden.

5 Material und Methoden

5.2.4 Präparation und Analyse von DNA und RNA

5.2.4.1 Erzeugung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

(Sambrook et al., 1998)

SOB-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
RF1	10 mM RbCl 50 mM MnCl (erst nach dem Autoklavieren zugeben) 230 mM KCl 10 mM CaCl 15 % (v/v) Glycerin
RF2	10 mM MOPS (pH 6,8) 10 mM RbCl 75 mM CaCl 15 % (v/v) Glycerin

2,5 ml einer Übernacht-Kultur von *Escherichia coli Dh5α* werden in 250 ml SOB-Medium überführt (1:100) und bis zu OD 600 von 0,5 - 0,6 auf dem Schüttler inkubiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis, werden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 upm und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wird in 80 ml kaltem RF1-Puffer resuspendiert und wieder 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden dann erneut bei 4000 upm und 4°C durch Zentrifugation pelletiert, in 20 ml kaltem RF2-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wird anschließend in 200 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

5 Material und Methoden

5.2.4.2 Transformation chemisch kompetenter *Escherischia coli*

200 µl chemisch kompetente *Escherischia coli* Zellen werden für 15 Minuten auf Eis aufgetaut, mit 1 µl Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden sie für eine bis zwei Minuten einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, und wieder für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wird 900 µl erwärmtes LB-Medium zugegeben, bevor die Zellen für 45 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wird auf LB-Agarplatten mit passendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.2.4.3 Plasmid-Mini-Präparation (analytischer Maßstab)

S1-Lösung 50 mM Tris/HCL, pH 8,0
 10 mM EDTA
 100 µg/ml RNase A

S2-Lösung 200 mM NaOH
 1 %(w/v)SDS

S3-Lösung 2,6 M Kaliumacetat, pH 5,2 mit Essigsäure

In 3 ml LB-Medium plus Antibiotikum wird eine Einzelkolonie angeimpft und über Nacht auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wird bei 6.000 upm für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wird in 100 µl P1 resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren werden 200 µl P2 zugegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wird anschließend zur Neutralisation und Proteinfällung mit 150 µl P3 und 40 µl Chloroform versetzt und fünf Minuten bei 13.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, und die enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,6 Vol Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 30

5 Material und Methoden

Miunten bei 13.000 upm bei 4°C gefällt. Der Überstand wird abgenommen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wird es getrocknet und in 40 µl ddH₂O resuspendiert. Lagerung erfolgt bei -18°C.

5.2.4.4 Plasmid-Midi-Präparation (präparativer Maßstab)

Für die Präparation größerer und sauberer Mengen von Plasmid-DNA. Die Präparation erfolgte mit dem Jetstar Plasmid Kit 2.0 von Genomed und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.2.4.5 Präparation von genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster*

Extraktionspuffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,0
	100 mM EDTA, pH 9,0
	1 % (w/v) SDS

Etwa 30 Fliegen werden in 100 µl Extraktionspuffer in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß mit einem Pistill zerstoßen und für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend werden 14 µl 8 M KAc zugegeben und die Mischung 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird bei 13.000 upm bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert um die Fliegenrückstände zu pelletieren. Der DNA-haltige Überstand wird in ein neues 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die DNA wird durch Zugabe von 0,6 Vol Isopropanol gefällt und durch 30 Minuten Zentrifugieren bei 13.000 upm und 4°C pelletiert. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30-100 µl ddH₂O resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

5.2.4.6 „Single Fly“ DNA Präparation

SquiB	10 mM Tris, pH 8,2
-------	--------------------

5 Material und Methoden

1 mM EDTA
25 mM NaCl

Eine Fliege wird in 50 µl SquiB plus 1 µl ProteinaseK (20 mg/ml) mit einem Pistill zermörsert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der ProteinaseK wird der Ansatz für zwei Minuten auf 85°C erhitzt. Aufbewahrung bei 4°C. Für eine PCR werden 10µl eingesetzt.

5.2.4.7 Isolation von Gesamt-RNA und mRNA aus *Drosophila melanogaster* Testes

Testes aus 50-100 Fliegen wurden in PBS präpariert und währenddessen auf Eis gelagert. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgt mit TRIzol (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde in 20µl Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Für RT-PCRs wurden 2µl einer 1:10 Verdünnung eingesetzt.

Für die Primer Extension wurde aus der Gesamt-RNA mRNA mit Hilfe des Quiagen RNeasy Mini Kits nach Herstellerangaben isoliert.

5.2.4.8 Agarosegelelektrophorese

(Sambrook et al., 1998)

In der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle aufgrund ihrer Größe in einem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA läuft entlang eines Spannungsfelds, gegensätzlich zu ihrer eigenen Ladung, zum positiven Pol durch ein TAE- oder TBE-Agarosegel. Die Agarosekonzentration liegt, abhängig von der Größe der DNA-Moleküle, zwischen 0,8 % und 2,0 %. Dem Agarosegel sind 0,5 µg/µl Ethidiumbromid zugesetzt, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Die DNA wird mit 1/6 Vol Ladepuffer aufgetragen und unter einer Spannung zwischen 60 und 100 V laufen gelassen.

5 Material und Methoden

5.2.4.9 Isolation von DNA aus Agarosegel

Die Isolation von DNA-Banden aus Agarosegel erfolgte mit GFX PCR, DNA and gel purification kit, Amersham Pharmacia Biotech oder dem JetStar purification Kit von Genomed und erfolgte nach Herstellerangaben. Die Isolierte DNA wurde in 25 μ l ddH₂O aufgenommen

5.2.4.10 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer maximalen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm photometrisch quantifiziert werden. Aus der Absorption (OD) lässt sich aufgrund folgender Beziehungen die Konzentration doppelsträngiger DNA in ng/ μ l bei einer Dicke der Quarzküvette von 1 cm berechnen:

$$\text{OD } 260 \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

5.2.4.11 Ethanol-fällung von DNA

(Ausubel et al., 1993)

Zur DNA-Lösung werden 1/10 Vol 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 Vol eiskalter 96% Ethanol zugegeben, und 15 Minuten bei -18°C inkubiert. Zur Präzipitation der gefällten DNA wird 15 Minuten bei 4°C und 13.000 upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet in 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-40 μ l ddH₂O aufgenommen.

5.2.5 Southern Blot Analyse

(Sambrook et al., 1998)

DNA Isolation und Kapillarblot

5 Material und Methoden

Alkaliner Transfer Puffer	0,4 N NaOH 1 m NaCl
Neutralisationspuffer	0,5 M Tris Hcl pH 7,2 1 M NaCl

Genomische DNA aus einem 1,5 ml Eppendorfgefäß voll Fliegen wurde mit DNAzol (Invitrogen) laut Herstellerangaben isoliert. 5 µg DNA werden mit 10 U EcoRI 7 Stunden bei 37°C verdaut. Die verdaute DNA wird dann auf einem 0,7 % TAE-Agarosegel sehr langsam laufen gelassen bis sie stark aufgetrennt ist. Das Gel wird mit Lineal fotografiert um später den Banden auf dem entwickelten Film Größen zuordnen zu können. Die DNA im Gel wird dann denaturiert indem das Gel zweimal 15 Minuten bei Raumtemperatur in alkalinem Transfer Puffer gewaschen wird. Um die Hybond-N-Membran vorzubereiten wird sie in ddH₂O gewässert bis sie durchnässt ist und dann für mindestens fünf Minuten in alkalinem Transfer Puffer schwimmen gelassen. An Membran und Gel wird die gleiche Ecke abgeschnitten, um die Orientierung bestimmen zu können. Es erfolgt der Transfer der DNA auf die Membran durch einen Kapillarblot nach Sambrook (1998). Nach dem Blot wird die Membran für 15 Minuten in Neutralisations Puffer gewaschen. Die DNA auf der noch feuchten Membran wird dann im UV-Crosslinker kovalent an die Membran gebunden.

Markierung der Sonden und Hybridisierung

Hybridisierungslösung	6x SSC 5x Denhardtts 0,5 % SDS 100 µg/ml Heringssperma DNA
100x Denhardtts	1 % (w/v) Ficoll 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 1 % (w/v) BSA
„blue juice“	20 mM Tris, pH 7,5

5 Material und Methoden

1 mM EDTA, pH 8,0
0,25% Bromphenolblau

Zuerst wird die Membran in 6x SSC (Material) eingeweicht, sie muss für mindesten zwei Minuten untergetaucht sein. Zur Prähybridisierung wird die Membran für eine Stunde bei 68°C in Hybridisierungslösung inkubiert. Derweil werden die Sonden mit ³²P markiert. Die Markierung erfolgt mit dem Prime-it® II Random Primer Labeling Kit von Stratagene® nach Herstelleranweisungen. Die Markierungsreaktion wird mit 50 µl „blue juice“ gestoppt. Es werden Säulen mit Capture Agarose zur Reinigung der Sonden vorbereitet dazu wird in 0,5 ml Reaktionsgefäß mit Loch im Boden mit 100 µl Glasperlen und 500 µl Biogel P10 gefüllt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und für eine Minute bei 1000 upm zentrifugiert. Die Sonden werden nun auf die vorbereiteten Säulen gegeben und bei 1000 upm zentrifugiert. Danach werden die Sonden für fünf Minuten bei 100°C gekocht und auf Eis abgekühlt. Die vorbereiteten Sonden werden jetzt auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgt bei 68°C über Nacht.

Waschen der Membran

Waschlösung 1	2 x SSC 0,5 % SDS
Waschlösung 2	2x SSC 0,1 % SDS
Waschlösung 3	0,1x SSC 0,1 % SDS
Waschlösung 4	0,1 % SDS

Es folgen vier Waschschrte mit steigender Stringenz. Der erste Waschschrte mit Waschlösung 1 erfolgt bei Raumtemperatur für fünf Minuten. Der zweite Waschschrte mit Waschlösung 2 erfolgt bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Der dritte Waschschrte mit Waschlösung 3 erfolgt bei 65°C für 15 Minuten. Und der Letzte

5 Material und Methoden

Waschschritt mit Waschlösung 4 erfolgt wieder bei Raumtemperatur für wenige Minuten. Die Membran wird dann mit einem Papiertuch abgetupft und noch feucht in Frischhaltefolie eingewickelt. In der Dunkelkammer wird sie dann auf einen Film aufgelegt und dann bei -80°C für eine Woche belichtet. Danach wird der Film in der Dunkelkammer entwickelt.

5.2.6 Enzymatische Manipulationen von DNA-Molekülen

5.2.6.1 Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Verdauansatz	DNA	0-100 ng
	Restriktionsenzym	0,5-1 U
	10x Puffer	2 μl
	BSA (optional)	2 μl
	Triton (optional)	2 μl
	ddH ₂ O	auf 20 μl auffüllen

Die Reaktion findet für ein bis zwei Stunden bei 37°C statt.

5.2.6.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden zur Prävention der Religation des Vektors

Um eine Religation des geschnittenen Vektors mit sich selber in der Ligationreaktion zu vermeiden, werden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert. Das geschieht durch Zugabe von 1 U alkaliner Phosphatase und der entsprechenden Menge 10x Reaktionspuffer. Die Mischung wird dann für 20 Minuten bei 37°C und für 20 Minuten bei 54°C inkubiert. Zur Reinigung der DNA wird anschließend eine Ethanol-Fällung durchgeführt.

5 Material und Methoden

5.2.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsansatz	Vektor-DNA	50-100 ng
	Insert-DNA	1x, 3x und 6 x molare Menge der Insert DNA
	10x Ligase-Puffer	2 µl
	T4 Ligase	2 U
	ddH ₂ O	auffüllen auf 20 µl

In die Reaktion werden 50-100 ng Vektor-DNA eingesetzt und die ein- bis sechsfach molare Menge der Insert-DNA. Die Reaktion findet bei RT für 30 Minuten statt.

5.2.6.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte nutzt man die Polymerase - Kettenreaktion. Synthetische Oligonukleotide dienen als Vorwärts- und Rückwärts-Primer und binden spezifisch am 3´ und 5´ Strang der DNA-Matrize. Die Matrizen-DNA wird durch Hitze denaturiert und die Primer lagern sich an, eine hitzebeständige DNA-Polymerase synthetisiert dann, ausgehend von den Primern, die komplementäre DNA zur Matrizen-DNA. Durch zyklische Denaturierung und Synthese der DNA amplifiziert sich der gewünschte DNA-Abschnitt zwischen den Primern exponentiell.

PCR-Reaktionsansatz	Template-DNA	5-50 ng
	Vorwärts-Primer (25 pmol/µl)	1 µl
	Rückwärts-Primer (25 pmol/µl)	1 µl
	10x PCR-Puffer	5 µl
	5x Enhancer Lösung	10 µl
	dNTPs (10 mM pro NTP)	1 µl
	ddH ₂ O	auffüllen auf 50 µl

PCR-Programm

5 Material und Methoden

1. Schritt Denaturierung	90 °C 10 Minuten
2. Schritt Denaturierung	90 °C 1 Minute
3. Schritt Primeranlagerung	Primer spezifische Temperatur 1 Minute
4. Schritt Elongation	72 °C Zeit abhängig von der Größe des Fragments
5. Schritt Elongation	72 °C 10 Minuten

Nach dem vierten Schritt der DNA-Synthese erfolgt ein Rücksprung zum zweiten Schritt. Der Zyklus wird dann 30 - 35mal wiederholt.

5.2.6.5 Klonieren mit dem TOPO™-TA-Vektor-Kit

(nach Angaben des Herstellers Invitrogen)

Klonierungsansatz	PCR-Produkt	0,5 µl - 2 µl
	TOPO™-TA-Vektor	0,2 µl - 0,5 µl
	Salzlösung	1 µl
	ddH ₂ O	auf 7 µl auffüllen

Das PCR-Produkt wird ohne vorherige Aufreinigung verwendet. Die Ligationsreaktion findet für fünf Minuten bei Raumtemperatur statt. Danach wird der gesamte Ansatz in chemisch kompetente *Escherichia coli* transformiert.

5.2.7 Histologische Methoden

5.2.7.1 Immunfluoreszenzfärbungen an Testesquetschpräparaten

5 Material und Methoden

Objektträger werden mit Polylysin vorbehandelt, damit die Testes an der Glasoberfläche haften bleiben. Dazu werden 20 µl Polylysin auf einen Objektträger gegeben und dieser an einem zweiten Objektträger gerieben. Das Polylysin muss dann trocknen. Die Testes werden in PBS präpariert, auf den polylysierten Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Danach werden Die Testes mit sanftem Druck mit Hilfe eines saugstarken Papiers gequetscht. Die Objektträger mit den Präparaten werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Deckgläschen wird mit Hilfe eines Skalpell abgesprengt. Die gequetschten Testes auf dem Objektträger werden 15 Minuten in eiskaltem 96 % Ethanol entwässert. Anschließend werden sie für sieben Minuten in 4% F-PBS fixiert und zweimal 30 Minuten mit 1 ml PBSTD permeabilisiert. Danach wird 10 Minuten mit PBT gewaschen. Anschließend werden die Präparate zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen für 30 Minuten mit PBT + 3 % BSA (Albumin-Fraktion V) behandelt. Im Anschluss werden die Objektträger über Nacht mit dem Erst-Antikörper bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wird der Zweitantikörper zur Verbesserung der Spezifität für eine Stunde bei leichtem Schwenken und im Dunkeln mit fixierten Embryonen geblockt. Während der Inkubationszeit werden die Objektträger mit den Testes viermal für je 15 Minuten mit PBT + 3 % BSA gewaschen. Danach werden die Präparate für eine Stunde bei 37°C und im Dunkeln mit dem vorbereiteten Zweit-Antikörper inkubiert. Alle weiteren Schritte finden im Dunkeln statt. Nach der Inkubation mit dem Zweit-Antikörper werden die Objektträger nochmals viermal mit PBT + 3 % BSA gewaschen, wobei beim zweiten Waschschrift 1 µg/ml Hoechst 33258 zur Waschlösung hinzugegeben wird. Zur mikroskopischen Auswertung werden die Präparate in Fluoromount G eingebettet. Die Lagerung der Präparate erfolgt unter Lichtabschluss bei 4°C.

5.2.7.2 Terminal transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) zur Detektion von DNA Brüchen

Zur Detektion von DNA Brüchen in Testesquetschpräparaten wird das Kit „In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red“ von Roche verwendet. Hierzu werden Quetschpräparate für Immunfluoreszenzen bis zum zweiten Antikörperschritt bearbeitet. Nach der Inkubation des Zweitantikörper werden die Präparate zweimal

5 Material und Methoden

15 Minuten in PBT + 3 % BSA gewaschen. Erst direkt vor der Verwendung werden 45 µl Labeling Solution und 5 µl Enzym Solution aus dem Kit vermischt, auf die Präparate gegeben und für 90 sec bei 37°C inkubiert. Danach werden die Präparate viermal mit PBT + 3 % BSA gewaschen wobei beim zweiten Waschschrift 1 µg/ml Hoechst 33258 zur Waschlösung hinzugegeben wird. Zur mikroskopischen Auswertung werden die Präparate in Fluoromount G eingebettet. Die Lagerung der Präparate erfolgt unter Lichtabschluss bei 4°C

5.2.7.3 X-Gal-Färbung an *Drosophila melanogaster* Testes

Fixierlösung für X-Gal-Färbungen 60 µl 25% Glutardialdehyd
in 2 ml 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4

Färbelösung für X-Gal-Färbungen 10 mM Phosphatpuffer
150 mM NaCl
1 mM MgCl₂
0,3 % TritonX-100
3,3 mM K₃[Fe(II)(CN)₆]
3,3 mM K₄[Fe(II)(CN)₆]

Die Testes werden in PBS präpariert und 15 Minuten (larvale Testes fünf Minuten) in der Fixierlösung fixiert. Anschließend zweimal mit PBS waschen dann wird 1 ml Färbelösung zugegeben. Die Färbung wird dann durch Zugabe von 20 µl 10 % X-Gal (Stocklösung in DMF) gestartet. Die Färbereaktion sollte im Dunkel stattfinden und kann durch Inkubation bei 37°C beschleunigt werden. Ist die Färbung intensiv genug, wird sie durch PBS-Waschungen gestoppt. Die Testes werden in Glycerin eingebettet.

5.2.7.4 RNA *in situ* Hybridisierung an *Drosophila melanogaster* Testes

Herstellung der DIG markierten RNA Sonde

5 Material und Methoden

Zur Herstellung der Sonden wurden Vektoren mit Sp6, T3 oder T7 Promotor genutzt die 500- 800 bp große Fragmente der entsprechenden ORFs tragen. Die Vektoren wurden linearisiert und mit Hilfe des DIG RNA labeling Mixes von Quiagen wurden, den Hersteller Angaben folgend, sense und antisense RNA-Sonden transkribiert. Diese wurden mit einer Ethanol-Fällung präzipitiert und in 50 µl ddH₂O aufgenommen. In den meisten Fällen wurden die Sonden dann 1:50 verdünnt in die Hybridisierung eingesetzt.

RNA Hybridisierungslösung	50% Formamid
	5x SSC
	100 µg/ml Heparin
	100 µg/ml Heringssperma DNA
	0,1% Tween 20

Färbelösung	0,1 M NaCl
(immer frisch ansetzen	0,05 M MgCl ₂
je 5 ml pro Probe)	0,1 M Tris, pH 9,5
	1 mM Levamisol
	0,1% Tween 20

Präparation und Fixierung

Die Testes werden in PBS präpariert und auf Eis gelagert bis sie fixiert werden. Zur Fixierung werde sie 20 Minuten mit frisch angesetzttem F-PBS behandelt und danach dreimal fünf Minuten mit PBT gewaschen. Es folgt ein ProteinaseK Verdau (10 µl ProteinaseK (5 mg/ml) auf 990µl PBT) für 90 sec. Dieser wird mit Glycerin (100 µl Glycerin (20 mg/ml) auf 900 µl PBT) abgestoppt. Es wird zweimal fünf Minuten mit PBT gewaschen und 20 Minuten mit 4% F-PBS refixiert und danach noch zweimal fünf Minuten mit PBT gewaschen.

Hybridisierung

5 Material und Methoden

Es folgt ein Lösungswechsel von PBT zur Hybridisierungslösung, durch drei Waschschrte für je 10 Minuten mit dem Verhältnis 1:3, 1:1 und 3:1 von PBT zur Hybridisierungslösung. Danach dreimal fünf Minuten mit Hybridisierungslösung waschen. Zum Prähybridisieren werden 100 µl Hybridisierungslösung pro Probe fünf Minuten bei 100°C gekocht und auf die Testes gegeben und eine Stunde bei 55°C prähybridisiert. Derweil wird die Sonde vorbereitet. Dafür die Sonde entsprechend in Hybridisierungslösung verdünnen, für drei Minuten auf 80°C erhitzen und dann auf Eis stellen bis sie benötigt wird. Zur Hybridisierung werden die vorbereiteten Sonden zu den Testes gegeben und 12-16 Stunden bei 55°C hybridisiert.

Antikörperbindung

Hybridisierungslösung und PBT auf 55°C vorwärmen. Die nächsten Waschschrte werden bei 55°C vorgenommen. Es wird einmal mit Hybridisierungslösung gespült und dann einmal 15 Minuten mit Hybridisierungslösung gewaschen. Es folgt wieder ein Lösungswechsel diesmal von Hybridisierungslösung zu PBT, es wird für je 15 Minuten im Verhältnis 1:3, 1:1, 3:1 Hybridisierungslösung zu PBT gewaschen. Danach wird viermal mit PBT gewaschen und dann werden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Der 1:2000 verdünnte Anti-DIG-AP Antikörper wird zu den Proben gegeben und zur Antikörperbindung werden die Proben eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Färbung

Die Proben werden viermal 20 Minuten mit PBT und dreimal 10 Minuten mit frisch angesetzter Färbelösung gewaschen. Die Testes werden zum färben in ein Blockschälchen überführt und durch Zugabe von 3,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phosphat zu 1 ml Färbelösung wird die Färbereaktion gestartet. Die Färbung soll sich im Dunkeln entwickeln und wird wenn sie intensiv genug ist durch mehrfaches Waschen

5 Material und Methoden

mit PBT gestoppt. Die Testes werden jetzt mit einer Ethanolserie für je 10 Minuten entwässert. Eventuelle Hintergrundfärbung kann mit einem 5 - 15 minütigen Waschschrift mit 1:1 gemischtem Ethanol Methylsalicylat und einem Waschschrift mit purem Methylsalicylat entfärbt werden. Danach muss noch einmal mit 100% Etanol gewaschen werden. Die Testes werden dann in Epon eingebettet. Das Epon muss bei 60°C über Nacht aushärten.

5.2.7.5 Chromatin Immunopreziatation (ChIPs) an *Drosophila melanogaster* Testes

Vorbereitung des Chromatins

Die Chromatin Immunoprezipitation wurde mit Hilfe des Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit von Upstate nach Hersteller Angaben gemacht.

Testes von ca 50-100 Fliegen wurden in kaltem PBS (+Protease Inhibitor, + PMSF) präpariert und auf Eis gelagert. Die Testes wurden in 1% F-PBS für 15 Minuten bei 37°C fixiert. Danach wurde zweimal mit 200 µl PBS (+Protease Inhibitor, + PMSF) gewaschen hierfür wurden die Testes vorher bei 2000 upm für zwei Minuten abzentrifugiert um den Überstand komplett abnehmen zu können. Nach dem Waschen wurden die Testes wieder abzentrifugiert und nach dem Abnehmen des Überstandes mit 200 µl SDS Lysis Puffer (+Protease Inhibitor, + PMSF) behandelt und mit einem Pistill homogenisiert. Danach wurden die Testes auf Eis mit Ultraschall beschallt und zwar mit fünf Sekunden Pulsen für eine Gesamtdauer von drei bis fünf Minuten. Gewebereste wurden durch zentrifugieren für 10 Minuten bei 13.000 upm abzentrifugiert, der Überstand entnommen und mit ChIP dilution Buffer (+Protease Inhibitor, + PMSF) verdünnt. An dieser Stelle werden 40 µl Lösung als Input-Kontrolle abgenommen. Zum preabsorbieren der Proben werden 60 µl ProteinA-beads ohne Antikörper zugegeben und für 30 Minuten bei 4°C geschüttelt.

Immunoprezipitation

5 Material und Methoden

Die Beads werden durch kurzes Zentrifugieren entfernt und der Antikörper wird dazu gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden je 60 µl ProteinA-beads zugegeben und bei 4°C für vier Stunden geschüttelt.

Waschschritte

Es folgen fünf Waschschritte für je fünf Minuten auf 4°C, für die die Beads jeweils für eine Minute bei 1000 upm abzentrifugiert werden. Gewaschen wird mit je 1 ml, einmal mit Low Salt Immune Complex Wash Buffer, einmal mit High Salt Immune Complex Wash Buffer, einmal LiCL Immune Complex Wash Buffer und zweimal mit TE-Puffer.

Elution

Elution Buffer	0,1 M NaHCO ₃
	1% SDS
	In 1x TE-Puffer

Mit frischen Elution Buffer wird zweimal mit je 125 µl für 15 Minuten auf dem Schüttler eluiert. Die eluierte DNA und der vorher entnommene Input werden mit 10 µl bzw. 2 µl 5 M NaCl behandelt und für 65°C für vier Stunden inkubiert um die Vernetzung der DNA mit Proteinen durch die Fixierung aufzuheben.

Danach wird die DNA mit dem PCR Purification Kit von Quiagen aufgereinigt. Die DNA wird jetzt zur Analyse mit quantitativer real-time PCR eingesetzt.

6 Anhang

6 Anhang

6.1 Liste der im Rahmen dieser Arbeit generierten Klone

Nr.	Name	Konstrukt / Primer	Vektor	Primer #
1	Pc77F1-Topo	EcoRI-448bp-BamHI	pCR®II-TOPO®	
2	Pc77F2-Topo	EcoRI-330bp-BamHI	pCR®II-TOPO®	
3	Pc77F2-Δ5'UTR-Topo	EcoRI-196bp-5'UTR-BamHI	pCR®II-TOPO®	
4	Pc77F3-Topo	EcoRI-261bp-BamHI	pCR®II-TOPO®	
5	Pc77F3-Δ5'UTR-Topo	EcoRI-127bp -5'UTR-BamHI	pCR®II-TOPO®	
1a	Pc77F1	EcoRI-448bp-BamHI	pChabΔSal	
2a	Pc77F2	EcoRI-330bp-BamHI	pChabΔSal	
3a	Pc77F2-Δ5'UTR	EcoRI-196bp-5'UTR-BamHI	pChabΔSal	
4a	Pc77F3	EcoRI-261 bp-BamHI	pChabΔSal	
mst3	pc77F3-Δ5'UTR-29bp-Topo	EcoRI-ganzohne5'UTR-BamHI	pCR®II-TOPO®	S89+8
12	pc77F3-Δ5'UTR-29bp	EcoRI-ganzohne5'UTR-BamHI	pChabΔSal	S89+8
202	ProtB-sonde		pCR®II-TOPO®	S24+86
209	Mst77F-sonde		pCR®II-TOPO®	104+ 87
321	CG4480-Sonde		pCR®II-TOPO®	20+61
326	CG15278-Sonde		pCR®II-TOPO®	19+3
339	CG33309-Sonde		pCR®II-TOPO®	30+32
213	6x-MS2-SL-Xba	amp.. von Vector AG Feldbrügge	pCR®II-TOPO®	91+92
220	6x-MS2-SL-Bam/Spe	amp. von Vector AG Feldbrügge	pCR®II-TOPO®	69+70
459	pChab-tpl-SL-MS2	KpnI-tpl-XbaI-eGFP-NotI---SpeI-MS2SL-BamHI	pChabΔSal mit tpl von Christina Rathke	
464	pChab-ProtA-SL-MS2	EcoRI-ProtA-NcoI-eGFP-NotI---SpeI-MS2SL-BamHI	pChabΔSal mit ProtA von Sunil	
466	pChab-ProtA-SL-MS2	EcoRI-ProtA-NcoI-eGFP-NotI---SpeI-MS2SL-BamHI	pChabΔSal mit ProtA von Sunil	
470	pChab-Mst77F-SL-	EcoRI-Mst77F-XbaI-eGFP-NotI---	pChabΔSal mit Mst77F	

6 Anhang

	MS2	SpeI-MS2SL-BamHI-LacZ	von Sunil	
804	Ms2cp-BamHI	SpeI-MS2cp-BamHI in Topo	pCR®II-TOPO®	122+123
812	Pchab-B2Tpro-MS2cp-cherry	EcoRI-NLSSV40-B2Tpro-SpeI-MS2cp-BamHI-Cherry	Pchab-B2tpro-Cherry si401	
824	Pchab-ProtB-MS2cp-cherry	EcoRI-NLSSV40-ProtBpro-SpeI-MS2cp-BamHI-Cherry	Pchab-ProtBpro-Cherry si411	
	CG3473pro		pCR®II-TOPO®	S96+124
	Pchab-β2Tpro-MS2cp-cherry-neueNLS		812	
	β2Tpro-λN-mCherry-neueNLS		Si836	
Silja Burkharts Klone (Bachelorarbeit Burkhard 2008)				
-	β2Tpro-Topo	EcoRI – β2Tubulin-Promotor – SpeI	pCR®II-TOPO®	79+77
Si 191	ProtBpro-Topo	EcoRI – Protamin B-Promotor – SpeI	pCR®II-TOPO®	78+85
Si 64	8x-BoxB-Topo	SpeI – 8x-BoxB – BamHI	pCR®II-TOPO®	80+76
Si 67	16x-BoxB-Topo	SpeI – 16x-BoxB – BamHI	pCR®II-TOPO®	80+76
Si 627	Topo-λN	SpeI – SV40-NLS - λN-Peptid – BamHI	pCR®II-TOPO®	Si1+Si2
Si 401	pChab-β2Tpro-mcherry	EcoRI – β2Tubulin-Promotor – SpeI – BamHI – mcherry – XbaI	pChabΔSal	
Si 411	pChab-ProtBpro - mcherry-	EcoRI – Protamin B-Promotor – SpeI – BamHI – mcherry – XbaI	pChabΔSal	
Si 587	Tpl94D-eGFP-16xBoxB	KpnI – tpl ^{94D} – XbaI – eGFP – NotI – SpeI – 16x-BoxB – BamHI	pChabΔSal	
Si 792	Mst77F-eGFP-16xBoxB	EcoRI – mst77F – XbaI – eGFP – NotI – SpeI – 16x-BoxB – BamHI	pChabΔSal	
Si 812	ProtA-eGFP-16xBoxB	EcoRI – protA – NcoI – eGFP – NotI – SpeI – 16x-BoxB – BamHI	pChabΔSal	
Si 840	ProtA-eGFP-8xBoxB	EcoRI – protA – NcoI – eGFP – NotI – SpeI – 8x-BoxB – BamHI	pChabΔSal	
Si 836	β2Tpro-λN-mCherry	EcoRI – β2Tubulin-Promotor – SpeI – SV40-NLS - λN-Peptid – BamHI – mcherry – XbaI	pChabΔSal	
Si 860	ProtBpro-λN-mCherry	EcoRI – Protamin B-Promotor – SpeI – SV40-NLS - λN-Peptid – BamHI – mcherry – XbaI	pChabΔSal	

Tab. 2: Liste der im Rahmen dieser Arbeit klonierten Konstrukte. In der Ersten Spalte ist die laborinternen Klonnummer verzeichnet. Daneben der Name des Konstrukts. In der dritten Spalte sind die Fragmente der Konstrukte mit dazwischen liegenden Schnittstellen benannt. In der Vierten Spalte

6 Anhang

ist der benutzt Vektor bezeichnet und in der letzten Spalte sind evt. Verwendete Primer mit laborinternen Nummerierung benannt. Im unteren Teil der Tabelle sind die Klone verzeichnet, die in Zusammenarbeit mit Silja Burkhart in Rahmen ihrer Bachelorarbeit entstanden (Bachelorarbeit Burkhart 2008).

6.2 Liste von Genen für RNA-binde-Proteine mit vorhergesagter Expression in der männlichen Keimbahn

Name	annot. ID	Fly-Atlas	Testis cDNA	annot. Funktion	Allele	Im Labor
arrest	CG31762				Mehrere Allele	BL 11755 P-Element
Bub3	CG7581	down	-			
	CG10384	-	-	Spermatogenesis Mi et al. 2003	Mehrere Allele	1 BL18762
	CG3875	up	+	Spermatogenesis Mi et al. 2003	1 Stock	BL14632 P-Element
	CG3927	up	4/4	Spermatogenesis Mi et al. 2003	2Stocks Viable+fertile	BL 18508 Piggybac
	CG4021	up	3/3	Spermatogenesis Mi et al. 2003	1Stock Wien RNAi	
cup	CG11181	+	up	neg. Reg. of oscar	11Stocks	BL4978 Cup ¹ EMS
Fmr1	CG6203	-	-		viele Allele	
heph	CG31000	down	-	Spermatid Ent. Castillon 1993 Robidon, Singh 2003	Viele Allele	BL635 Heph ¹ P-Element
loqs	CG6866	up	+	Spermatogenesis Mi et al. 2003 1 Allele Testis Phenotyp		BL 18371 P-Element

6 Anhang

				Fostemann et al 2005 Jiang et al. 2005		
mod	CG2050	down	+ wenig e	männl. steril Spermatid Ent. Castillon et al.1993	13 Allele	1 Allel vorhanden Flytraplinie CB02172
nos	CG5637	down	-	nos ¹⁸ , nos ⁵³ Testis Phänotyp Bhat et al. 1999	19 Allele 13 Stocks	Flytraplinie CB05200
orb	CG10868	down	+ viele	Oogenesis weibl. sterile	5 Stocks	Flytraplinien CB04897 YB0370le
pea	CG8241	-	-	Spermatid Ent.. Castillon et al.1993 RNA splicing Pea ¹ männl. steril		BL2495 Pea ¹ P-Element
Psi	CG8912	down	+	RNA splicing, processing Spermatogenesis Phänotyp in onion-Stadium spermatiden	1 Allel Psiv16 Labourier et al. 2002	Flytraplinie CC00797
Qkr54B	CG4816	-	-	Spermatogenesis Mi et al. 2003	1 Allel BL 18011	
Qkr58E1	CG3613	-	-	Spermatogenesis Mi et al. 2003 Apoptose	1 Allel BL 17023	
Qkr58E2	CG5821	-	+	Spermatogenesis Mi et al. 2003 Apoptose		
Qkr58E3	CG3584	-	+	Spermatogenesis	4 Allele	

6 Anhang

				Mi et al. 2003 Apoptose DiFrusico et al. 2003	4 Stocks	
Rb97D	CG6354	up	+ viele	Spermatogenesis Spermatid Ent.. Männl. Steril Defekt in Nukleus +Axonem	6 Allele 2 Stocks	
Rbp4	CG9654	up	6/6	Rbp4 ¹ Haynes et al. 1997	1 Allel 1 Stock	BL 15141 P-Element 25bp vor pred.TSS

Tab 3: Liste von Genen für RNA-Bindende Proteine mit vorhergesagter Expression in der männlichen Keimbahn. Daten von der Flybase-Seite ([=63 - Tweedie 2009 FlyBase: enhancing D...=]) Stand 2008. Erhalten durch den Abgleich der Liste der vorhergesagten Gene für RNA-Bindeproteine im Fliegen genom mit der Liste alle vorhergesagten Gene mit Expression in der Männlichen Keimbahn. In der ersten Spalte ist der Name verzeichnet, und in der Spalte daneben die annotierte ID (CG-Nummer). In der Dritten Spalte ist notiert, ob es nach den Microarraydaten der ‚FlyAtlas‘ Datenbank eine Hoch-oder runterregulation der mRNA im Testis im Vergleich zur ganzen Fliege gibt ([=62 - Chintapalli 2007 Using FlyAtlas to id...=]). In der vierten Spalte ist notiert, ob es Testis-cDNA gibt und z. T. wie viele. In der fünften Spalte sind potentielle Funktionen abgegeben, wenn welche bekannt waren. In der schsten Spalte ist angegeben ob es mutante Allele und andere Arten von Stocks gibt. Und in der letzten Spalte ist verzeichnet ob, und wenn ja, welche Stocks im Labor schon vorhanden sind.

7 Literatur

7 Literatur

- Agrawal, A. F., Wang, A. D. 2008. Increased transmission of mutations by low-condition females: evidence for condition-dependent DNA repair. *PLoS Biol.* 6. e30.
- Ahsan, B.; Saito, T. L.; Hashimoto, S.; Muramatsu, K.; Tsuda, M.; Sasaki, A.; Matsushima, K.; Aigaki, T., Morishita, S. 2009. MachiBase: a *Drosophila melanogaster* 5'-end mRNA transcription database. 37. D49-53.
- Andrews, J.; Bouffard, G. G.; Cheadle, C.; Lu, J.; Becker, K. G., Oliver, B. 2000. Gene discovery using computational and microarray analysis of transcription in the *Drosophila melanogaster* testis. *Genome Res.* 10. 2030-43.
- Aoki, V. W.; Emery, B. R.; Liu, L., Carrell, D. T. 2006. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl.* 27. 890-8.
- Aoki, V. W.; Moskovtsev, S. I.; Willis, J.; Liu, L.; Mullen, J. B. M., Carrell, D. T. 2005. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl.* 26. 741-8.
- Awe, S., Renkawitz-Pohl, R. 2010. Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone-to a protamine-based chromatin structure in spermatide nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Syst Biol Reprod Med.* in Druck.
- Balhorn, R. 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8. 227.
- Barckmann, B. 2005. Analyse der Transkriptions- und Translationskontrolle zur Synthese des Mst77F-Proteins, einer Komponente des kondensierten Chromatins des Spermiums in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit. Philipps Universität Marburg, Entwicklungsbiologie.
- Barreau, C.; Benson, E.; Gudmannsdottir, E.; Newton, F., White-Cooper, H. 2008a. Post-meiotic transcription in *Drosophila* testes. *Development.* 135. 1897-902.
- Barreau, C.; Benson, E., White-Cooper, H. 2008b. Comet and cup genes in *Drosophila* spermatogenesis: the first demonstration of post-meiotic transcription. *Biochem Soc Trans.* 36. 540-2.
- Bertrand, E.; Chartrand, P.; Schaefer, M.; Shenoy, S. M.; Singer, R. H., Long, R. M. 1998. Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast. *Mol Cell.* 2. 437-45.
- Blumer, N.; Schreiter, K.; Hempel, L.; Santel, A.; Hollmann, M.; Schafer, M. A., Renkawitz-Pohl, R. 2002. A new translational repression element and unusual transcriptional control regulate expression of *don juan* during *Drosophila* spermatogenesis. *Mech Dev.* 110. 97-112.

7 Literatur

- Braun, R. E. 2001. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet.* 28. 10-2.
- Bregues, M.; Teixeira, D., Parker, R. 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science.* 310. 486-9.
- Burkhard, S. 2008. Etablierung von Konstrukten zur in vivo Verfolgung von Protamin mRNA in *Drosophila melanogaster* sowie die Rolle der Protamine beim Schutz der DNA vor Mutagenen. Bachelorarbeit. Philipps Universität Marburg, Entwicklungsbiologie.
- Carrell, D. T.; Emery, B. R., Hammoud, S. 2007. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update.* 13. 313-27.
- Chen, X.; Hiller, M.; Sancak, Y., Fuller, M. T. 2005. Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. *Science.* 310. 869-72.
- Chintapalli, V. R.; Wang, J., Dow, J. A. T. 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet.* 39. 715-20.
- Cho, C.; Jung-Ha, H.; Willis, W. D.; Goulding, E. H.; Stein, P.; Xu, Z.; Schultz, R. M.; Hecht, N. B., Eddy, E. M. 2003. *Protamine 2* deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod.* 69. 211-7.
- Cho, C.; Willis, W. D.; Goulding, E. H.; Jung-Ha, H.; Choi, Y. C.; Hecht, N. B., Eddy, E. M. 2001. Haploinsufficiency of *protamine-1* or *-2* causes infertility in mice. *Nat Genet.* 28. 82-6.
- Daigle, N., Ellenberg, J. 2007. LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nat Methods.* 4. 633-6.
- Deato, M. D. E.; Marr, M. T.; Sottero, T.; Inouye, C.; Hu, P., Tjian, R. 2008. MyoD targets TAF3/TRF3 to activate myogenin transcription. *Mol Cell.* 32. 96-105.
- Dickey, L. F.; Wang, Y. H.; Shull, G. E.; Wortman, I. A. 3., Theil, E. C. 1988. The importance of the 3'-untranslated region in the translational control of *ferritin* mRNA. *J Biol Chem.* 263. 3071-4.
- Dikstein, R.; Zhou, S., Tjian, R. 1996. Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. *Cell.* 87. 137-46.
- Dorus, S.; Busby, S. A.; Gerike, U.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F., Karr, T. L. 2006. Genomic and functional evolution of the *Drosophila melanogaster* sperm proteome. *Nat Genet.* 38. 1440-5.
- Dorus, S.; Freeman, Z. N.; Parker, E. R.; Heath, B. D., Karr, T. L. 2008. Recent origins of sperm genes in *Drosophila*. *Mol Biol Evol.* 25. 2157-66.

7 Literatur

- Fajardo, M. A.; Butner, K. A.; Lee, K., Braun, R. E. 1994. Germ cell-specific proteins interact with the 3' untranslated regions of *Prm-1* and *Prm-2* mRNA. *Dev Biol.* 166. 643-53.
- Falender, A. E.; Freiman, R. N.; Geles, K. G.; Lo, K. C.; Hwang, K.; Lamb, D. J.; Morris, P. L.; Tjian, R., Richards, J. S. 2005. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev.* 19. 794-803.
- Forrest, K. M., Gavis, E. R. 2003. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for *nanos* mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol.* 13. 1159-68.
- Fuentes-Mascorro, G.; Serrano, H., Rosado, A. 2000. Sperm chromatin. *Arch Androl.* 45. 215-25.
- Fuller, M. T. 1993. Spermatogenesis. (Bate, M.; Martinez-Arias, A. eds.) The development of *Drosophila melanogaster*. I. Cold Spring Harbor Laboratory press. 71-147.
- Fuller, M. T. 1998. Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 9. 433-44.
- Geles, K. G.; Freiman, R. N.; Liu, W.; Zheng, S.; Voronina, E., Tjian, R. 2006. Cell-type-selective induction of c-jun by TAF4b directs ovarian-specific transcription networks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103. 2594-9.
- Giarre, M.; Torok, I.; Schmitt, R.; Gorjanacz, M.; Kiss, I., Mechler, B. M. 2002. Patterns of importin-alpha expression during *Drosophila* spermatogenesis. *J Struct Biol.* 140. 279-90.
- Gold, B.; Fujimoto, H.; Kramer, J. M.; Erickson, R. P., Hecht, N. B. 1983. Haploid accumulation and translational control of *phosphoglycerate kinase-2* messenger RNA during mouse spermatogenesis. *Dev Biol.* 98. 392-9.
- Grskovic, M.; Hentze, M. W., Gebauer, F. 2003. A co-repressor assembly nucleated by Sex-lethal in the 3'UTR mediates translational control of *Drosophila msl-2* mRNA. *EMBO J.* 22. 5571-81.
- Hecht, N. B. 1998. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays.* 20. 555-61.
- Hempel, L. U.; Rathke, C.; Raja, S. J., Renkawitz-Pohl, R. 2006. In *Drosophila*, *don juan* and *don juan like* encode proteins of the spermatid nucleus and the flagellum and both are regulated at the transcriptional level by the TAF II80 cannonball while translational repression is achieved by distinct elements. *Dev Dyn.* 235. 1053-64.
- Hennig, W. 2003. Chromosomal proteins in the spermatogenesis of *Drosophila*. *Chromosoma.* 111. 489-94.

7 Literatur

- Hentze, M. W.; Muckenthaler, M. U., Andrews, N. C. 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 117. 285-97.
- Hiller, M. A.; Lin, T. Y.; Wood, C., Fuller, M. T. 2001. Developmental regulation of transcription by a tissue-specific TAF homolog. *Genes Dev*. 15. 1021-30.
- Hiller, M.; Chen, X.; Pringle, M. J.; Suchorolski, M.; Sancak, Y.; Viswanathan, S.; Bolival, B.; Lin, T.; Marino, S., Fuller, M. T. 2004. Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program. *Development*. 131. 5297-308.
- Hochheimer, A., Tjian, R. 2003. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes Dev*. 17. 1309-20.
- Hubbard, T. J. P.; Aken, B. L.; Ayling, S. et al.,. 2009. Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res*. 37. D690-7.
- Iguchi, N.; Tanaka, H.; Yamada, S.; Nishimura, H., Nishimune, Y. 2004. Control of mouse *hils1* gene expression during spermatogenesis: identification of regulatory element by transgenic mouse. *Biol Reprod*. 70. 1239-45.
- Iguchi, N.; Tanaka, H.; Yomogida, K., Nishimune, Y. 2003. Isolation and characterization of a novel cDNA encoding a DNA-binding protein (Hils1) specifically expressed in testicular haploid germ cells. *Int J Androl*. 26. 354-65.
- Iguchi, N.; Yang, S.; Lamb, D. J., Hecht, N. B. 2006. An SNP in *protamine 1*: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet*. 43. 382-4.
- Jayaramaiah Raja, S. 2005. Chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis and decondensation after fertilization. Dissertation. Philipps Universität Marburg, Entwicklungsbiologie.
- Jayaramaiah Raja, S., Renkawitz-Pohl, R. 2005. Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Mol Cell Biol*. 25. 6165-77.
- Kempe, E.; Muhs, B., Schafer, M. 1993. Gene regulation in *Drosophila spermatogenesis*: analysis of protein binding at the translational control element TCE. *Dev Genet*. 14. 449-59.
- Keryer-Bibens, C.; Barreau, C., Osborne, H. B. 2008. Tethering of proteins to RNAs by bacteriophage proteins. *Biol Cell*. 100. 125-38.
- Kierszenbaum, A. L., Tres, L. L. 1975. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J Cell Biol*. 65. 258-70.
- Kimmins, S., Sassone-Corsi, P. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*. 434. 583-9.

7 Literatur

- Kleene, K. C. 2003. Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet Genome Res.* 103. 217-24.
- Klemenz, R.; Weber, U., Gehring, W. J. 1987. The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 15. 3947-59.
- Koundakjian, E. J.; Cowan, D. M.; Hardy, R. W., Becker, A. H. 2004. The Zuker collection: a resource for the analysis of autosomal gene function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 167. 203-6.
- Kuhn, R.; Kuhn, C.; Borsch, D.; Glatzer, K. H.; Schafer, U., Schafer, M. 1991. A cluster of four genes selectively expressed in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev.* 35. 143-51.
- Kwon, Y. K.; Murray, M. T., Hecht, N. B. 1993. Proteins homologous to the *Xenopus* germ cell-specific RNA-binding proteins p54/p56 are temporally expressed in mouse male germ cells. *Dev Biol.* 158. 99-100.
- Laberge, R., Boissonneault, G. 2005. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod.* 73. 289-96.
- Lecuyer, E.; Yoshida, H.; Parthasarathy, N.; Alm, C.; Babak, T.; Cerovina, T.; Hughes, T. R.; Tomancak, P., Krause, H. M. 2007. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell.* 131. 174-87.
- LeCuyer, K. A.; Behlen, L. S., Uhlenbeck, O. C. 1995. Mutants of the bacteriophage MS2 coat protein that alter its cooperative binding to RNA. *Biochemistry.* 34. 10600-6.
- Lewis, J. D.; Song, Y.; de Jong, M. E.; Bagha, S. M., Ausio, J. 2003. A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma.* 111. 473-82.
- Mansfield, J. H.; Wilhelm, J. E., Hazelrigg, T. 2002. Ypsilon Schachtel, a *Drosophila* Y-box protein, acts antagonistically to Orb in the *oskar* mRNA localization and translation pathway. *Development.* 129. 197-209.
- Marcon, L., Boissonneault, G. 2004. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod.* 70. 910-8.
- Martins, R. P.; Ostermeier, G. C., Krawetz, S. A. 2004. Nuclear matrix interactions at the human protamine domain: a working model of potentiation. *J Biol Chem.* 279. 51862-8.
- Metcalf, C. E., Wassarman, D. A. 2007. Nucleolar colocalization of TAF1 and testis-specific TAFs during *Drosophila* spermatogenesis. *Dev Dyn.* 236. 2836-43.

7 Literatur

- Michiels, F.; Gasch, A.; Kaltschmidt, B., Renkawitz-Pohl, R. 1989. A 14 bp promoter element directs the testis specificity of the *Drosophila* beta 2 tubulin gene. *EMBO J.* 8. 1559-65.
- Morales, C. R., Hecht, N. B. 1994. Poly(A)⁺ ribonucleic acids are enriched in spermatocyte nuclei but not in chromatoid bodies in the rat testis. *Biol Reprod.* 50. 309-19.
- Morales, C. R.; Kwon, Y. K., Hecht, N. B. 1991. Cytoplasmic localization during storage and translation of the mRNAs of *transition protein 1* and *protamine 1*, two translationally regulated transcripts of the mammalian testis. *J Cell Sci.* 100. 119-31.
- Muller, F., Tora, L. 2004. The multicoloured world of promoter recognition complexes. *EMBO J.* 23. 2-8.
- Muller, H. J., Altenburg, E. 1919. The rate of change of hereditary factors in *Drosophila*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 17. 10-14.
- Nakai, K., Horton, P. 1999. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* 24. 34-6.
- Nurminsky, D. I.; Nurminskaya, M. V.; De Aguiar, D., Hartl, D. L. 1998. Selective sweep of a newly evolved sperm-specific gene in *Drosophila*. *Nature.* 396. 572-5.
- Oliva, R. 2006. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 12. 417-35.
- Parisi, M.; Nuttall, R.; Edwards, P. et al.,. 2004. A survey of ovary-, testis-, and soma-biased gene expression in *Drosophila melanogaster* adults. *Genome Biol.* 5. R40.
- Parks, A. L.; Cook, K. R.; Belvin, M. et al.,. 2004. Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet.* 36. 288-92.
- Pointud, J.; Mengus, G.; Brancorsini, S.; Monaco, L.; Parvinen, M.; Sassone-Corsi, P., Davidson, I. 2003. The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *J Cell Sci.* 116. 1847-58.
- Rangan, P.; DeGennaro, M., Lehmann, R. 2008. Regulating gene expression in the *Drosophila* germ line. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 73. 1-8.
- Rangan, P.; DeGennaro, M.; Jaime-Bustamante, K.; Coux, R.; Martinho, R. G., Lehmann, R. 2009. Temporal and spatial control of germ-plasm RNAs. *Curr Biol.* 19. 72-7.
- Rathke, C. 2007. Chromatinveränderungen während der Spermienentwicklung von *Drosophila melanogaster* - von Histonen zu Protaminen - Dissertation. Philipps

7 Literatur

Universität Marburg, Entwicklungsbiologie.

- Rathke, C.; Baarends, W. M.; Jayaramaiah-Raja, S.; Bartkuhn, M.; Renkawitz, R., Renkawitz-Pohl, R. 2007. Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J Cell Sci*. 120. 1689-700.
- Rathke, C.*; Barckmann, B.*; Burkhard, S.; Jayaramaiah-Raja, S.; Roote, J.; Renkawitz-Pohl, R. 2010. Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *EJCB*. In Druck.
- Rau, A.; Buttgereit, D.; Holz, A.; Fetter, R.; Doberstein, S. K.; Paululat, A.; Staudt, N.; Skeath, J.; Michelson, A. M., Renkawitz-Pohl, R. 2001. *rolling pebbles (rols)* is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development*. 128. 5061-73.
- Renkawitz-Pohl, R.; Hollmann, M.; Hempel, L.; Schäfer, M. A. 2005. Spermatogenesis. (Gilbert, L.; Iatrou, K.; Gill, S. eds.) *Reproduction and Development*. 1. Elsevier BV. 157-177.
- Rouault, T. A.; Hentze, M. W.; Caughman, S. W.; Harford, J. B., Klausner, R. D. 1988. Binding of a cytosolic protein to the iron-responsive element of human ferritin messenger RNA. *Science*. 241. 1207-10.
- Rubin, G. M., Spradling, A. C. 1983. Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*. 11. 6341-51.
- Ryder, E.; Ashburner, M.; Bautista-Llacer, R. et al.,. 2007. The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genomewide chromosomal deficiency resource. *Genetics*. 177. 615-29.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B., Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239. 487-91.
- Sambrook, J.; Fritsch, E., Maniatis, T. 1998. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press,. Cold Spring Harbor, New York.
- Sassone-Corsi, P. 2002. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*. 296. 2176-8.
- Sassone-Corsi, P. 2005. Transcription factors governing male fertility. *Andrologia*. 37. 228-9.
- Saunders, P. T.; Millar, M. R.; Maguire, S. M., Sharpe, R. M. 1992. Stage-specific expression of rat *transition protein 2* mRNA and possible localization to the chromatoid body of step 7 spermatids by *in situ* hybridization using a nonradioactive riboprobe. *Mol Reprod Dev*. 33. 385-91.
- Saurin, A. J.; Shao, Z.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P., Kingston, R. E. 2001. A

7 Literatur

- Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature*. 412. 655-60.
- Sawamura, K.; Roote, J.; Wu, C., Yamamoto, M. 2004. Genetic complexity underlying hybrid male sterility in *Drosophila*. *Genetics*. 166. 789-96.
- Schmidt, E. E.; Hanson, E. S., Capecchi, M. R. 1999. Sequence-independent assembly of spermatid mRNAs into messenger ribonucleoprotein particles. *Mol Cell Biol*. 19. 3904-15.
- Schumacher, J. M.; Lee, K.; Edelhoff, S., Braun, R. E. 1995. Spnr, a murine RNA-binding protein that is localized to cytoplasmic microtubules. *J Cell Biol*. 129. 1023-32.
- Shaner, N. C.; Campbell, R. E.; Steinbach, P. A.; Giepmans, B. N. G.; Palmer, A. E., Tsien, R. Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 22. 1567-72.
- Shaner, N. C.; Steinbach, P. A., Tsien, R. Y. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods*. 2. 905-9.
- Steger, K. 1999. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol (Berl)*. 199. 471-87.
- Steger, K. 2001. Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anat Embryol (Berl)*. 203. 323-34.
- Stros, M.; Launholt, D., Grasser, K. D. 2007. The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci*. 64. 2590-606.
- Struhl, K.; Kadosh, D.; Keaveney, M.; Kuras, L., Moqtaderi, Z. 1998. Activation and repression mechanisms in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 63. 413-21.
- Tan, R., Frankel, A. D. 1995. Structural variety of arginine-rich RNA-binding peptides. *PNAS*. 92. 5282-6.
- Thibault, S. T.; Singer, M. A.; Miyazaki, W. Y. et al.,. 2004. A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet*. 36. 283-7.
- Tokuyasu, K. T.; Peacock, W. J., Hardy, R. W. 1972. Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 124. 479-506.
- Torregrosa, N.; Dominguez-Fandos, D.; Camejo, M. I.; Shirley, C. R.; Meistrich, M. L.; Balleca, J. L., Oliva, R. 2006. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod*. 21. 2084-9.

7 Literatur

- Tweedie, S.; Ashburner, M.; Falls, K. et al.,. 2009. FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Res.* 37. D555-9.
- Vazquez, J.; Belmont, A. S., Sedat, J. W. 2001. Multiple regimes of constrained chromosome motion are regulated in the interphase *Drosophila* nucleus. *Curr Biol.* 11. 1227-39.
- Vogel, E. W., Natarajan, A. T. 1995. DNA damage and repair in somatic and germ cells in vivo. *Mutat Res.* 330. 183-208.
- Wakimoto, B. T.; Lindsley, D. L., Herrera, C. 2004. Toward a comprehensive genetic analysis of male fertility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 167. 207-16.
- White-Cooper, H. 2009. Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. *Reproduction.* .
- White-Cooper, H.; Schafer, M. A.; Alphey, L. S., Fuller, M. T. 1998. Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*. *Development.* 125. 125-34.
- Wilhelm, J. E.; Mansfield, J.; Hom-Booher, N.; Wang, S.; Turck, C. W.; Hazelrigg, T., Vale, R. D. 2000. Isolation of a ribonucleoprotein complex involved in mRNA localization in *Drosophila* oocytes. *J Cell Biol.* 148. 427-40.
- Wouters-Tyrou, D.; Martinage, A.; Chevaillier, P., Sautiere, P. 1998. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie.* 80. 117-28.
- Yan, W.; Ma, L.; Burns, K. H., Matzuk, M. M. 2003. HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100. 10546-51.
- Yang, J.; Medvedev, S.; Yu, J.; Schultz, R. M., Hecht, N. B. 2006. Deletion of the DNA/RNA-binding protein MSY2 leads to post-meiotic arrest. *Mol Cell Endocrinol.* 250. 20-4.
- Yang, J.; Morales, C. R.; Medvedev, S.; Schultz, R. M., Hecht, N. B. 2007. In the absence of the mouse DNA/RNA-binding protein MSY2, messenger RNA instability leads to spermatogenic arrest. *Biol Reprod.* 76. 48-54.
- Yang, J.; Porter, L., Rawls, J. 1995. Expression of the dihydroorotate dehydrogenase gene, dhod, during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 246. 334-41.
- Zambrowicz, B. P.; Harendza, C. J.; Zimmermann, J. W.; Brinster, R. L., Palmiter, R. D. 1993. Analysis of the mouse *protamine 1* promoter in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90. 5071-5.
- Zhao, J., Klyne, G., Benson, E., Gudmannsdottir, E., White-Cooper H. and Shotton, D. (2010). FlyTED: the *Drosophila* Testis Gene Expression Database. *Nucleic Acids Research (Database Issue, January 2010)*, in Druck.

8 Abkürzungen

8 Abkürzungen

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
cp	coat protein
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
HMG-Box	high mobility group box
kb	Kilobasen
kDA oder kD	Kilodalton
Levamisol	L(-)2,3,5,6-Tetrahydro-6-phenylimidazol[2,1-6]-thiazol
M	Molar
mRNA	messenger-RNA, Boten-RNA
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“ (offener Leserahmen)
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	ReverseTranskriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Stemloop, Haarnadelschlaufe
SUMO	small ubiquitin-related modifier
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TAF	TATA-Box associated factor
TBE	Tris-Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

8 Abkürzungen

Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Units
UAS	Upstream Activating Sequence
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -Dthiogalaktosid

9 CV Bridlin Barckmann

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Name	Bridlin Barckmann
Adresse	Barfüßerstraße 18, 35037 Marburg, Deutschland
Telefon	0049-(0)6421-14748
Handy	0049-(0)170-7629962
E-mail	bridlinbarckmann@yahoo.de
Nationalität	Deutsch
Geburtstag	12. Juni 1980

SCHULE UND AUSBILDUNG

Oktober 2008 – andauernd

Philipps-Universität, Entwicklungsbiologie, Marburg, Deutschland

Projekt	Transcriptional and translational control of spermatogenesis relevant genes
Position	wissenschaftliche Mitarbeiterin, Arbeit an der Doktorarbeit
PI	Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl

Oktober 2005 – Oktober 2008

Philipps-Universität, Entwicklungsbiologie, Marburg, Deutschland

Projekt	Transcriptional and translational control of spermatogenesis relevant genes
Position	GRK 767 Graduiertenschule Doktorandenstipendium
PI	Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl

Juni 2006 – August 2006

Stanford University, Kalifornien, USA: Kooperation

Projekt	anti-tTAF ChIPs an den Promotoren von <i>Protamine B</i> und <i>Mst77F</i>
---------	--

9 CV Bridlin Barckmann

PI Prof. Dr. M.T. Fuller

September 2000 – September 2005

Philipps-Universität Marburg, Deutschland

Diplom in Biologie (1.2)

Fächer Entwicklungsbiologie (1.0), Genetik (1.0), Pharmakologie und Toxikologie (1.7), Mikrobiologie (Zusatzfach 2.0)

Diplomarbeit “Analyse der Transkription- und Translationskontrolle zur Synthese des Mst77F-Proteins, einer Komponente des kondensierten Chromatins des Spermiums in *Drosophila melanogaster*“ (1.2)

März 2004 - Juni 2004

Oxford University, Zoologie

Position Praktikum

Projekt Erste Analysen von Microarraydaten, die das Expressionsprofil von Wildtyp und Meiotic-arrest-Mutanten der Aly-Klasse verglichen, mittels *in situ* Hybridisierungen.

PI Dr. H. White-Cooper

1991 - 2000

Gesamtschule Konradsdorf, Germany

allgemeine Hochschulreife Abitur 1.4

PUBLIKATIONEN

Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis

Christina Rathke *, **Bridlin Barckmann** *, Silja Burkhard; Sunil Jayaramaiah-Raja, John Roote und Renate Renkawitz-Pohl

* contributed equally

Manuskript in Druck bei EJCB

9 CV Bridlin Barckmann

Protamine B and Mst77F are direct targets of tTAFs and the role of BRD1L1 in counteracting the tTAFs function.

Bridlin Barckmann, Xin Chen, Katja Leser, Magret T. Fuller, Renate Renkawitz-Pohl und Christina Rathke

Manuskript in Vorbereitung

KONFERENZEN

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Genetik

Köln, Deutschland, Sep 2009

Poster Presentation

Germ cells

Cold Spring Harbour meeting

Cold Spring Harbour laboratory, New York, USA, Okt 2008

Poster Presentation

31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie

Marburg, Deutschland, März 2008

mRNA localisation

EMBO workshop

Il Chiocco, Italien, Juni 2007

Poster Presentation

GfE Gesellschaft für Entwicklungsbiologie 17. Jahrestagung

Marburg, Deutschland, März 2007

Poster Presentation

GfE Gesellschaft für Entwicklungsbiologie 16. Jahrestagung

Münster, Deutschland, April 2005

9 CV Bridlin Barckmann

FÄHIGKEITEN

Methoden und Techniken

DNA	grundlegende DNA Techniken, Southern Blot, ChIPs
RNA	Handhabung und Isolierung von RNA, RT-PCR
Histologie	Präparation von <i>Drosophila</i> Testes, <i>in situ</i> Hybridisation und Immunfärbungen an <i>Drosophila</i> Testes
Genetik	klassische Genetik an <i>Drosophila</i> , Herstellung transgener Fliegen, Herstellung von Mutanten mittels des FRT/Flp system

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	schriftlich und mündlich fließend
Französisch	grundlegende Kenntnisse

Computer Fähigkeiten

Standard Microsoft office Software
Adobe Photoshop
LateX text layout software
div. Programmes zur Nutzung in der Molekularbiologie (z.B. LaserGene, Ape u.s.w.)

Workshops

In vivo imaging Kurs 5 Tage Workshop in englisch
Optical Imageing Centre (OIC)
Rotterdam, Niederlande

9 CV Bridlin Barckmann

Scientific Presentation
Bioscript Workshop,
Marburg, Deutschland

2.5 Tage workshop in englisch

Getting funded
Bioscript Workshop,
Marburg, Deutschland

2.5 Tage workshop in englisch

10 Danksagung

10 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe zu absolvieren, und die herzliche und kompetente Betreuung.

Prof. Dr. Michael Bölker danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ich danke Christina Rathke und Stephan Awe für die gute Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen im „Spermo-Team“ und Silja Burkhart für die Hilfe mit dem Muller5-Test und den diversen Klonierungen für das λ N/BoxB-System während ihrer Bachelor-Arbeit.

Ruth Hyland danke ich für die Übernahme der unzähligen Injektionen, und Inge Simons danke ich für das Auskratzen vieler, vieler Fliegenflaschen.

Ich danke Dr. Xin Chen und Prof. Minx Fuller für die Möglichkeit die Testis-ChIPs im Fullerlab in Stanford durchzuführen.

Danke an Dr. Michael Feldbrügge, Julian König und Sebastian Baumann für die Plasmide zur Klonierung des MS2cp/MS2sl-Systems sowie des λ N/BoxB-Systems.

Angela Sickmann danke ich für die tägliche Teepause, die hat immer gut getan!

Dem 064-Labor und Nadine Müller danke ich für die nette Zusammenarbeit und die gute Stimmung im Labor, die es einfach gemacht hat trotz diverser Tiefpunkte in der Forschungsarbeit immer noch gerne ins Labor zu kommen.

Der gesamten Arbeitsgruppe RePo danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre.

Christopher danke fürs tapfere Ertragen meiner Stimmungsschwankungen besonders während des letzten halben Jahres!

Catrin, Anne-Katrin und Annette danke einfach für reden, zuhören, Spaß haben!

Ganz besonders liebevoller Dank meinen Eltern und meiner Schwester, es tut gut eine starke Familie hinter sich zu wissen!



11 Erklärung

11 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Regulation der Transkription und Translation von *Mst77F* und der Protamine und die Funktion der Protamine während der Spermiogenese von *Drosophila*“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner andere Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn, 2009