

In der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* wird das Chromatin-assoziierte Protein Mst77F in seiner Translation, in seiner Kernlokalisierung und in seiner Chromatin-kompaktierenden Funktion über distinkte Bereiche kontrolliert.

Dissertation

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

dem Fachbereich Biologie der



vorgelegt von

Sophie Kaiser
aus Erfurt

Marburg/ Lahn 2014

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer: 1180)
als Dissertation am 17.07.2014 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alexander Brehm

Tag der mündlichen Prüfung am: 25.07.2014

*Für meine Eltern
& Robert*

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Die Spermatogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2.2	Die Chromatinreorganisation während der Spermiogenese von <i>Drosophila</i>	5
2.3	Die Einführung von DNA-Strangbrüchen während der <i>Drosophila</i> Spermiogenese	7
2.4	Die Reparatur der DNA-Brüche erfolgt nicht über Non-Homologes End Joining	9
2.5	Hohes Expressionsniveau an Ubiquitin in elongierenden Spermatidenkernen	10
2.5.1	Die Funktion des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Rad6 und seiner Homologen	11
2.6	Die Regulation von Genen während der Spermatogenese von <i>Drosophila</i>	12
2.6.1	Die Regulation der Transkription translational reprimierter mRNAs durch tTAFs	14
2.6.2	Die Expression von Mst77F und den Protaminen wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert	15
2.7	Die Regulation des Kernimports via Importine	16
2.7.1	Die Importin- α mRNAs werden in der Spermatogenese von Mäusen und <i>Drosophilae</i> unterschiedlich transkribiert	17
2.8	Zielsetzung	19
3	Material	20
3.1	Gerätschaften	20
3.2	Medien und Chemikalien	20
3.3	Nährmedien	23
3.4	Enzyme	23
3.5	Antikörper und Antiseren	23
3.6	Molekulare Reagenzien und Kits	24
3.7	Puffer und Lösungen	25
3.8	Bakterienstämme	25

3.9	Hefestamm _____	26
3.10	Fliegenstämme _____	26
3.11	Zell-Linie _____	28
3.12	Plasmide und Vektoren _____	28
3.13	cDNAs _____	29
3.14	Synthetische Oligonukleotide (Primer) _____	29
3.15	Sonstige Materialien _____	32
3.16	Software und Internetseiten _____	33
4	Methoden _____	34
4.1	Umgang mit <i>Drosophila melanogaster</i> _____	34
4.1.1	Stammhaltung _____	34
4.1.2	<i>Drosophila</i> -Kreuzungsexperimente _____	34
4.1.4	Herstellung transgener Fliegen _____	35
4.1.5	Chromosomale Lokalisation des P-Elementes _____	37
4.2	Molekularbiologische Methoden _____	38
4.2.1	Präparation und Analyse von DNA _____	38
4.2.1.1	Präparation genomischer DNA aus <i>Drosophilae</i> _____	38
4.2.1.2	Präparation genomischer DNA aus einer einzelnen Fliege _____	38
4.2.1.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR) _____	39
4.2.1.4	Agarosegelelektrophorese von DNA/RNA _____	40
4.2.1.5	Erzeugung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> _____	41
4.2.1.6	Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> _____	41
4.2.1.7	Ligation von PCR-Produkten in TOPO [®] -Vektoren _____	41
4.2.1.8	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> in analytischen Maßstab _____	42
	(Mini-Präparation) _____	42
4.2.1.9	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> in präparativen Maßstab _____	43
	(Midi-präparation) _____	43
4.2.1.10	DNA-Restriktionsverdau mit Endonukleasen _____	44
4.2.1.11	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA _____	44
4.2.1.12	DNA-Extraktion aus Agarosegelen _____	45
4.2.1.13	Ligation _____	46
4.2.1.14	Klonieren von Produkten mit Hilfe des Gateway-Systems _____	46
4.2.2	Präparation und Analyse von RNA _____	46

4.2.2.1	RNA-Isolation aus ganzen <i>Drosophilae</i> , Testes, Larven und Embryonen	46
4.2.2.2	Aufreinigung von polyA ⁺ -mRNA	47
4.2.2.3	cDNA Synthese	48
4.2.2.4	Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der RT-PCR	49
4.3	Histologische Methoden	49
4.3.1	<i>in situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila melanogaster</i> Testes	49
4.3.2	X-Gal-Färbung an <i>Drosophila melanogaster</i> Testes	52
4.3.3	Immunfluoreszenz zum Antigen Nachweis an Testes-Quetschpräparaten	52
4.3.4	Antigennachweis durch Immunfluoreszenz an Quetschpräparaten von Speicheldrüsen	53
4.3.5	Immunfluoreszenz zum Antigennachweis an <i>Drosophila</i> SL2-Zellen	54
4.4	Methoden aus der Zellkultur	55
4.4.1	Kultivieren von <i>Drosophila</i> SL2-Zellen	55
4.4.2	Aussäen von <i>Drosophila</i> SL2-Zellen	55
4.4.3	Transfektion von <i>Drosophila</i> Schneider Zellen	55
4.5	Präparation und Analyse von Proteinen	56
4.5.1	Proteinextraktion	56
4.5.2	Co-Immunopräzipitation (CoIP)	57
4.5.3	SDS-Gelelektrophorese	57
4.5.4	Western Blot Analyse	58
4.6	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	60
4.6.1	Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems	60
4.6.2	Hefekultur	61
4.6.3	Herstellung kompetenter Hefezellen	61
4.6.4	Transformation kompetenter Hefezellen	61
4.6.5	Überstreichen der Kotransformanten	62
5	Ergebnisse	63
5.1	Nukleasen als potenzielle Kandidaten zum Setzen von DNA-Strangbrüchen während des Histon-Protamin-Wechsels	63
5.1.1	Die Endonukleasen CG31682, CG31679 und CG4683 werden nicht in den Kernen des Kanustadiums exprimiert	63
5.1.2	Squash und CG15484 als mögliche Induktoren von DNA-Brüchen während des Histon-Protamin-Wechsels	65

5.1.2.1	Transkripte von <i>squash</i> und <i>squash-like</i> sind im Zytoplasma von Spermatozyten zu detektieren _____	66
5.1.2.2	Das Fusionsprotein Squash-eGFP zeigt ein hohes Expressionslevel im Zytoplasma von mitotischen Zellen _____	67
5.2	Das Ubiquitin-konjugierende Enzym UbcD6 sowie weitere Komponenten des Rad6-Reparaturweges werden während der Spermatogenese von <i>Drosophila</i> exprimiert _____	69
5.2.1	UbcD6-eGFP wird im Zytoplasma exprimiert _____	69
5.2.2	Die Isoform UbcD6-RA wird im Testis transkribiert _____	70
5.2.3	Das Fusionsprotein UbcD6-GFP mit einer genspezifischen 3' UTR wird in den Schwanz-Zystzellen exprimiert _____	71
5.2.4	Die Komponenten des Rad6-Signalweges werden nur in den frühen Stadien der Spermatogenese von <i>Drosophila</i> transkribiert _____	72
5.3	Regulatorische sowie funktionelle Analysen des Chromatin-assoziierten Proteins Mst77F _____	75
5.3.1	Die Regulation der translationalen Repression von Mst77F und Protamin B ____	75
5.3.1.1	Die 5' UTR ist essenziell für das Transkriptlevel von Mst77F und Protamin B __	76
5.3.1.2	Die Translation von Mst77F wird über Bereiche im offenen Leserahmen reguliert _____	77
5.3.1.3	Die Kontrolle der Translation von Mst77F erfolgt über die N-terminalen 222 bp _____	80
5.3.1.4	Mst77F wird in somatischen Zellen nur schwach exprimiert _____	81
5.3.1.5	Mst77F und Protamin B können mit Hilfe eines Keimbahntreibers in Spermatozyten exprimiert werden _____	83
5.3.2	Der Einfluss von Mst77F auf die Chromatinstruktur _____	85
5.3.2.1	Die Überexpression von Mst77F-eGFP im wildtypischen Mst77F Hintergrund führt zu deformierten Spermakernen _____	85
5.3.2.2	Eine Kombination aus dem C- und N-terminalen Bereich von Mst77F fördert die abnormale Kernform _____	89
5.3.2.2.1	Die nukleäre Lokalisation von Mst77F erfolgt über den C-terminalen Bereich von Mst77F _____	89
5.3.2.2.2	Mst77F besitzt eine N-terminale Coiled-Coil Domäne _____	92
5.3.3	Die Importine Karyopherin-alpha3 und alphaKaryopherin-4 sind im Testis exprimiert _____	94

5.3.3.1	Die mRNA kodierend für die Isoform <i>Kap-alpha3-RA</i> wird im Testes transkribiert _____	94
5.3.3.2	<i>alphaKap4</i> Transkripte sind bis in elongierende Stadien detektierbar _____	96
5.3.3.3	<i>Drosophila</i> Stämme mit einer P-Element Insertion in <i>Kap-alpha3</i> ^{EY02572} zeigen eine wildtypische Kernlokalisation von Mst77F _____	97
5.3.3.4	In den Allelen <i>alphaKap4</i> ^{M106313} und <i>CG32406</i> ^{PL00219} wird Mst77F wildtypisch exprimiert _____	99
5.3.4	Die Identifikation von Mst77F-Interaktionspartnern _____	101
5.3.4.1	In transfizierten <i>Drosophila</i> SL2-Zellen werden Mst77F, ProtA, ProtB sowie Tpl ^{94D} ineffizient exprimiert _____	102
5.3.4.2	Analyse weiterer möglicher direkter oder indirekter Interaktionspartner von Mst77F _____	104
5.3.4.2.1	Die Transkripte von <i>ocnus</i> , <i>CG10252</i> und <i>CG12861</i> sind bis in postmeiotische Stadien nachweisbar _____	105
5.3.4.2.2	Die Fusionsproteine Ocnus-, <i>CG10252</i> - und <i>CG12861</i> -eGFP sind in den Flagellen detektierbar und in <i>Drosophila</i> SL2-Zellen werden die Fusionsproteine <i>CG10252</i> -eGFP und <i>CG12861</i> -eGFP im Zytoplasma exprimiert _____	106
6	Diskussion _____	108
6.1	Die Endonukleasen <i>CG31679</i> , <i>CG31682</i> , <i>CG32463</i> und <i>CG4683</i> , wie auch Squash und Squash-like sind nicht am Setzen von DNA-Brüchen zum Zeitpunkt des H-P-Wechsels beteiligt _____	108
6.1.1	Die Nukleasen <i>CG31679</i> , <i>CG31682</i> , <i>CG32463</i> und <i>CG4683</i> bilden Homologe der Endonuklease G und werden in mitochondrialen Derivaten exprimiert _____	108
6.1.2	Squash und Squash-like werden nur in Spermatozyten transkribiert und auch das Squash-Fusionsprotein ist nur in mitotischen Zellen zu detektieren _____	109
6.2	UbcD6 als ein mögliches DNA-Reparaturprotein während des Histon-Protamin-Wechsels _____	111
6.2.1	Das Fusionsprotein UbcD6-eGFP ist nicht in den Spermatischen Kernen des Kanustadiums zu detektieren _____	111
6.2.2	Die Reparatur der DNA-Brüche erfolgt nicht mit Hilfe von Komponenten der Rad6-Postreplikationsreparatur _____	112

6.3	Die Regulation der Transkription und Translation der Proteine Mst77F und ProtB erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen _____	115
6.3.1	Die Translationsinitiation von Mst77F und Protamin B erfolgt auch über Bereiche im offenen Leserahmen _____	115
6.3.2	Mst77F wird keimbahnspezifisch exprimiert und unterliegt in Spermatozyten einer speziellen Translationsmaschinerie _____	118
6.4	Mst77F und dessen Funktion in der Kompaktierung des Chromatins _____	120
6.4.1	Ein Zusammenspiel aus der Kernlokalisierung über den C-Terminus und mögliche Homodimerisierung über die N-terminalen Coiled-Coil Domäne, bedingt die abnormale Kernform nach einer ektopischen Expression von Mst77F _____	121
6.4.2	Der Import von Mst77F in den Zellkern erfolgt nicht über einen Keimbahn-spezifischen Kernimport-Mechanismus und auch unabhängig vom Importin-alpha Protein α Kap4 _____	122
6.4.3	CG10252-eGFP und CG12861-eGFP bilden in den Flagellen von Spermatisden potenzielle Interaktionspartner von Mst77F _____	124
6.5	Ausblick _____	126
7	Anhang _____	128
7.1	Ergänzende Abbildungen _____	128
7.2	Liste der im Rahmen dieser Arbeit generierten Konstrukte _____	131
8	Literatur _____	134
9	Abkürzungen _____	145
10	Erklärung _____	147

1 ZUSAMMENFASSUNG

In der Spermiogenese von *Drosophila* wird im Kanustadium der Wechsel von einer auf Histonen- zu einer auf Protaminen-basierenden Chromatinstruktur von einer großen Menge an DNA-Brüchen begleitet. Die Analyse der Induktion wie auch der Reparatur dieser Brüche, liegt im Fokus des ersten Teils dieser Dissertation. Hierfür wird zunächst die Beteiligung von Endonukleasen am Setzen der DNA-Brüche untersucht, doch aufgrund der Expressionsmuster können die Nukleasen *Teng11-4*, wie auch *Squash* und *Squash-like* als Induktoren der Strangbrüche ausgeschlossen werden. Parallel zu den DNA-Brüchen werden große Mengen an *UbcD6*, dem *Drosophila* Homolog zu *Rad6* in Hefen, exprimiert und eine Beteiligung des Enzyms an der Reparatur der DNA wurde in Betracht gezogen. Jedoch ist es nicht möglich das Fusionsprotein *UbcD6-eGFP* im Kanustadium zu exprimieren und so wird die Verteilung weiterer Proteine der *Rad6*-Postreplikationsreparatur untersucht. Allerdings sind die Transkripte der Komponenten ausschließlich in frühen Spermatogenesestadien zu detektieren und so scheint die Reparatur der Brüche durch *UbcD6* auf anderen Mechanismen zu beruhen.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation befasst sich jedoch mit der Analyse des Histon-ähnlichen Proteins *Mst77F*. *Mst77F* ist ein Chromatin-assoziiertes Protein, dessen Transkription *tTAF*-abhängig erfolgt und zudem einer translationalen Repression unterliegt. Jedoch wird die translationale Repression von *Mst77F*, im Gegensatz zu den meisten anderen Testis-spezifischen Genen, nicht über die 5' UTR reguliert. Vielmehr zeigen meine Analysen von transgenen Fliegen, dass die Repression wie auch die Aktivierung der Translation der *Mst77F* mRNA über Bereiche im ORF kontrolliert wird. Weiterführende Expressionsstudien zeigen zudem, dass *Mst77F* in Spermatozyten einer speziellen Transkriptionsrepressionskontrolle unterliegt und die Translation von *Mst77F* spezifisch in der Spermiogenese aktiviert wird. Eine Translation in somatischen Zellen erfolgt hingegen nur sehr ineffizient.

Mst77F bildet eine Komponente des reifen Spermiums und überraschenderweise zeigen 20 % der späten Spermatidenkerne, nach einer ektopischen Expression von *Mst77F-eGFP*, im wildtypischen *Mst77F*-Hintergrund, eine abnormale Kernform. Zudem kann gezeigt werden, dass dieser Phänotyp in Abhängigkeit von speziellen Proteindomänen, einer C-terminalen Domäne mit Kernlokalisierungssignalen und einer N-terminalen Coiled-Coil Domäne, auftritt. Über die Coiled-Coil Domäne können Proteininteraktionen bzw. Vernetzungen von Proteinen erfolgen. *in vitro* führt dies zu einer Kompaktierung im Chromatin, in Übereinstimmung mit den hier präsentierten *in vivo* Daten. Daher kann postuliert werden, dass *Mst77F* während der Reifung des Spermiums, eine Region-spezifische Chromatinkondensation, ermöglicht.

SUMMARY

During *Drosophila* spermatogenesis the replacement of histones by protamines at the canoe stage is accompanied by numerous DNA breaks. The induction and repair of these DNA breaks are analyzed in the first part of this thesis. First I analyzed the influence of endonucleases in setting DNA breaks, but neither Tengl1-4, nor Squash or Squash-like are expressed during the switch and therefore are not required for the induction of DNA breaks. In parallel to the DNA breaks high amounts of UbcD6, the *Drosophila* homolog of yeast Rad6, are detectable. A specific role of the enzyme in DNA repair can be considered. But unfortunately it is not possible to express the fusion protein UbcD6-eGFP in canoe stage nuclei. Therefore we started analysing other components of the Rad6 postreplication repair. However, the transcripts of the components are transcribed only in early stages of spermatogenesis. Thus, the repair of DNA breaks via UbcD6 seems to base on an alternative repair mechanism.

The major part of this thesis deals with the linker *histone-like* protein Mst77F, a chromatin component of mature sperm. It was shown that the transcription of Mst77F depends on tTAFs und that *Mst77F* mRNA underlies translational repression. In addition, I could show that, in contrast to the majority of testis-specific genes, the 5' UTR is not sufficient to mediate translational repression of the corresponding mRNAs. Interestingly, analyses of transgenic flies clearly highlight distinct regions within the ORF essential for translational repression and activation of *Mst77F* mRNAs. Furthermore, analyzing ectopic expression of Mst77F suggests that translation of Mst77F may be specific for germ cells and that in spermatocytes *Mst77F* transcript expression is controlled by a special transcriptional machinery.

Mst77F is a chromatin component of the mature sperm and surprisingly, after ectopic expression of Mst77F-eGFP in a *wild-type* background, about 20 % of late spermatid nuclei look abnormal. It can be demonstrated that the phenotype depends on special domains in the protein structure, a C-terminal domain with several nuclear location signals and one N-terminal coiled-coil domain. The coiled-coil domain is a typical protein-protein interaction domain which allows a kind of crosslinking of the proteins. This fits very well with *in vitro* data, indicating a role of Mst77F in compaction of the chromatin. We hypothesize that Mst77F affords, in case of sperm maturation, chromatin condensation in specific regions.

2 EINLEITUNG

Die Spermatogenese ist in vielen Tieren, von *Drosophila melanogaster* bis hin zu den Mammaliern, stark konserviert (Übersichtsartikel: Rathke et al., 2014). Sie bildet ein komplexes Zelldifferenzierungssystem, bei dem sich aus einer diploiden Stammzelle ein befruchtungsfähiges haploides Spermium entwickelt. Eine große Menge an Genprodukten wird benötigt, welche nicht nur zeitlich, sondern auch gewebespezifisch reguliert werden müssen (Übersichtsartikel: White-Cooper, 2010). Es kommt zu morphologischen Änderungen des Spermatidenkerns, einhergehend mit einer Umstrukturierung von DNA-Protein Komplexen und der daraus resultierenden Kondensation des Chromatins.

Für die Untersuchung der zeitlich begrenzten und gewebespezifischen Translation der Genprodukte, wie auch für die Chromatinkondensation, bildet die *Drosophila* Spermatogenese ein perfektes Modellsystem. So besitzt sie nicht nur einen vergleichbar kurzen Lebenszyklus, sondern eine ebenso gute methodische Zugänglichkeit. Transgene Tiere können schnell erzeugt und genetische Hintergründe analysiert werden.

2.1 Die Spermatogenese in *Drosophila melanogaster*

Die Testes adulter Männchen von *Drosophila melanogaster* sind paarig angelegt und bilden schneckenartig aufgerollte Schläuche, in denen die Keimzellen, ihrem Entwicklungsstadium nach, von apikal nach distal angeordnet sind. An der Testis-Spitze befindet sich die Hub-Region, das Stammzellzentrum, bestehend aus somatischen Zystvorläuferzellen und Keimbahnstammzellen. Während der ersten asymmetrischen Zellteilung einer Stammzelle entstehen zwei Tochterzellen, von denen eine ihren Stammzellcharakter beibehält und die andere das Spermatogonium bildet (siehe Abbildung 2.0). Das Spermatogonium wird von zwei somatischen Zystzellen umgeben und beginnt mit der Keimzelldifferenzierung (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Die Zystzellen sind vermutlich funktionell analog zu den Sertolizellen aus Säugern und umschließen alle folgenden Stadien der Keimzelldifferenzierung. Das Spermatogonium durchläuft vier mitotische Teilungen mit unvollständiger Zytokinese. Die entstehenden sechzehn primären Spermatozyten bleiben über Zytoplasmabrücken verbunden und treten synchron in die meiotische Pro-Phase ein. In der 3,5 Tage andauernden G2-Phase (Lindsley und Tokuyasu, 1980) kommt es zu einem rapiden Anstieg der Transkription und einem Zellwachstum um den Faktor 25. Mit dem Beginn der

meiotischen Teilungen sinkt das Transkriptionslevel wieder fast bis zum Erliegen (Bendena et al., 1991; Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl, 2005, Barreau et al., 2008).

Aus den meiotischen Teilungen gehen 64 haploide Spermatiden hervor und durchlaufen den Prozess der Spermio-genese. Die Spermio-genese umfasst die Umformung des Zellkerns von einer runden zu einer nadelförmigen Struktur. Dieser Prozess wird von der Reorganisation des Chromatins begleitet, einhergehend mit dem Austausch von Histonen zu Protaminen (siehe Kapitel 2.2 Seite 11), und resultiert in einer Volumenreduktion des Spermatidenkerns um den Faktor 200 (Übersichtsartikel: Fuller, 1993). Zudem kommt es zu einer Umstrukturierung vieler Zellorganellen. Das Axonem des Flagellums beginnt vom Basalkörper am Nukleus her auszuwachsen und die Mitochondrien werden umgeformt. Das Flagellum erreicht eine Länge von bis zu 1,8 mm (Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl, 2005).

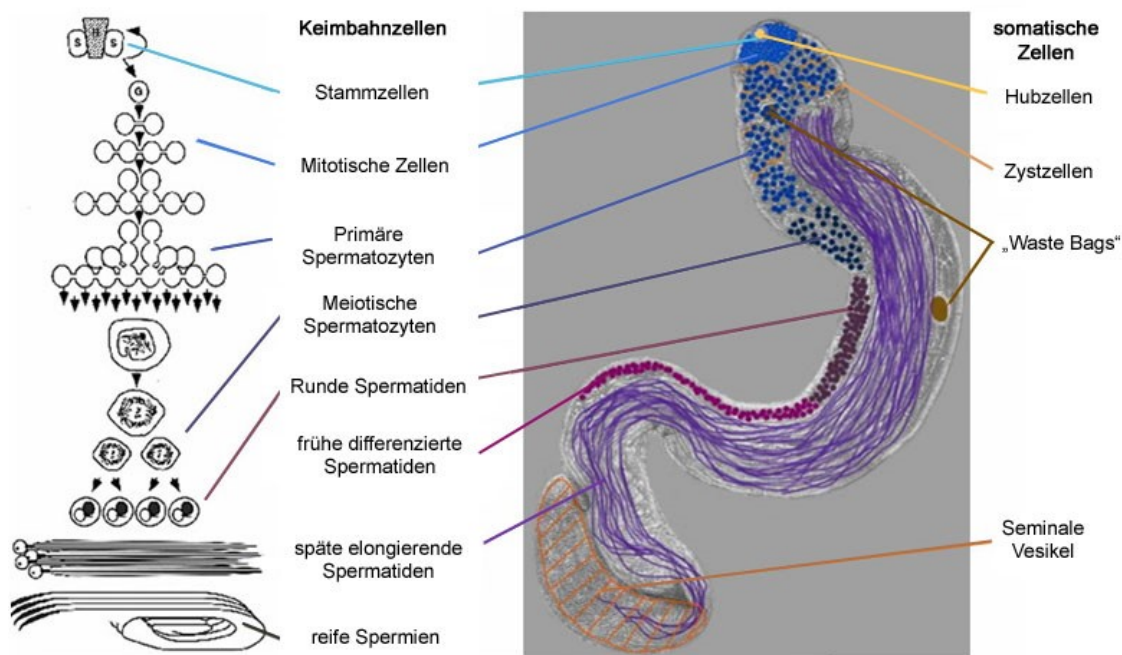


Abb. 2.0: Die Spermato-genese von *Drosophila melanogaster* im Überblick. Schematische Darstellung der Spermato-genese von *Drosophila*. Aufgezeigt sind die einzelnen Entwicklungsstadien der Spermato-genese, von den Stammzellen (oben links) bis hin zu den reifen Spermien (unten links). Auf der rechten Seite ist eine Durchlicht-Aufnahme eines adulten Testis gezeigt und die Lage der einzelnen Zellstadien farblich markiert. (Abbildung modifiziert nach: © Helen White-Cooper; <http://www.fly-ted.org>, Zhao et al., 2010)

Es folgt die Individualisierung. Der Individualisierungskomplex trennt die Spermatiden, die Zytoplasmabrücken werden aufgelöst und das überschüssige Zytoplasma in die „Waste Bags“ abgestriphen (Hicks et al., 1999). Die individualisierten Spermien werden aus dem Zystverband gelöst und in die Samenblase entlassen (Tokuyasu et al., 1972).

2.2 Die Chromatinreorganisation während der Spermio-genese von *Drosophila*

Im Laufe der Säugetier-Spermio-genese werden die somatischen Core-Histone von der DNA gelöst und durch Transitionsproteine (TP1 und TP2) ersetzt. Dies sind kleine basische Proteine, deren Funktion weitgehend unbekannt ist (Übersichtsartikel: Braun, 2001). Die Transitionsproteine werden anschließend durch stark basische Protamine ersetzt. Sie sind reich an Cysteinen und Argininen und ermöglichen in den reifen Spermien eine hoch kondensierte und transkriptional inaktive Chromatinstruktur (Übersichtsartikel: Sassone-Corsi, 2002). In den meisten Säugern existiert ein Protamingen, in Mäusen und Menschen existieren zwei Protamingene (Cho et al., 2001). Während in Fischen und Vögeln die Histone vermutlich direkt durch Protamine ersetzt werden, bleibt in Anneliden und Echinodermaten eine auf Histonen basierende Chromatinstruktur auch in reifen Spermien erhalten. Ein Rest an Histonen ist auch in den reifen Spermien von Säugern zu verzeichnen. Er variiert jedoch je nach Spezies zwischen 5 % und 20 %. In Menschen verbleiben etwa 10-20 % der Histone am Chromatin (Übersichtsartikel: Wouters-Tyrou et al., 1998).

In der Spermio-genese von *Drosophila melanogaster* wird der Wechsel von einer auf Histonen zu einer auf Protaminen basierenden Chromatinstruktur vollzogen (siehe Abbildung 2.1) (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). *Drosophila* besitzt zwei Protamingene, *Mst35Ba* (*protamine A*) und *Mst35Bb* (*protamine B*). Die Protamine sind größer als die Protamine von Säugern und besitzen eine HMG-Box (high mobility group), eine Domäne welche die Interaktion zwischen Protein und DNA ermöglicht (Dorus et al., 2006; Übersichtsartikel: Stros et al., 2007).

Ähnlich der Säugetier-Spermio-genese wird im Übergang von den Histonen zu den Protaminen ein Transitionsprotein exprimiert, Transition protein-like 94D (Tpl^{94D}), welches wie die Protamine von *Drosophila*, durch eine HMG-Box charakterisiert ist. Es zeigt das gleiche Expressionsmuster wie die Transitionsproteine der Säugetiere, weist jedoch keine Sequenzhomologien zu ihnen auf (Rathke et al., 2007). Ob zudem, ähnlich der Säuger, auch in *Drosophila* noch Histone im reifen Spermium vorhanden sind, kann mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Nachweisen nicht visualisiert werden (Rathke et al., 2007). Hinweise darauf liefern jedoch Proteomics-Analysen an reifen Spermien (Dorus et al., 2006). Fliegen mit einer homozygoten Deletion der Gene *protamine A* und *B* sind sensitiver gegenüber Röntgenstrahlung, jedoch verläuft die DNA-Kondensation weitgehend normal (Rathke, Barckmann et al., 2010). Aufgrund dessen wurde in dieser Dissertation eine weitere

Komponente des reifen Spermiums in *Drosophila* untersucht, Mst77F (Male specific transcribed 77F).

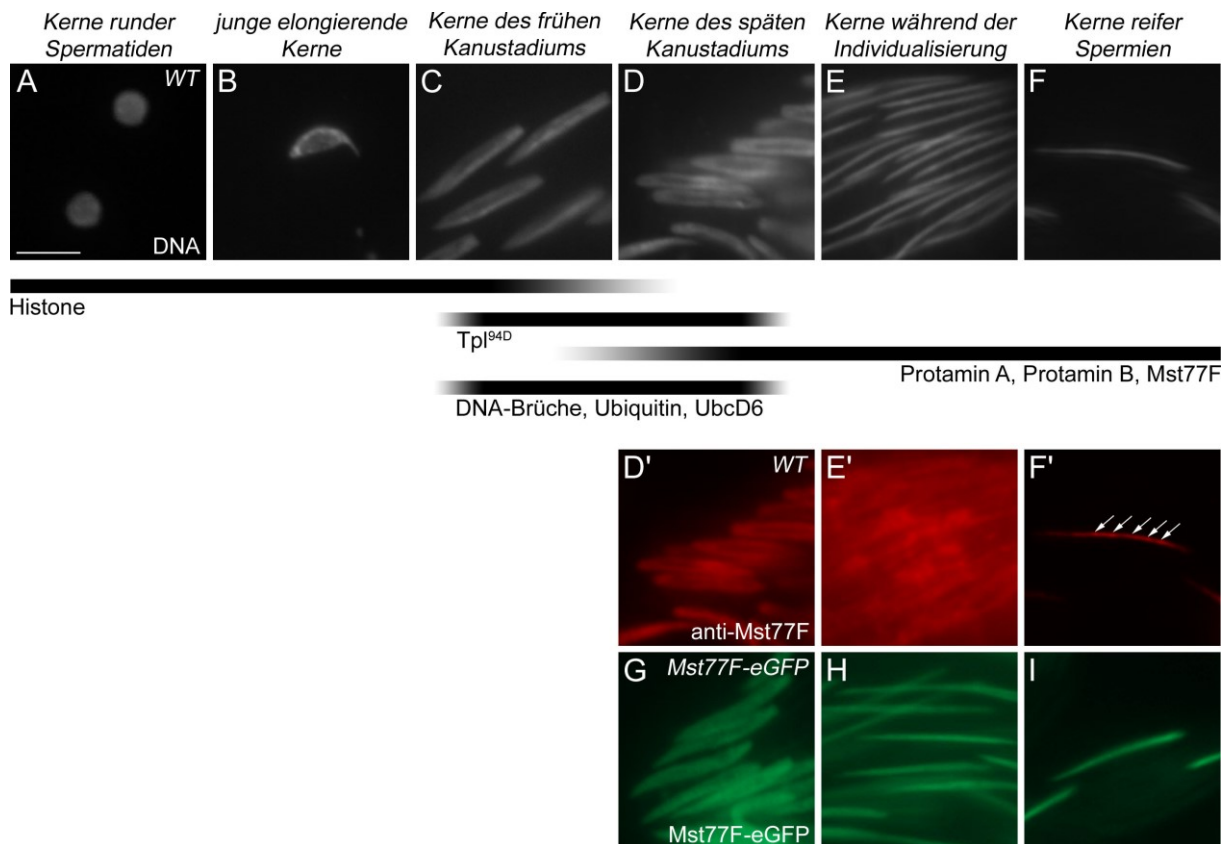


Abb. 2.1: Der Wechsel von einer auf Histonen zu einer auf Protaminen basierenden Chromatinstruktur. Gezeigt sind Testes-Quetschpräparate zur Visualisierung einzelner Stadien der Spermiogenese von *Drosophila*. In (A-F) ist ein Nachweis der DNA mit Hoechst an wildtypischen Spermatiden abgebildet. Darunter ist schematisch die Expression einzelner Chromatinkomponenten und von DNA-Brüchen gemäß ihres zeitlichen Auftretens dargestellt. (D'-F') zeigt die Verteilung von Mst77F, (G-I) die Verteilung von Mst77F-eGFP. Kurz nach der Meiose beginnen die runden Spermatidenkerne (A-B) zu elongieren und erreichen im Kanustadium eine bananenförmige Struktur (C-D). Der Wechsel von Histonen zu Protaminen wird vollzogen und das Transitionsprotein Tpl^{94D} exprimiert. Der Histon-Protamin-Wechsel wird zudem von einer Vielzahl an DNA-Strangbrüchen und der Expression von UbcD6 begleitet. Im späten Kanustadium wird neben den Protaminen auch das Chromatin-assoziiierende Protein Mst77F exprimiert. Wildtypisches Mst77F ist mit einem Antikörper in den Kernen des frühen Kanustadiums zu detektieren (D'), assoziiert über individualisierenden Kernen mit den Mikrotubuli (E') und zeigt in reifen Spermien ein gepunktetes Muster (F', Pfeile). Mst77F-eGFP ist ab dem späten Kanustadium (G) bis ins reife Spermium (I) gleichmäßig über den Kernen verteilt.

Mst77F zeigt Ähnlichkeiten zu dem Histon-linker Protein Hils1 aus Mäusen und liegt jedoch wie die Protamine in den reifen Spermien assoziiert mit dem Chromatin vor (Abb. 2.1 F', I) (Iguchi et al., 2004; Yan et al., 2003, Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Mst77F zeigt zudem eine genetische Interaktion mit β 2-tubulin und lässt auf eine weitere Funktion

von Mst77F in der Kernformung schließen (Fuller et al., 1989; Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Tweedie et al., 2009). Es lokalisiert an den Mikrotubuli junger elongierender Kerne sowie über den Kernen individualisierender Spermatiden (Abb. 2.1 E') (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke, Barckmann et al., 2010).

2.3 Die Einführung von DNA-Strangbrüchen während der *Drosophila* Spermiogenese

Ein weiteres charakteristisches Merkmal des Histon-Protamin-Wechsels (H-P-Wechsel) in Säugern wie auch in *Drosophila* ist die große Anzahl an DNA-Brüchen (McPherson und Longo, 1993; Marcon und Boissonneault, 2004; Laberge und Boissonneault, 2005; Rathke et al. 2007). In *Drosophila* überlappen die Brüche mit der Expression des Transitionsproteins Tpl^{94D} (siehe Abbildung 2.1). Sie sind schwach im frühen Kanustadium zu detektieren und in großen Mengen im späten Kanustadium zu verzeichnen (Rathke et al., 2007). In den Kernen sich individualisierender Spermatiden sind mit Hilfe von TUNEL-Färbungen keine DNA-Brüche mehr zu detektieren (Rathke et al., 2007). Ob es sich hier um Einzel- oder Doppelstrangbrüche handelt, ist nicht bekannt. Das transiente Auftreten von DNA-Brüchen in elongierenden Kernen von Säugern und Menschen mag darin begründet liegen, dass einzelne Strangbrüche das Auftreten von Supercoil-Strukturen nach dem Entfernen der Histone unterbinden. Der Mechanismus der Entstehung wie auch des Schließens der Strangbrüche ist jedoch nicht bekannt.

In der Spermienentwicklung von Mäusen wird zwar eine Aktivität der Topoisomerase II beta postuliert (Laberge und Boissonneault, 2005; Leduc et al., 2008), doch nach ersten Untersuchungen können die *Drosophila* DNA Topoisomerasen I und II als Induktoren der DNA-Brüche ausgeschlossen werden (Ripp, Masterarbeit 2009; Awe, Dissertation 2010). Beide Topoisomerasen werden lediglich im Spermatozyten exprimiert und auch Inhibitorkulturen an pupalen Testes mit Camptothecin (Inhibition der Topoisomerase I) und Etoposid (Inhibition der Topoisomerase II) zeigen keine Auswirkung auf den Histon-Protamin-Wechsel (Awe, Dissertation 2010). Es wurde zudem die Beteiligung der beiden verbleibenden *Drosophila*-spezifischen Topoisomerasen III alpha und III beta untersucht, doch ist die Topoisomerase III alpha nach der Meiose lediglich in den mitochondrialen Derivaten zu detektieren (Wu et al., 2010) und auch die Topoisomerase III beta zeigt keine Transkripte in elongierenden Spermatiden (Kaiser, Masterarbeit 2010). Dies deutet darauf hin, dass die Topoisomerasen keine essentielle Rolle

in der Induktion von DNA-Strangbrüchen während der postmeiotischen Spermatogenese übernehmen und somit auch nicht am Histon-Protamin-Wechsel beteiligt sind.

In Mäusen sind in den Kernen reifer Spermien Endonukleasen zu detektieren, welche Histon-gebundenes Chromatin schneiden (Pittoggi et al., 1999). Zudem scheint hier die Histon-gebundene DNA sensitiver gegenüber endogenen Nukleasen zu sein, als die Protamin-gebundene Form. Weitere endogene Nukleasen finden sich in den Kernen reifer Spermien von Hamstern und Menschen (Sotolongo et al., 2005). Sie schneiden die DNA an der Basis der „Loop-Domänen“, in den Bereichen der „Matrix Attachment Regions“ (MAR). Exogene Nukleasen scheinen hingegen häufiger Protamin-gebundenes Chromatin zu schneiden und weisen zudem eine Abhängigkeit von der Matrix-assoziierten Topoisomerase II beta auf (Shaman et al., 2006).

Eine Beteiligung von Endonukleasen in der *Drosophila* Spermatogenese ist bisher nicht bekannt und aus diesem Grund habe ich mich in meiner Masterarbeit mit der Untersuchung der vier Endonukleasen *CG31679*, *CG31682*, *CG32463* und *CG4683* beschäftigt (Kaiser, Masterarbeit 2010). Hierbei handelt es sich um Paraloge, von denen die Nukleasen *CG31682*, *CG32463* und *CG31679* benachbart auf dem linken Arm des 2. Chromosoms liegen und *CG4683* auf dem linken Arm des 3. Chromosoms (FlyBase: St Pierre et al., 2014). Alle vier Nukleasen sind im Testis hochreguliert und werden spezifisch in Männchen transkribiert (FlyAtlas: Chintapalli et al., 2007; Kaiser, Masterarbeit 2010). Über die Verteilung der Proteine im Testis, wie auch über die molekulare Funktion der Nukleasen war zu Beginn meiner Masterarbeit nichts bekannt und erste Analysen zeigten, dass die Transkripte von *CG31679*, *CG31682* und *CG4683* bis in elongierende Spermatiden zu detektieren sind (Kaiser, Masterarbeit 2010). Um jedoch die genaue Verteilung der Proteine untersuchen zu können, und um Hinweise auf eine mögliche Funktion in der *Drosophila* Spermiogenese zu erhalten, wurde in meiner Masterarbeit mit der Klonierung sowie der Etablierung von *eGFP*-Fusionsproteinen begonnen und in der vorliegenden Dissertation beendet.

2.4 Die Reparatur der DNA-Brüche erfolgt nicht über Non-Homologes End Joining

Der Wechsel von einer auf Histonen zu einer auf Protaminen basierenden Chromatinstruktur wird wie im Abschnitt zuvor beschrieben, von einer großen Menge an DNA-Strangbrüchen begleitet. Ob die zu detektierenden Strangbrüche Einzel- oder Doppelstrangbrüche darstellen, ist nicht bekannt. Die DNA-Brüche scheinen den Austausch zwischen Histonen und Protaminen zu erleichtern und sind nach Vollenden der Umstrukturierungsprozesse des Chromatins nicht mehr zu detektieren (siehe Abbildung 2.1). Welche Mechanismen der DNA-Reparatur - vermutlich im späten Kanustadium - zugrunde liegen, ist nicht bekannt.

Da eine Reparatur der DNA über den klassischen Weg der homologen Rekombination (HR) in haploiden Spermatiden nicht möglich ist, wurde eine Reparatur über Non-Homologes End Joining (NHEJ) in Betracht gezogen. Ein wesentlicher Bestandteil des NHEJ bildet das Ku-Protein. Dies bildet während der DNA-Reparatur ein Heterodimer aus den Proteinen Ku70 und Ku80 und interagiert mit der DNA-Proteinkinase C (DNA-PKc) (Hammel et al., 2010). Eine Reparatur mit Hilfe der Ku/NHEJ DNA-Reparatur kann in somatischen Zellen in Maus Testes wie auch in der Reparatur von Spo11-abhängigen DSBs in der späten meiotischen Prophase detektiert werden (Ahmed et al., 2013). Im Grashüpfer *Eyprepocnemis plorans* wurde das DNA-Reparaturprotein Ku70 in den Zellkernen von runden und elongierenden Spermatiden nachgewiesen und eine Reparatur der DNA über NHEJ sowie eine Funktion während der Chromatinkondensation in der Spermatogenese postuliert (Cabrero et al., 2007).

Eine Expression des Ku-Heterodimers konnte in der *Drosophila* Spermatogenese bisher nur in den Keimzell-umschließenden Zystzellen nachgewiesen werden (Boutanaev et al., 2007). Weiterführende Studien zeigten jedoch, dass die Transkripte von Ku70 wie auch Ku80 hauptsächlich im Zytoplasma von primären Spermatozyten zu detektieren sind (Kaiser, Masterarbeit 2010). Lediglich *Ku80* zeigt in single-cyst RT-PCRs eine schwache Transkription im frühen wie auch im späten Kanustadium. Dies kann jedoch auch auf die in der single-cyst RNA enthaltene RNA der Zystzellen zurückzuführen sein (Kaiser, Masterarbeit 2010). Denn auch in Studien zur Verteilung der *Ku70* und *Ku80* mRNAs sind die Transkripte lediglich im Zytoplasma von Spermatozyten zu verzeichnen. Das Ku-Heterodimer wird demnach vermutlich nur in frühen Spermatogenese-Stadien translatiert und übernimmt somit auch keine Rolle in der Reparatur von DNA-Strangbrüchen während der Reorganisation des Chromatins (Kaiser, Masterarbeit 2010).

2.5 Hohes Expressionsniveau an Ubiquitin in elongierenden Spermatidenkernen

In der *Drosophila* Spermatogenese sind zum Zeitpunkt des Histon-Protamin-Wechsels große Mengen an Ubiquitin in den Spermatidenkernen zu detektieren (siehe Abbildung 2.1) (Rathke et al., 2007). Ubiquitin ist eines der am höchst konservierten Proteine. Es wird kovalent an zelluläre Proteine gebunden und markiert diese für verschiedene Prozesse wie Degradation, Faltung oder auch Stabilisation (Koken et al., 1991 A). Die Proteine können an einem oder mehreren Lysinresten mit einem Ubiquitinmolekül (Monoubiquitinylierung oder Multiubiquitinylierung), oder auch mit mehreren Ubiquitinmolekülen in Reihe (Polyubiquitinylierung) markiert werden. Die Bindung des Ubiquitins ist ein reversibler Prozess und erfolgt in mehreren Schritten. Das Ubiquitin wird zunächst über ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) gebunden und zu einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) transferiert. Dieses ligiert, mitunter katalysiert durch eine Ubiquitin-Ligase (E3), das Ubiquitin an das Zielprotein (Koken et al., 1991 B).

Die meist beschriebene Rolle der Ubiquitinylierung ist die Degradation von Proteinen nach Polyubiquitinylierung via des 26S Proteasoms (Übersichtsartikel: Hochstrasser, 1996). Im Gegensatz hierzu dienen Monoubiquitinylierungen meist der Regulation von Transkriptionsfaktoren sowie der Umstrukturierung des Chromatins durch eine stabile Ubiquitinylierung von Histonen (Baarends et al., 2003). Multiubiquitinylierungen finden sich im Prozess der Endozytose. Mono- wie auch Polyubiquitinylierungen sind zudem Bestandteil von DNA-Reparaturmechanismen (Übersichtsartikel: Bergink und Jentsch, 2009).

Ähnlich der Spermatogenese von *Drosophila* finden sich große Mengen an Ubiquitin in den postmeiotischen Stadien von Mammaliern (Chen et al., 1998, Baarends et al., 1999). Analysen von wildtypischen Testes von Mäusen zeigen kurzzeitig eine erhöhte Anzahl an ubiquitinyliertem H2A in elongierenden Spermatidenkernen (Baarends et al., 2000). Monoubiquitinyliertes Histon H2A ist auch in frühen Spermatidenkernen von *Drosophila* zu detektieren (Rathke et al., 2007) und auch die erhöhten Mengen an Ubiquitin im Kanustadium weisen auf das Vorhandensein von Monoubiquitinylierungen hin. Zudem gibt es Hinweise, dass Histone und andere Proteine polyubiquitinyliert und dadurch für eine Degradation in den Proteasomen markiert werden (Rathke et al., 2007). Dies unterstützt die Hypothese, dass die Reorganisation des Chromatins gefördert und somit auch der Austausch von Histonen zu Protaminen begünstigt wird.

2.5.1 Die Funktion des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Rad6 und seiner Homologen

Der Austausch von Histonen zu Protaminen wird von großen Mengen an Ubiquitin und ebenso großen Mengen an DNA-Strangbrüchen begleitet (Rathke et al., 2007). Interessanterweise wird zeitgleich das Ubiquitin-konjugierende Enzym UbcD6, das *Drosophila*-Homolog zu Rad6 aus Hefen exprimiert (siehe Abb. 2.1) (Rathke et al., 2007).

Rad6 von *Saccharomyces cerevisiae* ist essentiell für die postreplikative DNA-Reparatur (Prakash, 1981). Es besitzt eine globuläre Domäne und einen C-terminalen „sauren Schwanz“, wobei eine Deletion des Schwanzes keinen Effekt auf die DNA-Reparatur zeigt (Koken et al., 1991 A). Zudem ist der C-terminale „saure Schwanz“ auf Hefen limitiert, wohingegen der N-terminale Bereich bis hoch zu den Säugern stark konserviert ist (Koken et al., 1991 B). Während *Drosophila* und *Hefe* jeweils nur eine Kopie des *rad6*-Gens besitzen, liegt in Säugern das Gen dupliziert vor, bestehend aus den Homologen *HR6A* und dem für die Fertilität essenziellen *HR6B* (Baarends et al., 2003). *HR6A* und *HR6B* sind zueinander zu 95 %, zu Rad6 aus Hefen zu etwa 70 % identisch. Beide Proteine sind wie Rad6 an Stellen der DNA-Reparatur zu detektieren (Koken et al., 1991 A, B; Baarends et al., 1999). Ein Vergleich zwischen *HR6A/B* aus Mäusen und den humanen *HR6A/B* zeigt eine Identität von 100 % (Baarends et al., 2003). *HR6B* knockout-Mäuse zeigen Defekte in der postmeiotischen Chromatinkompaktierung (Koken et al., 1996; Baarends et al., 2003). Defekte in der DNA-Reparatur von *rad6*-Mutanten in Hefen können mit Hilfe der Gene *HR6A* und *HR6B* komplementiert werden. Aufgrund des fehlenden C-terminalen „sauren Schwanzes“, kann der Phänotyp der Sporulation jedoch nicht gerettet werden (Koken et al., 1991 A).

Das *Drosophila* Homolog *UbcD6* ist zu 70 % identisch zu Rad6 aus Hefen und zu 85 % identisch zu den Homologen aus Säugetieren. *UbcD6* ist in der Fliege ubiquitär verteilt und im Testis in geringen Mengen bis hin zu elongierenden Spermatiden exprimiert. Das Maximum an *UbcD6* ist parallel zu den DNA-Brüchen in den Kernen des frühen und späten Kanustadiums zu detektieren (Rathke et al., 2007). In den folgenden Stadien sind weder *UbcD6* noch Strangbrüche zu detektieren und eine Beteiligung der Ubiquitynylierung, speziell des Enzyms *UbcD6* am Prozess der DNA-Reparatur scheint möglich.

Weiterführende *in vitro* Analysen des Säuger-Homologs zeigen zudem eine Phosphorylierung des humanen *HR6A* an AS Serin 120, welche die Ubiquitin-konjugierende Aktivität des Enzyms um ein Vielfaches erhöht (Sarcevic et al., 2002). Eine Phosphorylierung der AS Serin120 konnte auch in späten Spermatozyten und dem Kanustadium von *Drosophila*

nachgewiesen werden. Erste experimentelle Ansätze um mit Hilfe von mutanten eGFP-Fusionsproteinen (AS120 von Serin zu Alanin ausgetauscht) *in vivo* ein dominant negative wirkendes Protein zu erzeugen, zeigten leider keine Expression des Fusionsproteins (Kaiser, Masterarbeit 2010). Daher ist ein Ziel der vorliegenden Dissertation zunächst mit Hilfe von wildtypischen Fusionsproteinen eine Beteiligung von UbcD6 am Histon-Protamin-Wechsel zu untersuchen.

2.6 Die Regulation von Genen während der Spermatogenese von *Drosophila*

In der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* finden enorme morphologische Umformungsprozesse statt, einhergehend mit einer Umstrukturierung von DNA-Protein Komplexen und der daraus resultierenden Kondensation des Chromatins. Die Aktivierung einer Vielzahl von Spermatiden-Differenzierungsgenen wird benötigt, welche nicht nur zeitlich, sondern auch gewebespezifisch reguliert werden müssen. Die für die Spermatogenese essentiellen Gene unterliegen somit einer speziellen Regulation der Genexpression auf Transkriptions- und Translationsebene (siehe Abbildung 2.2) (Übersichtsartikel: White-Cooper, 2010).

In *Drosophila* kommt die Transkription nach der Meiose nahezu zum Erliegen. Somit werden die Gene aller Proteine, die während der Spermiogenese benötigt werden, mit dem Eintritt in das Spermatozytenstadium transkribiert und die mRNAs translational reprimiert (Übersichtsartikel: Fuller, 1993; Renkawitz-Pohl et al., 2005). Nur vereinzelt werden Gene auch nach den meiotischen Teilungen transkribiert (Barreau et al., 2008; Vbranovski et al., 2010). Eine ähnliche translationale Repression ist in Vertebraten zu beobachten. Zwar erfolgt die Transkription hier bis ins reife Spermatozytenstadium (Kierszenbaum und Tres, 1975), jedoch findet man für die mRNAs der postmeiotischen Proteine, wie beispielsweise die mRNAs der Transitionsproteine und der Protamine, ebenfalls eine Inhibition der Translation über mehrere Tage (Übersichtsartikel: Steger, 2001). Die postmeiotische Transkription ist dabei begleitet von der Präsenz aktiver RNA Polymerase II, welche mit der Kompaktierung des Chromatins nicht mehr zu detektieren ist (Dottermusch-Heidel et al., in Vorbereitung). Doch während die translationale Repression der mRNAs in der Spermatogenese von Säugern oft über die 3' UTR vermittelt wird (Braun, 1998), liegen die Elemente für die translationale Repression von bisher analysierten mRNAs in der *Drosophila* Spermatogenese in der 5' UTR,

wie z.B. für *don juan like (djl)* (Hempel et al., 2006), *don juan (dj)* (Hempel et al., 2006), und *Mst87F* (Kempe et al., 1993). Dies steht auch im Gegensatz zum Prozess der translationalen Repression in der Oogenese von *Drosophila*, in der die Regulation wie in den Säugern über die 3' UTR erfolgt (Rangan et al., 2009).

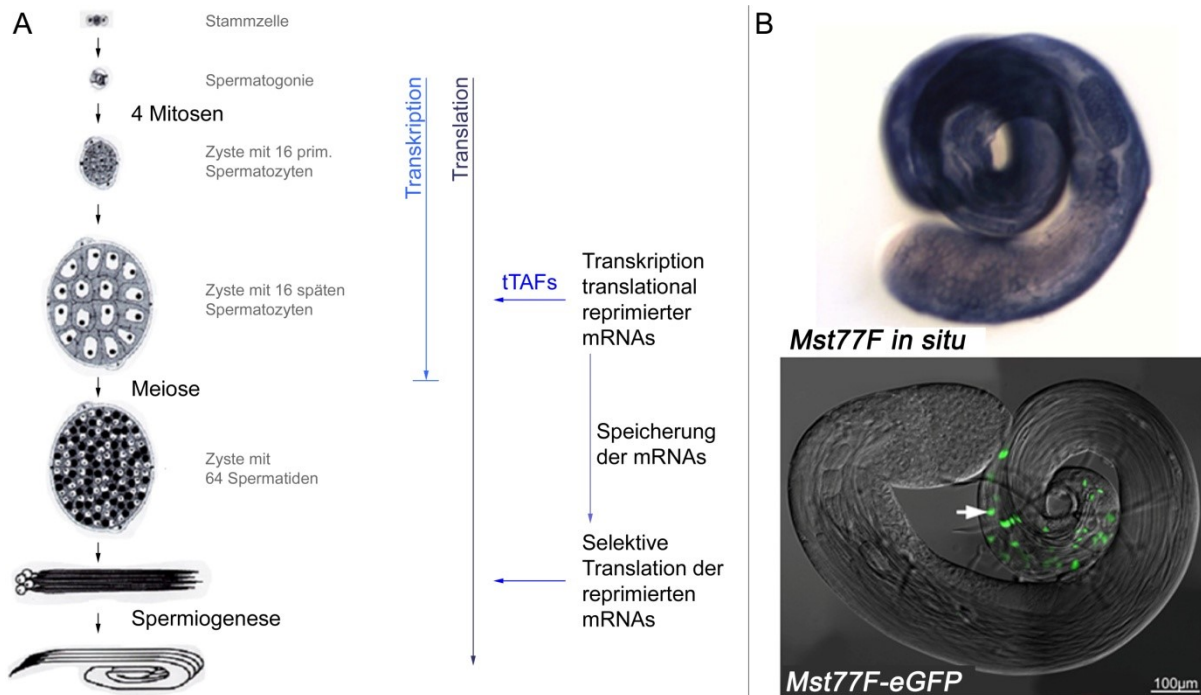


Abb. 1.2: Die Regulation der Translation und die translationale Repression von Spermiogenese-relevanten Transkripten . (A) Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung der Spermatogenese von *Drosophila* abgebildet, von einer Stammzelle (oben) bis hin zu individualisierenden Kernen (unten) (Abbildungsteil modifiziert nach Fuller, 1998). Mit dem Eintritt in die meiotischen Teilungen kommt die Transkription nahezu zum Erliegen. Eine Translation der Proteine erfolgt bis in die individualisierenden Kerne. Die Transkription translational reprimierter mRNAs Spermiogenese-relevanter Gene erfolgt tTAF-abhängig in primären Spermatozyten. Die translational reprimierten mRNAs werden gespeichert und können zeitlich und gewebsspezifisch aus der translationalen Repression entlassen werden. (B) *Mst77F* unterliegt einer translationalen Repression. Während das *Mst77F* Transkript ab dem Spermatozyten-Stadium und in allen folgenden Stadien zu detektieren ist, erfolgt die Translation des *Mst77F*-Fusionsproteins erst in elongierenden Spermatisden. (Abbildungsteil modifiziert nach Barckmann, Dissertation 2010).

Die Expression von Genen im Testis erfolgt in *Drosophila* über Testis-typische Promotoren, welche aus kurzen regulatorischen Sequenzen bestehen (Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl, 2005). Die erste analysierte Promotorregion ist die des Testis-spezifischen *β 2-tubulin* Gens. *β 2-tubulin* mRNA wird direkt nach der Transkription translatiert und bleibt bis in späte Spermatogenesestadien stabil. Michiels et al. (1989) konnten zeigen, dass die

Testis-spezifische und zeitliche Expression von *β2-tubulin* über 53 bp Promotorregion und den 5' untranslatierten Bereich (UTR) erfolgen und dass die Testis-spezifische Transkription allein über das 14 bp Motiv β 2UE1 erreicht wird. Für die zeitlich und räumlich korrekte Expression von *don juan like (djl)* werden sogar nur 106 bp benötigt, von denen lediglich 11 bp vor den Transkriptionsstart liegen (Hempel et al., 2006).

2.6.1 Die Regulation der Transkription translational reprimierter mRNAs durch tTAFs

In der Spermatogenese von *Drosophila* werden, bis auf einige wenige Ausnahmen, alle Spermio-genese-relevanten Transkripte vor dem Eintritt in die meiotischen Teilungen synthetisiert. Die Transkripte werden anschließend im Zytoplasma gespeichert und können mehrere Tage stabil gehalten und selektiv aus der Translationalen Repression entlassen werden (Übersichtsartikel: Schäfer et al., 1995). *protB* mRNAs können sogar bis zu sechs Tage translational reprimiert werden (Awe und Renkawitz-Pohl, 2010).

Für die Transkriptionsinitiation und Expression von Spermatiden-Differenzierungsgenen, wird neben dem ubiquitären TFIID-Komplex, ein Testis-spezifischer TFIID-Komplex postuliert. Der Transkriptionsfaktor TFIID reguliert die mRNA Produktion durch die RNA-Polymerase II. TFIID ist ein Multiprotein-Komplex bestehend aus einem TATA box Bindeprotein (TBP) und verschiedenen Testis-spezifisch exprimierten TBP-assoziierten Faktoren (tTAFs, vom engl. testis-specific TATA-Box associated factors) und einer Spleißvariante des TAF1, dem TAF1-2 (Hiller et al., 2001; Hiller et al., 2004; Metcalf und Wassarman, 2007). Bisher wurden fünf tTAFs charakterisiert, die Homologe der generellen TAFs darstellen und durch die *can*-Klasse der meiotic-arrest Gene kodiert werden: *spermatocyte arrest (sa, dTAF8 Homolog)*, *cannonball (can, dTAF5 Homolog)*, *no hitter (nht, dTAF4 Homolog)*, *meiosis I arrest (mia, dTAF6 Homolog)* und *ryan express (rye, dTAF12 Homolog)* (Hiller et al., 2001; Hiller et al., 2004). Mutationen in diesen Genen führen zu einem Stopp der Spermatogenese vor den meiotischen Teilungen und mutante Testes weisen nur prämeiotische Stadien auf (Übersichtsartikel: White-Cooper, 2010). Jedoch zeigen die Mutanten keinen generellen Defekt in der Transkription, sondern - soweit bisher im Detail analysiert - in der Aktivierung der Transkription von Genen, welche für die meiotischen Teilungen und die Spermio-genese benötigt werden (Übersichtsartikel: White-Cooper und Davidson, 2011).

Direkte Zielgene der tTAFs waren bis 2013 (siehe nächstes Kapitel) kaum bekannt. Einzig die für die Spermiogenese-relevanten Gene *fuzzy onions (fzo)*, *male specific transcript 87F (Mst87F)*, *don juan (dj)* und die *protamine* Gene zeigen eine direkte Abhängigkeit der Transkription von den tTAFs (White-Cooper et al., 1998; Hiller et al., 2004; Barckmann, Dissertation 2010).

2.6.2 Die Expression von Mst77F und den Protaminen wird auf unterschiedlichen Ebenen reguliert

Die Protamin-ähnlichen Proteine, Protamin A (ProtA) und Protamin B (ProtB), sowie das bereits beschriebene Linkerhiston-ähnliche Protein Mst77F sind Komponenten des reifen Spermiums und unterliegen ebenfalls einer translationalen Repression. *Mst77F* und die *protamine* Gene werden in primären Spermatozyten transkribiert und erst einige Tage später in elongierenden Kernen translatiert (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke et al., 2007). Die translationale Repression von Mst77F ist in Abbildung 2.2 B abgebildet.

Mit Hilfe von *Promotor-LacZ*-Reporter Genen kann gezeigt werden, dass kurze genomische Regionen proximal zum Transkriptionsstartpunkt für eine tTAF-abhängige Transkription von *protB* (-105 bp) und *Mst77F* (-89 bp) benötigt werden (Barckmann et al., 2013). Eine direkte Bindung des tTAFs *spermatocyte arrest* an die Promotorregion von *protamine B* wird gezeigt und auch eine Bindung von *sa* an die Promotorregion von *Mst77F* wird postuliert.

Zudem kann gezeigt werden, dass kurze aufwärts regulatorische Sequenzen (-105 aufwärts des Transkriptionsstarts sowie die ersten 94 bp 5' UTR) die zelltypspezifische Expression von ProtB regulieren und dass die 5' UTR von *protB* mRNA Sequenzen für die translationale Repression in Spermatozyten enthält. Jedoch reicht die 5' UTR allein nicht aus, um die translationale Repression von ProtB zu gewährleisten (Barckmann et al., 2013).

Mst77F-lacZ Reporter Assays zeigen zudem, dass auch die Expression von Mst77F über kurze regulatorische Sequenzen kontrolliert wird. Jedoch ist die 5' UTR von Mst77F nicht essenziell für die translationale Repression der *Mst77F* mRNA, sondern wird für das hohe Expressionslevel von Mst77F benötigt (Barckmann et al., 2013). Welche Sequenzen die translationale Repression von Mst77F bedingen, und ob womöglich Bereiche innerhalb des offenen Leserahmens die zeitliche und gewebespezifische Expression regulieren, soll in dieser Arbeit näher analysiert werden.

2.7 Die Regulation des Kernimports via Importine

Der Kernimport von Proteinen und RNA-Molekülen erfolgt über Kernporen (NPC, vom engl. nuclear pore complex) und mit Hilfe von Adaptermolekülen, welche den Transport des Substrats durch die Kernmembran vollziehen. Diese Adaptermoleküle werden Karyopherine genannt (Übersichtsartikel: Goldfarb et al., 2004). Dabei wird zwischen Molekülen unterschieden, welche den Import von Proteinen ermöglichen, die Importine, und welchen die den Export von Proteinen begleiten, die sogenannten Exportine. Die Bewegung durch die Kernporen erfordert Energie und wird über einen RanGDP/RanGTP Gradienten bereit gestellt (Kusano et al., 2002). Der Import von Kernproteinen durch den NPC erfolgt in zwei Schritten. Zunächst bindet auf zyttoplasmatischer Seite das Kernlokalisierungssignal (NLS, vom engl. nuclear localisation signal) des Substrates an das Importin- α/β Heterodimer. Das Heterodimer besteht aus den beiden Untereinheiten Importin-alpha (Importin- α , Imp- α) und Importin-beta (Importin- β , Imp- β). Importin- α besitzt eine N-terminale Importin- β Bindedomäne (IBB-Domäne), 10 interne Wiederholungen von ARM-Motiven (Armadillo-Motiven, Riggleman et al., 1989) und einen sauren C-Terminus (Giarrè et al., 2002). Im „Ruhezustand“ bindet die IBB Domäne an das ARM-Motiv. Durch die Bindung eines NLS-tragenden Substrates kommt es zu einer Konformationsänderung des Imp- α Proteins (Übersichtsartikel: Stewart, 2007). Die IBB-Domäne wird vom ARM-Motiv gelöst und das Substrat über die NLS an das freie ARM-Motiv gebunden. Daraufhin kann die Bindung des Importin- β an die IBB-Domäne erfolgen. Imp- β verfügt seinerseits über HEAT-Motive, welche die Bindung von RanGDP sowie die Bindung des Protein-Komplexes an den NPC ermöglichen (Conti et al., 1998). Der Komplex, bestehend aus Importin- α/β und Substrat, wird durch die Kernmembran transportiert. Im Zellkern bindet überschüssiges RanGTP an Imp- β und es kommt zum Zerfall des Imp-Heterodimers. Das NLS-Protein wird in den Zellkern entlassen (Übersichtsartikel: Stewart, 2007; Wentz und Rout, 2010).

Während in Hefen nur ein Imp- α Gen existiert, *SRP1* (Yano et al., 1992, Yano et al., 1994), weisen komplexe Organismen verschiedene *importin- α* Gene auf. *Drosophila* und *C. elegans* besitzen drei, Mäuse fünf und Menschen sechs verschiedene *importin- α* Gene (Hogarth et al., 2006). Dabei werden die Importine in drei verschiedene phylogenetische Gruppen eingeteilt, Importin- $\alpha 1$, - $\alpha 2$, und - $\alpha 3$ (Köhler et al., 1997). Ein Vergleich der Importin- α Familien in *Drosophila*, Maus und Mensch ist in Tabelle 2.0 aufgeführt. Im Gegensatz zu *importin- α* besitzen alle Organismen nur ein *importin- β* Gen, namens *importin- $\beta 1$* in Mäusen und Menschen, und *ketel* in *Drosophila* (Lippai et al., 2000).

Tabelle 2.0: Vergleich der Importin- α Subfamilien in *Drosophila*, Maus und Mensch

Die Daten wurden Köhler et al., 1997; Tsuji et al., 1997; Giarrè et al., 2002 und Hogarth et al., 2006 entnommen.

Importin- α Subfamilie	Importine <i>Drosophila</i>	Importine Maus	Importine Mensch
Importin- α 1	Importin- α 1	Importin- α 1 Importin- α 6	Importin- α 1 Importin- α 5 Importin- α 6
Importin- α 2	Importin- α 2	Importin- α 2	Importin- α 2
Importin- α 3	Importin- α 3	Importin- α 3 Importin- α 4	Importin- α 3 Importin- α 4

2.7.1 Die Importin- α mRNAs werden in der Spermatogenese von Mäusen und *Drosophilae* unterschiedlich transkribiert

In der Spermatogenese von Mäusen zeigen die Importin- α Proteine unterschiedliche Transkriptionssmuster und besitzen neben dem Kernimport von Proteinen, noch weitere gewebe- bzw. zelltypspezifische Funktionen in der Zelldifferenzierung (Hogarth et al., 2006). Während *imp- α 1* mRNA ab den Spermatogonien bis zu den runden Spermatischen zu detektieren ist, besitzen die übrigen Importin- α s stadienspezifische Transkriptionssmuster. So ist *imp- α 3* mRNA in Mäusen in den Spermatogonien und Spermatozyten zu verzeichnen und *imp- α 4* mRNA allein im Spermatozytenstadium. Die *imp- α 2* Transkripte sind ebenfalls in Spermatozyten zu detektieren, reichen aber bis in runde Spermatischen. Die Transkripte von *imp- α 6* finden sich spezifisch in runden Spermatischen (Hogarth et al., 2006).

Die Importine Imp- α 1 und Imp- α 3 scheinen zusätzliche Funktionen in der Mitose, speziell im Aufbau des Spindelapparates zu übernehmen, aber auch übergreifende Rollen mit den Importin- α s 2 und 4 in der Meiose zu spielen (Hogarth et al., 2006). Auch für *Drosophila* postulieren Gruss et al. (2001) eine zusätzliche Rolle der Importin- α s in der Organisation des Spindelapparates während der Mitose und es konnte eine Beteiligung der Importin- α s in der Bildung des Ring-Kanals in der Oogenese gezeigt werden (Gorjánác et al., 2002).

In der Spermatogenese von *Drosophila* sind drei Importin- α Proteine beschrieben, Imp- α 1 und - α 2 (Török et al., 1995) und Imp- α 3 (Dockendorff et al., 1999; Mathé et al., 2000). Imp- α 2 bildet jedoch kein generelles Transporterprotein (Török et al., 1995). Es wird in Spermatogonien und Spermatozyten exprimiert und besitzt eine Funktion im Aufbau und der Dynamik des mitotischen Spindelapparates (Gruss et al., 2001). *imp- α 2* Null-Mutanten sind männlich und weiblich steril. Der Defekt kann jedoch in Männchen durch eine ektopische

Expression von Imp- α 1 oder - α 3 gerettet werden (Mason et al., 2002). Eine funktionelle Redundanz der Importin- α s in der männlichen Keimbahn scheint möglich. Da die Sterilität in Weibchen jedoch nicht gerettet werden kann, werden verschiedene Notwendigkeiten für Imp- α 2 in der weiblichen und männlichen Gametogenese ersichtlich (Mason et al., 2002).

Imp- α 1 und Imp- α 3 werden im Gegensatz zu Imp- α 2 zum Zeitpunkt der Spermatidendifferenzierung exprimiert (Giarrè et al., 2002). Geringe Mengen an Imp- α 1 sind in Spermatogonien zu detektieren, die Hauptmengen an Imp- α 1 hingegen im Spermatozytenstadium bis in junge elongierende Kerne. Die Expression von Imp- α 3 startet in Spermatozyten und steigt bis in die postmeiotischen Stadien. Das Maximum an Imp- α 3 ist im Nukleoplasma des späten Kanustadiums zu detektieren. In reifen Spermien ist Imp- α 3 nicht mehr nachweisbar (Giarrè et al., 2002). Das Überlappen der Expressionsmuster der Imp- α s während der Meiose zeigt eine gemeinsame Funktion der Importin- α Proteine im Transport von Substraten während der Meiose. Zudem weisen aber auch die jeweiligen gesonderten Expressionsmuster in den unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese auf spezifischen Funktionen der einzelnen hin.

Kürzlich konnte in *Drosophila* ein weiteres Importin- α Protein identifiziert werden, CG10478, genannt alphaKaryopherin-4 (alphaKap-4, α Kap4) (Phadnis et al., 2012). α Kap4 wird im Gegensatz zu den anderen Imp- α Proteinen Testis-spezifisch exprimiert und besitzt die für die Importin- α Proteine charakteristischen ARM-Motive, jedoch aber keine N-terminale IBB-Domäne. Da α Kap4 ein Intron an präzise der gleichen Position wie *imp- α 3* trägt, ist davon auszugehen, dass α Kap4 ein Retrogen von *imp- α 3* bildet (Phadnis et al., 2012). Ob α Kap4 ebenso wie Imp- α 3 in den Spermatidenkernen des Kanustadiums exprimiert wird, und ob α Kap4 und Imp- α 3 eine Funktion im Import von Mst77F während des Histon-Protamin-Wechsels übernehmen, wird ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit sein.

2.8 Zielsetzung

In der Spermatogenese von *Drosophila* treten während des Histon-Protamin-Wechsels große Mengen an DNA-Strangbrüchen auf (Rathke et al., 2007). Dabei gelten Endonukleasen als mögliche Induktoren der DNA-Brüche (Kaiser, Masterarbeit 2010). Um eine Beteiligung der Nukleasen am Setzen der Brüche zu überprüfen, sollen im Rahmen dieser Arbeit transgene Fliegen erzeugt und die Verteilung der Fusionsproteine analysiert werden.

Parallel zu den DNA-Brüchen werden große Mengen an UbcD6 exprimiert (Rathke et al., 2007). UbcD6 bildet das *Drosophila* Homolog zu Rad6 in Hefen, welches eine Funktion in der postreplikativen DNA-Reparatur besitzt (Prakash, 1981). Dies macht UbcD6 zu einem geeigneten Kandidaten als Reparaturprotein. Es sollen Fusionsproteine für UbcD6-eGFP analysiert und zudem mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung nach weiteren Komponenten der postreplikativen Reparatur während des H-P-Wechsels gesucht werden.

Mit dem Wechsel von Histonen zu Protaminen wird auch das Chromatin-assoziierte Protein Mst77F exprimiert. Die Transkription von Mst77F erfolgt tTAF-abhängig und unterliegt einer translationalen Repression (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke, Barckmann et al., 2010). Die Regulation der Translation von Mst77F erfolgt jedoch weder über die 5' UTR, noch über die genspezifische 3' UTR (Barckmann et al., 2013). Eine Regulation der Translation von Mst77F über den offenen Leserahmen erscheint möglich und soll mit Hilfe von Mst77F-eGFP Deletionskonstrukten und der Expression von Mst77F unter heterologen Promotoren näher analysiert werden.

Die Protamine A/B sind für die Chromatinkondensation nicht essenziell (Rathke, Barckmann et al., 2010) und es stellt sich die Frage, ob Mst77F zudem eine Rolle in der Kondensation des Chromatins/der Kerne übernimmt. Hierfür soll der Effekt einer ektopischen Expression von Mst77F-eGFP im Testes analysiert werden und zudem die Proteinsequenz von Mst77F mit Hilfe von Datenbanken auf Proteindomänen, wie z.B. Protein-Protein-Interaktionsdomänen hin untersucht werden. Können entsprechende Domänen aufgezeigt werden, soll wiederum mit Datenbankanalysen nach potenziellen Interaktionspartnern für Mst77F gesucht und eine Interaktion mit diversen Interaktionsstudien verifiziert werden.

Da immunologische Analysen von Mst77F eine Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern aufweisen (Rathke, Barckmann et al., 2010), soll zudem die Abhängigkeit von Mst77F von den im Testis exprimierten Kernimport-Proteinen Importin-alpha3 und -alpha4 analysiert werden. Hierfür soll die Verteilung von Mst77F in mutanten Allelen beider Importingene untersucht werden.

3 MATERIAL

3.1 Gerätschaften

Binokular	Stemi SV6/ Stemi DV4, Zeiss, Jena
Eismaschine	AF-20, Scotsman
Entwicklermaschine Optimax Typ TR	MS-L GmbH, Diehlheim
Gelelektrophoreseapparatur	Werkstatt der Universität Marburg
Homogenisator	
Magnetrührer	Combimac RCT, IKA, Staufen
Mikroskop	Axioplan mit ApoTome, Zeiss, Göttingen
Mikroskopkamera	AxioCam MRm, Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Dimension 4, Panasonic
Mini Trans-Blot [®] Elektrophorese Apparatur	Bio-Rad
PCR-Maschine	Personal Cycler, Biometra, Göttingen
pH-Meter	GPRT 1400A, Greisinger Electron
Photometer	GeneQuant 1300, GE Healthcare, München
Rotator RS-RD 20	PHOENIX INSTRUMENT GmbH, Garbsen
Schüttler	Rexa 2000, Heidolph, Schwabach; Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau; WT-12, Biometra, GFL 3005/3033, Burgwedel
Spannungsquelle	Bio-Rad Power Pack 300
Thermoblock	Rotilabo [®] -Block-Heater H250, Roth, Karlsruhe
Thermoprinter	P93, Biometra
Thermostatschrank (SL2-Zellen)	BINDER GmbH, Tuttlingen
UV-Transilluminator	Ultralum, Electronic Dual-Light- Transilluminator
UV-Gel-Dokumentation	CCD-Kamera Ultralum, Carson Californien
Vortexer	M51 Minishaker
Wasserbäder	C10, C1, Haake, Karlsruhe GFL 1002, Biometra, Burgwedel
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus, Hanau Biofuge pico, Heraeus, Hanau Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau

3.2 Medien und Chemikalien

Acrylamid	Fluka, Neu-Ulm
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Fluka, Neu-Ulm oder Appligene, Heidelberg

Bacto-Trypton	Difco, Eggenstein/Becton & Dickinson, Heidelberg
Bacto Yeast Extract	Difco, Eggenstein oder Roth, Karlsruhe
Borsäure	Fluka, Neu-Ulm oder Roth, Karlsruhe
α -D-thio-galactosid (X- α -Gal)	Clontech, Göttingen
β -D-thio-galactosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (X-Phosphat)	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Riedel-de Haën AG, Hannover
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brillant Blau R250	Serva, Heidelberg
Dan Klorix	Colgate Palmolive GmbH, Hamburg
Desoxynucleotidtriphosphate (dNTPs)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dropout Zusatz (-Ade/-His/-Leu/-Trp)	Clontech, Göttingen
Einzel Aminosäuren (Adenine)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epon 812	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epon Härter DDSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epon Härter MNA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eponbeschleuniger DMP 30	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fluoromount GTM	Southern Biotech, Birmingham, England
Formaldehyd (37 % Lösung)	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum	GE-Healthcare Life Sciences, München
Fructose	Roth, Karlsruhe
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutardialdehyd	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Heparin	Roth, Karlsruhe
Heringssperma DNA	Fluka, Neu-Ulm
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Steinheim
4-Hydroxybenzoesäuremethylester (Nipagin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Igepal-CA-630 (np-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe

Kaliumhexacyanidoferrat(II)	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Levamisol	Sigma-Aldrich, Steinheim
10x Ligationspuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid	Fluka, Neu-Ulm
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
4-Nitrotetrazoliumchlorid (NBT)	Roche, Mannheim
Octylphenolpolyethylenglycolether (Triton X-100)	Roth, Karlsruhe
PEG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin – Streptomycin	GE-Healthcare Life Sciences, München
Phalloidin-TRITC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Roth, Karlsruhe
Propionsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rubidiumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Schneider's <i>Drosophila</i> Medium	Gibco® - Life Technologies GmbH, Darmstadt
Select Agar	Invitrogen, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Trockenhefe	
UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
YPD Broth	Sigma-Aldrich, Steinheim

Weitere, hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Steinheim) und Thermo Fisher Scientific (Karlsruhe) bezogen.

3.3 Nährmedien

Nährmedium <i>E.coli</i>	1 % (w/v) Bacto Trypton
LB-Medium (Luria-Bertani)	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	0,5 % (w/v) NaCl
	in ddH ₂ O
	für Festmedien: 1,5 % Agar
Selektion über	Ampicillin 100 µg/ml
	Chloramphenicol 23 µg/ml
	Kanamycin 50 µg/ml

3.4 Enzyme

Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Heidelberg
	NEB, Frankfurt am Main
RNase A	Roche, Mannheim
RnaseOut	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Axon, Kaiserslautern
VELOCITY DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
T4-DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

3.5 Antikörper und Antiseren

Primäre Antikörper

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten primären Antikörper aufgeführt. Zudem ist in Klammern die Verdünnung der Antikörper in der jeweiligen Methode angegeben. Dabei werden folgende Abkürzungen für die Methoden verwandt: IF – Immunfluoreszenz und WB - Western Blot.

Tabelle 3.0: Primäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	eingesetzte Verdünnung	Referenz
α-all histone	Maus (monoklonal)	1:1200 (IF, Testes)	Millipore, Schwalbach
α-GFP	Kaninchen (polyklonal)	1:500 (IF, Speicheldrüsen)	Rockland Inc., USA, Gilbertsville
α-GFP	Ratte (monoklonal)	1:5000 (WB)	Chromotek GmbH, Planegg-Martinsried

α -myc	Kaninchen (monoklonal)	1:500 (IF, SL2-Zellen), 1:2000 (WB)	Cell Signaling Technology, USA, Boston
α -Mst77F 1/105	Kaninchen (monoklonal)	1:1000 (IF, Testes)	Rathke, Barckmann et al., 2010
α -PAR	Maus (monoklonal)	1:500 (IF, Testes)	Muravska et al., 2011
α -Squash	Maus (monoklonal)	1:200 (IF, Testes)	Developmental Studies Hybridoma Bank, USA, Iowa

Sekundäre Antikörper

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper aufgeführt. In Klammern ist die Verdünnung des Antikörpers für die jeweilige Methode angegeben (IF – Immunfluoreszenznachweis, WB - Western Blot).

Tabelle 3.1: Sekundäre Antikörper

Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Referenz
α -Digoxigenin-AP Fab Fragment	1:2000 (<i>in situ</i>)	Roche, Mannheim
α -Kaninchen, Cyanin2-gekoppelt	1:40 (IF)	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen, Cyanine3-gekoppelt	1:100 (IF)	Dianova, Hamburg
α -Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt	1:5000 (WB)	Jackson Immunology, England, Newmarket
α -Maus, Cyanine5-gekoppelt	1:1000 (IF)	Dianova, Hamburg
α -Ratte, Peroxidase-gekoppelt	1:5000 (WB)	Dianova, Hamburg

3.6 Molekulare Reagenzien und Kits

2log DNA Ladder (0,1-10 kb)	NEB, Frankfurt am Main
Color Plus Prestained Ladder	NEB, Frankfurt am Main
Broad range (10-230 kDa)	
DIG RNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
Fötales Kälberserum	PAA, Cölbe
FuGENE [®] HD Transfection Reagent	Promega, Mannheim
Gateway [®] LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Genomed Jetstar Midi Kit 2.0.	Genomed, Bad Oeynhausen
GFP-Trap [®] _A Kit	Chromotek, Planegg-Martinsried
innuScript Reverse Transcriptase	Analytik Jena AG, Jena
JETSORB Gel Extraction Kit	Genomed, Löhne
Matchmaker [™] GAL4 Two Hybrid System 3	Clontech, Göttingen
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Novex [®] ECL Chemiluminescent	Invitrogen, Karlsruhe

Substrate Reagent Kit	
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Oligotex® mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
PCR – Lösungen	5x HiFi Buffer (Bioline, Luckenwalde)
	10x Puffer BD (Axon, Kaiserslautern)
	25 mM MgCl ₂ (Axon, Kaiserslautern)
pCR® II-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
pENTR™/D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
T4 DNA Ligase Puffer	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.7 Puffer und Lösungen

F-PBS	4 % (w/v) Formaldehyd in 1x PBS
10x PBS (phosphate buffered saline)	1,3 M NaCl
	7 mM Na ₂ HPO ₄
	3 mM NaH ₂ PO ₄ in H ₂ O
	pH 7,4
	autoklavieren
PBSTD	1x PBS
	0,3 % Triton X-100 und
	0,3 % Natriumdeoxycholat
PBT	0,1 % Tween 20 in 1x PBS
PBT/ 3 % BSA	PBT
	3 % (w/v) Albumin Fraktion V

Weitere Puffer sind nachfolgend über der jeweiligen Methode aufgelistet.

3.8 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5α	chemisch kompetente Zellen
	<i>supE44</i> , <i>ΔlacU169</i> , F ⁻ , Φ80 <i>lacZ</i> , ΔM15, Lamda ⁻ , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (AG Renkawitz-Pohl, Philipps-Universität Marburg)

One Shot® *ccdB* chemisch kompetente Zellen
 Survival™ 2T1R F- *mcrA* Δ (*mrr.hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1*
ara Δ 139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG fhuA::IS2*
 → zum Amplifizieren von *ccdB*-haltigen Plasmiden, wie den Gateway-
 Vektoren (Invitrogen, Karlsruhe)

3.9 Hefestamm

AH 109 *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2* :
 : *GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3* : :
MEL1UAS-MEL1 TATA-lacZ (James et al., 1996; A. Holtz,
 unpublizierte Daten).

3.10 Fliegenstämme

GAL4-Treiber-Linien

bam-GAL4 GAL4-Treiber-Linie unter der Kontrolle von *bam* regulatorischen
 Elementen (Chen und McKearin, 2003).

sgs58AB-GAL4 GAL4-Treiber-Linie unter der Kontrolle von *sgs4* regulatorischen
 Elementen (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von
 A. Hoffmann).

Transgene Fliegenlinien

CG31679-eGFP P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem
 Transformationsvektor *pUASattB-rfa-eGFP*. Expression des
CG31679-ORFs mit C-terminalen *eGFP*, unter Kontrolle des eigenen
 Promotors und der eigenen 5' UTR (Kaiser, Masterarbeit 2010).

CG31682-eGFP P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem
 Transformationsvektor *pUASattB-rfa-eGFP*. Expression des
CG31682-ORFs mit C-terminalen *eGFP*, unter Kontrolle des eigenen
 Promotors und der eigenen 5' UTR (Kaiser, Masterarbeit 2010).

CG4683-eGFP P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem
 Transformationsvektor *pUASattB-rfa-eGFP*. Expression des
CG4683-ORFs mit C-terminalen *eGFP*, unter Kontrolle des eigenen
 Promotors und der eigenen 5' UTR (Kaiser, Masterarbeit 2010).

Mst77F-eGFP P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem
 Transformationsvektor *pChab Δ Sal*. Expression des *Mst77*-ORFs mit
 C-terminalen *eGFP*, unter Kontrolle des eigenen Promotors und der
 eigenen 5' UTR (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005).

<i>UAS-ProtB-eGFP</i>	P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem Transformationsvektor <i>pUASl</i> (Brand und Perrimon, 1993), zur induzierbaren Expression eines ProtB-eGFP Fusionsproteins unter Kontrolle einer UAS-Sequenz (Barckmann et al., 2013).
<i>pc-77F3</i>	P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem Transformationsvektor <i>pChabΔSal</i> . Expression eines <i>Mst77F Promotor-LacZ</i> -Konstruktes (-89 bis +172) (Barckmann et al., 2013)
<i>pc-77F3Δ5' UTR</i>	P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem Transformationsvektor <i>pChabΔSal</i> . Expression eines <i>Mst77F Promotor-LacZ</i> -Konstruktes mit deletierter 5' UTR (-89 bis +38) (Barckmann et al., 2013)
<i>pc-protB2ΔInt1</i>	P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem Transformationsvektor <i>pChabΔSal</i> . Expression eines <i>protB Promotor-LacZ</i> -Konstruktes (-105 bis +94) (Barckmann et al., 2013)
<i>pc-protB2ΔInt1+Ex1</i>	P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem Transformationsvektor <i>pChabΔSal</i> . Expression eines <i>protB Promotor-LacZ</i> -Konstruktes mit deletierter 3' UTR (-105 bis +4) (Barckmann et al., 2013)

P-Element-Insertionen

<i>BL 30180</i>	<i>w¹¹¹⁸</i> ; <i>P{EP}Kap-α3^{G8397}/TM6C</i> , <i>Sb¹</i> ; Insertion an Position 85D25, innerhalb des ORFs von <i>Kap-α3</i>
<i>BL 15422</i>	<i>y¹ w^{67c23}</i> ; <i>P{EPgy2}Kap-α3^{EY02572}</i> ; Insertion an Position 85D25, 5' stromaufwärts des Gens <i>Kap-α3</i>
<i>BL 41517</i>	<i>y¹ w[*]</i> ; <i>Mi{MIC}αKap4^{M106313} CG32406^{M106313}</i> ; Insertion an Position 65A2, innerhalb des ORFs von <i>Kap-α4</i>
<i>BL 19418</i>	<i>w[*]</i> ; <i>PBac{GAL4D,EYFP}CG32406^{PL00219} P{FRT(w^{hs})}2A P{neoFRT}82B</i> ; Insertion an Position 65A2, 5' stromaufwärts des Gens <i>Kap-α4</i>

Allgemeine Fliegenlinien

<i>w¹¹¹⁸</i> (BL 6326)	Transformationsstamm, als wildtypischer Stamm verwendet
<i>CSTM</i>	<i>w[*]</i> ; <i>Sp/CyO</i> ; <i>MKRS/TM2</i> ; balancierter Multimarkerstamm zur Lokalisation von P-Elementen
<i>ZH-86Fb</i> (BL 24749)	<i>y¹ M (vas-int.Dm)ZH-2A w[*]</i> ; <i>M{3xP3-RFP.attP}ZH-86Fb</i> Keimbahnspezifische Expression der ϕ 31-Integrase; attP-Landungsstelle an zytologischer Position 86F (3R)

3.11 Zell-Linie

Drosophila Schneider SL2-Zellen

aus schlüpfbereiten Embryonen der Linie OregonR etabliert (Schneider, 1972; freundlicher Weise zur Verfügung gestellt vom AG Brehm, IMT, Philipps-Universität Marburg)

3.12 Plasmide und Vektoren

<i>Act-GAL4</i>	GAL4-Treiber-Plasmid unter der Kontrolle von <i>actin</i> -regulatorischen Elementen zur Nutzung in SL2-Zellen (Yepiskoposyan et al., 2006)
<i>pπ25.7wc</i>	Helferplasmid zur Transformation von P-Elementen. Kodiert für die von P-Elementen notwendige Transposase (Karess und Rubin, 1984)
<i>pBlueskript KS⁺eGFP</i>	Klonierungsvektor, der über <i>BamH I</i> und <i>Spe I</i> ein eGFP inseriert trägt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. L. Hempel)
<i>pChabΔSalΔlacZ-eGFP</i>	P-Element Transformationsvektor für <i>Drosophila melanogaster</i> (Thummel et al., 1988) mit einer Länge von 9405 bp. Der im Original enthaltene Heatshock-Promotor und das <i>lacZ</i> -Gen wurden entfernt und ein eGFP-Tag eingefügt. Der Vektor besitzt Ampicillin-Resistenz. (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. Stephan Awe)
<i>pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]</i>	Klonierungsvektor mit einer Länge von 3519 bp zum Klonieren von PCR-Produkten. Der Vektor enthält Resistenzen gegen Kanamycin und Zeocyn. (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>pCR[®] II-TOPO[®]</i>	Klonierungsvektor mit einer Länge von 3973 bp und 3'-überhängenden Desoxyadenosin-Enden zum Klonieren von PCR-Produkten. Der Vektor enthält Resistenzen gegen Ampicillin und Kanamycin, sowie das <i>lacZ</i> -Reporter gen. (Invitrogen, Karlsruhe)
<i>pGADT7</i>	Hefe Expressionsvektor mit einer Länge von 7987 bp. Verwendung im MATCHMAKER [™] GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech, Göttingen). Das inserierte Gen unterliegt einer GAL4 Aktivierungsdomäne. Der Vektor enthält einen HA-Tag und trägt eine Ampicillin-Resistenz.
<i>pGBKT7</i>	Hefe Expressionsvektor mit einer Länge von 7303 bp. Verwendung im MATCHMAKER [™] GAL4 Two-Hybrid System 3 (Clontech, Göttingen). Das inserierte Gen unterliegt einer GAL4 DNA Bindedomäne. Der Vektor enthält einen Myc-Tag und trägt eine Kanamycin-Resistenz.
<i>pPWG</i>	Rekombinations- und Gateway-Vektor zur Erstellung von eGFP-Fusionsproteinen. Der Vektor trägt Resistenzen gegen Ampicillin

und Chloramphenicol. (*Drosophila* Gateway (TM) Vector Collection, Murphy et al., unpublizierte Daten)

<i>pUAS_{attB}-rfa-eGFP</i>	Rekombinations- und Gateway-Vektoren zum Erstellen von diversen Fusionsgenen. Die Vektoren tragen Resistenzen gegen Ampicillin und Chloramphenicol. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. S. Bogdan, Universität Münster)
<i>pUAS_{attB}-eGFP-rfa</i>	
<i>pUAS_{attB}-rfa-mCherry</i>	
<i>pUAS_p-attB-rfa-10xmyc</i>	
<i>CG31679-eGFP</i>	P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem Transformationsvektor <i>pUAS_{attB}-rfa-eGFP</i> . Expression des <i>CG31679</i> -ORFs mit C-terminalen <i>eGFP</i> , unter Kontrolle des eigenen Promotors und der eigenen 5' UTR (Kaiser, Masterarbeit 2010)
<i>CG31682-eGFP</i>	P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem Transformationsvektor <i>pUAS_{attB}-rfa-eGFP</i> . Expression des <i>CG31682</i> -ORFs mit C-terminalen <i>eGFP</i> , unter Kontrolle des eigenen Promotors und der eigenen 5' UTR (Kaiser, Masterarbeit 2010)
<i>CG4683-eGFP</i>	P-Element tragender Fliegenstamm, basierend auf dem Transformationsvektor <i>pUAS_{attB}-rfa-eGFP</i> . Expression des <i>CG4683</i> -ORFs mit C-terminalen <i>eGFP</i> , unter Kontrolle des eigenen Promotors und der eigenen 5' UTR (Kaiser, Masterarbeit 2010)

3.13 cDNAs

Die cDNAs wurden von der Firma Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) hergestellt und als Template für eine PCR verwandt.

Tabelle 3.2: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten cDNAs

Name/ Stock #	Gen	Vektor	Selektion
Gold GH 13953	CG10252	pOT2	Chloramphenicol
Gold IP 01723	Kua	pOT2	Chloramphenicol
Gold IP 10875	Tp194D	pOT2	Chloramphenicol

3.14 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die Orientierung ist in Richtung 5' nach 3' angegeben. Alle integrierten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

((# XY) > Laborinterne Nummerierung)

B3aa23
B3aa140

ATC ATT TCC GAG GAG CAC GGC
GCC CAG CGA GTG CGT CAA TTG

Primer Projekt Endonukleasen

CG15484-RT-sen (# SK 62) ATG GCT TGG GTT CCC ACA TC
 CG15484-RT-as (# SK63) TGT ATT CTG AAT TTC GCC CTT GC
 CG15484-GW-fw (# SK64) CAC CCG CCG GGA TAT TCC
 Squ-ATG-sen (# SK 80) ATG GCA TGG GTT CCC AAT TCG
 Squash-GW-as (# SK 60) TTC ATT GAA TTG GTT TCC AAA TTG G
 Squ-KpnI-sen (# SK73) GGG GGT ACC CAT GTT ACA TAC TTT TC
 Squ-SpeI-as (# SK76) GGG ACT AGT TTC ATT GAA TTG GTT TC

Primer Projekt UbcD6

UbcD6-as-gate (# SK40) ATC GAT GAA ACT CTG CTC AAC G
 UbcD6-RT-RAse (# SK77) ATG TCA ACA CCC GCA CG
 UbcD6-RT-as (# SK1) CGC GCC GAT TTT CTT TAT AC
 UbcD6-RT-sen (# SK2) TGG TGG AAT ATG CTT GGA CA
 UbcD6-RT-RAAs (# SK102A) GGG TTG CGA ATT GTG TGC
 UbcD6-Prsen-gate (# SK57) CAC CGA AAT TGA ATG CGT CAA AG
 GFP-TAA-speI-as (# SK152) GAT ACT AGT TTA CTT GTA CAG CTC G
 GFP-SacII-as (# SK153) GAT CCG CGG ATG GTG AGC AAG GGC
 KpnI-UbcD6-Prsen (# SK53) GGG GGT ACC GAA ATT GAA TGC GTC
 UbcD6-SacII-as (# SK154) GAT CCG CGG ATC GAT GAA ACT CTG
 Spe-UbcD63UTRse (# SK130) GAT ACT AGT CCA TGC GCC CAC
 Xba-UbcD63UTRas (# SK131) GAT TCT AGA CGT GTT ACT TTC ATT TAT TG

Interaktionspartner

CG3473-RT-sen (# SK90) ATG GCC GCA CTG ACT C
 CG3473-RT-as (# SK91) ATT TTG CAT CGC ATG TTT C
 CG5524-ins-se (# SK94) CTC ATT TAG CTG ATA GCG GCG
 CG5524-ins-as (# SK95) CTC AAA CTG AAA CTG AAC CAT TGT G
 CG7376-ins-se (# SK98) GAG CAC GTG AGA TCG AGA TG
 CG7376-ins-as (# SK99) GTG TTT CTT GGT GCA GAT GCA G
 Kua-RT-sen (# SK100) GCG GCC AAG AGC GAT ATG G
 Kua-RT-as (# SK101) CAA TCA TCG GTA TGT CCA CCG

Primer Projekt Mst77FTranslationskontrolle

LacZ-insitu-se (# SK150) CGC CCA TCT ACA CCA ACG
 LacZ-insitu-as (# SK151) CCA CCA CAT ACA GGC CG
 EcoRI-b2t-Prsen (# SK7) GAT GAA TTC TCA TTG TAG GAG CCA GAG
 Kpn-b2t-Pras (# SK8) GAT GGT ACC TTT GAT AGT AAA GTT AGG G
 ProtB-Kpn-sen (# SK45) GAT GGT ACC ATG AGT TCA AAT AAT G
 ProtB-BamHI-as (# SK46) GAT GGA TCC CTT GCA AAT CCG
 Mst77F-Kpn-sen (# SK47) GAT GGT ACC ATG AGT AAT CTG AAA C
 Mst77F-BamHI-as (# SK48) GAT GGA TCC CAT CGA GCA CTT G
 b2t-gate-sen (# SK65) CAC CTC ATT GTA GGA GCC AGA G
 Mst77F-gate-as (# SK69) CAT CGA GCA CTT GGG CTT G
 Mst77F-Pr-Kpn (# SK83) GAT GGT ACC CGC GTT ACT CAG
 Mst77Fd60CSpe (# SK86) GAT ACT AGT CTT CCG CAC CCT G
 Mst-gate2-se (# SK121) CAC CAT GAG TAA TCT GAA ACA AAA GGA TAG CAA G
 Mst-gate-Stop (# SK149) TTA CAT CGA GCA CTT GGG CTT G

Chromatinkondensation

Mst77-Pr-Eco-se (# SK155) GAT GAA TTC CGC GTT ACT CAG
 Mst77-Pr-Kpn-as (# SK156) GAT GGT ACC TTT GCA ACC AAT TC

Mst77-SacII-as (# SK157) GAT CCG CGG CAT CGA GCA CTT G
Mst3UTR-spe-se (# SK158) GAT ACT AGT TCG GAG GTT TCA TCT TC
Mst3UTR-xba-as (# SK159) GAT TCT AGA GAT CAG ACA TAA AAC C
Mst77F-GWsen (# SK226) CAC CCG CGT TAC TCA GCT AGT C
Mst77F-GWas (# SK227) CAT CGA GCA CTT GGG CTT GGA G
Mst77Fd20CSpe (# SK84) GAT ACT AGT GCC GCA TTC CAT C
Mst77Fd40CSpe (# SK85) GAT ACT AGT CTT CGG TTT GCC G
Mst77F-Pr2-Kpn (# SK122) GAT GGT ACC CGC GTT ACT CAG CTA GTC GGA TTG
Mstd40CNLS-Spe (# SK124) GAT ACT AGT CTT CCG GGG TCG CTT CGG TTT GCC G
Mst77-SacII-as (# SK157) GAT CCG CGG CAT CGA GCA CTT G
Mst77F-Pr-SacII (# SK104) GAT CCG CGG CGC GTT ACT CAG
Mst77d100NSacII (# SK106) GAT CCG CGG ATG CAT GTA GAG CCC

Kernimport

aKap3-RA-3UTRse (# SK176) GAT CGA TTT AAT CAG AAA GCA GCC
aKap3-RA-3UTRas (# SK177) GAT GCA GAG TCG CTT CAA TCG
aKap3-RC-3UTRas (# SK178) GAT GGA AAC GCC CAG TCC CTT C
aKap3-RA-5UTRse (# SK179) GAT CAG CCA ACT TCA CTC
aKap3-RA-5UTRas (# SK180A) GAT GAT TTC CTT GTA TAA
aKap4-ins-as (# SK170) GAT GCC GGA CAC CTC TGC
aKap4-ins-se (# SK171) GCG AAG GCT GGC GCC G
aKap4-Kpn-sen (# SK174) GAT GGT ACC GGC ATG TAA TGC GCT C
aKap4-SacII-as (# SK175) GAT CCG CGG GAA TTT AGT TGC GAT GTG
SeqBL15422-sen (# SK175) GTG GAG CGG CAT TGA ATA CG
SeqBL30180-sen (# SK175) GCG ACG TCG GAG AAA TGA AG
Plac1 CAC CCA AGG CTC TGC TCC CAC AAT
MiMIC5-2 (# SK181) GGT ATG TGT TAT CTT TAG TAG TAT TG
pB3Seq CGA TAA AAC ACA TGC GTC AAT T

Interaktionsstudien

Y2HProtAEcoRIfw1 (# SK207) GAA TTC ATG AGT TCA AAT AAT GTA AAT G
Y2HProtABamHIrv (# SK208) GGA TCC TCA GTA TTG CTG GC
Y2HProtAEcoRIfw2 (# SK209) GAA TTC ATG AGT TCA AAT AAT GTA AA
Y2HProtBBamHIrv (# SK210) GGA TCC TTA CTT GCA AAT CC
Y2HTplNdeIfw (# SK211) CAT ATG ATG GGT AGC GTT TTA AG
Y2HTplBamHIrev (# SK212) GGA TCC CTA TAA GTC TGA TAT GA
Mst77StopBamHI (# SK107) GAT GGA TCC TTA CAT CGA GCA CTT G
ProtA-GW-se (# SK221) CAC CAT GAG TTC AAA TAA TGT AAA TG
ProtA-GW-as (# SK222) GTA TTG CTG GCA AAT CCG TC
ProtB-GW-as (# SK223) CTT GCA AAT CCG TCG GCG
Tpl94D-GW-se (# SK224) CAC CAT GGG TAG CGT TTT AAG
Tpl94D-GW-as (# SK225) TAA GTC TGA TAT GAA AAT GCC AC
CG7929-ins-se (# SK160) ATG AAA ACC TTG AAT CTT TTG
CG7929-ins-as (# SK161) CGT GGT CCT TGG AGG
CG10252-ins-se (# SK162) GGG ACT ACA AAC AAA GAT TTT G
CG10252-ins-as (# SK163) CTA CAT ATT GTC ACA TCT AAC
CG12861-ins2-se (# SK168) GGC CAG TCG CAA CGA TAA G
CG12861-ins2-as (# SK169) GCG GCA ACC TGG CGT G
CG7929Kpn-Prse (# SK191) GAT GGT ACC GGT TCT TGA TGG GTC
CG7929SpeI-as (# SK192) GGG ACT AGT CTG ATA CGC GTT CAG
CG10252Kpn-Prse (# SK193) GAT GGT ACC CCC TTA GGG AAC AG
CG10252SpeI-as (# SK194) GGG ACT AGT CAT ATT GTC ACA TCT AAC
CG12861Kpn-Prse (# SK195) GAT GGT ACC GCC TTG TCT ATC GAC
CG12861SpeI-as (# SK196) GGG ACT AGT GTG TGT CTT ATG GCG

CG7929NdeI-se (# SK199)	GGG <u>CAT ATG</u> ATG AAA ACC TTG AAT C
Y2H7929EcoRIas (# SK200)	GGG <u>GAA TTC</u> TCA CTG ATA CGC GTT
CG12861NdeI-se (# SK203)	GGG <u>CAT ATG</u> ATG GGG GTG TTG
Y2H12861SalI-as (# SK204)	GGG <u>GTC GAC</u> TTA GTG TGT CTT ATG
CG7929ORF-GW-se (# SK215)	CAC CAT GAA AAC CTT GAA TC
CG7929-GW-as (# SK216)	CTG ATA CGC GTT CAG ATT C
CG10252ORF-Gwse (# SK217)	CAC CAT GGC GGT GCG ACC
CG10252-GW-as (# SK218)	CAT ATT GTC ACA TCT AAC TAT CAT AG
CG12861ORF-Gwse (# SK219)	CAC CAT GGG GGT GTT GCA G
CG12861-GW-as (# SK220)	GTG TGT CTT ATG GCG GAA ATA TG

Zur Sequenzierung verwendete Primer der AG Renkawitz-Pohl

pChab 5' neu	GCG GAC GCA GCG GCG AAA GAG ACG
RV-XFPpChabSeq (# S09)	CAC GCT GAA CTT GTG GCC
Delta lacZ rev Seq (# S10)	GAA CCT TAC TTC TGT GGT GTG ACA
pUASp-KC10-rev	GGT GCT ATG TTT ATG GCG CT

Sequenzierungs-Primer der Firma LGC Genomics GmbH (Berlin)

T7prom	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
Sp6-20	CTA TTT AGG TGA CAC TAT AG

Die Sequenzierungen wurden durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) durchgeführt. Gensynthesen wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon in Auftrag gegeben.

3.15 Sonstige Materialien

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Life Sciences, München
Deckgläschen (18x18 mm; 24x32 mm)	Roth, Karlsruhe
Deckgläschen (ø 12 mm)	Roth, Karlsruhe
Dumont Pinzetten (Inox 5)	Mercateo, Köthen
Hybond N-Membran	Amersham, Braunschweig
Nitrozellulosemembran Optitran BA-S 83	GE Healthcare Life Sciences, München
Kulturflasche (25 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Neubauer Zählkammer	LO - Laboroptik Ltd, Lancing (UK)
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Petrischale (92x16 mm, ohne Nocken)	Sarstedt, Nümbrecht
24-Well Platte	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman-Papier	Schleicher und Schütt

3.16 Software und Internetseiten

Textverarbeitung Microsoft Word 2007

Bildbearbeitung Adobe® Photoshop® CS2 9.0
Axiovision Rel. 4.8

Genanalysen mit Hilfe von Internetdatenbanken

- ApE -A plasmid Editor (v1.17)
- Clustal W2 Larkin et al., 2007
- DNA-traffic Kuchta et al., 2012
- Ensemble Genome Browser Flicek et al., 2011
- FlyAtlas: the *Drosophila* gene expression atlas Chintapalli, Wang und Dow, 2007
- FlyBase St Pierre et al., 2014
- OligoCalc (v. 3.25) Kibbe, 2007
- PubMed – NCBI Übersichtsartikel: McEntyre und Lipman, 2001
- PSORT/PSORT II Prediction Nakai und Horton, 1999
- RegRNA 1.0/2.0 Huang et al., 2006/ Chang et al., 2013
- SMART Letunic, Doerks und Bork, 2012
- SpermPress Vibranovski et al., 2009
- STRING Known and Predicted Protein-Protein Interactions (v. 9.1) Snel et al., 2000; Franceschini et al., 2013

4 METHODEN

4.1 Umgang mit *Drosophila melanogaster*

4.1.1 Stammhaltung

Futtermedium	90 g Agar Agar
	1 kg Maismehl
	180 g Trockenhefe
	1 kg Fructose
	120 ml 20 % Nipagin in 70 % Ethanol
	360 ml 20 % Propionsäure
	ad 12 l H ₂ O

Die Zucht von *Drosophila melanogaster* erfolgt in Plastik-Kulturröhrchen. Verschluss werden die Röhrchen mit einem milbensicheren Stopfen. Je nach Anzahl an Fliegen werden kleine (Ø 2,5 cm), mittlere (Ø 3 cm) oder große (Ø 4 cm) Röhrchen verwendet. Die Fliegen werden bei 25°C bzw. 18°C gehalten und können durch die Betäubung mit CO₂ oder Diethylether ausgewertet und evtl. neue Kreuzungsexperimente angesetzt werden. In einem Abstand von ca. 2 bis 3 Wochen auf 25°C und ca. 4 bis 5 Wochen auf 18°C, werden die Fliegen auf neue Kulturröhrchen mit frischem Nährmedium umgesetzt.

4.1.2 *Drosophila*-Kreuzungsexperimente

Für die Kreuzungsexperimente werden jungfräuliche Weibchen mit Männchen gepaart. Da *Drosophila melanogaster* Männchen etwa 4 bis 6 Stunden nach Schlüpfen geschlechtsreif werden, können alle bereits geschlüpften Tiere von den Fliegenflaschen entfernt werden, und anschließend alle in den folgenden 4 bis 6 Stunden schlüpfenden Weibchen für Kreuzungen eingesetzt werden. Für Einzelpaarkreuzungen wird je ein transgenes Tier mit 2-3 Tieren des anderen Geschlechts verkreuzt.

4.1.3 Ektopische Expression durch das UAS/GAL4-System

(Brand et al., 1994)

Zur ektopischen Expression von Genen in anderen Geweben wird das UAS-/GAL4-System verwendet. Hierfür werden GAL4-Treiberlinien mit UAS-Effektorlinien (Upstream activating sequence) gekreuzt. In den GAL4-Treiberlinien wird der Transkriptionsaktivator GAL4 unter der Kontrolle eines bestimmten genomischen Enhancers exprimiert. Die UAS-Effektorlinien tragen den ORF des zu untersuchenden Gens unter Kontrolle einer oder mehrerer UAS-Sites. In den

Nachkommen der Kreuzung bindet der Transkriptionsaktivator GAL4 an die UAS-Bindestelle und aktiviert die ektopische Expression des Gens in einem gewebespezifischen Expressionsmuster.

4.1.4 Herstellung transgener Fliegen

(Spradling und Rubin, 1982; Rubin und Spradling, 1982)

Für die Herstellung transgener Fliegenlinien werden Transformationvektoren verwendet, welche auf natürlich vorkommende P-Elemente basieren, jedoch aber für keine funktionsfähige Transposase kodieren. Für die Integration des gewünschten Gens werden die Transformationsvektoren in Verbindung mit einem Helferplasmid (*pπ25.7wc*) injiziert, der das Transposasegen zu Verfügung stellt. Der Helferplasmid selbst kann nicht in das Genom integrieren, da er keine Erkennungssequenzen für die Transposase besitzt. Transformationsvektor und Helferplasmid werden in das synzytiale Blastoderm des posterioren Pols von *white*⁻ Embryonen injiziert.

Neben der ungerichteten Integration des gewünschten DNA-Fragmentes in das *Drosophila* Genom, besteht die Möglichkeit einer ϕ C31-Integrase vermittelten Integration von P-Elementen. Die Injektion erfolgt in spezielle *white* Stämme, die eine ϕ C31-Integrase in der Keimbahn exprimieren (Bischof et al., 2007). Zudem tragen die Fliegenstämme vordefinierte Landungsstellen mit speziellen attP-Sequenzen. Da die ϕ C31-Integrase eine Sequenz-spezifische Rekombination zwischen einer bakteriellen Anheftungsstelle (attachment site attB) und einer Phagen Anheftungsstelle (attachment site attP) ermöglicht, kann somit die Kopplung des attB-tragenden P-Elementes an die Landungsstellen mit Hilfe der attP-Sequenzen vermittelt werden (Bischof et al., 2007; Markstein et al., 2008).

Vorbereitung der Embryonen für die Mikroinjektion

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

Die Fliegen des Injektionsstammes werden auf Apfelsaftagarschalen (5 cm) überführt und die Agarschalen zur Stimulation der Eiablage mit etwas Hefe bestrichen. Die Embryonen werden alle 20 Minuten ab gesammelt, wobei die ersten Ablagen zunächst verworfen werden, um die Eiablage zu synchronisieren. Die Embryonen werden anschließend in ein feinmaschiges Stahlnetzchen überführt und mehrmals mit 0,7 % NaCl gewaschen. Es folgt das Dechorionisieren der Embryonen in einem 1:1 Gemisch aus Dan Klorix® und dH₂O für zwei bis drei Minuten. Nach weiteren Waschschritten mit 0,7 % NaCl werden die Embryonen auf Apfelsaftagarblock aufgereiht. Dabei ist darauf zu achten, dass das posteriore Ende immer in die gleiche Richtung zeigt. Die dechorionisierten Embryonen werden auf ein Deckgläschen übertragen, das mit einem Heptan-Klebstoff (Tesa-Packband™) Gemisch

beschichtet ist. Um den inneren Druck der Embryonen für eine erfolgreiche Injektion zu mindern, werden sie etwa 10 Minuten in einem mit Kieselgel gefüllten Exsikkator getrocknet und anschließend mit Voltalef-Öl überschichtet, um eine weitere Austrocknung zu verhindern.

Mikroinjektion

Injektionsmischung	5 µg Transformationsvektor
P-Transposase vermittelt	2,5 µg Helferplasmid pπ25.7wc
	2,5 µl 10x Injektionspuffer
	mit ddH ₂ O auf 25 µl auffüllen
Injektionsmischung	5 µg Transformationsvektor
φC31-Integrase vermittelt	2,5 µl 10x Injektionspuffer
	mit ddH ₂ O auf 25 µl auffüllen
10x Injektionspuffer	5 mM KCl
	0,1 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4

Der Injektionsansatz wird vor der Injektion für 30 Minuten bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert, und so von Partikel befreit, die die Injektionsnadel verstopfen könnten. Die Injektion der DNA erfolgt anschließend mit Hilfe einer Glaskapillare (Ø 1,2 mm), die manuell in einem Kapillarziehgerät gezogen wurde. Die Nadel wird mit einem Aliquot des Injektionsansatzes beladen und in die Mikroinjektionsapparatur eingespannt. Zudem wird das Deckgläschen mit den dechorionisierten Embryonen in den Kreuztisch der Injektionsapparatur eingespannt. Anschließend wird das Injektionsgemisch in den posterioren Pol aller Embryonen injiziert, die noch keine Polzellen ausgebildet haben.

Zum Schutz vor dem Austrocknen werden die Embryonen erneut mit Voltalef-Öl überschichtet, das Deckglas mit den Embryonen in eine Apfelsaftagarpetrischale gelegt und anschließend bei 25°C inkubiert. Dem Apfelsaftagar wurde zuvor ein Agarblock ausgeschnitten, der freie Bereich mit Wasser gefüllt, um so die Embryonen mit ausreichend Luftfeuchtigkeit zu versorgen. Nach ca. 24 Stunden beginnen die Larven zu schlüpfen. Sie werden vorsichtig mit Hilfe einer Präpariernadel auf Flaschen mit Futtermedium überführt und bis zum Schlüpfen der adulten Tiere auf 25°C inkubiert.

Selektion transgener Fliegenstämme

Die Integration der zu transformierenden DNA erfolgt als keimbahnspezifische Transposition und somit auch ausschließlich in den Keimzellen des injizierten Embryos. Demnach wird auch das auf dem P-Element-Vektor liegende *white*⁺-Gen erst nach einer Kreuzung mit einem *white*⁻-Injektionsstamm exprimiert. In den Tieren der F1-Generation kann somit ein Farbumschlag der Augenfarbe von weiß zu rot beobachtet und die rotäugigen transgenen Tiere von den nicht-transgenen weißäugigen Tieren unterschieden werden.

Nach einer Injektion mit einer P-Transposase vermittelten Integration folgen zwei weitere Einzelpaarkreuzungen der rotäugigen Fliegen gegen den *white*⁻-Injektionsstamm um mögliche Mehrfachintegrationen zu vermeiden. Für die Etablierung transgener Linien werden die heterozygoten Tiere weiter miteinander gekreuzt, bis keine weißäugigen Nachkommen mehr auftreten.

4.1.5 Chromosomale Lokalisation des P-Elementes

Die chromosomale Lokalisation der P-Insertion wird mit Hilfe des Multimarker-Fliegenstammes CSTM ermöglicht. CSTM-Fliegen tragen auf dem zweiten Chromosom den Balancer *Curly of Oster* (*CyO*) und den Marker *Sternopleura* (*Sp*), sowie auf dem dritten Chromosom die Balancer TM2 mit dem Marker *Ultrabithorax* (*Ubx*) und MKRS mit dem Marker *Stubble* (*Sb*). Balancer-Chromosomen sind spezifisch für *Drosophila melanogaster* und erlauben die stabile Haltung rezessiver, letaler Mutationen, da in diesen Fliegen homologe Rekombination zwischen den Schwesterchromosomen durch crossing over verhindert wird. Die Balancer-Chromosomen sind zusätzlich mit dominanten Markern versehen und erlauben das Erkennen der Fliegen im heterozygoten Zustand. Balancer-Chromosomen tragen zudem eine Reihe von Mutationen, welche im homozygoten Zustand zur Letalität führen.

Zunächst werden transgene rotäugige Männchen mit Weibchen des CSTM-Stammes gekreuzt. Anschließend werden rotäugige Männchen der F1-Generation, welche nun die Marker *CyO* und *Sb* tragen, erneut mit Weibchen des CSTM-Stammes gekreuzt. Mit Hilfe der F2-Generation dieser Kreuzung kann dann die chromosomale Lokalisation des P-Elements auf den Chromosomen II, III oder IV bestimmt werden. Besteht eine Insertion auf dem zweiten Chromosom, so müssen alle rotäugigen Nachkommen die Marker *Sb/Ubx* und *CyO* oder *Sp*, alle weißäugigen Nachkommen die Marker *CyO/Sp* und *Ubx* oder *Sb* aufweisen. Hingegen zeigen alle rotäugigen Fliegen mit einer P-Insertion auf dem dritten Chromosom die Marker *CyO/Sp* sowie *Sb* oder *Ubx*. Weißäugige Tiere besäßen die Marker *Ubx/Sb* und *Ubx* bzw. *Sb*. Besitzt ein rotäugiges Tier der F2-Generation alle vier Marker, so deutet dies auf eine Insertion auf dem vierten Chromosom hin. Befinden sich bereits in der F1-Generation nur rotäugige Weibchen und nur weißäugige Männchen weist dies auf eine Lokalisation des P-Elements auf dem X-Chromosom hin.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Präparation und Analyse von DNA

4.2.1.1 Präparation genomischer DNA aus *Drosophila*

(Pirrota, 1986; Steller und Pirrota, 1986)

Extraktionspuffer 100 mM Tris/ HCl, pH 9,0
100 mM EDTA, pH 9,0
1 % SDS

Ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wird zu einem Drittel mit Fliegen gefüllt und nach der Zugabe von 500 µl Extraktionspuffer werden die Fliegen mit Hilfe eines Potters homogenisiert. Das Gemisch wird für 20 Minuten bei 65°C im Heizblock inkubiert. Zur Zellyse werden 180 µl 8 M Kaliumacid zugegeben und das Gemisch für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird zum Entfernen von Fliegenresten zweimal für 15 Minuten bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zum Sedimentieren der genomischen DNA wird ein 1/2 Volumen Isopropanol zugegeben und erneut 30 Minuten bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Überstands wird das Pellet noch zweimal mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in ca. 30 µl ddH₂O aufgenommen. Als Kontrolle der Präzipitation der genomischen DNA wird 1 µl einer 1:10 Verdünnung auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Lagerung der DNA erfolgt bei -20°C.

4.2.1.2 Präparation genomischer DNA aus einer einzelnen Fliege

Squi B 10 mM Tris/ HCl, pH 8,2
1 mM EDTA
25 mM NaCl

Neben der Methode der Präparation genomischer DNA aus mehreren Fliegen besteht die Möglichkeit DNA aus einer einzelnen Fliege zu isolieren. Hierbei wird mit Hilfe einer Pipettenspitze eine Fliege in 50 µl Squi B zerkleinert. Anschließend werden durch die Zugabe von 1 µl Proteinase K (20 mg/ml) und einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C die Proteine verdaut. Daraufhin wird der Ansatz zwei Minuten bei 85°C erhitzt und somit die Proteinase K inaktiviert. Die Lagerung der DNA erfolgt bei -20°C.

4.2.1.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988)

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet. Dabei dienen zwei synthetisch hergestellte Oligonukleotide, welche spezifisch am 3' wie auch am 5' Strang der Matrize binden können, als Primer für die Neusynthese des innen liegenden DNA-Abschnitts. Eine hitzebeständige Polymerase bindet an die Primer und synthetisiert das gesuchte DNA-Fragment.

Die Polymerase-Kettenreaktion wird in mehreren Zyklen vollzogen und führt somit zu einer exponentielle Amplifikation des DNA-Fragments. Die Reaktionsbedingungen variieren in der Länge der zu amplifizierenden DNA, wie auch in der Schmelztemperatur der Primer.

Reaktionsansatz und PCR-Programm unter Verwendung der Taq-Polymerase (Axon)

Reaktionsansatz:	Template DNA	10-100 ng
	Vorwärts-Primer (25 pmol/μl)	1 μl
	Rückwärts-Primer (25 pmol/μl)	1 μl
	dNTPs (10 mM pro NTP)	1 μl
	MgCl ₂ (25 mM)	5 μl
	10x Puffer BD	5 μl
	Taq-Polymerase (5 U/μl)	0,5 μl
	ddH ₂ O	ad 50 μl

PCR Programm:

1.	Denaturierung	95°C	10 Minuten
2.	Denaturierung	95°C	1 Minute
3.	Primerbindung	XX°C	1 Minute
4.	Polymerisation	72°C	XX Minuten
			Anzahl PCR-Zyklen: 25-35
5.	Polymerisation	72°C	10 Minuten
6.	Pause	4°C	∞

Reaktionsansatz und PCR-Programm unter Verwendung der VELOCITY DNA Polymerase (Bioline)

Reaktionsansatz:	Template DNA	5-500 ng
	Vorwärts-Primer (25 pmol/μl)	1 μl
	Rückwärts-Primer (25 pmol/μl)	1 μl
	dNTPs (10 mM pro NTP)	1,5 μl
	5x Hi-Fi Buffer	10 μl
	VELOCITY DNA-Polymerase (2U/μl)	0,5 μl
	ddH ₂ O	ad 50 μl

PCR-Programm:

1.	Denaturierung	96°C	2 Minuten
2.	Denaturierung	96°C	40 Sekunden
3.	Primerbindung	XX°C	40 Sekunden
4.	Polymerisation	72°C	XX Minuten
			Anzahl PCR-Zyklen: 25-35
5.	Polymerisation	72°C	10 Minuten
6.	Pause	4°C	∞

4.2.1.4 Agarosegelelektrophorese von DNA/RNA

(Sambrook et al., 1998)

TAE (50x)	2 M Tris	MOPS (1x)	20 mM MOPS, pH 7
	100 mM EDTA, pH 8		1 mM EDTA
	5,71 % (v/v) Essigsäure reinst		8 mM Natriumacetat

Ladepuffer (10x) 0,1 % Bromphenolblau
 0,1 % Xylencyanol
 0,9 % Borsäure
 40 % Glycerin
 in TAE bzw. MOPS

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können DNA-, wie auch RNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden. Eine Gleichspannung wird angelegt und die Fragmente beginnen vom negativen Pol zum positiven Pol zu „wandern“. Zudem laufen große Stücke deutlich langsamer als kleine Fragmente. Die Agarosekonzentration ist abhängig von der Produkt-Größe und liegt zwischen 0,8 und 2,0 %.

Zum Lösen der Agarose wird diese in 1x TAE (bzw. 1x MOPS bei RNA-Gelen) aufgekocht und anschließend auf 60°C abgekühlt, bevor pro 100 ml Agaroselösung 1 µl Ethidiumbromid (10 µg/ml) zugefügt wird. Ethidiumbromid interkaliert in DNA bzw. RNA und macht die einzelnen Fragmente unter UV-Licht sichtbar. Anschließend wird das Agarosegel gegossen und sofort der Kamm für die Probenaschen eingesteckt. Nach Erkalten des Agarosegels wird 1x TAE bzw. 1x MOPS als Laufpuffer zugeführt.

Zum Beschweren der DNA werden die Proben mit 1/10 Volumen des 10x Ladepuffers versehen. Dieser wandert ebenfalls in Richtung der Anode und markiert die Lauffront des Gels. Die Gele laufen zwischen 60 und 100 V.

4.2.1.5 Erzeugung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

(Sambrook et al., 1998)

Tfb I	30 mM Kaliumacetat	Tfb II	10 mM MOPS
	100 mM Rubidiumchlorid		75 mM Calciumchlorid
	10 mM Calciumchlorid		10 mM Rubidiumchlorid
	15 % (v/v) Glycerin (steril)		15 % (v/v) Glycerin
	pH auf 5,8 (dilute Essigsäure)		pH 6,5 einstellen mit NaOH
	autoklavieren		autoklavieren
	50 mM Manganchlorid		
	(sterilfiltriert)		

50 ml LB-Medium werden mit einer Kolonie von *Escherichia coli* DH5 α angeimpft und die Kultur über Nacht im Schüttler und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden aus dieser Kultur 500 μ l in einen frischen Erlenmeyerkolben mit 500 ml Psi broth/LB überführt und die Kultur erneut bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 0,6 bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 15 Minuten auf Eis gehalten, dann auf 50 ml Falcons verteilt, und für 5 Minuten bei 3.000 UpM und 4°C zu sedimentieren. Der Überstand wird verworfen. Resuspendiert werden die Zellen in 1/3 Volumen TfbI und erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 Minuten, 3.000 UpM, 4°C) werden die Zellen in 1/12 Volumen TfbII resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Je 50 μ l Zellen werden in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung von *Escherichia coli* DH5 α erfolgt bei -80°C.

4.2.1.6 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*

10 μ l Ligationsansatz bzw. 0,5 μ l Plasmid-DNA (Retransformation von Plasmiden) werden zu 50-100 μ l chemisch kompetenten Zellen gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 30 Sekunden einem Hitzeschock im 42°C-Wasserbad ausgesetzt und wiederum kurz auf Eis inkubiert. Daraufhin werden 250 μ l erwärmtes LB-Medium auf die Zellen gegeben und der Ansatz für 30-45 Minuten bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Zellen werden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Antibiotika werden Ampicillin (100 μ g/ml), Chloramphenicol (23 μ g/ml) oder Kanamycin (50 μ g/ml) verwendet.

4.2.1.7 Ligation von PCR-Produkten in TOPO[®]-Vektoren

(Invitrogen)

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten werden sie in einen Zwischenvektor kloniert. Dabei wird für Produkte, welche mit der Taq-Polymerase (Axon) amplifiziert wurden und somit an den 3'-Enden ein Adenin-Überhang tragen, der Vektor *pCR[®]II-TOPO[®]* genutzt. An dessen linearisierten Enden

befinden sich entsprechend dazu Thymidin-Überhänge. Die VELOCITY DNA Polymerase (Bioline) erzeugt im Gegensatz zur Taq-Polymerase Blunt-end PCR-Fragmente und folglich werden diese Produkte in den Vektor *pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]* zwischen kloniert. Zudem besteht die Möglichkeit PCR-Produkte mit dem Gateway-System zu klonieren. Es findet eine gerichtete Klonierung des PCR-Produktes mittels eines 5' CACC-Überhang in den Zwischenvektor *pENTR[™]/D-TOPO[®]* statt.

Ligationsansätze:

<i>pCR[®]II-TOPO[®]</i> und <i>pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]</i>		<i>pENTR[™]/D-TOPO[®]</i>	
PCR-Produkt	1-4 µl	PCR-Produkt	1-5 ng (1 kb)
Vektor	0,5 µl		5-10 ng (2 kb)
(Salt-Solution	1 µl)	Vektor	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 6 µl	(Salt-Solution	1 µl)
		ddH ₂ O	ad 6 µl

Die Zugabe von 1 µl Salt-Solution erfolgt optional nach einer Aufreinigung des PCR-Produkts.

Nach einer Inkubation von ca. 5-20 Minuten bei Raumtemperatur (RT), in Abhängigkeit von der Größe des PCR-Produkts, wird der komplette Ligationsansatz zu 50 µl kompetente Zellen gegeben und analog zur Transformation verfahren. Der Vektor *pCR[®]II-TOPO[®]* besitzt eine Ampicillin-Kassette und somit werden für die Transformation LB-Agarplatten mit Ampicillin (1 µg/µl) verwendet. Die Vektoren *pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]* und *pENTR[™]/D-TOPO[®]* besitzen eine Kanamycin-Kassette und die Zellen werden auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (1 µg/µl) ausgestrichen.

4.2.1.8 Plasmidpräparation aus *E. coli* in analytischen Maßstab (Mini-Präparation)

(Birboim und Doly, 1979)

3 ml LB-Medium werden mit einer *E. coli*-Kolonie angeimpft und mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler, werden 1,5 ml Übernacht-Kultur abzentrifugiert (30 Sekunden, 13.000 UpM) und der Überstand verworfen. Anschließend wird das Pellet in 100 µl E1 resuspendiert, zum Aufschließen der Zellen 200 µl E2 zugegeben und der Ansatz für 5 Minuten bei RT inkubiert. Zur Neutralisation der Reaktion und Protein-Fällung werden 150 µl E3 zugegeben. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 UpM für 4 Minuten wird der klare Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zum Fällen der Plasmid-DNA 320 µl Isopropanol zugegeben. Es wird erneut für 30 Minuten bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die pelletierte Plasmid-DNA wird daraufhin mit 320 µl 70 % Ethanol gewaschen (10 Minuten, 13.000 UpM, 4°C), drei Minuten bei RT getrocknet und in 25 µl destilliertem Wasser aufgenommen. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgt bei 4°C. Die Lösungen E1, E2 und E3 werden nach Anleitung des JETSTAR 2.0 Plasmid Kits (Genomed) hergestellt.

4.2.1.9 Plasmidpräparation aus *E. coli* in präparativen Maßstab (Midi-präparation)

(JETSTAR 2.0 Plasmid Kit, Genomed)

E1	50 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A	E4	600 mM NaCl 100 mM NaAc, pH 5,0 (Essigsäure) 0,15 % (v/v) Triton X-100
E2	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS	E5	800 mM NaCl 100 mM NaAc, pH 5,0 (Essigsäure)
E3	3,1 M KaAc, pH 5,5 (Essigsäure)	E6	125 mM NaCl 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

Für die Präparation größerer und sauberer Mengen an Plasmid-DNA wird das Jetstar 2.0 Plasmid Kit (Genomed), unter Benutzung von Anionenaustauschersäulen, verwendet.

Zunächst werden 50 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum und 30 µl Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wird die Bakterienkultur in 50 ml Falcons abgefüllt und 10 Minuten zentrifugiert (4.000 UpM, RT). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4 ml E1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen werden 4 ml E2 zugegeben, der Ansatz mehrmals geschwenkt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 4 ml E3 wird der Ansatz erneut mehrmals invertiert und zur Fällung der chromosomalen DNA wie auch von Proteinen zentrifugiert (6.000 UpM, 10 Minuten, RT). Der Überstand mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA wird anschließend auf eine zuvor mit 10 ml E4 equilibrierte Genomed-Anionenaustauschersäule geladen. Die Plasmid-DNA wird dabei von der Matrix der Säule gebunden und wird zweimal mit 10 ml E5 gewaschen. Die Elution erfolgt anschließend mit 5 ml E6 in ein 15 ml Falcon. Nach der Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wird der Ansatz vermischt und auf vier 2-ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Mit der folgenden Zentrifugation bei 13.000 UpM und 4°C für 30 Minuten wird die Plasmid-DNA präzipitiert und in einem weiteren Schritt mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen (10 Minuten, 13.000 UpM). Das Pellet wird daraufhin 3 Minuten bei RT getrocknet und in 30 µl destilliertem Wasser aufgenommen. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

4.2.1.10 DNA-Restriktionsverdau mit Endonukleasen

Restriktionsendonukleasen können doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen schneiden. Die für die Reaktion erforderliche Menge des Enzyms wird in der Einheit Units (U) angegeben. Dabei entspricht eine Unit der Menge an Enzym die benötigt wird um an 1 µg DNA des Vektors λ alle spezifischen Schnittstellen innerhalb einer Stunde bei 37°C zu spalten.

Die benötigte Menge am Restriktionsenzym kann wie folgt berechnet werden:

$$\text{benötigte Enzymmenge (U/µg DNA)} = \frac{48,5 \text{ kb (bp } \lambda) \times \text{Anzahl Schnittstellen in der DNA}}{\text{Größe der DNA (bp)} \times \text{Anzahl Schnittstellen in } \lambda}$$

Etwa 100 ng Plasmid-DNA werden mit der berechneten Menge Enzym und 1/10 Volumen Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 20 µl für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Reaktionsansatz:	DNA	< 100 ng
	Restriktionsenzym	0,5-1 U
	10x Reaktionspuffer	2 µl
	ddH ₂ O	ad 20 µl

Anschließend können 10 µl des Verdau auf ein Agarosegel aufgetragen und ausgewertet werden.

4.2.1.11 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Zur Quantifizierung von DNA und RNA wird 1 µl der Probe mit 499 µl destilliertem Wasser gemischt und zur photometrischen Bestimmung in eine Quarzküvette überführt. Als Referenzprobe dienen 500 µl destilliertes Wasser. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm wird gemessen.

Bei einer Quarzküvettenstärke von 1 cm berechnet sich die Konzentration von Nukleinsäuren in µg/µl folgendermaßen:

doppelsträngige DNA	OD260 x 50 x Verdünnungsfaktor
RNA	OD260 x 37 x Verdünnungsfaktor

Neben der Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Photometers kann der Gehalt einer DNA-Probe auch mittels einer Gelelektrophorese überprüft werden. Hierbei wird die Intensität der einzelnen Banden im Vergleich zu den Banden des Markers betrachtet und mit Hilfe von Herstellerangaben bei bestimmten Einsatzvolumina die Konzentration der DNA bestimmt.

4.2.1.12 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um Produkte aus den Vektoren *pCR[®]II-TOPO[®]* und *pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]* in den Endvektor zu klonieren, werden Vorklon wie auch Endvektor mit den gleichen Endonukleasen geschnitten und auf ein Agarosegel aufgetragen.

Isolierung der DNA mit Hilfe des JETSORB DNA-Extraction Kits (Genomed)

Mit dem JETSORB DNA-Extraction Kit von Genomed können DNA-Fragmente aus einem Agarosegel isoliert werden. Hierfür wird mit Hilfe eines sterilen Skalpells und unter UV-Licht die entsprechende Gelbande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin werden pro 100 mg Gelblöckchen 300 µl Puffer A1 und 10 µl JETSORB-Solution zugegeben. Die Lösung wird kurz gevortext und bis zum vollständigen Lösen des Blöckchens für 15 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Dabei wird der Ansatz mehrmals gut durchmischt. Nachdem das Gelstück vollständig gelöst ist, wird die Suspension 30 Sekunden bei 13.000 UpM zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut mit 300 µl Puffer A1 gewaschen (13.000 UpM, 30 Sekunden). Der Überstand wird wiederum verworfen und das Pellet mit 300 µl Puffer A2 gewaschen (13.000 UpM, 30 Sekunden). Der Waschschrift wird ein zweites Mal wiederholt, bevor das Pellet für 10 Minuten bei 50°C getrocknet und in 30 µl ddH₂O aufgenommen wird. Es folgen die Inkubation für fünf Minuten bei 50°C und ein finaler Zentrifugationsschritt bei 13.000 UpM für 30 Sekunden. Der Überstand mit der darin gelösten DNA wird abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der DNA erfolgt bei 4°C.

Isolierung der DNA mit Hilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

Mit Hilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kits von Macherey-Nagel lassen sich ebenfalls DNA-Fragmente aus Agarosegelen isolieren. Die gewünschte DNA-Bande wird mit Hilfe eines sterilen Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend werden pro 100 mg Gelblöckchen 200 µl Puffer NT zugeführt und der Ansatz bis zum vollständigen Lösen des Gelstücks (5-10 Minuten) bei 50°C inkubiert. Währenddessen wird die Suspension alle 2-3 Minuten gevortext. Anschließend wird eine NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Säule in ein Sammelgefäß gestellt und die Säule mit der Suspension beladen. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 Sekunden bei 11.000 UpM, wird das Sammelgefäß geleert und zwei Mal mit 700 µl Waschpuffer NT3 gewaschen (11.000 UpM für 30 Sekunden). Es folgt eine weitere Zentrifugation für eine Minute bei 11.000 UpM, um eventuelle Ethanolreste vollständig zu entfernen. Nun wird die Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und 20 µl ddH₂O auf die Säulen-Membran gegeben. Nach der Inkubation von einer Minute bei RT wird der Ansatz abzentrifugiert (11.000 UpM für 30 Sekunden,). Die Lagerung der isolierten DNA erfolgt bei 4°C.

4.2.1.13 Ligation

Ligationsansatz:	DNA Vektor	100 ng
	DNA Insert	3x und 5x molare Menge
	10x T4 Ligationspuffer	2 µl
	T4-Ligase	1 µl
	ddH ₂ O	ad 20 µl

Für die Ligation wird das Insert in einem dreifachen bzw. fünffach molaren Überschuss eingesetzt. Die Menge an Vektor-DNA im Ligationsansatz beträgt etwa 80 ng bei Vektorgrößen von ~8 kb und etwa 100 ng bei Vektorgrößen von ~10 kb. Die Ligation wird in einem 20 µl Ansatz und für 1,5 bis 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16°C durchgeführt.

4.2.1.14 Klonieren von Produkten mit Hilfe des Gateway-Systems

(Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme Mix, Invitrogen)

Um Produkte aus dem *pENTR[™]/D-TOPO[®]*-Vektor in die Endvektoren zu klonieren, wird der Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme Mix (Invitrogen) verwendet. Dieser katalysiert die *in vitro* Rekombination zwischen attL-Stellen des Eingangsklons und den attR-Stellen des Zielvektors und führt somit zum Transfer des Gens von Interesse in den Zielvektor.

Reaktionsansatz:	Klon pENTR [™] /D-TOPO [®]	150 ng
	Endvektor	150 ng
	ddH ₂ O	ad 8 µl

Zu diesem Gemisch werden 2 µl LR Clonase[™] II Enzyme Mix zugefügt, kurz gevortext und der Ansatz für 2 h bei 25°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wird 1 µl Proteinase K-Lösung zugefügt, wieder kurz gevortext und der Ansatz 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird 1 µl der Reaktion für die Transformation eingesetzt.

4.2.2 Präparation und Analyse von RNA

4.2.2.1 RNA-Isolation aus ganzen *Drosophila*, Testes, Larven und Embryonen

(TRIzol[®], Invitrogen)

Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgt mit TRIzol[®] (Invitrogen) und nach der Methode der Einzschritt-RNA-Isolierungsmethode von Chomczynski und Sacchi (2006).

Für die Isolation werden 30 *Drosophila*-Männchen, jungfräuliche Weibchen, Larven und Testes in 1 ml TRIzol[®] (1 ml/ 50-100 mg Gewebe) mit einem Potter homogenisiert und anschließend 5 Minuten

bei RT inkubiert. Es folgt die Zugabe von 0,2 ml Chloroform und nach 15 Sekunden kräftigem Schütteln wird der Ansatz erneut für 3 Minuten bei RT inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 12.000 UpM wird der Ansatz in eine untere Phenol-Chloroform-Phase und in eine klare obere wässrige Phase getrennt. Diese wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zum Fällen der RNA 0,5 ml Isopropanol zugegeben. Daraufhin wird der Ansatz 10 Minuten bei RT inkubiert, 10 Minuten zentrifugiert (12.000 UpM, 4°C) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wird anschließend mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen (7.500 UpM, 5 Minuten, 4°C) und 10 Minuten an der Luft getrocknet. Gelöst wird die RNA in 25 µl RNase-freiem Wasser für 10 Minuten bei 55°C. Die Lagerung erfolgt bei -20°C. Als Kontrolle wird ein Aliquot auf ein 1,3 %-iges MOPS-Agarosegel aufgetragen.

4.2.2.2 Aufreinigung von polyA⁺-mRNA

(Oligotex® mRNA Mini Kit, Qiagen)

Um PolyA⁺ mRNA aus Gesamt-RNA zu gewinnen, wurde das Oligotex® mRNA Mini Kit von Qiagen verwandt. Hierfür wird Gesamt-RNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zu einem Volumen von 250 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Es folgt die Zugabe von 250 µl Puffer OBB und 15 µl Oligotex Suspension. Der Ansatz wird gut durchmischt und zunächst für 3 Minuten bei 70°C im Heizblock inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei RT (20-30°C). Dieser Schritt ermöglicht die Hybridisierung zwischen den Oligotex-Partikeln und dem PolyA Schwanz der mRNA. Zum Pelletieren des Oligotex-mRNA Komplexes folgt eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 13.000 UpM. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 400 µl Puffer OW2 resuspendiert und das Gemisch auf eine RNase-freie Oligotex-Säule pipettiert. Die Säule wird in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und für eine Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert. Anschließend wird die Säule in ein frisches RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und erneut eine Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird beide Male verworfen. Nun wird die Säule erneut in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zum Eluieren der PolyA⁺-mRNA 25 µl 70°C heißer OEB Puffer zugegeben. Anschließend wird die Lösung auf der Säule vorsichtig 3-4 Mal auf- und abpipettiert und der Ansatz eine Minute bei 13.000 UpM zentrifugiert. Um sicher zu gehen, dass das maximale Volumen an PolyA⁺-mRNA aus der Säule eluiert wird, werden nochmals 25 µl 70°C heißer OEB Puffer zugegeben, kurz auf- und abpipettiert und der Ansatz ein letztes Mal zentrifugiert. Das Eluat wird anschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

4.2.2.3 cDNA Synthese

QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)

Mit Hilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits von Qiagen kann Testes Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür werden zunächst die Komponenten für die „Genomische-DNA-Eliminierungs-Reaktion“ zusammen pipettiert, bestehend aus:

gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl
Template RNA	up to 1 µg
RNase-freies Wasser	ad 14 µl

Der Reaktionsansatz wird für zwei Minuten auf 42°C inkubiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Nun werden die Komponenten für die Reverse Transkription zusammen pipettiert.

Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl
RT Primer Mix	1 µl

Es folgt die Zugabe der Template-RNA („Genomische-DNA-Eliminierungs-Reaktion“) und eine Inkubation der Reaktion für 25 Minuten bei 42°C. Um die Quantiscript Reverse Transkriptase zu inaktivieren folgt eine zweite Inkubation für 3 Minuten bei 95°C. Die cDNA wird bei -20°C gelagert.

innuSCRIPT Reverse Transcriptase (Analytik Jena)

Mit Hilfe der innuSCRIPT Reverse Transcriptase von Analytik Jena wird mit Hilfe von Gen-spezifischen Rückwärts-Primern aus Testes mRNA cDNA geschrieben. Mit dieser Methode wird somit für jedes zu untersuchende Gen eine spezifische cDNA geschrieben.

Die Reaktionskomponenten werden wie folgt zusammen pipettiert:

Testes-mRNA	1 µl
Gen-spez. Rückwärts-Primer (25 pmol)	1 µl
ddH ₂ O	11 µl

Zur Primerbindung wird der Ansatz 10 Minuten bei 60°C inkubiert und anschließend 10 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend werden die folgenden Komponenten hinzu gefügt:

dNTPs (10mM pro NTP)	2 µl
10x RT-PCR Puffer	2 µl
DTT (100mM)	2 µl
innuSCRIPT Reverse Transcriptase	1 µl

Die Reaktion der Reversen Transkription läuft für eine Stunde bei 50°C. Nach einer Inkubation der Reaktion von 15 Minuten bei 70°C und somit der Inaktivierung der Reverse Transkriptase, kann die cDNA auf -20°C gelagert werden.

4.2.2.4 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der RT-PCR

(QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit, Qiagen)

Reaktionskomponenten:	Gesamt-RNA	1 pg-2 µg
	5x QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer	4 µl
	Q-Solution	4 µl
	Vorwärts-Primer (30 pmol/µl)	3 µl
	Rückwärts-Primer (30 pmol/µl)	3 µl
	dNTP Mix (10 mM/µl)	2 µl
	QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym-Mix	0,8 µl
	RNase-Inhibitor	0,25 µl
	RNase-freies Wasser	ad 20 µl

RT-PCR Bedingungen:

1.	Reverse Transkription	50°C	30 Minuten
2.	PCR-Aktivierung	95°C	15 Minuten
3.	Denaturierung	94°C	1 Minuten
4.	Primerbindung	XX°C	1 Minuten
5.	Polymerisation	72°C	XX Minuten
			Anzahl PCR-Zyklen: 25-35
6.	Polymerisation	72°C	10 Minuten
7.	Pause	4°C	∞

Nach dem fünften Schritt erfolgt ein Rücksprung zum dritten Schritt in 25-35 Zyklen.

4.3 Histologische Methoden

4.3.1 *in situ* Hybridisierung an *Drosophila melanogaster* Testes

(modifiziert nach Morris, Benson und White-Cooper, 2009)

Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

(DIG RNA Labeling Kit, Roche)

Zu Beginn werden die benötigten Vektoren linearisiert, welche das Genfragment von Interesse tragen. Hierfür werden 3 µg DNA mit 0,5 µl Enzym gedaut und die DNA anschließend mit einer Ethanol-fällung präzipitiert. Hierfür werden 1/10 Vol 3 M Natriumacetatlösung und 2,5 Vol eiskalter

96 % Ethanol hinzu gegeben und die Lösung anschließend für 15 Minuten bei -18°C inkubiert. Zur Präzipitation der gefällten DNA wird 15 Minuten bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet in 70 % Ethanol gewaschen, 3 Minuten bei RT getrocknet und in 20 μl ddH₂O aufgenommen. Anschließend werden mit Hilfe des DIG RNA Labeling Mix (Roche), sense und antisense RNA-Sonden transkribiert.

Reaktionskomponenten:	DNA linearisierter Vektor	1 μg
	10x Transkriptionspuffer	2 μl
	DIG-RNA-Labeling-Mix	2 μl
	T7-, Sp6- bzw. T3-RNA Polymerase	1 μl
	RNase-freies H ₂ O	ad 20 μl

Die Reaktion wird bei 37°C für 2 h inkubiert. Die RNA-Sonde kann daraufhin durch eine Ethanol-fällung präzipitiert und in 50 μl ddH₂O aufgenommen werden. Die Sonden werden in einer Verdünnung von 1:50 eingesetzt.

Spot-Test DIG-markierter RNA-Sonden

(nach Roche, Mannheim)

DIG I Puffer	0,1 M Tris/HCl, pH 7,5	DIG III Puffer	0,1 M Tris/HCl, pH 9,5
	0,15 M NaCl		0,1 M NaCl
			50 mM MgCl ₂

Zur Qualitätskontrolle der DIG markierten RNA-Sonde wird ein Spot-Test durchgeführt. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe von 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10.000 in RNase-freiem Wasser hergestellt. Daraufhin wird aus jeder Verdünnungen 1 μl auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) gespottet und durch UV-Bestrahlung kovalent vernetzt. Anschließend wird die Membran eine Minute in DIG I Puffer gewaschen und für 30 Minuten in PBT unter leichtem Schwenken geblockt. Daraufhin wird die Membran 30 Minuten in anti-DIG-AP-Antikörperlösung (1:5000 in PBT) bei RT geschwenkt. Es folgen zwei Waschschrte für je 5 Minuten in DIG I und ein weiterer Waschschrte für zwei Minuten in DIG III. Die anschließende Färbereaktion wird durch die Zugabe von 2 ml Färbelösung (4,5 μl NBT + 3,4 μl X-Phosphat/ ml DIG III) gestartet, und unter Lichtabschluss bei RT vollzogen. Wird nach etwa 5 Minuten Färbezeit eine Färbung des Spots der Verdünnung 1:1000 erreicht, ist die Sonde ausreichend markiert und kann bis zur Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Präparation und Fixierung

Die Testes werden in 1x PBS präpariert und auf Eis gelagert. Anschließend werden die Testes für 20 Minuten in frisch angesetzten 4 % Paraformaldehyd/ PBS (F-PBS) fixiert und dreimal für fünf Minuten in PBT gewaschen. Es folgt ein Verdau mit Proteinase K (2,5 μl Proteinase K (20 mg/ml) auf 997,5 μl PBT). Der Verdau wird nach exakt 90 Sekunden durch die Zugabe von Glycerin (100 μl

Glycerin (20 mg/ml) auf 900 µl PBT) gestoppt. Daraufhin werden die Testes zweimal fünf Minuten in PBT gewaschen, für 20 Minuten in 4 % F-PBS refixiert und wiederum zweimal in PBT gewaschen.

Hybridisierung

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

Es folgt ein Lösungswechsel von PBT zur Hybridisierungslösung. Hierfür werden drei Waschschrte für je 10 Minuten mit einem Verhältnis von 1:3, 1:1 und 3:1 von PBT zur Hybridisierungslösung durchgeführt. Daraufhin wird dreimal fünf Minuten mit Hybridisierungslösung gewaschen.

Zum Prähybridisieren werden anschließend pro Probe 100 µl Hybridisierungslösung für fünf Minuten bei 100°C gekocht, auf die Testes gegeben und eine Stunde bei 55°C prähybridisiert. Während der Prähybridisierung wird die Sonde vorbereitet. Hierfür werden die Sonden in Hybridisierungslösung 1:50 verdünnt und für drei Minuten auf 80°C erhitzt. Die Sonden werden anschließend bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gelagert. Die verdünnten Sonden werden auf die Testes gegeben und 12-16 Stunden bei 55°C hybridisiert.

Antikörperbindung

Am nächsten Tag werden die Hybridisierungslösung und das PBT auf 55°C vorgewärmt und die folgenden Waschschrte ebenfalls bei 55°C vollzogen. Zunächst werden die Testes einmal mit Hybridisierungslösung gespült und anschließend 15 Minuten mit Hybridisierungslösung gewaschen. Es folgt ein Lösungswechsel von Hybridisierungslösung zurück zu PBT, durch 15 Minuten-Waschschrte in einem Verhältnis von 1:3, 1:1 und 3:1 von Hybridisierungslösung zu PBT. Daraufhin wird viermal mit PBT gewaschen. Die Proben werden bis auf RT abkühlen gelassen und mit 100 µl anti-DIG-AP Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 in PBT behandelt. Die Inkubation erfolgt eine Stunde bei 37°C.

Färbung

Färbelösung	0,1 M NaCl	Epon	51,5 % (v/v) Epon 812
	0,1 M Tris, pH 9,5		28 % (v/v) Epon Härter DDSA
	1 mM Levamisol		19 % (v/v) Epon Härter MNA
	0,1 % Tween 20		1,5 % (v/v) Eponbeschleuniger
	0,05 M MgCl ₂		DMP 30

Nach der Inkubation mit dem Antikörper werden die Proben viermal je 20 Minuten mit PBT und anschließend dreimal je 10 Minuten mit frisch angesetzter Färbelösung gewaschen. Im letzten Waschschrte werden die Testes zum Färben mit einer abgeschnittenen gelben Pipettenspitze in ein

Blockschälchen transferiert und die Färbung durch die Zugabe von 3,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phosphat auf 1 ml Färbelösung gestartet. Die Färbereaktion wird im Dunkeln und bei RT vollzogen und kann gegebenenfalls auf 37°C inkubiert werden. Wenn die Färbung intensiv genug ist, kann sie durch mehrfaches Waschen mit PBT gestoppt werden. Anschließend werden die Testes mit Hilfe einer Ethanolreihe entwässert (25 %, 50 %, 75 % und 100 % Ethanol für je 5 Minuten). Eine eventuelle Hintergrundfärbung kann durch einen 5-15 minütigen Waschschrift mit einem 1:1 Gemisch aus Ethanol und Methylsalicylat und einem Waschschrift mit purem Methylsalicylat entfärbt werden. Danach wird noch ein weiteres Mal mit 100 % Ethanol gewaschen und die Testes in Epon eingebettet. Epon muss über Nacht bei 60°C aushärten.

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

Fixierlösung	60 µl 25 % Glutardialdehyd in 2 ml 100 mM Phosphatpuffer pH 7,4	Phosphatpuffer 0,1 M 70 mM Na ₂ HPO ₄ 30 mM NaH ₂ PO ₄
Färbelösung	10 mM Phosphatpuffer 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 0,3 % Triton X-100 3,3 mM K ₃ [Fe(II)(CN) ₆] 3,3 mM K ₄ [Fe(III)(CN) ₆]*3H ₂ O pH 7,0	Phosphatpuffer 10 mM 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄

Die Testes werden in 1x PBS präpariert und in Blockschälchen mit 1x PBS überführt. Anschließend wird das PBS abgesaugt und durch 1 ml 0,7 % Glutaraldehydlösung ersetzt. Nach 15 Minuten Fixieren bei Raumtemperatur wird das Glutaraldehyd abgesaugt und zweimal für eine Minute mit 2 ml PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS werden 2 ml Färbelösung zugegeben und die Färbung durch die Zugabe von 25 µl 8 % X-Gal gestartet. Die Färbung findet im Dunkeln statt und kann durch eine Inkubation bei 37°C beschleunigt werden. Ist die Färbung stark genug werden die Testes noch zweimal mit je 2 ml PBS gewaschen und anschließend in 50 % Glycerin eingebettet.

4.3.3 Immunfluoreszenz zum Antigen Nachweis an Testes-Quetschpräparaten

(Hime et al, 1996)

Testes adulter Fliegen werden in 1x PBS präpariert, auf zuvor mit Polylysin behandelte Objektträger transferiert und ein 18x18 mm großes Deckglas aufgelegt. Durch leichtes Aufdrücken eines Papiertuches wird das PBS vorsichtig abgesaugt und die Keimzellen des Testisschlauchs freigesetzt. Der Objektträger wird sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren und das Deckglas mit Hilfe eines

Skalpells abgesprengt. Die Präparate werden für 10 Minuten bei -20°C in 95 % Ethanol entwässert und anschließend bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd/ PBS (F-PBS) für 7 Minuten fixiert. Durch zweimaliges Waschen für 30 Minuten mit PBSTD wird das Gewebe permeabilisiert. Es folgt ein Waschschriff in PBT für 10 Minuten. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen werden die Präparate für 30 Minuten in 3 % BSA (Albumin-Fraktion V) in PBT geblockt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (verdünnt in 3 % BSA/ PBT) erfolgt in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C . Am nächsten Tag folgen vier Waschschriffe für je 15 Minuten in 3 % BSA/ PBT. Anschließend wird der Zweitantikörper (verdünnt in 3 % BSA/ PBT) auf die Präparate gegeben und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur oder 60 Minuten bei 37°C in einer abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Alle folgenden Schritte werden ebenfalls im Dunkeln vollzogen. Nach der Behandlung mit dem Zweitantikörper werden die Präparate zunächst einmal für 15 Minuten in 3 % BSA in PBT gewaschen und anschließend optional für 20 Minuten mit Phalloidin-TRITC (verdünnt in 3 % BSA/ PBT) inkubiert. Es folgt ein erneuter Waschriff in 3 % BSA in PBT, bevor 1 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 zur Waschlösung hinzu gegeben und erneut für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wird. Nach weiteren drei Waschschriffen in 3 % BSA/ PBT werden die Präparate für die mikroskopische Auswertung in Fluoromount G eingebettet. Die Lagerung der Präparate erfolgt unter Lichtabschluss bei 4°C .

4.3.4 Antigennachweis durch Immunfluoreszenz an Quetschpräparaten von Speicheldrüsen

(Murawska und Brehm, 2012)

Fixierlösung 45 % (v/v) Essigsäure
 0,5 % (v/v) Formaldehyd
 auf 4°C maximal 2 h haltbar

Waschlösung A	300 mM NaCl	Waschlösung B	400 mM NaCl
	0,2 % NP-40		0,2 % NP-40
	0,2 % Tween20 in 1x PBS		0,2 % Tween20 in 1x PBS

Die Speicheldrüsen von L3-Larven werden in 1x PBS präpariert. Ein Tropfen Fixierlösung wird auf einem 24x32 mm Deckglas vorgelegt und die Speicheldrüsen hinein transferiert. Nach einer Fixierzeit von 5 Minuten wird ein mit Polylysin-beschichteter Objektträger von oben auf den Tropfen Fixierlösung gelegt und umgedreht. Um die Polytäanchrosomen zu spreizen wird zunächst mit der Radiergummiseite eines Bleistiftes vorsichtig mehrmals auf das Deckglas geklopft und anschließend das Präparat mit der Seite des Deckglases nach unten zwischen zwei Whatman-Papiere gelegt. Von oben wird nun ein starker Druck mit dem Daumen erzeugt, wobei jedoch darauf zu achten ist, dass das Deckglas nicht horizontal verschoben wird. Anschließend werden die Präparate in flüssigen Stickstoff schockgefroren, das Deckglas abgesprengt und die Objektträger 10 Minuten in PBS gewaschen.

Das PBS wird durch Blocklösung (5 % Milchpulver in 1x PBS) ersetzt und die Präparate für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Blocken werden die Objektträger kurz in PBS gewaschen, die überschüssige Flüssigkeit kurz mit einem Tuch abgesaugt und 40 µl Erstantikörper (verdünnt in 5 % Milchpulver in PBS) auf die Präparate gegeben. Die Inkubation des Erstantikörpers ist von einer Stunde bei RT bis hin zu 2 Tagen auf 4°C möglich.

Anschließend werden die Präparate kurz in PBS gespült, dreimal für 5 Minuten in 5 % Milchpulver in PBS gewaschen, wiederum kurz mit PBS gespült, bis schließlich die Zugabe von 40 µl des Zweitantikörpers (verdünnt in 5 % Milchpulver in PBS) erfolgt. Nach der Inkubation von einer Stunde in einer dunklen Feuchtkammer und bei RT, werden die Objektträger erneut kurz in PBS gespült. Es folgen zwei Waschschrte für 10 Minuten mit den Waschpuffern A und B. Nach kurzem Spülen in PBS folgt die Färbung der DNA mit Hoechst (1:250 verdünnt in PBS) für 4-5 Minuten. Bevor die Präparate in Fluoromount eingebettet werden können, wird noch einmal kurz in PBS gespült und für 10 Minuten in PBS gewaschen. Die Lagerung der Präparate erfolgt unter Lichtabschluss bei 4°C.

4.3.5 Immunfluoreszenz zum Antigennachweis an *Drosophila* SL2-Zellen

Drosophila SL2-Zellen werden in 24-Well-Platten ausgesät und mit DNA-Konstrukten transfiziert (siehe Kapitel 4.4.1 und 4.4.2). Parallel hierzu wird eine zweite 24-Well-Platte mit Glasplättchen bestückt. Die Glasplättchen werden mit 200 µl Poly-L-Lysin beschichtet und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wird das Poly-L-Lysin von den Glasplättchen abgenommen und 500 µl der transfizierten Zellen auf die mit Glasplättchen bestückte 24-Well-Platte überführt. Damit die Zellen adhärent werden können, werden sie für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend kann der Überstand abgenommen werden und es erfolgt die Zugabe von 500 µl frischem 4 % F-PBS für 15 Minuten. Nach dem Fixieren wird das F-PBS wieder abgenommen und die Zellen zweimal für 5 Minuten in 1x PBS gewaschen. Daraufhin werden die Zellen durch die Zugabe von 500 µl 0,5 % Triton X-100 in PBS für 2,5 Minuten permeabilisiert. Es folgt ein weiterer Waschschrte in PBS für 5 Minuten, bevor die Zellen für 30 Minuten in 500 µl Blocklösung (3 % BSA in 1x PBS) inkubieren. Nun werden die einzelnen Glasplättchen vorsichtig mit Hilfe einer Kanüle und einer Pinzette aus der 24-Well-Platte genommen, kurz in PBS und dH₂O geschwenkt, und anschließend in 30 µl Erstantikörper (verdünnt in 3 % BSA/ PBS) für 2 Stunden bei RT und in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Behandlung mit dem Erstantikörper werden die Glasplättchen erneut kurz in PBS und danach in dH₂O geschwenkt und in 30 µl Zweitantikörper (1:100 in 3 % BSA/ PBS) inkubiert. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei RT und in einer dunklen Feuchtkammer. Anschließend werden die Glasplättchen wiederum in PBS und danach in dH₂O geschwenkt. Es folgt die Behandlung für 15 Minuten in Phalloidin (1:100 in PBS) und danach für 15 Minuten mit Hoechst 33258 (1:200 in PBS). Nach einem letzten Schwenken in PBS und dH₂O können die Glasplättchen in einem kleinen Tropfen Fluoromount G eingebettet werden. Die Lagerung der Präparate erfolgt im Dunkeln bei 4°C.

4.4 Methoden aus der Zellkultur

4.4.1 Kultivieren von *Drosophila* SL2-Zellen

Kulturmedium Schneider's *Drosophila* Medium
 10 % (v/v) fötales Kälberserum (30 Minuten bei 56°C inaktiviert)
 5000 U/ml Penicillin
 5000 µg/ml Streptomycin

Drosophila Schneiderzellen (SL2-Zellen) sind semi-adhärenente Suspensionszellen. Die Zellen werden bei 25°C ohne CO₂ in 5 ml Schneiderzellmedium und in 25 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % werden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren gelöst und 1 ml der Zellsuspension in eine frische Kulturflasche mit 5 ml frischem Medium gegeben.

4.4.2 Aussäen von *Drosophila* SL2-Zellen

Für die im folgenden Abschnitt behandelte „Transfektion von *Drosophila* Schneider Zellen“ werden die Zellen in 24-Well-Platten (Ø 1 cm) ausgesät. Für Immunfluoreszenz zum Antigennachweis (IF) wird pro Konstrukt ein Well benötigt und für die Herstellung von Proteinextrakten (PE) jeweils 20 Wells pro Konstrukt. Für ein Well werden 3x10⁵ Zellen/ ml benötigt. Hierfür werden zunächst 10 µl unverdünnte Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer pipettiert, 4 Großquadrate (4x16 Kästchen) ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Dieser Wert gibt die derzeitige Zellzahl (x10⁴ Zellen/ ml) im Kulturmedium an. Nun kann in einem Falcon die für die Transfektion benötigte Menge an Zellsuspension mit frischem Kulturmedium gemischt und pro Well 1 ml Zellsuspension pipettiert werden. Die Well-Platte wird mit Parafilm abgedichtet und die Zellen im 25°C Schrank für ca. 3 Stunden inkubiert.

4.4.3 Transfektion von *Drosophila* Schneider Zellen

(FuGENE[®] HD Transfection Reagent, Promega)

Die Transfektion von SL2-Zellen wird mit FuGENE[®] HD Transfection Reagenz (Promega) vollzogen.

Reaktionsansatz:	<u>Pro Well (AK)</u>	<u>für 20 Well (PE)</u>
	0,5 µg DNA 1	10 µg DNA 1
	0,5 µg Act-GAL4	(10 µg DNA2)
		10 µg Act-GAL4
	+ 3 µl FuGENE [®]	+ 60 µl bzw. 90 µl FuGENE [®]
	+ 20 µl Medium	+ 440 µl bzw. 410 µl Medium

Pro Well werden 0,5 µg des zu untersuchenden DNA-Konstrukts mit der gleichen Menge des Act-GAL4 DNA-Konstrukts vermischt. Das Experiment beruht auf dem UAS-GAL4-System. So exprimiert das Act-GAL4-Konstrukt GAL4 unter Kontrolle des Aktin-Promotors und bewirkt dadurch die Expression des zu untersuchenden Gens, welches ein UAS-Element N-Terminal vom ORF trägt. Zu der DNA werden 20 µl Medium und 3 µl FuGENE® (im Verhältnis 1:3 zur Menge an Gesamt-DNA) gegeben. Der Ansatz wird gut durchmischt und für 5-10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend werden 25 µl des Reaktionsansatzes zu den ausgesäten Zellen (siehe Kapitel 4.4.2) gegeben, und die Well gut durchmischt. Die Well-Platte wird mit Parafilm abgedichtet und die Zellen für zwei Tage bei 25°C inkubiert. Die Zellen können anschließend für Proteinextraktion oder Antikörperfärbungen verwendet werden.

4.5 Präparation und Analyse von Proteinen

4.5.1 Proteinextraktion

(NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit, Thermo Scientific)

Vorbereitung der Zellen

Die Proteinextraktion aus *Drosophila* SL2-Zellen wird mit Hilfe des NE-PER Kits durchgeführt. Hierfür werden die transfizierten Zellen zunächst durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in den Wells gelöst und in ein 50 ml-Falcon überführt. Es folgt eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 2.000 UpM und 4°C. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 1 ml 1x PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Ansatz erneut zentrifugiert (2.000 UpM, 3 Minuten und 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer CER I und 1 µl 10x Proteinaseinhibitor resuspendiert.

Zytoplasmatische und Nukleäre Protein Extraktion

Der Ansatz wird nun 15 Sekunden auf höchster Stufe gevortext und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es wird 5,5 µl eiskalter Puffer CER II zugegeben und 5 Sekunden gevortext. Es folgt eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 UpM und 4°C, woraufhin der klare Überstand (Zytoplasmatische Fraktion) in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden kann. Die Fraktion kann bis zum Gebrauch auf Eis gehalten oder bei -80°C gelagert werden.

Um die nukleären Proteine zu gewinnen, wird das Pellet in 50 µl eiskaltem NER I und 0,5 µl 10x Proteinaseinhibitor resuspendiert, der Ansatz 15 Sekunden auf höchster Stufe gevortext und für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Innerhalb der Inkubationszeit wird das Gemisch zudem alle 10 Minuten für 15 Sekunden gevortext. Es folgt ein letzter Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 13.000 UpM und 4°C. Der Überstand mit dem nukleären Extrakt wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und kann bei -80°C gelagert werden.

4.5.2 Co-Immunopräzipitation (CoIP)

(GFP-Trap[®]_A Kit, Chromotek)

2x SDS-Ladepuffer	120 mM Tris/HCl, pH 6.8
	20 % Glycerol
	4 % SDS
	0.04 % Bromphenolblau
	10 % β -Mercaptoethanol

Für die Immunopräzipitation von GFP-Fusionsproteinen wird das GFP-Trap[®]_A Kit von Chromotek verwendet. Hierfür werden zunächst die GFP-Trap[®]_A Beads equilibriert. Es werden ~30 μ l Beads in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und anschließend dreimal mit Verdünnungspuffer gewaschen. Hierzu werden 500 μ l Verdünnungspuffers zugegeben und der Ansatz für 5 Sekunden bei 13.000 UpM und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wird der Verdünnungspuffer entfernt und die Beads können für die Immunopräzipitation verwendet werden.

Bevor die Kern-Proteinextrakte auf die GFP-Trap[®]_A Beads gegeben werden können, werden noch 500 μ l Verdünnungspuffer zugegeben, der Ansatz gut durchmischt und pro Ansatz 50 μ l in ein neues Reaktionsgefäß als Input (10 %) auf Eis gelagert. Das übrige Gemisch wird nun für die Immunopräzipitation auf die equilibrierten Beads gegeben und der Ansatz 2,5 h auf 4°C und in einem Rotator inkubiert. Die GFP-Proteine binden an die GFP-Trap[®]_A Beads und nach der Inkubation kann das überschüssige Material durch eine Zentrifugation für 5 Sekunden bei 13.000 UpM und 4°C entfernt werden. Der Überstand kann als „nicht gebundenes Material“ in ein neuen Reaktionsgefäß überführt werden. Die Beads werden im Anschluss dreimal für 5 Minuten mit 500 μ l Verdünnungspuffer gewaschen und anschließend abzentrifugiert (13.000 UpM, 5 Sekunden, 4°C). Nach dem letzten Waschschrift und der Abnahme des Verdünnungspuffers, werden pro Probe 100 μ l 2x SDS-Ladepuffer zugegeben, der Ansatz mit den Beads gut durchmischt und für 10 Minuten auf 95°C aufgeköcht, um die Proteinkomplexe von den Beads zu lösen. Anschließend wird noch einmal zentrifugiert (13.000 UpM, 5 Sekunden, 4°C), der Überstand mit den GFP-Fusionsproteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

4.5.3 SDS-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970; Bio-Rad)

10x SDS-Page Laufpuffer (BIO-RAD)	25 mM Tris/HCl, pH 8,3
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS

Sammelgel	130 mM Tris/HCl, pH 6,8	Trenngel	380 mM Tris/HCl, pH 8,8
	4 % (v/v) Acrylamid		10 % (v/v) Acrylamid
	0,1 % (v/v) SDS		0,1 % (v/v) SDS
	0,1 % (v/v) APS		0,14 % (v/v) APS
	0,1 % (v/v) TEMED		0,1 % (v/v) TEMED

Mit der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei hilft das im SDS-Ladepuffer enthaltene β -Mercaptoethanol, die Tertiärstrukturen der Proteine und deren mögliche Komplexverbindungen aufzulösen. Desweiteren führt SDS zu einer negativen Ladung der Proteine, sodass beim Anlegen einer elektrischen Spannung die Proteine durch die Polyacrylamid-Matrix zum Pluspol wandern. Die netzartigen Strukturen des Acrylamids führen zudem dazu, dass kleine Proteine schneller als große wandern und die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Porengröße der Matrix nimmt mit steigender Acrylamid-Konzentration ab.

Die einzusetzende Acrylamid-Konzentration richtet sich nach den aufzutrennenden Proteingrößen. In dieser Arbeit sollen Proteine mit einer Größe von ~ 50 kDa aufgetrennt werden und so wurde ein 10 %-iges Trenngel gewählt. Die einzelnen Komponenten werden zusammen pipettiert, wobei darauf zu achten ist, dass TEMED und 10 % APS als letztes dazugegeben werden, da diese Komponenten zur Polymerisierung des Gels führen. Nach dem das Trenngel gegossen und auspolymerisiert ist, kann das Sammelgel gegossen werden. Das Sammelgel konzentriert später die Proben in einer Front zum Trenngel und führt somit zu einer gleichmäßigen Trennung.

Nach dem Polymerisieren des SDS-Gels werden pro Spur vorerst 25 μ l Proteinextrakt (siehe Kap. 4.5.2 Co-Immunopräzipitation) aufgetragen und zum Größenvergleich der Banden der Massenstandard *Color Plus Prestained Ladder* (NEB). Für eine bessere Verteilung der Proben in den Taschen des Gels, wird es zunächst für 2-3 Minuten bei 100 V angeschlossen. Anschließend werden die verbleibenden 25 μ l Proteinextrakt aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 200 V für ~ 1 h, bis die Lauffront aus dem Gel heraus gelaufen ist.

4.5.4 Western Blot Analyse

(Bio-Rad)

10x Tankblot-Puffer	25 mM Tris/HCl, pH 8,3	TBSTT	1x TBS
	129 mM Glycin		
	20 % (v/v) Methanol (Zugabe im 1x Puffer)		
10x TBS	20 mM Tris/HCl, pH 7,7	TBSTT	1x TBS
	140 mM NaCl		
			0,2 % Triton X-100
Färbelösung	Methanol	40 % (v/v)	
	Essigsäure	10 % (v/v)	
	Coomassie Brillant Blau	0,05 % (w/v)	

Entfärbelösung	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

Durch die Tauch-Blot-Methode werden Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und können anschließend mit proteinspezifischen Antikörpern sowie sekundären Enzym gekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden.

Nachdem mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese die Proteine aufgetrennt wurden kann die Gelapparatur abgebaut werden, das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 10 Minuten in 1x Tankblot-Puffer auf einem Schwenker gewaschen werden. Anschließend kann der Blot zusammengebaut werden. Hierfür werden zunächst 6 Whatman-Papiere und eine Nitrozellulosemembran auf die Größe des Gels geschnitten. Die 6 Whatman-Papiere wie auch zwei Schwämme werden in Tankblot-Puffer getaucht und die Membran mit dH₂O angefeuchtet. Die Blotapparatur wird nach folgendem Schema zusammen gebaut, und über Nacht bei 4°C und 30 V durchgeführt.

- Pol **Schwamm**
 3 Whatman-Papiere
 Gel
 Nitrozellulosemembran
 3 Whatman-Papiere
+ Pol **Schwamm**

Am nächsten Tag wird die Apparatur abgebaut und die Membran für 10 Minuten in 1x TBS gewaschen. Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen, wird das Trenngel mit Coomassie gefärbt und anschließend in Entfärbelösung geschwenkt, bis deutliche Protein-Banden zu erkennen sind.

Um unspezifische Bindestellen auf der Membran abzusättigen, wird die Membran für ca. eine Stunde in 5 % Milchpulver in TBS geschenkt. Anschließend wird die Nitrozellulosemembran mit dem Erstantikörper (verdünnt in 5 % Milchpulver in TBS) über Nacht und bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgen zwei Waschschrte mit TBSTT und ein Waschschrte mit TBS für je 10 Minuten, woraufhin die Membran für eine Stunde bei RT mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert werden kann. Dieser wird ebenfalls in 5 % Milchpulver in TBS verdünnt. Nach der Inkubation folgen 4 Waschschrte in TBSTT für je 10 Minuten.

Für die anschließende ECL-Reaktion wird das Novex[®] ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit von Invitrogen verwandt. Die beiden im Kit enthaltenen Reagenzien A (Luminol) und B (Enhancer) werden vermisch und 1 ml für eine Minute des Gemisches auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert eine Chemolumineszenzreaktion des Reagenziengemisches, die mit einem Chemilumineszenz-sensitivem Films sichtbar gemacht wird.

4.6 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

4.6.1 Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

(MATCHMAKER™ GAL4 Two-Hybrid System 3, Clontech)

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems können Protein-Protein Interaktionen nachgewiesen werden. Das Prinzip des Systems basiert darauf, dass eukaryotische Transkriptionsaktivatoren aus physikalisch trennbaren und funktionell unabhängigen Domänen bestehen. Sie bestehen aus einer DNA-Bindungsdomäne (BD), die die Bindung an spezifische Promotorsequenzen vermittelt, und einer Aktivierungsdomäne (AD), welche den Transkriptionsapparat rekrutiert und somit die Transkription von Genen *downstream* der DNA-Bindungsdomäne aktiviert. Natürlicherweise sind beide Domänen Bestandteil eines Proteins und führen nur in Verbindung zu einer Transkriptionsaktivierung. Werden beide Domänen aus getrennten Systemen in physikalische Nähe gebracht, so kann die Transkriptionsaktivierung dennoch aktiviert werden. Auf dieser Eigenschaft beruht das Hefe-Zwei-Hybrid System. Es werden zwei Expressionsvektoren verwendet die entweder für die BD (*pGBKT7*) oder für die AD (*pGADT7*) kodieren. Interagieren die zu untersuchenden Proteine, kommen beide Domänen in räumliche Nähe und die Transkription des Reportergens (z.B. *lacZ*) wird aktiviert.

Im Hefestamm AH109 ist das Gen *adenin* deletiert und die Hefe somit auxotroph für Adenin (Ade). Somit kann durch Ausplattieren der Kotransformanten auf Mangelmedium (-Ade), auf Transformanten selektiert werden, welche das Fusionsprotein und somit den Marker Ade2 exprimieren. Zusätzlich ist die Detektion positiver Interaktionspartner durch das Reportergen *lacZ* möglich. Bei einer positiven Interaktion wird *lacZ* exprimiert und das im Mangelmedium vorhandene X- α -Gal umwandelt (siehe Abbildung 4.0).

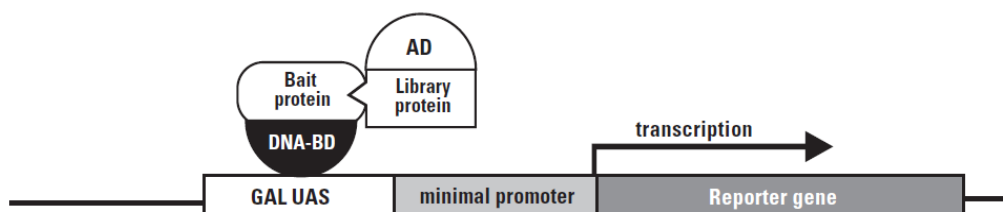


Abb. 4.0: Schematische Darstellung des MATCHMAKER™ GAL4 Two-Hybrid System 3. Die DNA-BD, fusioniert mit dem Köderprotein (Bait; im Vektor *pGBKT7*), rekrutiert bei Interaktion mit dem Beuteprotein (Library- oder Prey; im Vektor *pGADT7*) die AD, und das Reportergen wird angeschaltet. Das MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 verwendet verschiedene Reportergene, wie z.B. *lacZ*. (Abb. entnommen aus Clontech User Manual PT3247-1).

Selektionsplatten (SD/-His/-Leu/-Trp)

Kolben A	Yeast nitrogen base	4,02 g	Kolben B	Agar	12 g
	10x Do (-AHLT)	60 ml		dH ₂ O	300 ml
	10x Einzel-AS (+Ade)	60 ml			
	dH ₂ O	150 ml			

Beide Kolben werden getrennt autoklaviert und nachträglich 30 ml 40 % Glucose zugegeben.

Für die Transformation der kompetenten Hefezellen wird folgender Ansatz pipettiert:

100 µl	kompetente Zellen
2,5 µg	Köder-Protein (inseriert im Vektor <i>pGBKT7</i>)
2,5 µg	Beute Protein (inseriert im Vektor <i>pGADT7</i>)
10 µl	Lachssperma DNA (10 mg/ml)

Der Ansatz wird gut durchmischt, frisch angesetztes 600 µl PEG/LiAc zugeben und gevortext. Anschließend wird die Transformations-Reaktion bei 30°C und auf dem Schüttler (220 UpM) inkubiert. Nach 40 Minuten Inkubationszeit werden 70 µl DMSO zugegeben, der Ansatz mehrfach invertiert und zunächst für 15 Minuten bei 42°C, dann für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 3-5 Minuten bei 2.000 UpM. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 150 µl 1x TE resuspendiert und die transformierten Hefezellen mit Hilfe von sterilen Glasperlen auf Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgt für etwa 3 Tage bei 30°C.

4.6.5 Überstreichen der Kotransformanten

Induktionsplatten (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X-α-Gal)

Kolben A	Yeast nitrogen base	0,65 g	Kolben B	Agar	2 g
	10x Do (-AHLT)	10 ml		dH ₂ O	57 ml
	dH ₂ O	28 ml			

Beide Kolben werden getrennt autoklaviert und nachträglich 5 ml 40 % Glucose und 100 µl X-α-Gal (20 µg/ml) zugegeben.

Mit Hilfe von sterilen Zahnstochern werden Kolonien von den Selektionsplatten auf Induktionsplatten überstrichen. Im Falle einer Interaktion der zu untersuchten Proteine, bilden das pGBKT7-Konstrukt mit der DNA-Bindedomäne und das pGADT7-Konstrukt mit der Aktivierungsdomäne einen funktionellen Transkriptionsaktivator. Die Transkription des im MATCHMAKER™ Two-Hybrid System 3 enthaltenen Reportergens *lacZ* wird aktiviert, β-Galaktosidase exprimiert und eine mögliche Interaktion anhand einer Blaufärbung der Kolonien auf den X-Gal-haltigen Induktionsplatten ersichtlich. Zudem können nur positive Kotransformanten Adenin synthetisieren und somit auch nur positive Kotransformanten auf dem Mangelmedium (-Ade) der Induktionsplatten wachsen.

5 ERGEBNISSE

5.1 Nukleasen als potenzielle Kandidaten zum Setzen von DNA-Strangbrüchen während des Histon-Protamin-Wechsels

Einhergehend mit dem Wechsel von einer auf Histonen zu einer auf Protaminen basierenden Chromatinstruktur treten große Mengen an DNA-Strangbrüchen auf (Rathke et al., 2007). Es wird postuliert, dass das Lösen von DNA-Bindestrukturen den Prozess der Chromatinumstrukturierung ermöglicht. Sein zugrundeliegender Mechanismus ist jedoch bisher nicht bekannt. In den Kernen reifer Spermien von Mäusen und Menschen ist eine Beteiligung von Endonukleasen beschrieben (Pittoggi et al., 1999; Sotolongo et al., 2005). Diese schneiden bevorzugt Histon-gebundenes Chromatin und wurden somit auch als geeignete Kandidaten, zum Setzen von DNA-Brüchen während des Histon-Protamin-Wechsels in *Drosophila* in Betracht gezogen (Kaiser, Masterarbeit 2010).

5.1.1 Die Endonukleasen CG31682, CG31679 und CG4683 werden nicht in den Kernen des Kanustadiums exprimiert

In meiner Masterarbeit (Kaiser, Masterarbeit 2010) habe ich mit der Untersuchung der Nukleasen-kodierenden Gene *CG31679*, *CG31682*, *CG32463* und *CG4683* begonnen und mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen die Verteilung der Nukleasen-mRNAs bis in post-meiotische Stadien nachgewiesen. Eine Beteiligung der Endonukleasen an der Umstrukturierung des Chromatins erschien aufgrund dieser Ergebnisse möglich (Kaiser, Masterarbeit 2010). Um eine Verteilung der Proteine im Testis bestimmen zu können, wurde mit der Klonierung von Fusionsproteinen für *CG31679*, *CG31682* und *CG4683*, unter der Kontrolle des eigenen Promotors und der 5' UTR, begonnen. Zur Visualisierung der Expression wurden die Gene C-terminal mit einem eGFP-Tag fusioniert (Kaiser, Masterarbeit 2010). Die Klonierungen wurden im Rahmen dieser Arbeit beendet und die Injektion und Etablierung transgener Fliegen vollzogen.

Die transgenen Fliegen für *CG31682-eGFP* exprimieren das eGFP-Fusionsprotein im Zytoplasma von Spermatozyten (Abb. 5.0 A,A" Pfeile). Zudem wird ein eGFP-Signal in den Nebenkernen (Pfeilköpfe) und in den Flagellen (Doppelpfeil) detektiert. In den Zellkernen der Keimzellen, speziell im Kanustadium und somit zum Zeitpunkt des Histon-Protamin-Wechsels, ist kein *CG31682-eGFP* nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Zu diesem Zeitpunkt ist auch das *CG31682* Transkript kaum mehr nachweisbar (Kaiser, Masterarbeit 2010).

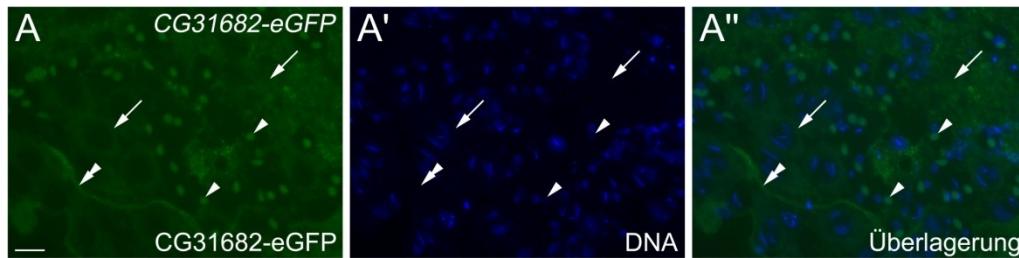


Abb. 5.0: *CG31682-eGFP* wird im Zytoplasma, in den Nebenkernen und in den Flagellen exprimiert. Autofluoreszenz von GFP an Testes-Quetschpräparaten zur Analyse der Verteilung von *CG31682-eGFP*. (A) Das Fusionsprotein *CG31682-eGFP* wird im Zytoplasma exprimiert (Pfeile). Zudem findet sich eine Anreicherung von *CG31682-eGFP* in den Nebenkernen (Pfeilköpfe) und in den Flagellen (Doppelpfeil). (A') Färbung mit Hoechst zur Visualisierung der DNA. (A'') Überlagerung beider Kanäle. Maßstabsbalken: 20 μm .

Transgene Fliegen für *CG31679-eGFP* und *CG4683-eGFP* zeigen ebenfalls eine Expression des Fusionsproteins in den Nebenkernen, den mitochondrialen Derivaten, und in den einzelnen Flagellen einer Zyste (Daten nicht gezeigt). Demnach werden die Endonukleasen *CG31679* und *CG4683* scheinbar ebenfalls nicht in den Kernen des Kanustadiums exprimiert und können zusammen mit der Endonuklease *CG31682* als mögliche Induktoren der DNA-Strangbrüche während der Umstrukturierung des Chromatins als eher unwahrscheinlich betrachtet werden.

5.1.2 Squash und CG15484 als mögliche Induktoren von DNA-Brüchen während des Histon-Protamin-Wechsels

Nachdem sich CG31679, CG31682 und CG4683 als potenzielle Nukleasen zum Setzen von DNA-Strangbrüchen während des Histon-Protamin-Wechsels als eher unwahrscheinlich erwiesen hatten, wurde eine Beteiligung der Nuklease Squash (CG4711) untersucht. *squash* wurde in einem Screen für weiblich sterile Mutanten identifiziert und die Mutanten zeigen Defekte in der dorsoventralen Musterbildung während der Oogenese (Schupbach und Wieschaus, 1991). Zudem ist Squash an der Stilllegung von Genen mittels RNA Interferenz (RNAi) beteiligt (Pane et al., 2007). Squash enthält Proteindomänen, welche Homologien zu denen von Nukleasen aufweisen (Pane et al., 2007). Neben Squash wurde auch dessen Paralog CG15484 untersucht. *CG15484* kodiert für ein 206 Aminosäuren langes Protein, das zu ~48 % (98 von 206 Aminosäuren) mit Squash identisch ist (siehe Abb. 5.1). Aufgrund der hohen Identität zu Squash, wird CG15484 unter dem Synonym Squash-like aufgeführt.

Squash	MAWVPNSQFEDDLVDMEDPFDNFVHGQLAYDMKKQGEFWP-RPKCTYEYILKSREKRNSELE	59
CG15484	MAWVPTSRFEHDLVQLEPHFNLVHGQIAYELRKKKEEFSESVPIHTEYELLTAREDLLG---	57
	*****.*:***.***:::*.**.*:*****:***:::*.** * *** *.:***. .	
Squash	NIHGSRRGGTGRDIRQSLQLMENIQKIAGTRPLGEHATMKDWEDESTNELEALAMMRHFGM	119
CG15484	--YGRGGKGREIRQSLQMMETIQRVAGTKPLGEHATMEDWEDTTMVDVEAIAIIRNFGR	115
	:*:***.***:*****:*.**.*:***:*****:*****:***** : : :***:***:*.**	
Squash	MSMATDSLPLVLPVEKPPPEGPIKIIRNGRKQFPLITDPEFFKPRKIPRTKNSSSSSSSYHTA	179
CG15484	MTLKQDSLTLQPQISLP----AVAPNESQRFPPLITDRDFFTPRKIRRPKDLPP-----VE	166
	*:: **.*: *::.* * : * : :***** :**.**** *.*:.. .	
Squash	NSSISSFSLYESAASDLSSKKQGEIKASKSEKYLEVPYKQLAESYDQEVESPVQFGNQF	239
CG15484	NSPDN-----SADDSFHTAKSLSNCIWLNGLKYPDKTSK-----GEIQNT-----	206
	**.. ***.. : : ** : . * *:::..	
Squash	NE	241
CG15484	--	

Abb. 5.1: Squash und CG15484 zeigen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz. Gezeigt ist ein Alignment der Nukleasen Squash und CG15484. (*) zeigt einzelne konservierte Aminosäuren. (:) und (.) weisen auf konservierte Gruppen hin. Das Alignment wurde mit ClustalW 2.1 erstellt (Larkin et al., 2007).

squash wie auch *squash-like* Transkripte sind im Testis angereichert (FlyAtlas: Chintapalli et al., 2007) und mit Hilfe von PSORT II (Nakai und Horton, 1999) wurde eine Wahrscheinlichkeit der Kernlokalisierung dieser Proteine von rund 50-60 % ermittelt (siehe Tab. 5.0). *squash* und *CG15484* liegen auf Chromosom 2L an Position 36A10 und 33F (FlyBase: St. Pierre et al., 2014).

Tab. 5.0: Squash und Squash-like sind weitere Nukleasen-kodierende Gene

Protein	Anzahl Aminosäuren	im Testis hochreguliert	Wahrscheinlichkeit für eine Kernlokalisierung
Squash	241	+	61 %
Squash-like (CG15484)	206	+	48 %

5.1.2.1 Transkripte von *squash* und *squash-like* sind im Zytoplasma von Spermatozyten zu detektieren

Zunächst wurde die Verteilung der Transkripte von *squash* und *squash-like* im Testis untersucht. Es wurden *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Testes durchgeführt und sense und antisense RNA-Sonden verwendet, welche jeweils gegen das vollständige Transkript gerichtet sind. Die Färbungen mit den antisense-Sonden zeigen, dass die Transkripte von *squash* und *squash-like* im Zytoplasma von Spermatozyten zu detektieren sind (siehe Abb. 5.2 A und C, Pfeile). In postmeiotischen Stadien können keine Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 5.2 A,C, Pfeilköpfe). Zudem zeigen die Testes der sense-Sonden keine Färbung, woraus zu schließen ist, dass die Färbungen mit den antisense-Sonden spezifisch sind (Abb. 5.2 B,D).

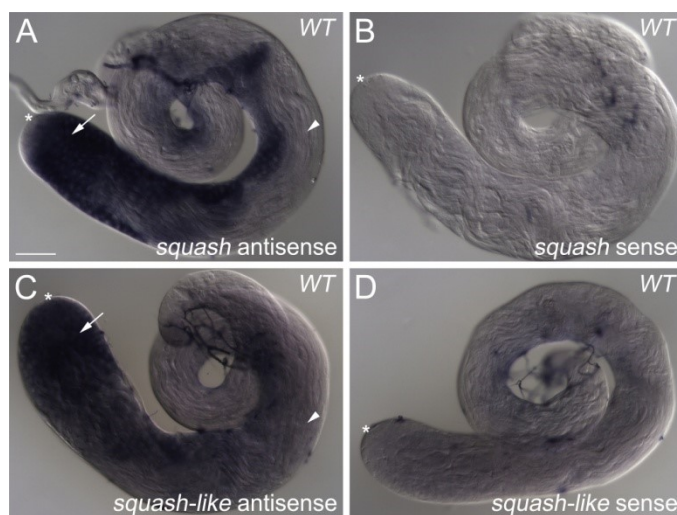


Abb. 5.2: Die Transkripte von *squash* und *squash-like* sind im Spermatozytenstadium zu detektieren. *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Testes von *Drosophila*. (A) *squash* mRNA kann im Zytoplasma von Spermatozyten detektiert werden (Pfeil). In postmeiotischen Stadien ist kein Transkript nachweisbar (Pfeilkopf). (C) *squash-like* Transkripte sind ebenfalls im Spermatozytenstadium erkennbar (Pfeil). Postmeiotische Stadien zeigen keine Färbung (Pfeilkopf). (B und D) In den Kontrollen mit den sense-Sonden ist kein Signal zu detektieren. Die Sterne markieren die Hub-Regionen der Testes. Maßstabsbalken: 100 μ m.

5.1.2.2 Das Fusionsprotein Squash-eGFP zeigt ein hohes Expressionslevel im Zytoplasma von mitotischen Zellen

Um die Verteilung von *squash* und *squash-like* auf Proteinebene zu analysieren, wurde zunächst Immunfluoreszenz (IF)-Nachweise mit einem Antiserum gegen Squash (Hybridoma Bank) an doppeltransgenen Tieren für *histon-RFP;protamineB-eGFP* durchgeführt. Die Proteinverteilung zeigt ein sehr schwaches Signal im Bereich der Testis-Spitze, in den Kernen von Spermatogonien (Daten nicht gezeigt), und schwache Signale im Zytoplasma wie auch im Nukleolus von Spermatozyten (siehe Anhang Seite 128 Abb. 7.0 A, Pfeil). Squash ist zudem in den Kernen junger elongierender Spermatiden (siehe Anhang Seite 128 Abb. 7.0 B, Pfeile) und in den Schwanz-Zystzellen detektierbar (Daten nicht gezeigt). In den Kernen des frühen Kanustadiums ist nur noch ein schwaches sehr diffuses Signal erkennbar, dessen Spezifität fraglich ist (siehe Anhang Seite 128 Abb. 7.0 C, Pfeile). Mit dem vollständigen Abbau von Histon-RFP und dem Einbau von ProtaminB-eGFP ist kein Squash mehr zu detektieren (siehe Anhang Seite 128 Abb. 7.0 D,E). Somit scheint Squash ein geeigneter Kandidat um die DNA-Strangbrüche zum Histon-Protamin-Wechsel einzuleiten.

Da das Proteinsignal in der IF jedoch sehr schwach ist, wurde ein Squash-eGFP Fusionsprotein generiert. Hierfür wurde der Bereich 1077 bp stromaufwärts des AUG-Translationsstarts von *squash* sowie der offene Leserahmen (ORF) C-terminal mit einem eGFP-Tag fusioniert und transgene Fliegen etabliert. Die transgenen Fliegen zeigen ein hohes Expressionslevel des eGFP-Fusionsproteins im Zytoplasma von mitotischen Zellen (siehe Abb. 5.3 A,A' Pfeil). Im weiteren Verlauf der Spermatogenese ist ein schwaches Signal im Zytoplasma von Spermatozyten zu verzeichnen, jedoch aber kein Signal in den Spermatiden (Abb. 5.3 A,A' Pfeilkopf). Es besteht somit eine Diskrepanz zwischen dem Immunhistologischen Nachweis von Squash mit Hilfe des Antiserums und der Expression des Squash-eGFP Fusionsproteins. Ein überlappendes Färbemuster ist lediglich im Zytoplasma von Spermatozyten zu beobachten. Es muss überprüft werden, ob das Signal des Antikörpers in den elongierenden Kernen spezifisch ist und ob hier der 3' UTR zu korrekten Verteilung des Fusionsproteins nötig ist.

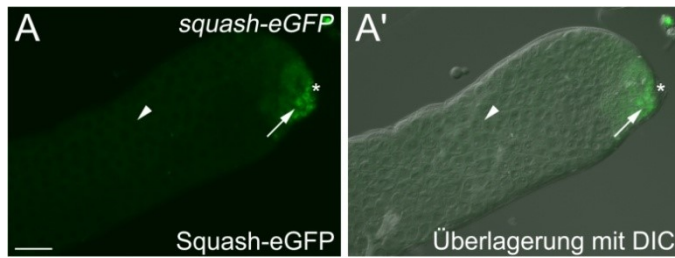


Abb. 5.3: Squash-eGFP wird stark im Zytoplasma einiger mitotischen Zellen exprimiert. Das eGFP-Fusionsprotein wird im hohen Maß in mitotischen Zellen exprimiert (Pfeil) und nimmt im Spermatozyten-Stadium sichtlich ab (Pfeilkopf). (1) Squash-eGFP Signal und (2) eine Überlagerung mit dem zugehörigen DIC-Kanal. Der Stern markiert den Hub des Testis. Maßstabsbalken: 50 μm .

Es wurden ebenfalls transgene Fliegen für *squash-like* generiert, doch ist in diesen kein Fusionsprotein detektierbar. Eine Beteiligung von Squash oder auch von Squash-like am Setzen von DNA-Strangbrüchen während des Chromatin-Umbaus kann somit nicht bestätigt werden.

5.2 Das Ubiquitin-konjugierende Enzym UbcD6 sowie weitere Komponenten des Rad6-Reparaturweges werden während der Spermatogenese von *Drosophila* exprimiert

Wie einleitend erwähnt, wird für Rad6 in Hefen, als auch für HR6A und HR6B in Säugern, eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur postuliert (Koken et al., 1991 A, B; Roest et al., 1996). Auch in der Spermatogenese von *Drosophila* sind große Mengen an phosphoryliertem UbcD6 in Spermatozyten und nochmals im späten Kanustadium zu detektieren (Rathke und Renkawitz-Pohl, unpublizierte Daten). Zu diesem Zeitpunkt wird der Wechsel von einer Histon-basierenden zu einer auf Protaminen-basierenden Chromatinstruktur vollzogen. Dieser Prozess wird von einer großen Zahl an DNA-Brüchen begleitet (Rathke et al., 2007). Nach dem Histon-Protamin-Wechsel sind keine DNA-Brüche mehr zu detektieren und machen UbcD6 somit zu einem geeigneten Kandidaten als DNA-Reparaturprotein (Rathke et al., 2007).

5.2.1 UbcD6-eGFP wird im Zytoplasma exprimiert

Um die Funktion des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms UbcD6 während der Umstrukturierung des Chromatins zu analysieren, wurden im Laufe meiner Masterarbeit bereits diverse UbcD6-Fusionskonstrukte kloniert und transgene Fliegen etabliert (Kaiser, Masterarbeit 2010). Um die Expression von UbcD6 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Spermatogenese zu ermöglichen und den Einfluss analysieren zu können, wurde der ORF von *UbcD6* (exklusive der Introns) unter die genregulatorische Kontrolle heterologer Promotoren gestellt und C-terminal mit einem Tag fusioniert. Die Fusionskonstrukte wurden nachweislich transkribiert, jedoch war es nicht möglich die Fusionsproteine zu detektieren (Kaiser, Masterarbeit 2010).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Konstrukt etabliert, welches den kompletten offenen Leserahmen von *UbcD6* sowie die Introns und, anstelle eines heterologen Promotors, putative regulatorische Sequenzen von 999 bp stromaufwärts des AUG-Translationsstarts trägt. C-terminal und im richtigen Leserahmen wurde ein eGFP-Tag angehängen. Aus Fliegen, welche das Konstrukt in ihr Genom integriert haben, wurden Testes isoliert und Frischpräparate unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das UbcD6-eGFP

Fusionsprotein ist in den Schwanz-Zystzellen zu detektieren (siehe Abb. 5.4) und zeigt zudem ein sehr schwaches Signal in den Zystzellen früher Spermatogenese-Stadien (Daten nicht gezeigt). Ein stadienspezifisches eGFP-Signal in den Kernen einzelner Keimzellen ist nicht zu detektieren.

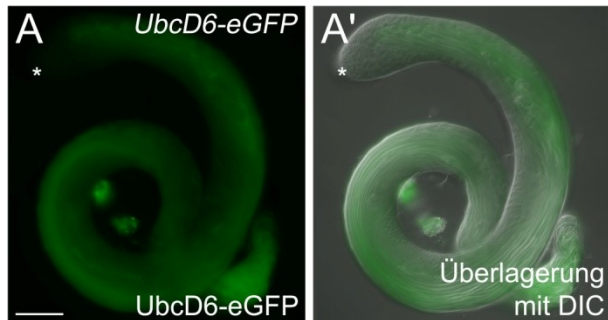


Abb. 5.4: UbcD6-eGFP ist in den Schwanz-Zystzellen detektierbar. Das eGFP-Fusionsprotein zeigt ein starkes Signal in den Schwanz-Zystzellen. (A) UbcD6-eGFP Signal mit der (A') Überlagerung mit dem DIC-Kanal. Der Stern markiert den Hub des Testis. Maßstabsbalken: 100µm.

5.2.2 Die Isoform UbcD6-RA wird im Testis transkribiert

Da die Expression des UbcD6-eGFP Fusionsproteins lediglich in den Schwanz-Zystzellen nachzuweisen ist, sollte im nächsten Versuch ein Fusionsprotein für UbcD6 generiert werden, welches zusätzlich den genspezifischen 3' untranslatierten Bereich (3' UTR) trägt, da dieser möglicherweise die Stabilität des Fusionsproteins und/oder die Translation reguliert. Hierfür musste zunächst analysiert werden, welche Isoform - *UbcD6-RA* oder *UbcD6-RC* - im Testis vorhanden ist, da beide Isoformen sich hinsichtlich der Länge der 3' UTR unterscheiden.

Um das Vorhandensein beider Isoformen während der Spermatogenese zu bestätigen bzw. widerlegen, wurde eine RT-PCR an mRNA wildtypischer *Drosophila* Testes durchgeführt. Mit Hilfe der Oligonukleotide *UbcD6-RT-RAse* und *UbcD6-RT-as* des Primerpaares 1 (Position der Primer siehe Abb. 5.5 A) können die distinkten Transkripte beider UbcD6-Isoformen amplifiziert werden. Die Primer überspannen ein Intron und amplifizieren ein 406 bp langes Fragment an RNA bzw. ein 2168 bp großes Fragment an DNA. Es wurde ein Fragment mit einer Länge von 406 bp amplifiziert (siehe Abb. 5.5 B1) und die Transkription von *UbcD6* im Testes verifiziert. In einer weiteren RT-PCR konnte zwischen den Isoformen *UbcD6-RA* und *UbcD6-RC* unterschieden werden. Hierfür wurden spezifische Oligonukleotide für die Isoform *UbcD6-RA*, *UbcD6-RT-sen* und *UbcD6-RT-RAas* (Position des Primerpaares 2 siehe Abbildung 5.5 A), verwendet. Die Primer überspannen ein Intron und amplifizieren ein 456 bp langes RNA-Fragment bzw. ein 518 bp großes DNA-Fragment. Die Auswertung der RT-PCR zeigt, dass ein Fragment von 456 bp amplifiziert werden kann (siehe Abb. 5.5 B2) und somit im Testes die Isoform *UbcD6-RA* transkribiert wird. Da durch

dieses Experiment eine Transkription der Isoform *UbcD6-RC* nicht ausgeschlossen werden kann, besteht zudem die Möglichkeit, dass neben der Isoform *UbcD6-RA* auch die Isoform -*RC* transkribiert wird.

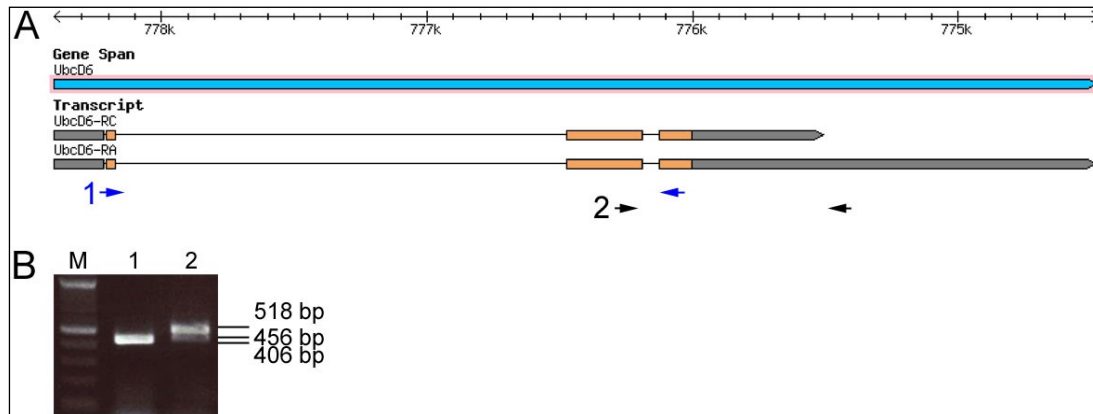


Abb. 5.5: Nachweis von Transkripten der Isoform *UbcD6-RA* durch RT-PCR an mRNA wildtypischer *Drosophila*-Testes. (A) Schematische Darstellung der genomischen Region von *UbcD6* mit den möglichen Isoformen *UbcD6-RA* und *UbcD6-RC*. Die Positionen der verwendeten Primerpaare für die RT-PCR werden mit blauen bzw. schwarzen Pfeilen dargestellt. (B) Mit spezifischen Primern wurden in beiden Spuren RNA-Banden erhalten. (1) Die Primer liefern ein Amplifikat von 406 bp und somit den Nachweis von *UbcD6* im Testis. (2) Mit spezifischen Primern für die Isoform *UbcD6-RA* wird ein RNA-Fragment von 456 bp erhalten. Zudem liegt bei 518 bp eine Kontamination mit DNA vor. (M) Marker: 2 log DNA Ladder.

5.2.3 Das Fusionsprotein UbcD6-GFP mit einer genspezifischen 3' UTR wird in den Schwanz-Zystzellen exprimiert

Wie bereits zuvor praktiziert, besteht neben der Methode der Antikörperfärbung, die Möglichkeit mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen das Expressionsmuster von Proteinen zu analysieren. In der Spermatogenese von *Drosophila* erfolgt die Translationskontrolle meist über die 5' UTR, so z.B. für die Testis-spezifisch transkribierten Gene *dj-like* und die *protamine A* und *B* (Hempel et al., 2006; Barckmann et al., 2013). Demnach werden für die Herstellung transgener Fliegen Konstrukte generiert, welche aus dem Promotor und der 5' UTR, sowie dem ORF des zu analysierenden Gens bestehen. Die 3' UTR sowie das Polyadenylierungssignal entstammen meist dem *Simian Virus 40* (SV 40). Sie werden über den Transformationsvektor bereit gestellt.

Mit Hilfe eines Antikörpers und einer IF konnte phosphoryliertes UbcD6 in Spermatozyten sowie in Keimzellen des Kanustadiums nachgewiesen werden (Rathke und Renkawitz-Pohl, unpublizierte Daten). Jedoch weisen im Vergleich hierzu die *UbcD6-eGFP* exprimierenden

Testes ein GFP-Signal allein in den Schwanz-Zystzellen auf. Um zu klären, ob die Diskrepanz zwischen beiden Expressionsmustern an der in den bisherigen Fusionsgenen fehlenden genspezifischen 3' UTR liegt, wurde eine weitere Klonierungsstrategie angewandt. Hierfür wurden 999 bp stromaufwärts des AUG-Translationsstarts sowie der vollständige ORF von *UbcD6*, C-terminal mit einem GFP-Tag fusioniert und zudem die genspezifische 3' UTR von *UbcD6* angefügt. *UbcD6* ist kein Testis-spezifisch exprimiertes Gen und so besteht die Möglichkeit, dass über die 3' UTR die Regulation der Translation erfolgen kann und deshalb der Nachweis mit Antikörpern in IF ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweist als das GFP-Fusionsprotein ohne eine genspezifische 3' UTR. Nachdem in Kapitel 5.2.2 nachgewiesen werden konnte, dass die Isoform *UbcD6-RA* im Testis transkribiert wird, wurde für das Konstrukt die 3' UTR der Isoform *UbcD6-RA* mit einer Länge von 1524 bp gewählt.

Aus transgenen Fliegen für das Konstrukt *UbcD6-eGFP+3' UTR*, wurden Testes isoliert und Frischpräparate unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das eGFP-Fusionsprotein zeigt ein vergleichbares Expressionsmuster wie das Fusionsprotein *UbcD6-eGFP* (Verteilung *UbcD6-eGFP* siehe Kap. 5.2.1, Abb. 5.4). Das eGFP-Signal ist allein in den Schwanz-Zystzellen zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Es ist kein stadienspezifisches eGFP-Signal in den Kernen der Keimzellen erkennbar.

5.2.4 Die Komponenten des Rad6-Signalweges werden nur in den frühen Stadien der Spermatogenese von *Drosophila* transkribiert

Wie bereits erwähnt ist Rad6 u.a. ein Mitglied im Signalweg der Postreplikationsreparatur (PRR) und die Komponenten des Rad6-Weges sind von der Hefe bis zum Menschen stark konserviert (Prakash, 1981). Da es nicht möglich war *UbcD6-eGFP* in den Keimzellen, speziell im Kanustadium zu detektieren, soll im nächsten Abschnitt die Verteilung weiterer DNA-Reparaturproteine während des Histon-Protamin-Wechsels analysiert werden. Es wurde nach geeigneten Kandidaten gesucht die eine erhöhte Expression in der männlichen Keimbahn zeigen. Mit Hilfe der Datenbank DNA-traffic (Kuchta et al., 2012) wurden zunächst die Proteine MMS2, Rad5, Rad18 und Ubc13 als weitere Komponenten des Rad6 Signalweges identifiziert, und anschließend mit Hilfe der Datenbanken DNA-traffic und Ensemble (Flicek et al., 2011) nach Homologen Proteinen in *Drosophila* gesucht. Eine

Anreicherung der jeweiligen Transkripte im Testis wurde über die Datenbank FlyAtlas (Chintapalli et al., 2007) ermittelt. Somit konnten als homologe Proteine, die Kandidaten Kua, CG7376, CG5524 und CG3473 identifiziert werden. Die Komponenten des Rad6-Reparatur Signalweges in der Hefe *S. cerevisiae* und die dazugehörigen Homologe in *Drosophila* sind in der Tabelle 5.1 aufgeführt. Für MMS2 und Ubc13 wurden zudem die homologen Proteine Uev1A bzw. Bendless identifiziert, beide sind jedoch, im Vergleich zur gesamten Fliege, auf dem Transkriptionsniveau im Testis runter reguliert (siehe Tab. 5.1, Kennzeichnung mit „-“).

Tab. 5.1: Mitglieder des Rad6 -DNA-Reparaturweges und deren Homologe in *Drosophila* (Stand 11/2011)

<i>S. cerevisiae</i>	Potentielles Homolog in <i>Drosophila</i>	Transkripte im Testis hochreguliert
MMS2	Kua	+
	Uev1A	-
Rad5	CG7376	+
Rad18	CG5524	+
Ubc13	CG3473	+
	Bendless	-

Nachdem Kandidaten für homologe *Drosophila* Reparaturproteine identifiziert werden konnten, wurde die Verteilung ihrer Transkripte im Testis untersucht. Um erste Hinweise auf das Expressionsmuster der zu untersuchenden DNA-Reparaturproteine zu erhalten, wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Es wurden antisense RNA-Sonden mit Längen von ~450-600 bp gegen die jeweiligen Transkripte synthetisiert, wobei als Template für die Kua-Sonden cDNA diente und für alle weiteren Sonden genomische DNA verwandt wurde. Die *in situ* Hybridisierungen wurden an wildtypischen Testes durchgeführt.

Die Auswertung der Experimente zeigt, dass die Transkripte der Reparaturproteine Kua (A), CG7376 (C), CG5524 (E) und CG3473 (G) im Zytoplasma von Spermatozyten nachzuweisen sind (siehe Abb. 5.6, Pfeile). Zudem sind Transkripte von CG5524 und CG3473 in frühen Spermatiden zu erkennen (Abb. 5.6 C,D Pfeilköpfe). In Stadien mit elongierenden Spermatiden können keine Transkripte mehr detektiert werden. Die mit den sense-Sonden behandelten Testes weisen keine Signale auf, woraus sich schließen lässt, dass die Nachweise der Transkripte mit den antisense-Sonden spezifisch sind (Abb. 5.6 B,D,F,H). Demnach sind die untersuchten Transkripte des PRR-Signalweges in *Drosophila* nur bis in die frühen Spermatiden zu detektieren und somit auch scheinbar nicht in den Kernen des Kanustadiums präsent. Eine Reparatur von DNA-Strangbrüchen nach dem Wechsel von

Histonen zu Protaminen über den Signalweg der Postreplikationsreparatur (PRR) scheint demnach eher unwahrscheinlich.

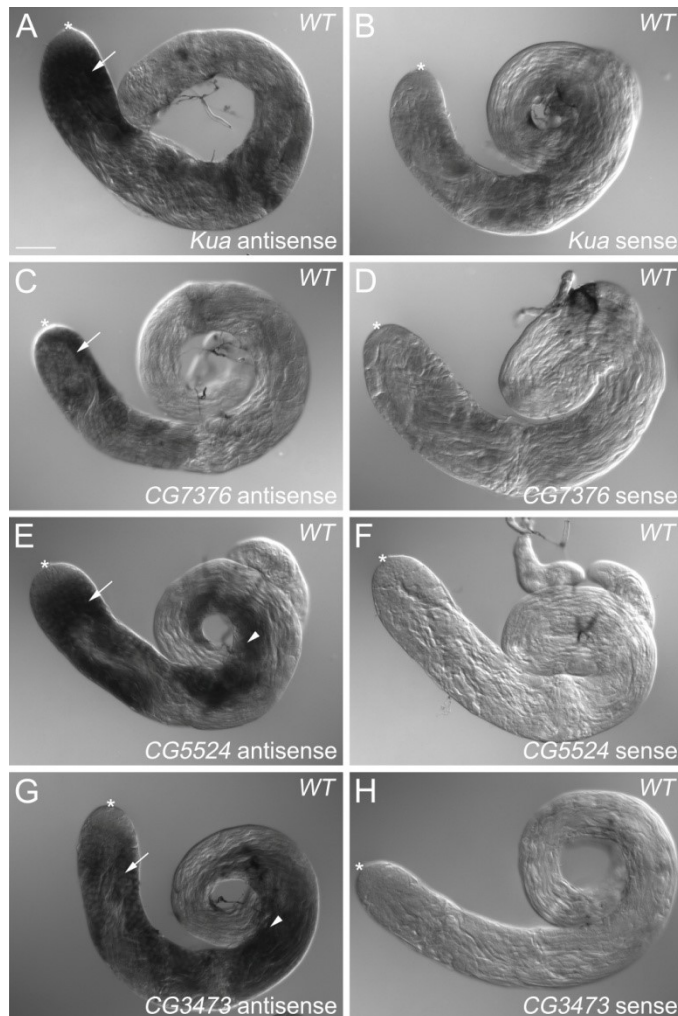


Abb. 5.6: Die mRNAs von *Kua*, *CG7376* und *CG5524* und *CG3473* sind im Spermatozyten-Stadium zu detektieren. *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Testes von *Drosophila*. (A) Die antisense-Sonde detektiert das *Kua* Transkript im Zytoplasma von Spermatozyten (Pfeil). (C) *CG7376* mRNA ist ebenfalls im Spermatozyten-Stadium nachweisbar (Pfeil). (E) Transkripte für *CG5524* und (G) *CG3473* sind im Zytoplasma von Spermatozyten und zudem in frühen Spermatiden detektierbar (Pfeilkopf). (B,D) Die Kontrollen mit den sense-Sonden weisen eine leichte Hintergrundfärbung auf. (F,H) Weitere Kontrollen zeigen hingegen keine Hintergrundfärbung. Die Sterne markieren die Hub-Regionen der Testes. Maßstabsbalken: 100 μ m.

5.3 Regulatorische sowie funktionelle Analysen des Chromatin-assoziierten Proteins Mst77F

Während der Spermatidendifferenzierung kommt es zu einer Umstrukturierung und einer Kompaktierung des Chromatins. Die Histone werden herausgelöst und die Proteine Protamin A (ProtA) und Protamin B (ProtB) eingebaut. Die korrespondierenden mRNAs werden im Spermatozytenstadium transkribiert, doch die Proteine erst im Kanustadium translatiert (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke et al., 2007).

Neben den Protaminen ist das Linkerhiston-ähnliche Protein Mst77F eine Komponente des reifen Spermiums. Es besitzt eine duale Funktion und scheint am Prozess der Chromatin-kondensation beteiligt zu sein. *Mst77F* zeigt eine genetische Interaktion mit *β2-tubulin*, lokalisiert an den Mikrotubuli und ist somit auch am Prozess der Kernformung beteiligt (Fuller et al., 1989; Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke, Barckmann et al., 2010). Die mRNA von *Mst77F* unterliegt wie auch die Transkripte der Protamine einer translationalen Repression und wird im Spermatozytenstadium transkribiert und erst im Kanustadium translatiert (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke et al., 2007).

5.3.1 Die Regulation der translationalen Repression von Mst77F und Protamin B

Mit *Promotor-LacZ*-Konstrukten und β -Galaktosidase Färbungen konnte gezeigt werden, dass die translationale Repression von Protamin B über Sequenzen innerhalb der 5' UTR ermöglicht wird (Barckmann et al., 2013). Doch anders als bei den Protaminen ist die 5' UTR von *Mst77F* nicht ausreichend für Regulation der Translation (Barckmann, Dissertation 2010). Vielmehr gab es Hinweise, dass hier andere Bereiche die Expressionshöhe des Galaktosidase Reporter Konstrukts bedingen.

5.3.1.1 Die 5' UTR ist essenziell für das Transkriptlevel von Mst77F und Protamin B

Es stellte sich die Frage, ob Expressionslevel und Transkriptionsrate in Abhängigkeit vom 5' UTR miteinander korrelieren. Hierfür wurden zunächst β -Galaktosidase-Aktivität an adulten Testes von *Promotor-lacZ*-Konstrukt tragenden Fliegen durchgeführt. Eine Übersicht der transgenen Fliegenlinien ist Abbildung 5.7 A und F abgebildet. Die Enzymassays verliefen parallel für 0,5 h (siehe Abbildung 5.7 B,D,G,I). Die Auswertung zeigt, dass die Reporter-Linien *pc-protB2 Δ Int1* (B) und *pc-77F3* (G), welche jeweils die genspezifische 5' UTR von *protamine B* bzw. *Mst77F* beinhalten, eine höhere β -Galaktosidaseaktivität aufweisen, als die Linien *pc-protB2 Δ Int1+Ex1* (D) und *pc-77F3 Δ 5'UTR* (I), ohne 5' UTR.

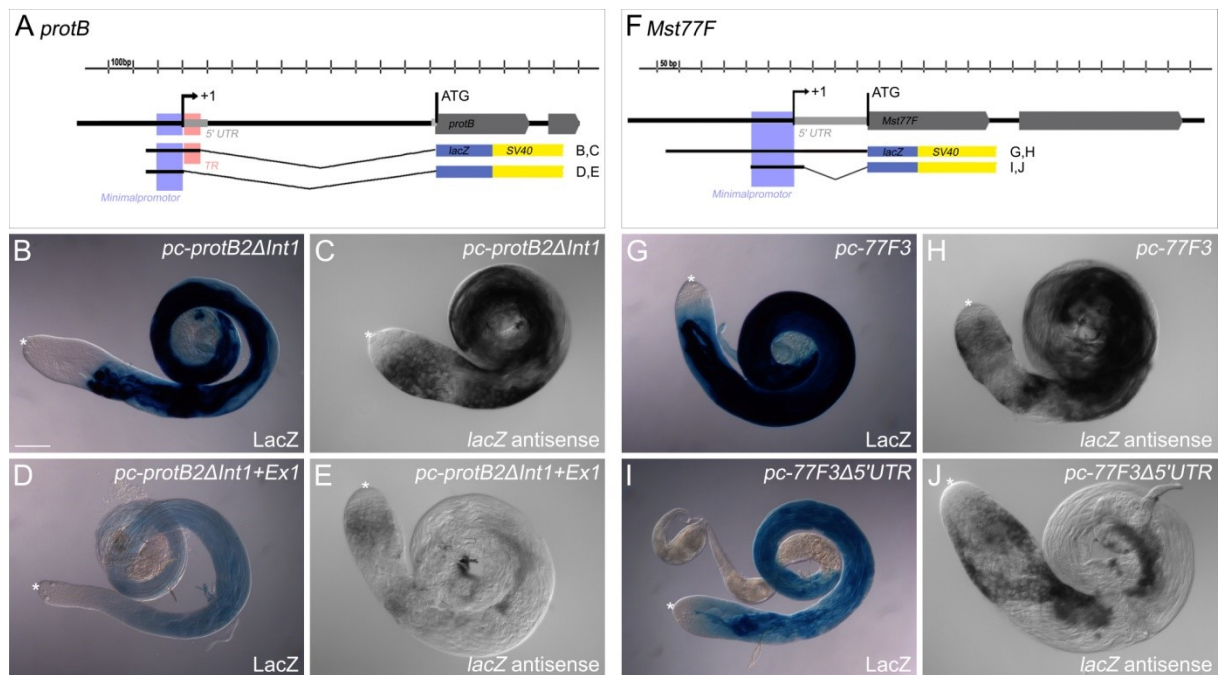


Abb. 5.7: Die 5' UTR ist essenziell für das Transkriptlevel von Mst77F und Protamin B. (A) Schematische Darstellung des genetischen Hintergrundes der transgenen Linien *pc-protB Δ Int1* (B,C) und *pc-protB Δ Int1+Ex1* (D,E) sowie (F) eine schematische Darstellung des genetischen Hintergrundes der Fliegenlinien *pc-77F3* (G,H) und *pc-77F3 Δ 5'UTR* (I,J). (B,D,G,I) β -Galaktosidase-Aktivität an adulten Testes transgener Fliegen mit *Promotor-LacZ*-Konstrukten für ProtB und Mst77F. Die Enzymassays verliefen für 0,5 h. Reporter-Linien mit einer genspezifischen 5' UTR, *pc-ProtB2 Δ Int1* (B) und *pc-77F3* (G), zeigen eine hohe Galaktosidase-Aktivität im Gegensatz zu Linien, ohne 5' UTR, wie *pc-ProtB2 Δ Int1+Ex1* (D) und *pc-77F3 Δ 5'UTR* (I). (C,E,H,J) *in situ* Hybridisierungen mit einer *lacZ* antisense-Sonde. *pc-ProtB2 Δ Int1* (C) und *pc-77F3* (H), inklusive der 5' UTR, weisen eine große Menge an *lacZ* mRNA in Spermatozyten bis in späte Spermatidenstadien auf. Die Linien *pc-ProtB2 Δ Int1+Ex1* (E) und *pc-77F3 Δ 5'UTR* (J) zeigen hingegen ein schwächeres Transkriptlevel. Die Transkripte sind zudem nur in frühen Spermatogenesestadien zu beobachten. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Um das Aktivitäts-Niveau der β -Galaktosidase mit der Transkriptionsmenge vergleichen zu können bzw. um Hinweise auf die Stabilität der mRNA zu erhalten, wurden anschließend *in situ* Hybridisierungen mit *lacZ* antisense-Sonden durchgeführt (siehe Abb. 5.7 C,E,H,J). Diese zeigen ebenfalls eine direkte Korrelation zwischen dem Vorhandensein der 5' UTR und dem Transkriptlevel. So weisen *Reporter-lacZ*-Konstrukte inklusive der 5' UTR, *pc-ProtB2 Δ Int1* (C) und *pc-77F3* (H), eine hohe Menge an *lacZ* mRNA in Spermatozyten bis in späte Spermatidenstadien auf. Hingegen zeigen die Linien *pc-ProtB2 Δ Int1+Ex1* (E) und *pc-77F3 Δ 5'UTR* (J) ein schwächeres Transkriptlevel. In späten Spermatogenesestadien ist keine *lacZ* mRNA mehr detektierbar. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Transkriptionsmenge von *lacZ* und der daraus resultierenden β -Galaktosidase-Aktivität wurde gezeigt. Die Stabilität der mRNA scheint durch die Deletion der 5' UTR vermindert zu sein. Es ist möglich, dass mit der Deletion der 5' UTR regulierende Bereiche für die Transkriptstabilität oder auch mögliche nachgeschaltete Kontrollbereiche (Downstream Elements, DEs) deletiert wurden.

5.3.1.2 Die Translation von Mst77F wird über Bereiche im offenen Leserahmen reguliert

Mst77F-eGFP exprimierende Fliegen zeigen eine translationale Repression des Fusionsproteins. Das Polyadenylierungssignal wird dabei über den Transformationsvektor *pChab Δ Sal* mit SV40 3' UTR bereit gestellt. Somit erfolgt die Regulation der Translation von Mst77F weder über die genspezifische 3' UTR, noch über die 5' UTR von *Mst77F*. Stattdessen werden regulierende Bereiche innerhalb des offenen Leserahmens immer wahrscheinlicher, welche die Expression von Mst77F ab den späten Spermatogenese-Stadien ermöglichen. Um diese Hypothese zu untermauern, wurde ein Mst77F-Fusionsprotein generiert, welches den *Mst77F*-ORF unter der genregulatorischen Kontrolle des Testis-spezifisch exprimierten Gens *β 2-tubulin* trägt. *β 2-tubulin* wird ab der Spermatozytenphase transkribiert. Zeitgleich erfolgt die Translation der mRNAs und bleibt bis in späte Spermatidenstadien, zur Etablierung des Axonems, erhalten. Die Genkontrolle und sowie die für die mRNA-Stabilität notwendigen Bereiche sind sehr gut charakterisiert (Santel et al., 2000 und darin enthaltene Referenzen). Daher wurden 677 bp stromaufwärts des AUG-Translationsstarts von *β 2-tubulin* amplifiziert, der *Mst77F*-ORF angehängen und das Konstrukt C-terminal mit einem eGFP-Tag fusioniert (*β 2t-Mst77F-eGFP*). Das Konstrukt wurde anschließend in Fliegen injiziert und transgene Fliegen etabliert. Als Kontrolle wurden

zudem transgene Fliegen etabliert, welche ausschließlich eGFP unter der genregulatorischen Kontrolle von $\beta 2$ -*tubulin* tragen ($\beta 2t$ -*eGFP*). Eine schematische Abbildung des genetischen Hintergrundes der beiden Fliegenlinien ist in Abbildung 5.8 A aufgeführt. Die Fliegen konnten daraufhin hinsichtlich des Expressionsmusters der Fusionsproteine verglichen und zudem das *eGFP*-Transkriptmenge mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen und *eGFP*-Sonden analysiert werden.

Der genregulatorische Bereich von $\beta 2$ -*tubulin* bewirkt die Stabilität der *eGFP* Transkripte, ab dem Spermatozytenstadium (Pfeile) bis in die frühen Spermatiden (Pfeilköpfe) (Abb. 5.8 C). Zeitgleich wird auch das Fusionsprotein exprimiert. Es ist im Zytoplasma von Spermatozyten bis in die späten Stadien der Spermatogenese zu detektieren (siehe Abb. 5.8 B).

eGFP mRNA ist in $\beta 2t$ -*Mst77F-eGFP* exprimierenden Fliegen ebenfalls ab dem Spermatozytenstadium (Pfeile) zu detektieren (Abb. 5.8 F), und bleibt bis in die späten Spermatogenesestadien erhalten (F, Doppelpfeil). Doch im Gegensatz zu $\beta 2t$ -*eGFP*, ist das Fusionsprotein $\beta 2t$ -*Mst77F-eGFP* erst in späten Spermatiden zu detektieren (Abb. 5.8 E, Pfeilköpfe sowie Vergrößerung), was auf eine Repression der Translation des entsprechenden Transkriptes hindeutet. In Testes-Quetschpräparaten ist *Mst77F-eGFP* zunächst in sehr geringen Mengen im Nukleolus von Spermatozyten zu detektieren (Abb. 5.8 H) und wird im weiteren Verlauf erst wieder ab dem Kanustadium exprimiert (Abb. 5.8 J). Die translationale Repression von *Mst77F* bleibt somit erhalten, trotz des 5' UTR Bereichs von $\beta 2$ -*tubulin*, und somit auch trotz des Verlustes der eigenen genspezifischen Promotorregion und der 5' UTR. Eine Regulation der Translation von *Mst77F* über Bereiche innerhalb des offenen Leserahmens scheint möglich.

Ein vergleichbares Ergebnis lieferten Studien mit einem entsprechenden *protB*-Konstrukt ($\beta 2t$ -*protB-eGFP*). Eine schematische Darstellung dieses Konstrukts ist in Abbildung 7.1 A im Anhang (Seite 128) aufgeführt. Während die Transkripte ab den Spermatozyten (Pfeile) bis in späte Spermatiden (Doppelpfeil) zu detektieren sind (siehe Anhang Abb. 7.1 C), bleibt die translationale Repression des *ProtB-eGFP*-Fusionsproteins erhalten. Das Fusionsprotein wird nur in späten Spermatiden exprimiert (siehe Anhang Seite 128 Abb. 7.1 B, Pfeile und Vergrößerung). Die Regulation der Translation von Protamin B erfolgt demnach nicht nur über die 5' UTR, sondern auch über Bereiche innerhalb des ORFs. Die zugrunde liegenden Mechanismen bzw. potentielle Sequenzen für regulative Bereiche innerhalb der offenen Leserahmen, müssen jedoch noch analysiert werden.

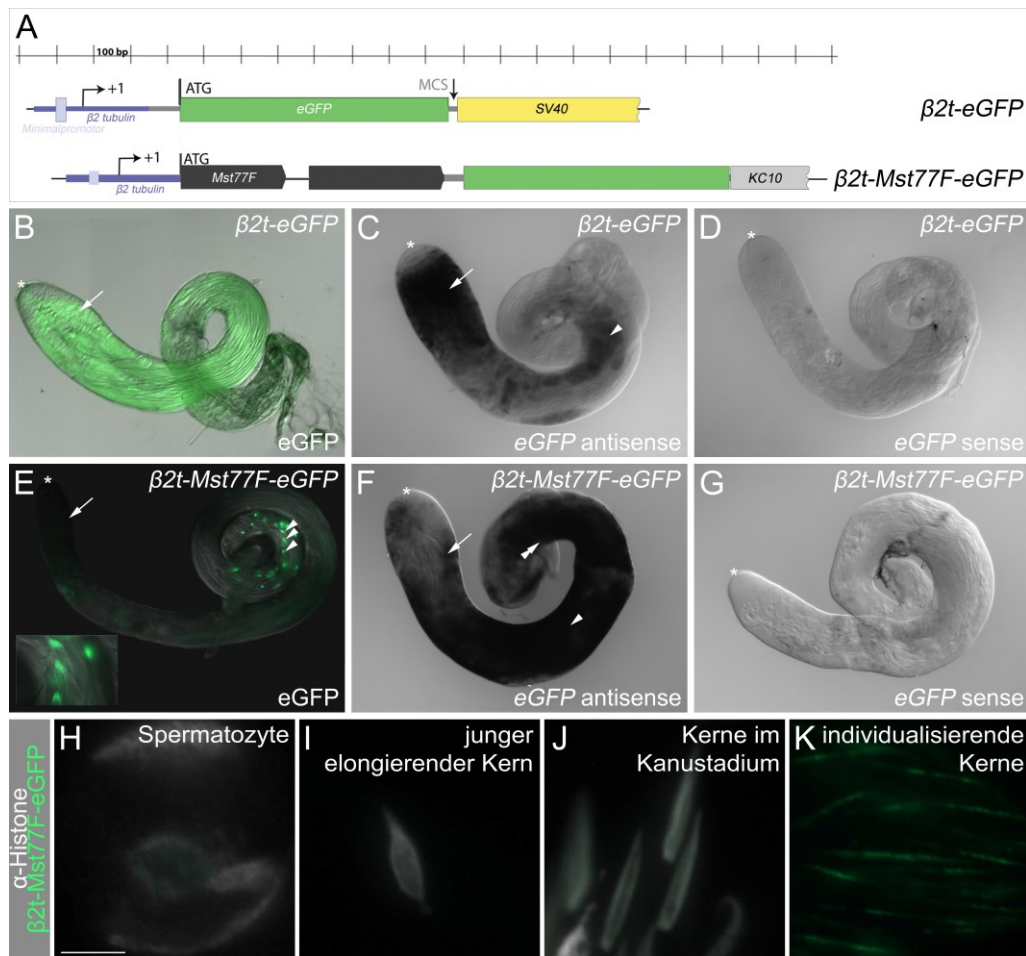


Abb. 5.8: Die Translation von Mst77F erfolgt über Bereiche im ORF. (A) Schematische Darstellung der Konstrukte. (B-D) eGFP unter der Kontrolle des $\beta 2t$ -tubulin Promotors sowie dessen 5' UTR ($\beta 2t$ -eGFP). (B) Das eGFP-Fluoreszenzsignal ist ab dem Spermatozyten bis in späte Stadien detektierbar. (C-D) *in situ* Hybridisierungen. (C) *eGFP* mRNA ist in Spermatozyten (Pfeil) bis in elongierende Stadien (Pfeilkopf) detektierbar. (D) Die *eGFP* sense-Sonde liefert kein Signal. (E-K) *Mst77F*-ORF unter der Kontrolle des genregulatorischen Bereichs von $\beta 2t$ -tubulin. (E) Testis-Frischpräparate zeigen ein eGFP-Signal in späten Spermatiden (Pfeilköpfe, sowie Vergrößerung). In frühen Stadien ist kein Signal detektierbar (Pfeil). (F-G) *in situ* Hybridisierungen. (F) Die *eGFP* antisense-Sonde liefert ein Signal in Spermatozyten (Pfeil), frühen Spermatiden (Pfeilkopf) bis in späte Stadien (Doppelpfeil). (G) Die sense-Sonde liefert kein Signal. (H,I,J,K) Testes-Quetschpräparate. Für eine stadienspezifische Zuteilung wurde mit einem Marker für Histone gegen gefärbt. (H) Das *Mst77F*-Fusionsionsprotein ist im Nukleolus von Spermatozyten zu detektieren. (I) Junge elongierende Kerne zeigen kein GFP-Signal. (J) Kerne des Kanustadiums sind *Mst77F*-eGFP positiv. (K) Kerne während der Individualisierung zeigen eine gepunktete Verteilung von $\beta 2t$ -*Mst77F*-eGFP. Balken: 5 μ m.

5.3.1.3 Die Kontrolle der Translation von *Mst77F* erfolgt über die N-terminalen 222 bp

Auf Grund der bisherigen Daten wird postuliert, dass die Regulation der translationalen Repression über den ORF von *Mst77F* erfolgt. Um diesen Bereich weiter einzugrenzen wurden Deletionskonstrukte für *Mst77F* hergestellt, und zunächst 60 Aminosäuren, dann 141 Aminosäuren am C-Terminus des *Mst77F*-ORFs deletiert. Die Expression der beiden Konstrukte erfolgte unter dem Promotor und der 5' UTR von *Mst77F*. Das Konstrukt *Mst77FΔ60C-eGFP* wurde zudem mit einem eGFP-Tag fusioniert und das *Mst77FΔ141C-mCherry* Konstrukt mit einem mCherry-Tag. Eine schematische Darstellung der beiden Konstrukte, sowie der beiden Konstrukte *Mst77F-eGFP* und *β2t-ProtB-eGFP* ist in Abbildung 5.9 A aufgeführt. Die Konstrukte wurden in Fliegen injiziert, transgene Linien etabliert und Testes-Frischpräparate analysiert (Abbildung 5.9 B-E).

Transgene Fliegen für *Mst77F-eGFP* und *β2t-ProtB-eGFP* zeigen die Expression der Fusionsproteine ausschließlich in den Kernen von späten Spermatiden (B und C, Pfeile). Auch die Fusionsproteine *Mst77FΔ60C-eGFP* (D) und *Mst77FΔ141C-mCherry* (E) sind nur in Stadien später Spermatiden zu visualisieren, wobei die Proteine nur im Zytoplasma und über den Flagellen zu detektieren sind (Pfeilköpfe). Trotz der unterschiedlichen Lokalisation der Fusionsproteine ist eine translationale Repression von *Mst77* in allen vier Fliegenlinien zu beobachten und wird folglich über Sequenzen in den verbleibenden 222 bp des N-terminalen Bereichs des ORFs reguliert. Weiterhin ist zu vermerken, dass der Verlust der C-terminalen 60 Aminosäuren mit dem Verlust der Kernlokalisierung einhergeht. Dies legt nahe, dass innerhalb des C-terminalen Bereiches verschiedene Kernlokalisierungssignale inseriert sind (siehe Kap. 5.3.2.2.1 für fortführende Analysen).

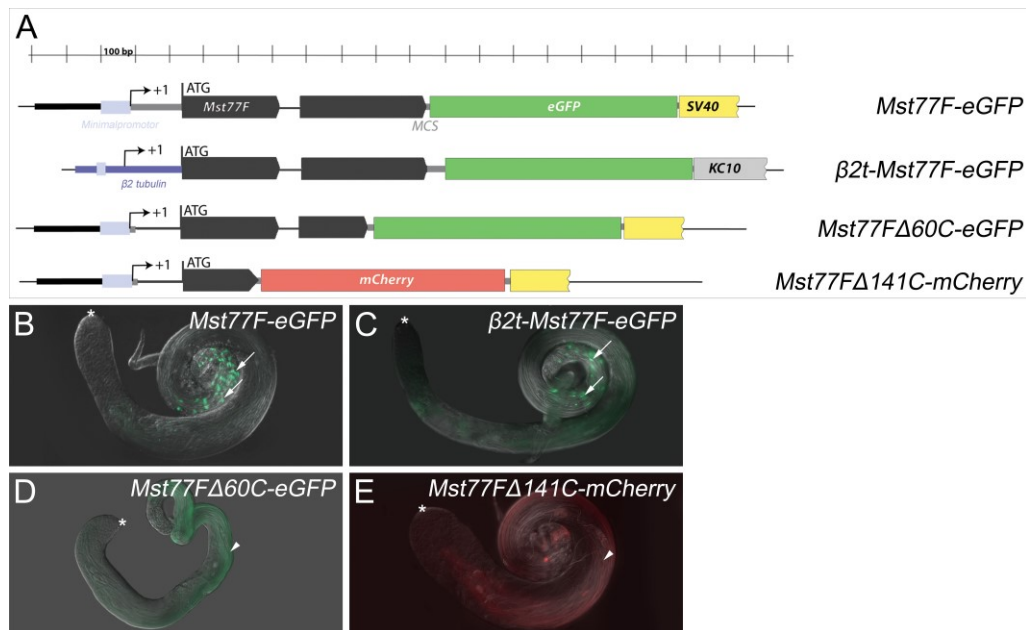


Abb. 5.9: Der N-Terminus bestimmt die Kontrolle der Translation von Mst77F und der C-Terminus die nukleäre Lokalisation (A) Schematische Darstellung der C-terminalen Deletionskonstrukte. (B-E) Testes-Frischpräparate transgener Fliegenlinien für (B) *Mst77F-eGFP*, (C) *β2t-Mst77F-eGFP*, (D) *Mst77FΔ60C-eGFP*, und (E) *Mst77FΔ141C-mCherry*. (B-C) Die Fusionsproteine sind nur in späten Spermatiden zu detektieren. (D-E) Die Mst77F Fusionsproteine mit C-terminalem Bereich sind in den Kernen zu detektieren (B und C, Pfeile), solche mit C-terminalen Deletionen sind nur im Zytoplasma später Spermatiden (D und E, Pfeilköpfe) und über den Flagellen zu detektieren. Die Sterne markieren jeweils die Hub-Region des Testis.

5.3.1.4 Mst77F wird in somatischen Zellen nur schwach exprimiert

Damit die Verteilung von Mst77F am Chromatin analysiert werden konnte, wurde unter Verwendung des UAS-GAL4 Systems, Mst77F-eGFP ektopisch in Speicheldrüsen exprimiert (Brand et al, 1994). Hierfür wurden transgene Fliegen etabliert, welche *Mst77F-eGFP* unter der Kontrolle einer UAS-Sequenz (aus engl. upstream activating sequence) tragen. Der genetische Hintergrund des Konstrukts *UAS-Mst77F-eGFP* ist schematisch in Abbildung 5.12 A aufgeführt. Die Fliegen wurden mit dem *sgs58AB-GAL4* Treiberstamm gekreuzt, welcher GAL4 spezifisch in Speicheldrüsen exprimiert und somit die Expression von Mst77F selektiv einschaltet. Das UAS-GAL4 System stammt aus Hefe, sodass eine Temperatur von 30°C optimal für die Transkription ist. Somit wurden die Fliegen für eine optimale Expression des Fusionsproteins auf 25°C bzw. 30°C gehalten.

Bei einer Haltung der Fliegen auf 25°C ist nur ein sehr schwaches Mst77F-Signal erkennbar (siehe Abbildung 5.10 A,A'). Und auch mit einer Haltung auf 30°C kann die Expression von Mst77F-eGFP nur leicht erhöht werden. Mst77F-eGFP ist schwach über den

Chromosomen zu detektieren, wohingegen eine Anreicherung des Fusionsproteins im Nukleolus ersichtlich ist (B,B', Pfeile). Jedoch ist eine Gegenfärbung mit einem Marker für Nukleoli notwendig, um diese Struktur eindeutig als den Nukleolus zu identifizieren. Nachdem Mst77F mit dem C-terminalen Tag nur schwach in den somatischen Zellen exprimiert werden konnte, wurde ein Mst77F-Protein mit einem N-terminalen Tag generiert und in Speicheldrüsen exprimiert. Doch auch mit diesem Konstrukt ist Mst77F nur in geringen Mengen exprimierbar (C,C'). In einzelnen Zellkernen ist eine schwache Lokalisation des Fusionsproteins an den Chromosomenarmen erkennbar.

Mst77F lässt sich somit in somatischen Zellen nur sehr schlecht exprimieren. Denn obwohl die Speicheldrüsen einen Chromosomensatz von 1000 n besitzen, scheint die Translationseffizienz der Mst77F-Fusionsproteine nur sehr gering zu sein.

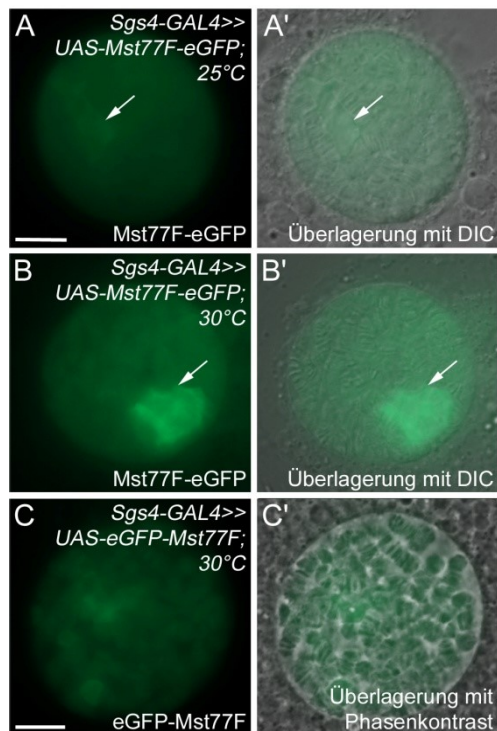


Abb. 5.10: Mst77F kann nur schwach in *Drosophila* Speicheldrüsen exprimiert werden. *sgs58-GAL4* getriebene Expression von Mst77F-Fusionsproteinen in den Kernen von *Drosophila* Speicheldrüsen. (A,A') Bei 25°C ist nur eine sehr schwache Mst77F-Konzentration detektierbar. (B,B') Die Mst77F-eGFP Expression ist auf 30°C leicht erhöht. Eine deutliche Anreicherung des Fusionsproteins im Nukleolus ist zu detektieren. (C,C') eGFP-Mst77F wird ebenfalls nur in geringen Mengen exprimiert. (A-C) eGFP-Fluoreszenzsignale mit einer (A'-B') Überlagerung zu einem DIC-Kanal bzw. eine (C') Überlagerung mit dem Phasenkontrast. Die Pfeile markieren die Nukleoli. Maßstabsbalken: 10 µm.

5.3.1.5 Mst77F und Protamin B können mit Hilfe eines Keimbahntreibers in Spermatogonien exprimiert werden

Da die Translationseffizienz von Mst77F in somatischen Zellen sehr gering ist, soll im nächsten Abschnitt überprüft werden, ob Mst77F und Protamin B einer keimbahnspezifischen Transkriptions- bzw. Translationskontrolle unterliegen. Hierfür wurden transgene Fliegen für *UAS-Mst77F-eGFP* und *UAS-protB-eGFP* mit dem Treiberstamm *bam-GAL4* gekreuzt, und so die Expression selektiv in Spermatogonien getrieben. Der genetische Hintergrund der Fliegenlinien *UAS-Mst77F-eGFP* und *UAS-protB-eGFP* ist in Abbildung 5.11 A aufgeführt. Um die Transkriptverteilung mit der Proteinexpression vergleichen zu können, wurden Testes-Frischpräparate analysiert und *in situ* Hybridisierungen mit *eGFP* antisense- und sense-Sonden durchgeführt.

Die Fusionsproteine Mst77F-eGFP (Abbildung 5.11 B) wie auch ProtB-eGFP (E) sind in Spermatogonien zu detektieren (Pfeile, Vergrößerungen). Mit dem Eintreten in das Spermatozytenstadium sind keine eGFP-Signale mehr nachweisbar. Im Gegensatz hierzu sind die Transkripte für *Mst77F-eGFP* (C) und *protB-eGFP* (F) im Zytoplasma von Spermatogonien (Pfeile) und weiter bis in frühe Spermatidenstadien (Pfeilkopf) zu detektieren. Die Transkripte für *Mst77F-eGFP* sind zudem noch stark bis in die späten elongierenden Spermatiden zu detektieren, wohingegen *protB-eGFP mRNA* in diesen Stadien nur schwer zu detektieren ist (F, Doppelpfeil). Die Färbungen mit den *eGFP* sense-Sonden zeigen für *bam-GAL4>>UAS-Mst77F-eGFP* eine Hintergrundfärbung (D), welche jedoch im Färbemuster und der Signalintensität von der *in situ* Hybridisierung mit der antisense-Sonde abweicht. Das Signal mit der antisense-Sonde kann als ein echtes Signal gewertet werden.

Somit ist festzuhalten, dass auf der einen Seite die Translation bzw. Transkription von Mst77F in somatischen Zellen nur bedingt möglich ist (siehe Kapitel 5.3.1.4), wohingegen eine keimbahnspezifische Expression vollzogen werden kann. Dabei scheinen Transkriptions- und/ oder Translationseffizienz von keimbahnspezifischen Faktoren abzuhängen. Zudem zeigt dieser Versuch aber auch, dass Mst77F und ProtB im Spermatozytenstadium möglicherweise der regulären Translationsrepression unterliegen. So scheinen Spermatozyten transaktivierende Faktoren zu besitzen, welche die Translation der Proteine trotz vorhandener Transkripte in Abhängigkeit vom offenen Leserahmen reprimieren.

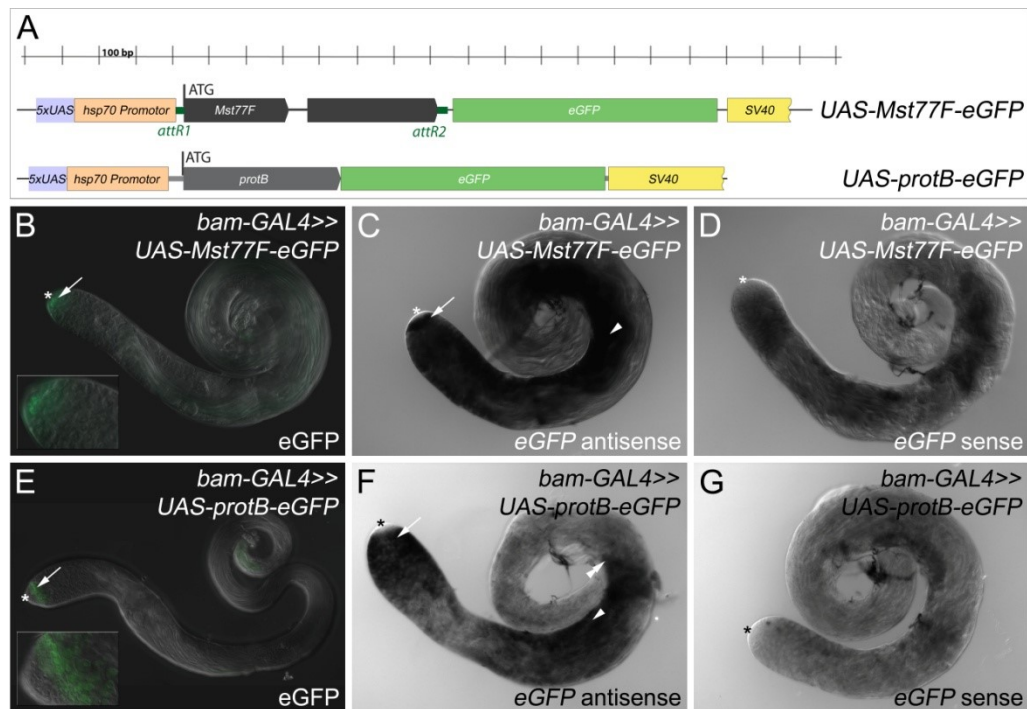


Abb. 5.11: Mst77F und ProtB können in frühen Stadien der Spermatogenese getrieben werden. (A) Schema des genetischen Hintergrundes. (B-D) *UAS-Mst77F-eGFP* getrieben mit *bam-GAL4*. (B) In Testes-Frischpräparaten ist Mst77F-eGFP in Spermatogonien detektierbar (Pfeil und Vergrößerung). (C,D) *in situ* Hybridisierungen. (C) Mit der *eGFP* antisense-Sonde ist *Mst77F-eGFP* mRNA ab Spermatogonien (Pfeil) bis in späte Stadien (Pfeilkopf) zu detektieren. (D) Die *eGFP* sense-Sonde zeigt eine leichte Hintergrundfärbung. (E-G) *UAS-ProtB-eGFP* getrieben mit *bam-GAL4*. (E) Testes-Frischpräparate zeigen ProtB-eGFP in Spermatogonien (Pfeil und Vergrößerung). (F,G) *in situ* Hybridisierungen. (F) *protB-eGFP* mRNA ist im Zytoplasma von Spermatogonien (Pfeil) und Spermatiden (Pfeilkopf) zu detektieren. In späteren Stadien sind *protB-eGFP* Transkripte nur schwer nachweisbar (Doppelpfeil). (G) Die *eGFP* sense-Sonde liefert eine leichte Hintergrundfärbung.

5.3.2 Der Einfluss von Mst77F auf die Chromatinstruktur

Drosophilae der durch EMS induzierten Mutante *ms(3)nc3* (Fuller et al., 1989) sind über eine Defizienz (*ms(3)nc3/Df(3L)ri-79c*) männlich steril. Sie trägt eine Punktmutation in Mst77F in Aminosäure 149, von Serin zu Threonin, und weist einen Defekt in der Spermatogenese von *Drosophila* auf (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Die Spermatidenkerne sind oft klein und rund und elongieren nicht in ihre wildtypische nadelförmige Form (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). *ms(3)nc3* zeigt eine genetische mit dem $\beta 2$ -*tubulin* Gen (Fuller et al., 1989). Zudem konnten Rathke, Barckmann et al. (2010) zeigen, dass Mst77F zusammen mit $\beta 2$ -Tubulin exprimiert wird, und durch eine Assoziation mit den Mikrotubuli, die Elongation der Spermatidenkerne ermöglicht wird. Neben der Funktion in der Kernformung, ist Mst77F ein Chromatin-assoziiertes Protein und möglicherweise am Prozess der Chromatinkondensation beteiligt (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Die Funktion von Mst77F in der Chromatinkompaktierung ist jedoch nicht näher beschrieben.

5.3.2.1 Die Überexpression von Mst77F-eGFP im wildtypischen Mst77F Hintergrund führt zu deformierten Spermatidenkernen

Mst77F-eGFP akkumuliert in den Kernen des Kanustadiums und ist, entgegen dem wildtypischen Mst77F Expressionsmuster, gleichmäßig in allen Spermatidenkernen verteilt (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke, Barckmann et al., 2010). Zudem ist mit Hilfe des Mst77F-Antikörpers auch die Expression von Mst77F in jungen elongierenden Kernen detektierbar und die Assoziation mit den Mikrotubuli zu verzeichnen (Rathke, Barckmann et al., 2010). Individualisierende Spermatidenkerne heterozygot für *Mst77F-eGFP* auf dem zweiten Chromosom (B,B') und auf dem dritten Chromosom (D,D') sind in Abbildung 5.12 gezeigt. Die Kerne weisen eine wildtypische Kernform auf und zeigen eine gleichmäßige Verteilung von Mst77F-eGFP.

In dieser Arbeit wurden erstmals Testes von Fliegen analysiert, welche *Mst77F-eGFP* (Abb. 5.12 A) homozygot exprimieren. Interessanter Weise zeigen hier alle Spermatiden in etwa 20 % der Zysten eine abnormalen Kernform. Unabhängig ob die Insertion von *Mst77F-eGFP* auf dem zweiten (Abb. 5.12 C,C') oder dritten Chromosom (Abb. 5.12 E,E') erfolgt, weisen die Spermatiden eine verkrüppelte Form auf (Pfeile). Zudem besitzen einzelne Spermatiden eine kleine und runde Form (Abb. 5.12 F-F'''). Die Kerne sind Mst77F-eGFP positiv (E, Pfeil), Histone sind nicht mehr zu detektieren (F', Pfeilkopf). Es

zeigen jeweils alle synchron entwickelten Spermatiden einer Zyste den Phänotyp, und auch nur Spermatiden im Stadium der Individualisierung. Kerne mit einer abnormalen Kernform scheinen jedoch den Prozess der Individualisierung nicht zu vollenden, da in die seminalen Vesikel lediglich Kerne mit einer normalen Kernform entlassen werden (Abb. nicht gezeigt).

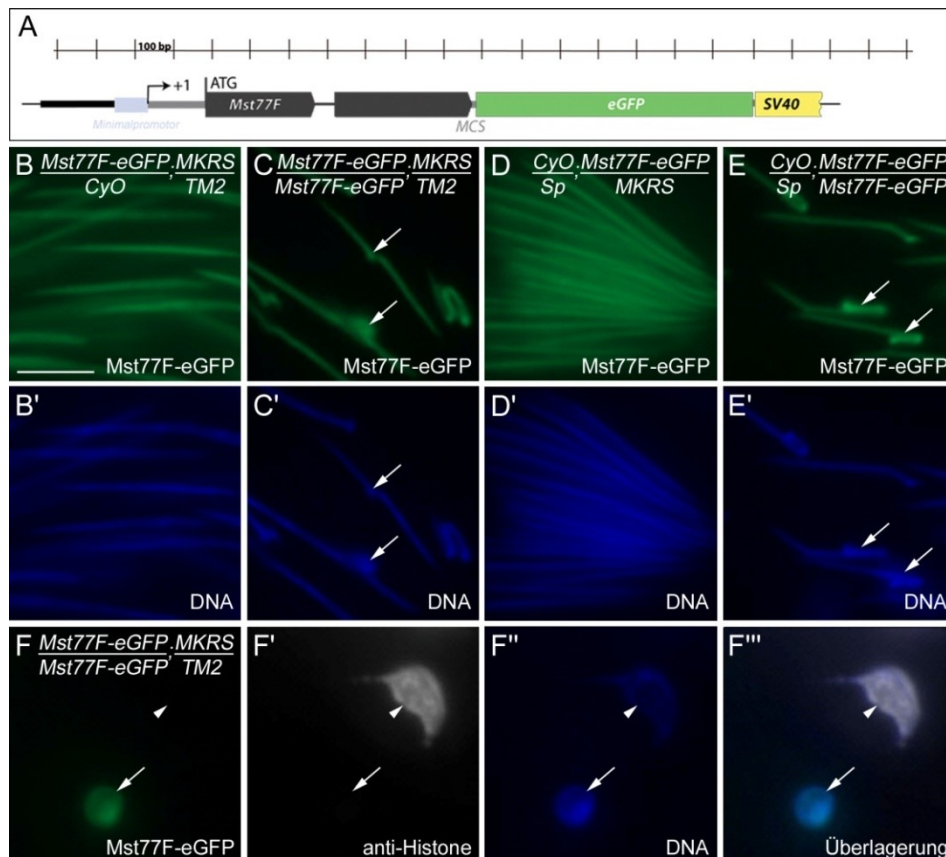


Abb. 5.12: Die Überexpression von Mst77F-eGFP führt bei ca. 20 % der Spermatiden zu einer abnormalen Kernform. (A) Schematische Darstellung des Konstruktes *Mst77F-eGFP*. (B-F''') GFP-Autofluoreszenz und Immunfluoreszenznachweis von Histonen an *Drosophila* Testes. Die Insertion des Konstruktes in das *Drosophila* Genom erfolgte ungerichtet auf das zweite (B,C,F) bzw. dritte Chromosom (D,E). (B,D) Heterozygote Fliegen für *Mst77F-eGFP* weisen eine wildtypische Kernform auf. (C,E) Testes homozygot für *Mst77F-eGFP* weisen in ca. 20 % der Spermatiden eine abnormale Kernform auf (Pfeile). (B'-E') Zugehöriger Nachweis der DNA mit Hoechst. (F) In homozygoten Fliegen für *Mst77F-eGFP* treten zudem runde Spermatidenkerne auf, welche positiv für Mst77F-eGFP sind (Pfeil). (F') Der runde Kern ist Histonegativ (Pfeil) im Gegensatz zum Histonepositiven jungen elongierenden Kern (Pfeilkopf). (F'') Gezeigt ist der Nachweis der DNA und die (F''') Überlagerung der einzelnen Fluoreszenz-Signale. Maßstabsbalken: 5 μ m.

Hinweise worin der Phänotyp begründet liegt und warum die Expression des GFP-Fusionsproteins vom Färbemuster mit dem Mst77F-Antikörper abweicht, soll ein Blick auf den genomischen Bereich des Mst77F-Konstrukts liefern. So tragen die analysierten Fliegen ein Mst77F-eGFP Konstrukt, bestehend aus dem Promotor und der 5' UTR, sowie

dem ORF von *Mst77F*. C-terminal wurde ein eGFP-Tag fusioniert und das Polyadenylierungssignal über den Transformationsvektor *pChabΔSal* bereitgestellt (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Von Säugetiergenen ist jedoch bekannt, dass für die Regulation der Translation eines Proteins zudem regulatorische Bereiche in der 3' UTR notwendig sind. So sind in Mäusen z.B. Elemente in der 3' UTR von *prm-1 mRNA* essenziell für die translationale Kontrolle des Proteins (Braun et al., 1989). Zwar liegt die translationale Repression von *Mst77F* nicht in der 3' UTR begründet (siehe Kapitel 5.3.1.2), doch besteht die Möglichkeit, dass über Sequenzen innerhalb der 3' UTR zudem eine zellspezifische Regulation von *Mst77F* erfolgt, wie z.B. die Proteinstabilität oder auch der Transport der mRNA. Aus diesem Grund wurde im nächsten Experiment ein neues *Mst77F*-Konstrukt inkl. der genspezifischen 3' UTR generiert. Hierfür wurde die genomische Region von *Mst77F* kloniert, C-terminal mit einem eGFP fusioniert und die 3' UTR angehängen (siehe Abb. 5.13 A). Transgene Fliegen wurden etabliert und Testes-Frischpräparate analysiert. Doch wie in Abbildung 5.13 B gezeigt, weisen auch Fliegen homozygot für *Mst77F-eGFP+3'UTR* in 15-20% der Zysten Spermatiden mit verkrümpelten Kernen auf (Pfeile). *Mst77F-eGFP* ist gleichmäßig über die Kerne verteilt und die Samenblasen sind wie zuvor, frei von deformierten Kernen. Fliegen heterozygot für *Mst77F-eGFP+3'UTR* zeigen keine verkrümpelten Kerne und weisen das gleiche *Mst77F*-Expressionsmuster auf, wie Fliegen heterozygot für *Mst77F-eGFP*.

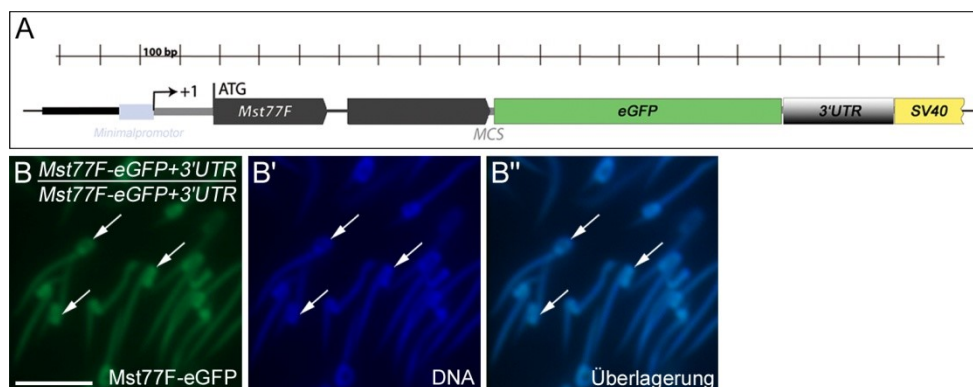


Abb. 5.13: Einzelne Zysten homozygot *Mst77F-eGFP+3' UTR* exprimierender Fliegen weisen eine abnormale Kernform auf. (A) Schematische Darstellung des genetischen Hintergrunds von *Mst77F-eGFP+3'UTR* Fliegen. Dem *Mst77F-eGFP* Konstrukt wurde C-terminal die *Mst77F*-spezifische 3' UTR angefügt. (B) Immunfluoreszenzfärbung an *Drosophila* Testes homozygot für *Mst77F-eGFP+3'UTR* zeigen einzelne Zysten mit abnormal geformten Spermatidenkernen (Pfeile). (B') Dargestellt ist der Nachweis der DNA mit Hoechst und (B'') die Überlagerung der Kanäle. Maßstabsbalken: 5 μ m.

Nachdem Fliegen homozygot für *Mst77F-eGFP+3'UTR* weiterhin eine defekte Kernform aufweisen, und *Mst77F-eGFP* im Gegensatz zu *Mst77F*-Antikörperfärbungen gleichmäßig in den Kernen verteilt ist, stellte sich die Frage, ob der Effekt durch den Insertionsort des Transgens hervorgerufen wird. Da die Insertion der Konstrukte bisher ungerichtet ins Genom erfolgte, wurde für den nächsten Versuch ein *Mst77F*-Konstrukt generiert, welches mit Hilfe einer keimbahnspezifischen $\phi 31$ -Integrase an die zytologische Position 86F auf dem dritten Chromosom (3R) inseriert wurde. Das Konstrukt beinhaltet den Promotor, die 5' UTR sowie den ORF von *Mst77F*, C-terminal fusioniert mit einem eGFP-Tag. Das Polyadenylierungssignal wird durch den Vektor *pUAS-attB-rfa-eGFP* bereitgestellt. Nach der gerichteten Insertion des Konstrukts in das Genom, zeigen heterozygote, wie auch homozygote Fliegen eine punktuelle Verteilung des eGFP-Signals über den Spermatidenkernen (siehe Abb. 5.14 A, Pfeile). Zysten mit deformierten Kernen sind nicht detektierbar.

Diese Beobachtungen lassen auf einen Dosiseffekt schließen. Nach der gezielten Insertion von *Mst77F-eGFP* ins Genom zeigt das Fusionsprotein ein vergleichbar niedriges Expressionslevel. Das eGFP-Signal ist punktuell über den Kernen verteilt. Hingegen zeigen die Spermatiden nach einer ungerichteten Insertion des Konstrukts ins Genom eine erhöhte Expression von *Mst77F-eGFP*, resultierend in einer gleichmäßigen Verteilung des Fusionsproteins und einer Deformierung der Spermatidenkerne.

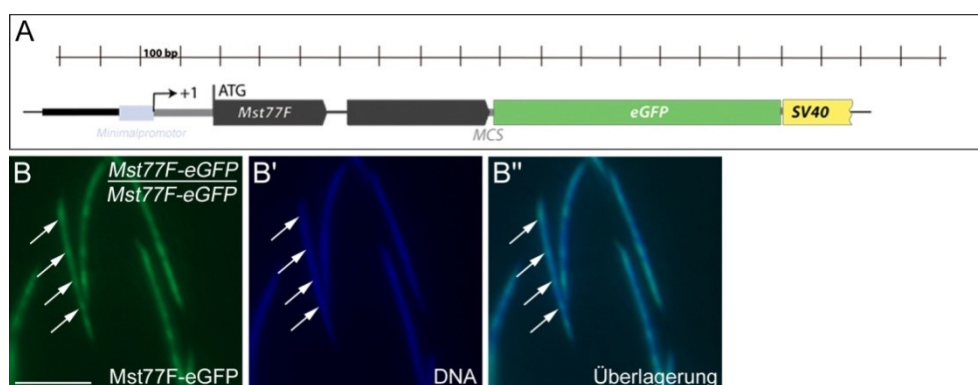


Abb. 5.14: Nach einer gerichteten Integration des Konstruktes *Mst77F-eGFP* ins Genom zeigen homozygote Fliegen eine punktuelle Verteilung von *Mst77F-eGFP*. (A) Schematische Darstellung des Konstruktes *Mst77F-eGFP*. (B) Immunfluoreszenzfärbung an Testes homozygot für *Mst77F-eGFP* nach einer gezielten Integration auf das 3. Chromosom. Individualisierende Kerne zeigen eine punktuelle Verteilung von *Mst77F-eGFP* (Pfeile). Es sind keine abnormalen Kernformen zu detektieren. (B') Färbung der DNA mit Hoechst und (B'') die Überlagerung von DNA mit *Mst77F-eGFP*. Maßstabsbalken: 5 μ m.

Um einen möglichen Dosisseffekt näher zu analysieren und den Phänotyp möglicherweise zu verstärken, wurden zudem Testes untersucht, welche drei oder vier Kopien Mst77F-eGFP im wildtypischen Mst77F Hintergrund exprimieren. Diese zeigen ebenfalls verkrumpte und kleine Mst77F-eGFP positive Kerne (Abbildung nicht gezeigt). Der Phänotyp wurde jedoch im Vergleich zu Fliegen mit zwei Kopien Mst77F-eGFP nicht verstärkt. Demnach bewirkt zwar eine Überexpression von Mst77F und das damit einhergehende Mst77F-Expressionslevel, in einzelnen Zysten die Deformation von Spermatidenkernen, doch scheint der Phänotyp limitiert zu sein. Warum nur ein Teil der Zysten den Phänotyp aufweist, mag ebenfalls im Dosisseffekt begründet liegen, denn auch die Proteinexpression von Mst77F kann in den verschiedenen Zysten einer Varianz unterliegen. So konnte zum Beispiel in Menschen mittels Immunfluoreszenzfärbungen gezeigt werden, dass der Protamingehalt einzelnen Spermien einer signifikanten Schwankung unterliegt (Aoki et al., 2006) und auch in den Spermien *protamin 2*-defizienter Mäuse ein variabler Phänotyp auftritt, der auf eine Varianz in der Expression weiterer benötigter Proteine begründet liegen mag (Cho et al., 2003).

5.3.2.2 Eine Kombination aus dem C- und N-terminalen Bereich von Mst77F fördert die abnormale Kernform

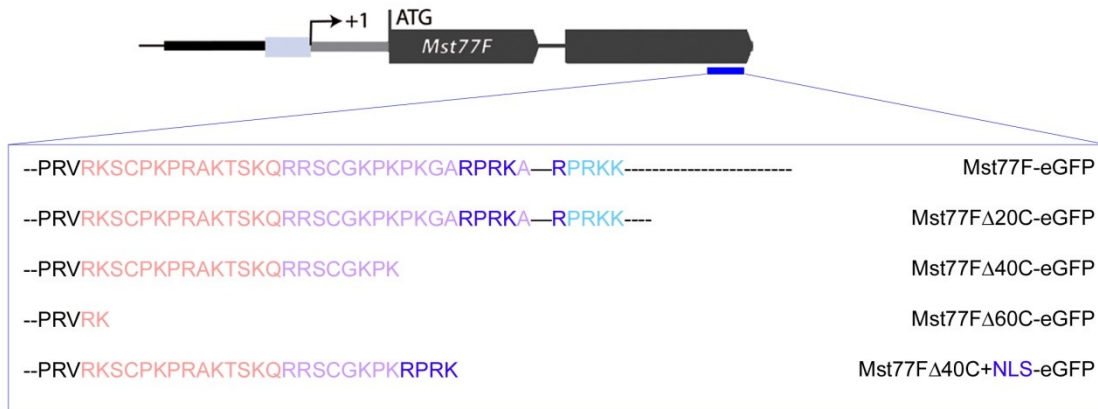
Im vorhergehenden Versuch konnte gezeigt werden, dass nach einer Überexpression von Mst77F-eGFP verkrumpte und auch kleine runde Spermatidenkerne auftreten. Daraufhin stellt sich die Frage, welche Bereiche von Mst77F den beschriebenen Phänotyp hervorrufen können. Hierzu wurden im Folgenden Abschnitt Deletionskonstrukte für Mst77F generiert, in Fliegen injiziert und das Expressionsmuster sowie die Kernmorphologie analysiert.

5.3.2.2.1 Die nukleäre Lokalisation von Mst77F erfolgt über den C-terminalen Bereich von Mst77F

In Kapitel 5.3.1.3 wurde gezeigt, dass nach einer Deletion der letzten 60 Aminosäuren (AS) des offenen Leserahmens von Mst77F, das eGFP-Fusionsprotein nur noch zytoplasmatisch vorliegt. Aus diesem Grund wurden weitere Mst77F-Deletionskonstrukte generiert, um den für die Kompaktierung des Chromatins nötigen Bereich näher einzugrenzen. Die Konstrukte tragen den Promotor sowie die 5' UTR von *Mst77F*, sowie den jeweils am C-Terminus deletierten ORF. Zu Beginn wurde das Konstrukt *Mst77F Δ 20C-eGFP* mit einer Deletion der C-terminalen 20 AS kloniert und in Fliegen injiziert. Homozygote Fliegen weisen Testes mit

einzelnen Zysten mit ausschließlich deformierten Spermatidenkernen auf (siehe Abb. 5.15 D-D", Pfeile). Der Phänotyp gleicht den beobachteten Defekten nach einer Überexpression des volle-Länge Mst77F-Konstruktes (Abb. 5.15 E-E"). Mst77FΔ20C-eGFP ist ebenfalls gleichmäßig über den Kernen verteilt und die Samenblasen sind frei von deformierten Kernen.

A



B

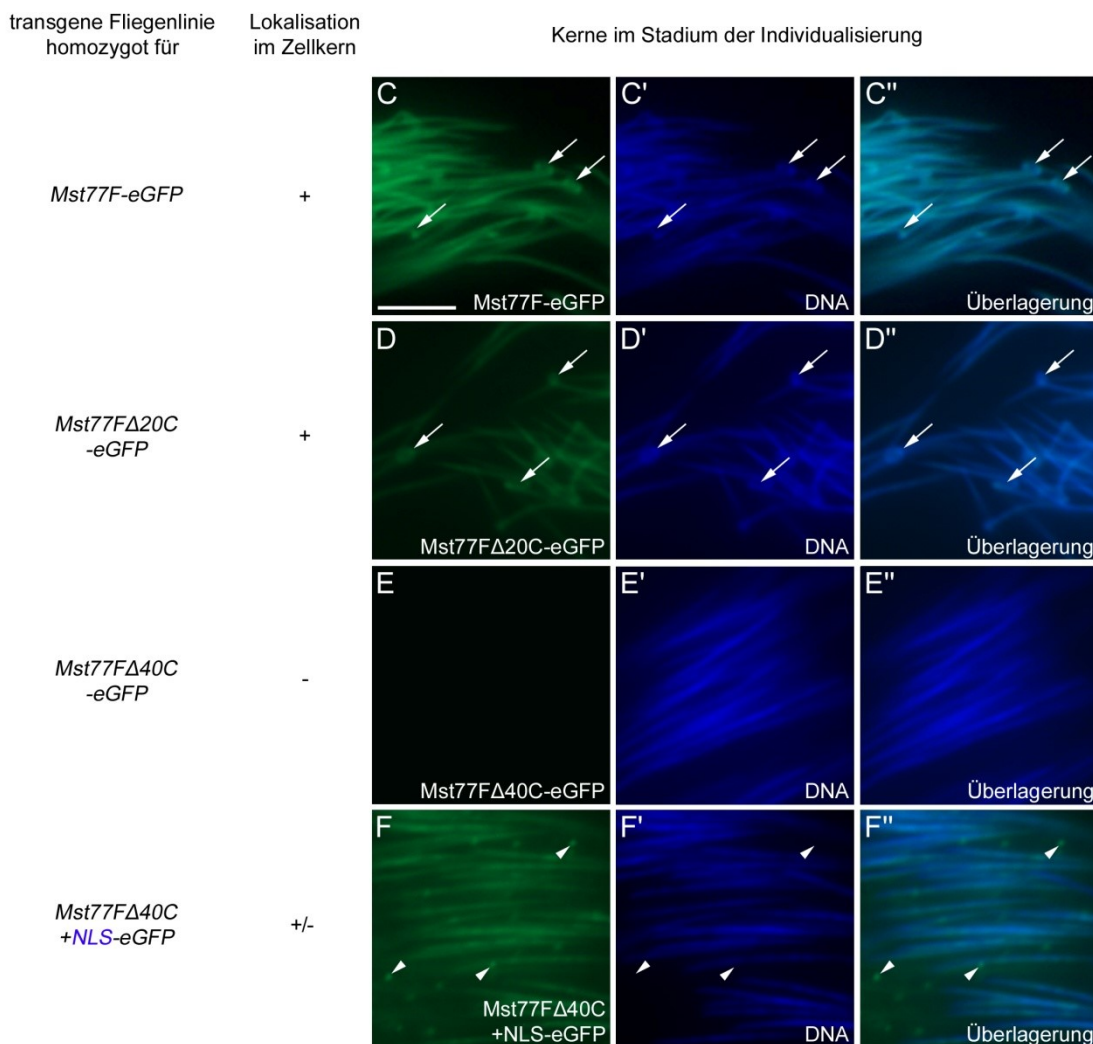


Abb. 5.15: Der Bereich zwischen den Aminosäuren 153 und 191 wird für die Kernlokalisierung von Mst77F-eGFP benötigt. (A) Schematische Darstellung der genomischen Region von *Mst77F* mit einer Vergrößerung des C-terminalen Bereiches. In farbigen Großbuchstaben sind die mittels PSORT vorhergesagten Nukleus Konsensus-Sequenzen in hellrot und violett, wie auch drei Kernlokalisierungssignale in blau und türkis, gezeigt. Darunter aufgeführt sind die C-terminalen Enden der verwendeten Deletionskonstrukte von *Mst77F*. (B) Immunhistochemische Analysen von Testes-Quetschpräparaten homozygot für *Mst77F-eGFP* (C-C"), *Mst77FΔ20C-eGFP* (D-D"), *Mst77FΔ40C-eGFP* (E-E") und *Mst77FΔ40C+NLS-eGFP* (F-F"). (C) und (D) 20 % der Spermatiden besitzen eine abnormale Kernform (Pfeile). Die Fusionsproteine sind gleichmäßig in den Kernen verteilt. (E) *Mst77FΔ40C-eGFP* zeigt keine Lokalisation im Zellkern und keine abnormale Kernform. (F) Die Kernlokalisierung kann auch durch das Anfügen einer der Kernlokalisierungssignale nicht vollständig wiederhergestellt werden. *Mst77F* ist diffus in den Kernen und als Aggregate im Zytoplasma (Pfeilköpfe) zu detektieren. Die Kerne besitzen eine wildtypische Form. (C'-F') Färbung der DNA mit Hoechst und (C''-F'') eine Überlagerung der Kanäle. Maßstabsbalken: 5 μm.

Im darauf folgenden Schritt wurden die letzten 40 AS des C-Terminus entfernt und homozygot *Mst77FΔ40C-eGFP* exprimierende Fliegen analysiert. Diese Fliegen zeigen jedoch nur ein zytoplasmatisches Vorkommen von *Mst77FΔ40C-eGFP*. In den Kernen ist kein eGFP-Signal zu detektieren (siehe Abb. 5.15 E-E"). Hervorzuheben ist hier zudem, dass mit dem Eintreten des Verlustes der Lokalisation von *Mst77F-eGFP* im Zellkern, auch keine deformierten Spermatiden zu beobachten sind. Alle Kerne im Stadium der Individualisierung weisen eine wildtypische Kernform auf.

Nach einer Deletion der letzten 40 Aminosäuren und dem damit einhergehenden Verlust der Kernlokalisierung, wurde die C-terminale Region von *Mst77F* auf mögliche Kernlokalisierungssignale hin untersucht. Ein Schema des genomischen Bereichs von *Mst77F* sowie eine Vergrößerung des C-terminalen Schwanzes ist in Form einer Box in Abbildung 5.15 A aufgeführt. Zu sehen sind die letzten 67 Aminosäuren. Dabei codieren die Aminosäuren in Form von farbigen Großbuchstaben für bestimmte Kernlokalisierungssignale (NLS). Die Kernlokalisierungssignale wurden mit Hilfe von PSORT (Nakai und Horton, 1999) ermittelt und befinden sich nur im abgebildeten C-terminalen Bereich von *Mst77F*. Es wurden zwei Nukleus Konsensus-Sequenzen (RK SCPKPRAKTS KQRRS und RR SCGKPKPKGA RPRKA) sowie drei Kernlokalisierungssignale (2x RPRK, PRKK) identifiziert. Die Sequenzen sind im Schema der Abbildung 5.15 A farbig hinterlegt. Betrachtet man schließlich die Verteilung der einzelnen Sequenzen, fällt auf, dass sich die Signale zwischen den Aminosäuren 153 und 191 konzentrieren und im Konstrukt *Mst77FΔ20C-eGFP* noch vollständig erhalten sind. Im Konstrukt *Mst77FΔ40C-eGFP* fehlen hingegen große Teile der Kernlokalisierungssignale. Diese Beobachtung korreliert auch mit den Expressionsmustern der

Fusionsproteine. *Mst77FΔ20C-eGFP* (D) lokalisiert in den Spermatidenkernen, *Mst77FΔ40C-eGFP* (E) und *Mst77FΔ60C-eGFP* (Abb. 5.15 D) hingegen, werden lediglich im Zytoplasma exprimiert.

Mit dem Konstrukt *Mst77FΔ40C+NLS-eGFP* wurde daraufhin versucht die Kernlokalisierung wiederherzustellen. Hierfür wurde dem Konstrukt *Mst77FΔ40C-eGFP* die NLS „RPRK“ angefügt (siehe Abbildung 5.15 Schema A). Es wurden transgene Fliegen erzeugt und mit Hilfe von Testes-Quetschpräparaten, die Spermatiden hinsichtlich eines Defekts in der Kernform untersucht. Jedoch konnte mit Hilfe der NLS die Lokalisation im Kern nicht vollständig wieder hergestellt werden. In den Kernen ist nur ein diffuses Signal des Fusionsproteins zu erkennen (Abb. 5.15 F-F") und im Zytoplasma eine große Menge an eGFP-Aggregaten zu detektieren (Pfeilköpfe). Daraus lässt sich schließen, dass für die Lokalisation von *Mst77F* in den Zellkern, der vollständige C-terminale Bereich von AS 153 bis 191 benötigt wird, und in Folge dessen, auch den Phänotyp nach einer Überexpression von *Mst77F-eGFP* bedingt.

5.3.2.2.2 *Mst77F* besitzt eine N-terminale Coiled-Coil Domäne

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich im C-terminalen Bereich des *Mst77F*-ORFs Kernlokalisierungssignale befinden, wurde mit Hilfe der Datenbank SMART (Letunic et al., 2012) nach weiteren vorhergesagten Proteindomänen gesucht. Eine N-terminale Coiled-Coil Domäne (CC; Aminosäuren 26-49) wurde identifiziert (siehe Abbildung 5.17) und deren Einfluss auf den bereits beschriebenen Phänotyp nach einer Überexpression von *Mst77F* untersucht. Coiled-Coil Domänen dienen meist Protein-Protein-Interaktionen (Mason und Arndt, 2004), doch die genaue Funktion der Coiled-Coil Domäne in *Mst77F* ist nicht bekannt.

Es wurde ein *Mst77F*-Deletionskonstrukt generiert, welches neben dem Promotor und der 5' UTR, den ORF von *Mst77F* mit einer N-terminalen Deletion von 100 AS trägt (siehe Abbildung 5.16 A). Das Konstrukt wurde in Fliegen injiziert und Testes-Quetschpräparate homozygoter Fliegen analysiert. Im Gegensatz zu *Mst77F-eGFP*-Fliegen zeigen die *Mst77FΔ100N-eGFP* exprimierenden Fliegen keine Testes mit deformierten Spermatidenkernen (siehe Abb. 5.16 A-A"). Das Fusionsprotein ist gleichmäßig über den Kernen verteilt und nur sehr vereinzelt sind kleine *Mst77F*-positive Aggregate im Zytoplasma zu beobachten (Pfeilköpfe).

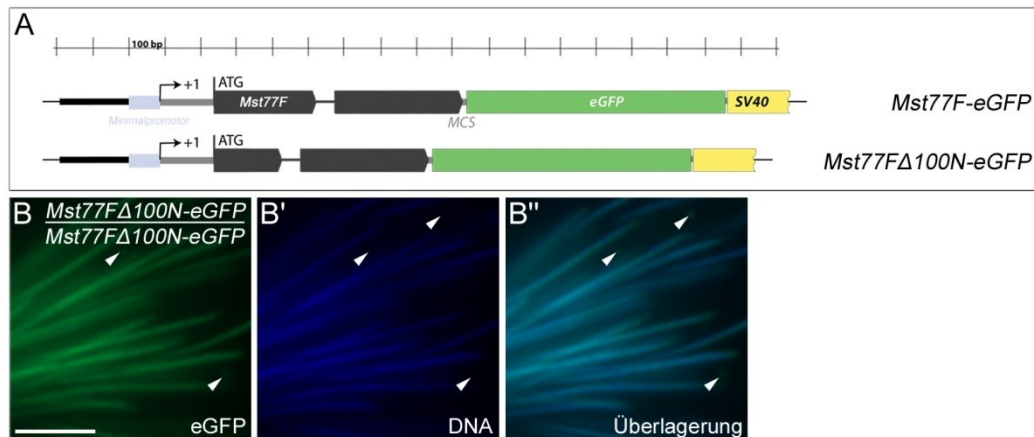


Abb. 5.16: *Mst77FΔ100N-eGFP* exprimierende Fliegen besitzen keine deformierten Spermatidenkerne. (A) Schematische Darstellung des genetischen Hintergrunds von *Mst77FΔ100N-eGFP* exprimierenden Fliegen im Vergleich zum volle-Länge-Konstrukt *Mst77F-eGFP*. 100 Aminosäuren wurden N-terminal deletiert. (B) Immunfluoreszenzfärbung an *Drosophila* Testes homozygot für *Mst77FΔ100N-eGFP* zeigen keinen Phänotyp. Während der Individualisierung ist das eGFP-Fusionsprotein gleichmäßig über den Kernen verteilt. Es sind nur vereinzelt Artefakte von *Mst77F-eGFP* über den Kernen detektierbar (Pfeilköpfe). (B') Nachweis der DNA mit Hoechst und (B'') Überlagerung der beiden Kanäle. Maßstabsbalken: 5 μm.

Somit zeigen homozygote Fliegen für *Mst77F* nach einer Deletion der N-terminalen Coiled-Coil Domäne, wie auch nach einer Deletion der C-terminal gelegenen Kernlokalisationssignale, keinen Phänotyp in der Kernform. Eine Abbildung der Proteinsequenzen der Deletionskonstrukte im Vergleich zum wildtypischen *Mst77F* ist in Abbildung 5.17 aufgeführt. Demnach bewirkt die Kombination aus der C-terminal definierten Kernlokalisierung und die Möglichkeit einer Protein-Protein-Interaktion über die N-terminale Coiled-Coil Domäne, die abnormale Kernform der individualisierenden Spermatiden bzw. die Chromatinaggregation nach einer Überexpression von *Mst77F-eGFP* im wildtypischen *Mst77F*-Hintergrund.

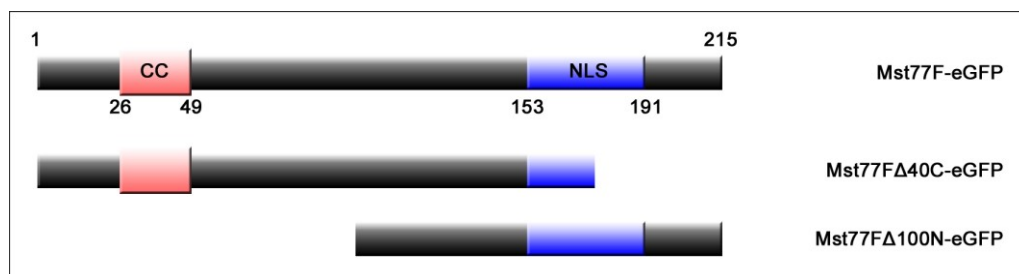


Abb. 5.17: *Mst77F* besitzt eine N-terminal gelegene Coiled-Coil Domäne sowie einen C-terminalen Bereich mit Kernlokalisationsignalen. Schematische Darstellung des wildtypischen *Mst77F* Proteins sowie der verwendeten Deletionskonstrukte. *Mst77F* besitzt eine N-terminale Coiled-Coil Domäne (CC, hellrote Box) und eine C-terminale Region mit verschiedenen Kernlokalisationsignalen (NLS-Bereich, blaue Box).

5.3.3 Die Importine Karyopherin- α 3 und α Karyopherin-4 sind im Testis exprimiert

Mst77F zeigt während der Spermatidenentwicklung ein dynamisches Expressionsmuster. So zeigen Nachweise mit einem Mst77F Antikörper, dass Mst77F zunächst mit β 2-Tubulin und der Mikrotubuli kolokalisiert. Aufgrund der Kolokalisation ist jedoch eine Verteilung von Mst77F in den Zellkernen des Kanustadiums oder in Kernen während der Individualisierung nicht aufzulösen und wildtypisches Mst77F somit erst in den Kernen reifer Spermien am Chromatin klar zu detektieren (Rathke, Barckmann et al., 2010). Mst77F-eGFP scheint sich im Gegensatz zum wildtypischen Mst77F, in allen Kernen ab dem Kanustadium zu befinden (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Lokalisation von Mst77F über Kernregulationssignale im C-terminalen Bereich des offenen Leserahmens ermöglicht wird (siehe Kapitel 5.3.2.2.1)

Es stellt sich somit die Frage, welche Proteine den Transport von Mst77F in den Zellkern ermöglichen und ob möglicherweise Importin- α Proteine die vorhandenen NLS erkennen und Mst77F so in den Zellkern rekrutieren können. In *Drosophila melanogaster* sind drei Importin- α Proteine bekannt welche im Testis exprimiert werden. Von diesen zeigt lediglich Importin- α 3 eine erhöhte Expression im Kanustadium (Giarrè et al., 2002). Importin- α 3 wird im Folgenden unter dem Synonym Karyopherin- α 3 (Kap- α 3, Kap- α 3) beschrieben. Phadnis et al (2012) zeigten zudem ein weiteres Importin, Importin- α 4, ein Retrogen von Karyopherin- α 3. Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass Importin- α 4 Testis-spezifisch exprimiert wird. Importin- α 4 wird im weiteren Verlauf unter dem Synonym α Karyopherin-4 (α Kap-4, α Kap4) aufgeführt.

5.3.3.1 Die mRNA kodierend für die Isoform *Kap- α 3-RA* wird im Testes transkribiert

Für die Analyse der für die Testis-spezifischen Isoform von Karyopherin- α 3 kodierenden mRNA wurden RT-PCRs an mRNA wildtypischer *Drosophila* Testes durchgeführt. Um die Qualität der mRNA zu überprüfen wurde zunächst eine PCR gegen das *β 3-tubulin* Transkript mit den Primern *B3aa23* und *B3aa140* durchgeführt. Sie überspannen ein Intron und amplifizieren ein 397 bp langes RNA-Fragment und im Falle einer DNA-Verunreinigung ein 492 bp langes Fragment. Die Auswertung der PCR zeigt, dass die Primer ein Produkt von 397 bp liefern (Abb. 5.18 B, Spur c) und die RNA somit nicht durch DNA verunreinigt ist.

Es sind für Karyopherin- $\alpha 3$ vier Isoformen beschrieben, *Kap-alpha3-RA*, *-RB*, *-RC* und *-RD* (FlyBase: St. Pierre et al., 2014; siehe Abbildung 5.18 A). Die Positionen der verwendeten Primerpaare für die Analyse der Testis-spezifischen Isoform, sind in Abbildung 5.18 A aufgeführt. Mit Hilfe des ersten Primerpaares, *aKap3-RA-3UTRse* und *aKap3-RA-3UTRas*, können alle Isoformen von Kap-alpha3 amplifiziert werden. Sie liefern ein Produkt von 360 bp (Abb. 5.18 B1). Mit Hilfe des zweiten Primerpaares, *aKap3-RA-3UTRse* und *aKap3-RC-3UTRas*, wurde daraufhin zwischen den Isoformen *RB* und *RC* und den Isoformen *RA* und *RD* unterschieden. Ein PCR-Produkt (815 bp) wurde hier nur für die Isoformen *RB* und *RC* erwartet. Es wurde kein Produkt erhalten (Abb. 5.18 B2) und daraus geschlossen, dass im Testes die Isoformen *aKap3-RA* und/oder *RD* transkribiert werden können. In einer weiteren PCR mit spezifischen Primern für die Isoform *aKap3-RA*, *aKap3-RA-5UTRse* und *aKap3-RA-5UTRas*, wurde ein RNA-Fragment von 218 bp erhalten (Abb. 5.13 B3) und der Nachweis für die Isoform *aKap3-RA* im Testis erbracht. Ein spezifischer Nachweis der Isoform *aKap3-RD* wurde nicht durchgeführt.

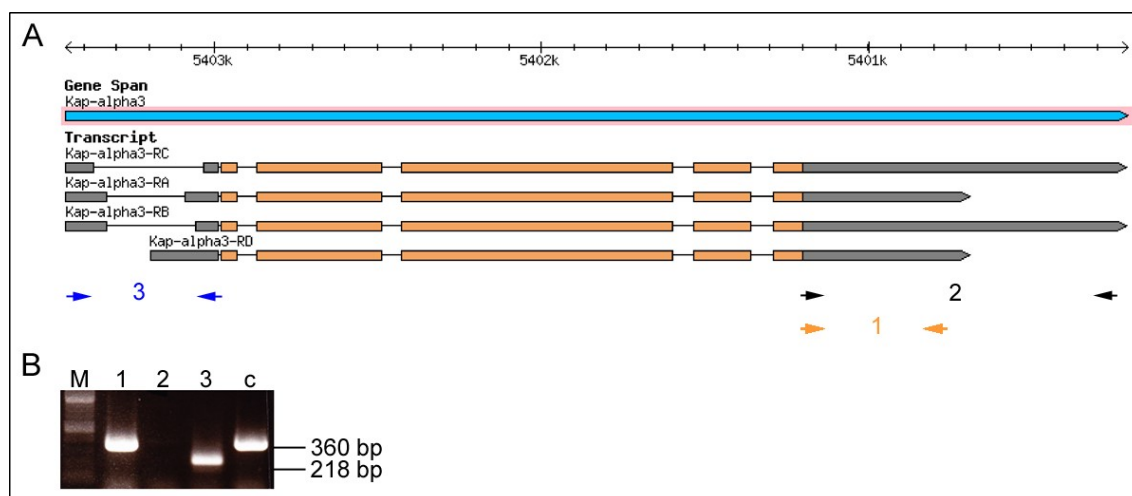


Abb. 5.18: Die mRNA für die Isoform *Kap-alpha3-RA* wird in *Drosophila* Testes transkribiert. (A) Schematische Darstellung der genomischen Region von *Kap-alpha3* mit den Isoformen *Kap-alpha3-RA*, *-RB*, *-RC* und *Kap-alpha3-RD*. (Schema verändert nach FlyBase). Die Positionen der RT-PCR Primer sind mit farbigen Pfeilen und Ziffern dargestellt. (B) RT-PCR an mRNA von wildtypischen *Drosophila* Testes. (1) Das Primerpaar 1 amplifiziert alle Isoformen und liefert ein Produkt von 360 bp. (2) Mit Hilfe des Primerpaares 2 wird zwischen den Isoformen *RB/RC* und *RA/RD* unterschieden. Nur die Isoformen *RB* und *RC* hätten ein PCR-Produkt (815 bp) geliefert. Es wurde kein Produkt erhalten und der Nachweis für die Isoformen *RA* und/oder *RD* erbracht. (3) Mit spezifischen Primern für *Kap-alpha3-RA* wird ein RNA-Fragment von 218 bp erhalten. (c) Kontrolle der mRNA mit spezifischen Primern für *$\beta 3$ -tubulin*. (M) 2 log DNA Ladder.

5.3.3.2 *alphaKap4* Transkripte sind bis in elongierende Stadien detektierbar

Neben Kap-alpha3, ist das Retrogen alphaKaryopherin-4 Testis-spezifisch transkribiert (Phadnis et al., 2012). Die Verteilung der Transkripte ist jedoch unbekannt und soll im Folgenden näher untersucht werden. Es wurden *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Testes durchgeführt und antisense und sense RNA-Sonden generiert, welche gegen rund 900 bp des Transkripts gerichtet sind. Die Hybridisierungssignale zeigen, dass das *alphaKap4* Transkript im Zytoplasma von Spermatozyten (siehe Abbildung 5.19 A, Pfeil) und bis in Stadien mit elongierenden Spermatidenkernen (Pfeilkopf) zu detektieren ist. Die Testes der sense-Sonden zeigen keine Hybridisierungssignale (Abb. 5.19 B). Der Nachweis mit der antisense-Sonde ist somit spezifisch.

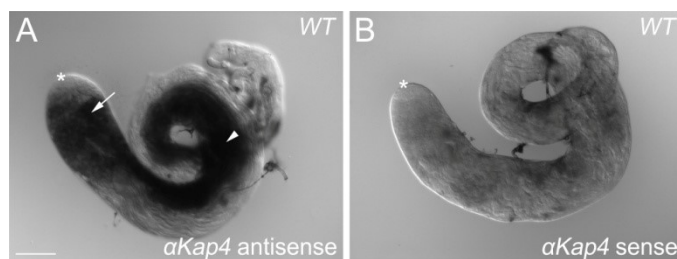


Abb. 5.19: *alphaKap4* Transkripte sind bis in elongierende Stadien detektierbar. *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Testes von *Drosophila*. (A) Die antisense-Sonde detektiert das *alphaKap4* Transkript im Zytoplasma von Spermatozyten (Pfeil) bis in Stadien mit elongierenden Spermatidenkernen (Pfeilkopf). (B) Mit der sense-Sonde ist kein Signal zu detektieren. Der Stern markiert den Hub des Testis. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Neben der Verteilung des Transkripts mit Hilfe eines *alphaKap4*-eGFP-Fusionsprotein das Expressionsmuster von alphaKap4 analysiert werden. Hierfür wurden 660 bp des regulatorischen Bereichs inklusive der 5' UTR, sowie der offene Leserahmen von *alphaKap4* an genomischer DNA amplifiziert und in den Zwischenvektor *pCR[®]-Blunt II-TOPO[®]* ligiert. Die Ligation des Konstrukts in einen Transformationsvektor steht allerdings noch aus. Somit kann über die Verteilung des *alphaKap4*-Fusionsproteins keine Aussage getroffen werden.

5.3.3.3 *Drosophilae* Stämme mit einer P-Element Insertion in *Kap-alpha3*^{EY02572} zeigen eine wildtypische Kernlokalisierung von Mst77F

Um den Einfluss der Importine Kap-alpha3 und alphaKap4 auf die Verteilung des Mst77F Proteins zu untersuchen, wurden diverse P-Elementlinien analysiert. Für *Kap-alpha3* war lediglich eine P-Element Insertionslinie verfügbar, welche eine P-Elementinsertion im ORF trägt, *P{EP}Kap-alpha3*^{G8397}. Das P-Element *P{EP}Kap-alpha3*^{G8397} liegt 453 bp stromabwärts des AUG-Translationsstarts, im zweiten Exon des offenen Leserahmens von *Kap-alpha3* (FlyBase: St. Pierre et al., 2014; Abb. 5.20 A). *Kap-alpha3*^{G8397} Fliegen sind jedoch homozygot letal und sterben meist noch vor dem Ende des Larvenstadiums (Mason et al., 2002). Aus diesem Grund wurden zudem *Drosophilae* mit einer P-Element Insertion im möglicherweise genregulatorischen Bereich von *Kap-alpha3* untersucht. In diesen Fliegen ist das P-Element *P{EPgy2}Kap-alpha3*^{EY02572} 795 bp stromaufwärts des AUG-Translationsstarts inseriert (FlyBase; Abb. 5.20 A). Bevor in den P-Insertions-Stämmen die Verteilung des Mst77F-Proteins näher untersucht werden konnte, musste zunächst der Insertionsort der P-Elemente verifiziert werden. Hierfür wurde eine PCR an genomischer DNA homozygoter *Drosophilae* für *Kap-alpha3*^{EY02572} und heterozygoter *Drosophilae* für *Kap-alpha3*^{G8397} durchgeführt. Die Primer *SeqBL15422-sen* und *Plac1* lieferten für *Kap-alpha3*^{EY02572} ein erwartetes Produkt von rund 730 bp und die Primer *SeqBL30180-sen* und *Plac1* für *Kap-alpha3*^{G8397} das erwartete Produkt von rund 420 bp. Die Insertionsorte der beiden P-Elemente konnten somit verifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

In Folge dessen konnte der Einbau und die Verteilung des Mst77F-Proteins in späten Spermatiden untersucht werden. Nachdem jedoch, wie bereits erwähnt, *Kap-alpha3*^{G8397} Stämme keine homozygoten Tiere aufweisen, wurden die anschließenden Analysen an Testes homozygoter *Kap-alpha3*^{EY02572} Fliegen durchgeführt. Es wurden Testes-Quetschpräparate hergestellt und IF-Nachweise von Mst77F und Histonen durchgeführt. Die Nachweise zeigen, dass die Spermatogenese in diesen Tieren scheinbar wildtypisch verläuft und auch Mst77F wildtypisch exprimiert wird (siehe Abbildung 5.20 H-L, im Vergleich zu IF-Nachweis von Mst77F an wildtypischen Fliegen *w*¹¹¹⁸ (C-G)). Mst77F ist ab dem Kanustadium und bis ins reife Spermium zu detektieren (J-L). Der Abbau der Histone verläuft ebenfalls wildtypisch (Abb. 5.20 C'-G'). Die Histone sind bis in die Kerne des frühen Kanustadiums zu detektieren (C',D'). Es bleibt an dieser Stelle jedoch zu überprüfen, ob die P-Element Insertion in den *Drosophilae* generell einen Einfluss auf die Expression des Gens *Kap-alpha3* ausübt.

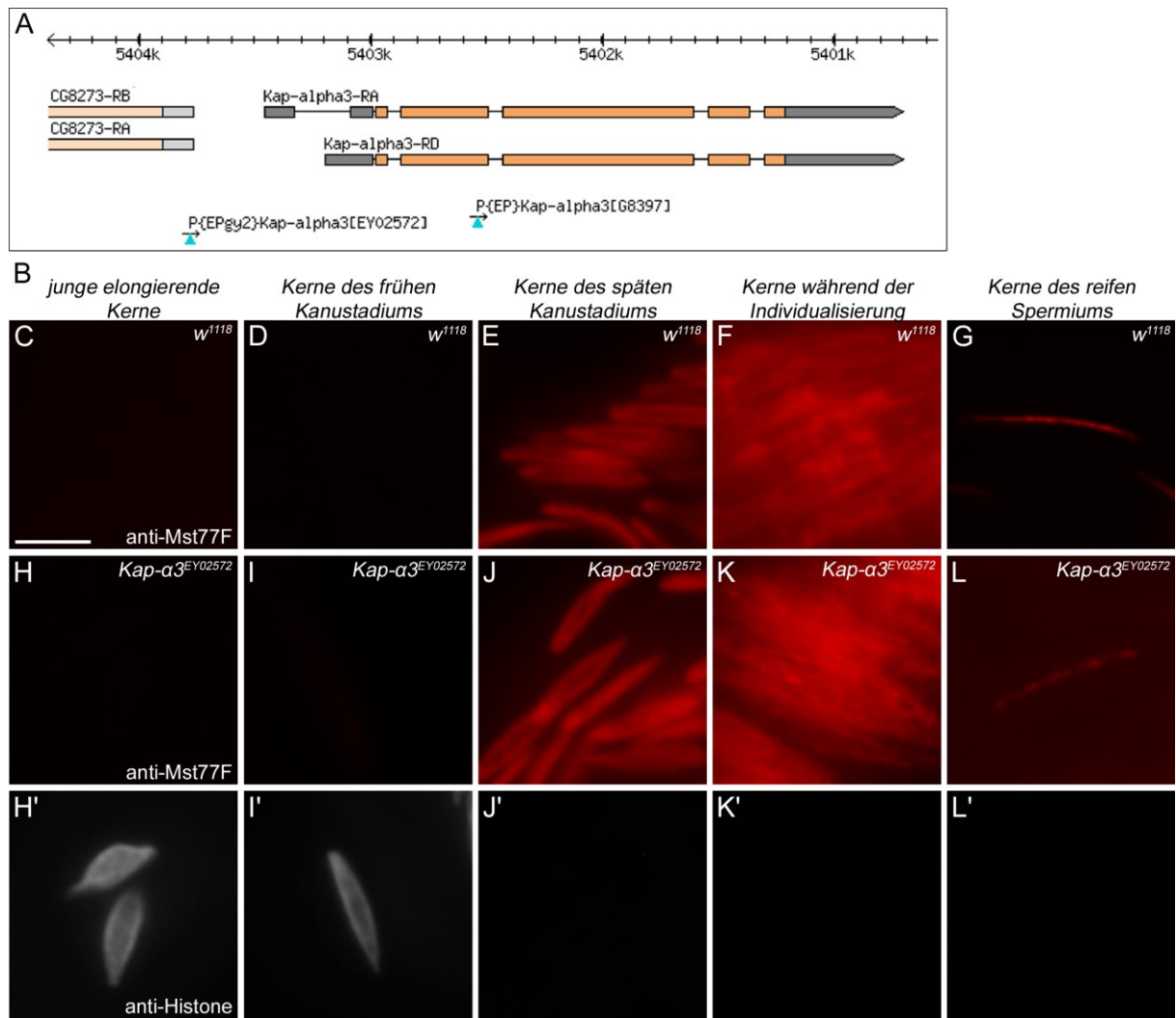


Abb. 5.20: *Kap- $\alpha 3^{EY02572}$* transgene Fliegen zeigen eine wildtypische Expression von Mst77F. (A) Schematische Darstellung der genomischen Region von *$\alpha Kap3$* mit den Isoformen *$\alpha Kap3-RA$* und *$\alpha Kap3-RD$* . Zudem sind die Positionen der verwendeten P-Element Linien angegeben. Das Schema wurde modifiziert nach FlyBase. (B) Immunfluoreszenznachweis an *Drosophila* Testes-Quetschpräparaten. (C-G) Mst77F ist in wildtypischen Fliegen ab dem Kanustadium bis ins reife Spermium zu detektieren. (H-L) In Testes homozygot für die P-Element Insertion *P{EPgy2}Kap-alpha3^{EY02572}* wird Mst77F wildtypisch exprimiert. (H'-L') Der Abbau der Histone verläuft ebenfalls wildtypisch ab dem frühen Kanustadium. Maßstabsbalken: 5 μ m.

5.3.3.4 In den Allelen *alphaKap4*^{MI06313} und *CG32406*^{PL00219} wird Mst77F wildtypisch exprimiert

Neben Kap-alpha3 soll der Einfluss des Testis-spezifischen Importins alphaKap4 auf die Verteilung des Mst77F-Proteins untersucht werden. Hierfür wurden die P-Elementlinien *Mi{MIC}alphaKap4*^{MI06313} und *PBac{GAL4D,EYFP}CG32406*^{PL00219} analysiert. Das P-Element *Mi{MIC}alphaKap4*^{MI06313} ist 654 bp stromabwärts des AUG-Translationsstarts im zweiten Exon des offenen Leserahmens des Gens *alphaKap4* inseriert und das P-Element *PBac{GAL4D,EYFP}CG32406*^{PL00219} 106 bp stromaufwärts des AUG-Translationsstarts (FlyBase: St. Pierre et al., 2014; Abb. 5.21 A). Beide Fliegenstämme sind fertil. Es wurde zunächst der Insertionsort der P-Elemente verifiziert und eine PCR an genomischer DNA homozygoter Fliegen durchgeführt. Die Primer *alphaKap4-ins-se* und *MiMIC5-2* lieferten für *alphaKap4*^{MI06313} das erwartete Produkt von rund 490 bp und die Primer *alphaKap4-Kpn-sen* und *pB3Seq* für *CG32406*^{PL00219} ein Produkt von rund 610 bp (Daten nicht gezeigt). Die Insertionsorte der P-Elemente konnten somit verifiziert werden.

Anschließend wurden Testes-Quetschpräparate hergestellt und ein Immunnachweis mit einem Histon-Antikörper durchgeführt. Die Immunnachweise an den Fliegen homozygot für *alphaKap4*^{MI06313} ist stellvertretend für beide Insertionslinien in Abbildung 5.22 B aufgeführt. Der Abbau der Histone verläuft wildtypisch (Daten nicht gezeigt) und auch an diesen Präparaten ist eine wildtypische Verteilung von Mst77F erkennbar. Mst77F ist ab dem Kanu-stadium zu detektieren und bis ins reife Spermium zu visualisieren (siehe Abb. 5.21 C-G). Der Import von Mst77F in den Spermaticidenkern ist demnach gewährleistet.

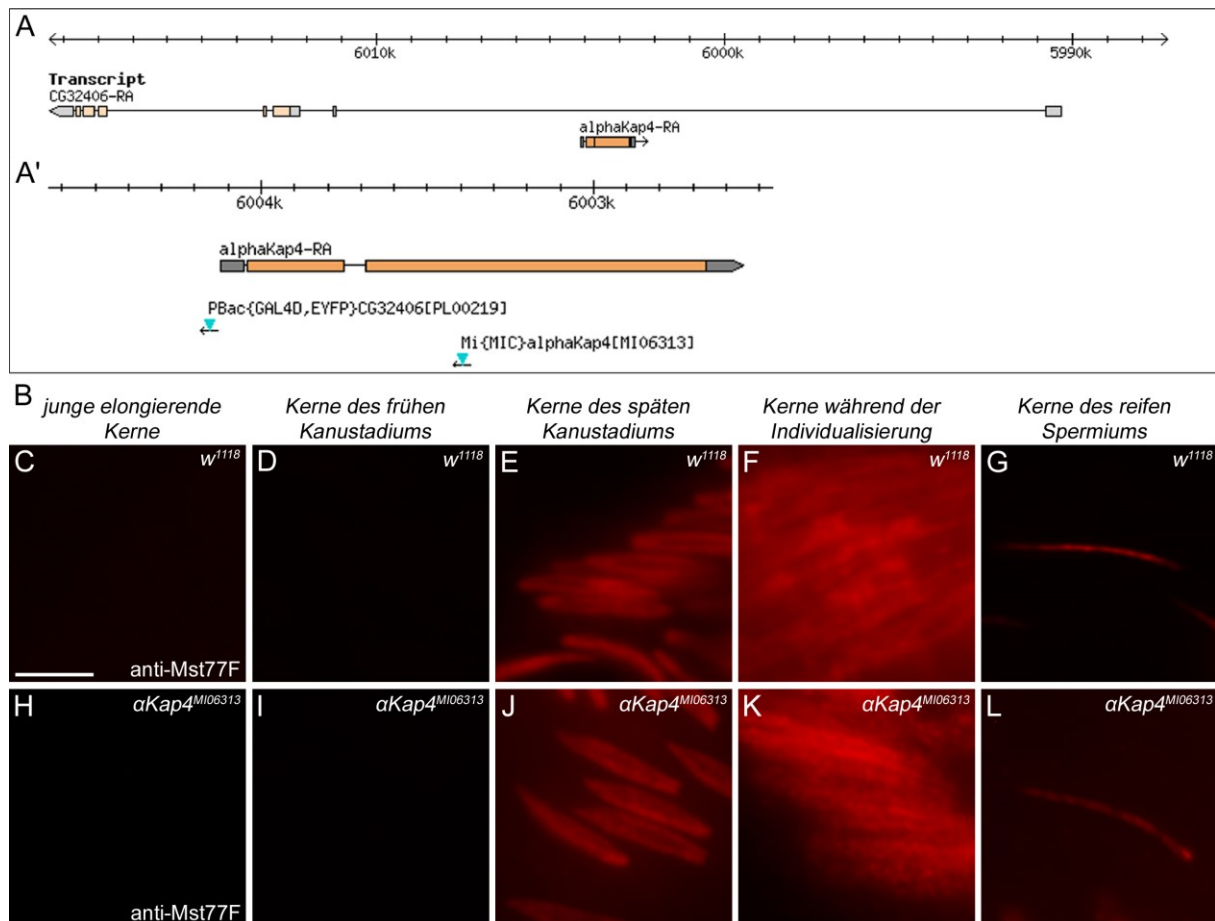


Abb. 5.21: Die P-Element Linie *Mi{MIC}alphaKap4[MI06313]* zeigt eine wildtypische Mst77F Expression. (A) Schematische Darstellung der genomischen Region von *alphaKap4*. *alphaKap4* liegt im ersten Intron des auf dem Gegenstrang befindlichen Gens *CG32406*. (A') Gezeigt ist die Vergrößerung des Transkripts *alphaKap4-RA* und die Positionen der verfügbaren P-Element Linien. Das Schema wurde modifiziert nach FlyBase. (B) Immunfluoreszenzfärbung an Testes-Quetschpräparaten mit anti-Mst77F. (C-G) In wildtypischen Testes akkumuliert Mst77F in den Kernen des späten Kanustadiums (E) und ist bis in reife Spermien zu detektieren (G). (H-L) In Testes homozygot für das P-Element *Mi{MIC}alphaKap4[MI06313]* wird Mst77F scheinbar wildtypisch exprimiert. Maßstabsbalken: 5 µm.

5.3.4 Die Identifikation von Mst77F-Interaktionspartnern

Wie bereits beschrieben, zeigt Mst77F eine Assoziation mit β 2-Tubulin (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke, Barckmann et al., 2010). Desweiteren wurde postuliert, dass Mst77F als ein Chromatin-assoziiertes Protein möglicherweise am Prozess der Chromatinkondensation beteiligt ist (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Der zugrundeliegende Mechanismus und die Beteiligung von Mst77F konnte jedoch bisher nicht verifiziert werden. Erste Hinweise hierauf liefern jedoch die phänotypischen Analysen nach einer Überexpression von Mst77F in den Zellkernen von Spermatisden, resultierend in einer abnormalen Kernmorphologie mit teilweise kleinen hyperkondensierten Kernen (siehe Kapitel 5.3.2.1).

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass Mst77F eine Coiled-Coil Domäne im N-terminalen Bereich besitzt, welche die Interaktion in Form von Homodimeren aber auch Heterodimeren mit weiteren Proteinen ermöglicht und so eventuell die Kondensation des Chromatins durch eine Art Vernetzung der Proteine untereinander fördert (Kap. 5.3.2.2.2). Zusätzlich wäre aber auch die Bindung an andere Chromatinkomponenten oder auch direkt an die DNA zu überprüfen. Tatsächlich haben wir für Mst77F in einer Kooperation mit Dr. W. Fischle (MPI Göttingen), Regionen mit „low complexity“ identifizieren können, mit Hilfe derer Mst77F sequenzspezifisch an DNA binden kann (Kost, Kaiser et al., in Vorbereitung).

Der Prozess der Chromatinkondensation wird unter anderem von den Proteinen Protamin A und Protamin B begleitet. Es stellt sich die Frage, ob diese Proteine zum Teil in gemeinsamen Komplexen vorkommen. Weitere potenzielle Komplexkomponenten oder direkte Interaktionspartner von Mst77F sind bisher nicht bekannt. Daher war ein Ziel mit Hilfe von Datenbankanalysen mögliche Interaktionspartner von Mst77F zu identifizieren und auf Homodimerisierung zu testen. Mit Hilfe von Ko-Transfektionen in Zellkultur und der Methode der Co-Immunoprecipitation – sofern die somatischen Zellen in der Spermiogenese relevante Komponenten enthalten – können möglicherweise gemeinsame Komplexe detektiert werden. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems können zudem direkte Interaktionen festgestellt werden.

5.3.4.1 In transfizierten *Drosophila* SL2-Zellen werden Mst77F, ProtA, ProtB sowie Tpl^{94D} ineffizient exprimiert

Für die Ko-Transfektionsstudien in Zellkultur wurde zunächst die Expression der Fusionsproteine Mst77F-eGFP, ProtaminA/B-GFP und Tpl^{94D}-eGFP nach Transfektion in *Drosophila* S2-Zellen überprüft. Hierfür wurden die offenen Leserahmen der Kandidatengene *protA*, *protB* und *tpl^{94D}* sowie von Mst77F in den Zwischenvektor *pENTRTM/D-TOPO[®]* ligiert und anschließend in den Vektor *pUAS-attB-rfa-eGFP* rekombiniert. Mst77F wurde zusätzlich in *pUASp-attB-rfa-10xmyc* kloniert. *Drosophila* SL2-Zellen wurden transfiziert und durch die Ko-Transfektion mit einem *Act-GAL4* Konstrukt die Expression der Fusions-Konstrukte induziert. Es folgte ein Immunfluoreszenznachweis der Expression in SL2-Zellen, um die Expressionsfähigkeit zu analysieren und die Lokalisation der Fusionsproteine innerhalb der SL2-Zellen zu visualisieren. Hierfür wurde zudem die DNA mit Hoechst visualisiert (siehe Abb. 5.22 A'-E') und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin markiert (Abb. 5.22 A"-E").

Die Auswertung der Autofluoreszenz zeigt, dass Mst77F-eGFP (Abb. 5.22 A) wie auch ProtA-eGFP (C) und ProtB-eGFP (D) schwach im Zellkern der SL2-Zellen zu detektieren sind und eine starke Anreicherung in den Nukleoli aufweisen (Pfeile). Transfizierte Zellen für Tpl^{94D}-eGFP zeigen ebenfalls eine Lokalisation im Zellkern, jedoch ist keine Anreicherung im Nukleolus zu beobachten. Mst77F-10xmyc ist mit einem gegen den Myc-Tag gerichteten Antikörper kaum nachzuweisen (Abb. 5.22 B). Es wird sehr schwach im Zellkern exprimiert und auch im Nukleolus ist eine schwache Anreicherung erkennbar (Pfeil). Die ineffiziente Expression von Mst77F-10xmyc schränkt somit die Möglichkeiten von Co-Immunopräzipitationsstudien stark ein. Dennoch wurde eine Co-Immunopräzipitation mit GFP-Trap[®]_A Beads (GFP-Trap[®]_A Kit, Chromotek) an UAS-Mst77F-10xmyc und UAS-Mst77F-eGFP transfizierten *Drosophila* SL2-Zellen durchgeführt. Mit Hilfe eines gegen den GFP-Tag gerichteten Antikörpers konnten im Input wie auch nach der IP, Signale mit einer Größe von etwa 52 kDa detektiert werden (siehe Anhang Seite 129 Abb. 7.2 A). Dies entspricht der Summe aus den Größen für Mst77F (24,5 kDa) und dem eGFP-Tag (27 kDa). Mit Hilfe des gegen den Myc-Tag gerichteten Antikörpers konnten jedoch, aufgrund der bereits erwähnten ineffizienten Expression von UAS-Mst77F-10xmyc, keine Signale nachgewiesen werden.

Zusammenfassend erlaubt dieser Versuch somit zwei Schlussfolgerungen: A) Die Transkriptionseffizienz und/oder die Translationseffizienz bzw. die Proteininstabilität ist in diesen somatischen Zellen weitaus geringer als in den männlichen Keimzellen. B) Im

Gegensatz dazu ist der Kernimport von Mst77F in den somatischen Zellen gewährleistet und spricht somit gegen einen Keimbahn-spezifischen Kernimport Mechanismus des Proteins.

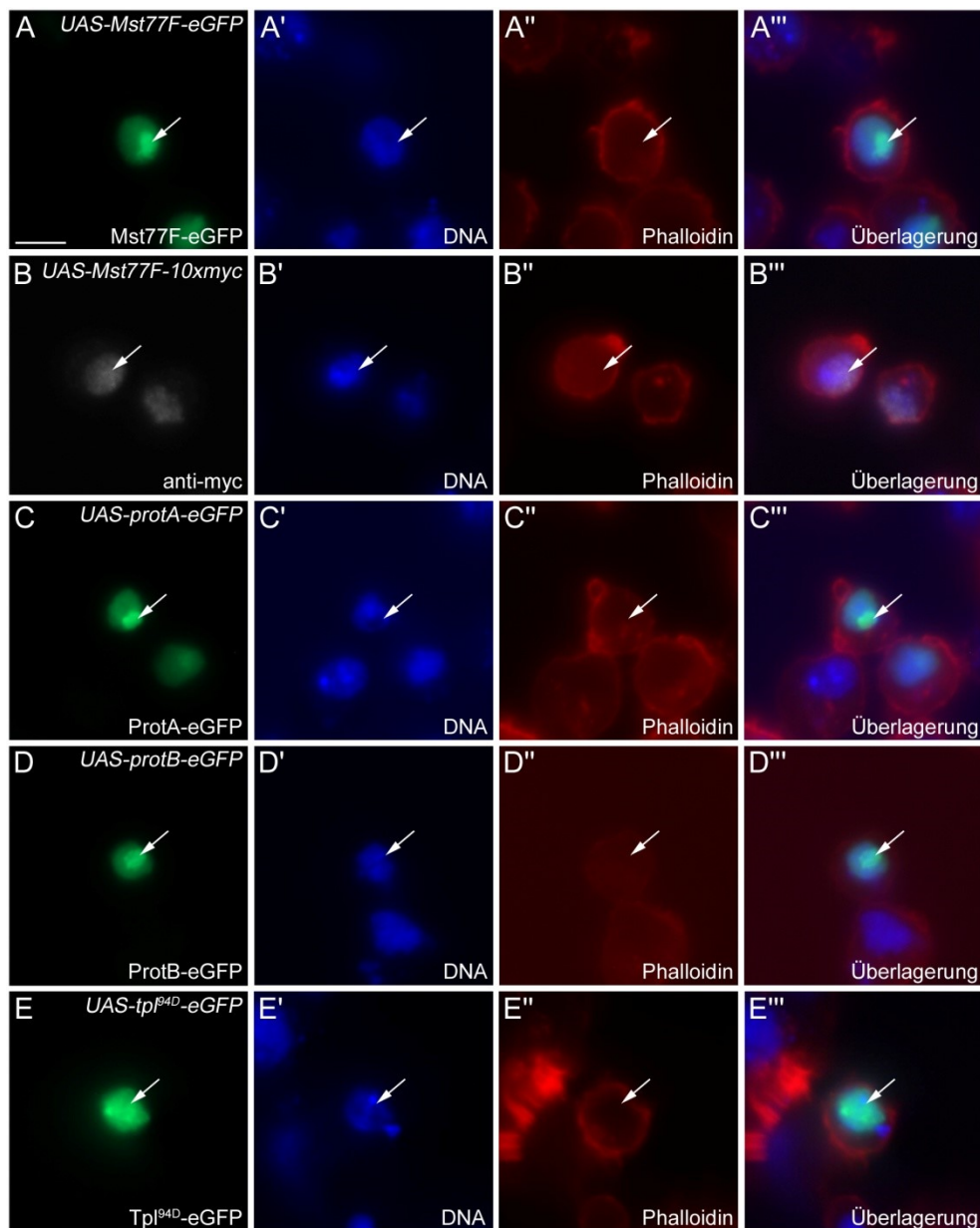


Abb. 5.22: UAS-eGFP-Fusionskonstrukte von *Mst77F*, *protA* und *protB* sowie von *tpl^{94D}* sind im Zellkern von *Drosophila* SL2-Zellen zu detektieren. eGFP-Autofluoreszenz transfizierter *Drosophila* SL2-Zellen. (A,C,D) Gezeigt sind mit *UAS-Mst77F-eGFP*, *UAS-protA-eGFP* und *UAS-protB-eGFP* transfizierte SL2-Zellen. Die eGFP-Fusionsproteine werden im Zellkern schwach translatiert und zeigen eine starke Anreicherung über dem Nukleolus (Pfeile). (B) Auch *Mst77F-10xmyc* wird schwach im Zellkern exprimiert. Eine leichte Anreicherung im Nukleolus ist ebenfalls zu beobachten. (E) Das Fusionsprotein von *UAS-tpl^{94D}-eGFP* wird im Zellkern exprimiert (Pfeile). Es ist keine gesonderte Anreicherung über dem Nukleolus zu detektieren. (A'-E') Färbung mit Hoechst zur Visualisierung der DNA. (A''-E'') Färbung des F-Aktins mit Phalloidin. (A'''-E''') Überlagerung der einzelnen Kanäle. Maßstabsbalken: 5 μ m.

5.3.4.2 Analyse weiterer möglicher direkter oder indirekter Interaktionspartner von Mst77F

Es wurde nach weiteren möglichen Interaktionspartnern von Mst77F gesucht und mit Hilfe der Datenbank STRING (Snel et al., 2000; Franceschini et al., 2013) konnten drei Kandidaten aus Ko-Expressionsstudien identifiziert werden, CG7929, CG10252 und CG12861. Nach einer Aktualisierung der Datenbank wurden zwar CG7929 und CG12861 für eine direkte Interaktion mit Mst77F ausgeschlossen, jedoch aber eine Interaktion der einzelnen Gene untereinander postuliert. Aus diesem Grund wurden CG7929 und CG12861 weiterhin als mögliche Partner von Mst77F in Komplexen in Betracht gezogen und analysiert. Die Transkription der drei Kandidatengene ist im Testis hochreguliert (FlyAtlas) und eine Wahrscheinlichkeit für eine Kernlokalisierung von 25 % für CG7929 und von ~70 % und ~80 % für die Proteine CG10252 und CG12861, wird vorhergesagt (PSORT II) (siehe Tabelle 5.2). Ergänzende Daten in der Tabelle wurden FlyBase und Ensemble entnommen.

Tab. 5.2: Mögliche Interaktionspartner von Mst77F

Gen	Name	Homolog in Mäusen	Anzahl Aminosäuren	im Testis hochreguliert	Wahrscheinlichkeit für eine Kernlokalisierung
CG7929	Ocnus	-	148	+	26 %
CG10252	-	ODF3L1/2	229	+	74 %
CG12861	-	-	239	+	83 %

Die molekulare Funktion der Gene ist bisher nicht geklärt und auch über das Expressionsmuster der Proteine während der *Drosophila* Spermatogenese ist nichts bekannt. Mittels RT-PCR wurde lediglich gezeigt, dass die Transkription von *ocnus* (CG7929) Testis-spezifisch erfolgt, es Homologien zu *janus A* und *janus B* aufweist und aus einer multiplen Duplikation derer heraus entstanden sein könnte (Parsch et al. 2001 A, B). Für *janus A* und *janus B* wird eine Beteiligung an der Regulation der Geschlechts-Differenzierung beschrieben. JanusB kodiert dabei für ein 140 AS basisches (PI 10.39) Protein, dessen Gen *janusB* Keimbahn-spezifisch im Testis transkribiert wird. JanusB unterliegt zudem einer Translationskontrolle, welche eine postmeiotische Translation bedingt (Yanicostas et al., 1989; Yanicostas und Lepesant, 1990). Das Gen *ocnus* kodiert ebenfalls für ein kleines basisches Protein (148 AS, PI 10.6) und daher ist es vorstellbar, dass die Proteine in einem Komplex im Spermienchromatin vorkommen.

Für CG10252 konnte mittels *in situ* Hybridisierung gezeigt werden, dass dessen Transkripte bis in späte Stadien nachweisbar sind (Barreau et al., 2008). Zudem zeigen

SpermienProteom Daten, dass CG10252 eine Komponente des reifen Spermiums darstellt (Dorus et al., 2006). Wie Ocnus bildet auch dieses Protein eine mögliche Spermienchromatin-Komponente.

5.3.4.2.1 Die Transkripte von *ocnus*, *CG10252* und *CG12861* sind bis in postmeiotische Stadien nachweisbar

Zunächst wurde die Verteilung der Transkripte von *ocnus*, *CG10252* und *CG12861* im Testis analysiert. Es wurden *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Testes durchgeführt und antisense und sense RNA-Sonden generiert. Die Sonden sind jeweils gegen 200-400 bp der Transkripte gerichtet. Die Färbungen zeigen, dass die Transkripte aller zu untersuchenden Gene in der gesamten Spermio-genese zu detektieren sind (siehe Abb. 5.23 A,C,E). Die mRNAs sind erstmals im Spermatozyten-Stadium zu visualisieren (Pfeile) und bis in Stadien mit späten elongierenden Spermatiden nachweisbar (Pfeilköpfe). Die Testes der sense-Sonden zeigen weitgehend keine Färbung (Abb. 5.23 B,F). Lediglich die *CG10252* sense-Sonde weist eine leichte Hintergrundfärbung auf (Abb. 5.23 D). Sie unterscheidet sich jedoch von der antisense-Sonde und somit ist anzunehmen, dass die Färbungen mit den antisense-Sonden spezifisch sind.

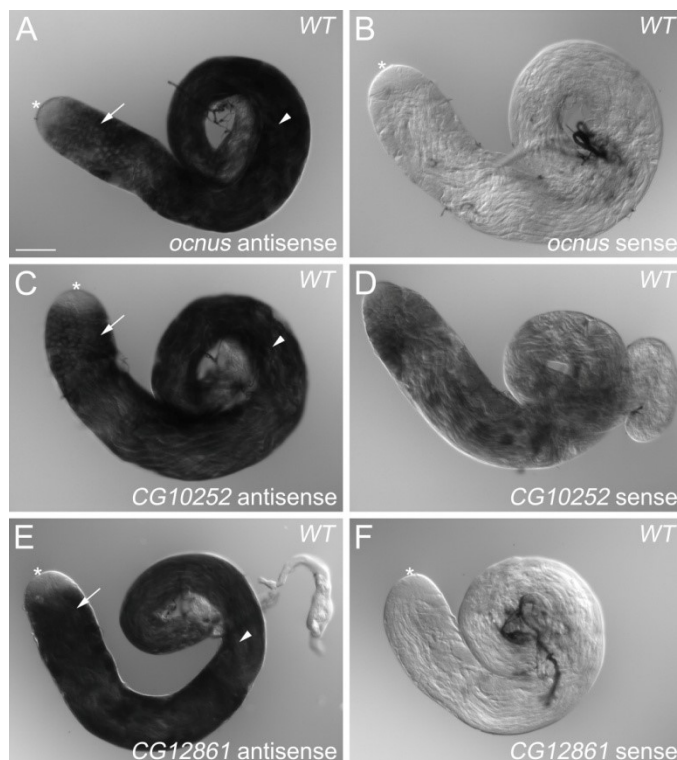


Abb. 5.23: Die mRNAs von *ocnus*, *CG10252* und *CG12861* sind bis in späte Spermatidenstadien zu detektieren. (A,C,E) *in situ* Hybridisierungen an wildtypischen Testes von *Drosophila* zeigen Färbungen im Zytoplasma aller Spermatogenese-Stadien, ab den Spermatozyten (Pfeile) bis in späte Spermatiden (Pfeilköpfe). (B,F) Mit den sense-Sonden ist kein Signal ersichtlich. (D) Die sense-Sonde für *CG10252* weist eine leichte Hintergrundfärbung auf. Die Sterne markieren jeweils den Hub der Testes. Maßstabsbalken: 100 μ m.

5.3.4.2.2 Die Fusionsproteine Ocnus-, CG10252- und CG12861-eGFP sind in den Flagellen detektierbar und in *Drosophila* SL2-Zellen werden die Fusionsproteine CG10252-eGFP und CG12861-eGFP im Zytoplasma exprimiert

Nachdem die Transkripte bis in späte Spermatisden nachgewiesen werden konnten, sollte das Expressionsmuster näher analysiert werden. Hierfür wurden eGFP-Fusionskonstrukte für *ocnus*, *CG10252* und *CG12861* generiert, welche den Promotor und die 5' UTR, sowie den ORF des zu analysierenden Gens beinhalten. Transgene Fliegen wurden erzeugt und Testes-Frischpräparate hinsichtlich der eGFP-Expressionsmuster analysiert.

Die Fusionsproteine der drei möglichen Interaktionspartner sind in den Flagellen detektierbar (siehe Abb. 5.24, Pfeile). In frühen Stadien der Spermatogenese und in den Kernen der Keimzellen sind keine eGFP-Signal nachweisbar (Abb. 5.24, Pfeilköpfe).

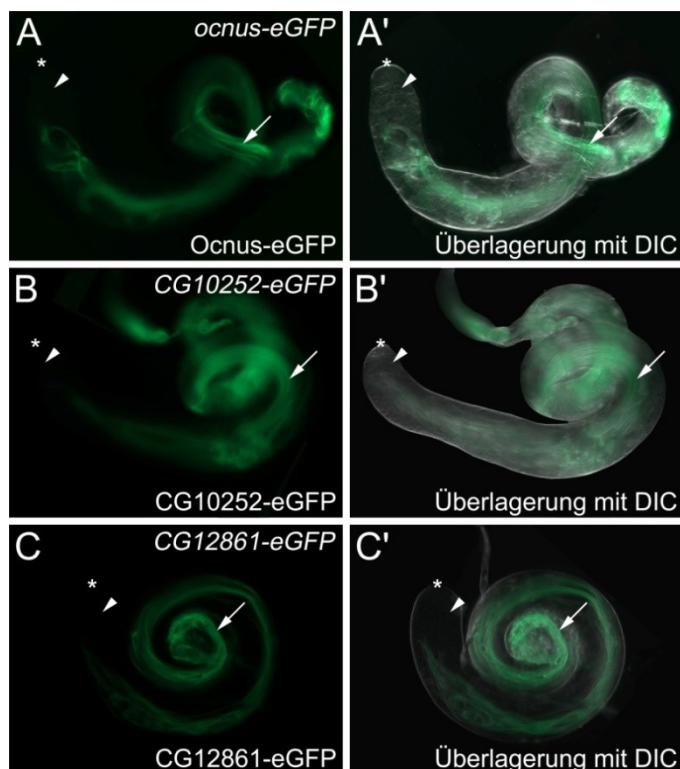


Abb. 5.24: Die Fusionsproteine Ocnus-eGFP, CG10252-eGFP und CG12861-eGFP sind in den Flagellen detektierbar. Testes-Frischpräparate transgener Linien für *ocnus-eGFP*, *CG10252-eGFP* und *CG12861-eGFP*. Die Fusionsproteine sind in den Flagellen detektierbar (Pfeile). Es kann kein Signal in den Kernen der Keimzellen, wie auch in frühen Spermatogenese-Stadien nachgewiesen werden (Pfeilkopf). (A,B,C) eGFP-Autofluoreszenz und (A',B',C') Überlagerung mit dem DIC-Kanal. Die Sterne markieren die Hub-Region der Testes. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Eine mögliche Interaktion von Ocnus und/oder CG12861 zu Mst77F, ebenso wie eine eventuelle Interaktion von Mst77F zu den Protaminen A/B bzw. Tpl^{94D}, wurde zunächst mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems getestet. Eine Interaktion der Proteine konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (siehe Anhang Seite 130, Abb. 7.3 und 7.4), wobei die Expression der einzelnen Fusionsproteine in den Hefezellen, noch bestätigt werden muss.

Übereinstimmungen zu den *in vivo* Daten aus *Drosophila* Testes sind mit Zellkultur-Transfektionsexperimenten zu verzeichnen. So werden die Fusionsproteine CG10252-eGFP und CG12861-eGFP in *Drosophila* SL2-Zellen ebenfalls nur zytoplasmatisch exprimiert (siehe Abb. 5.25 B,C, Pfeile). Für die Transfektion der Zellen wurden die offenen Leserahmen der Gene *ocnus*, *CG10252* und *CG12861* in den Vektor *pUASattB-rfa-eGFP* rekombiniert, SL2-Zellen mit den Konstrukten transfiziert und die Expression der Konstrukte durch die Ko-Transfektion mit einem *Act-GAL4* Konstrukt induziert. Die Auswertung zeigt, dass lediglich Ocnus-eGFP, neben einer zytoplasmatischen Komponente (siehe Abb. 5.25 B, Pfeilkopf), eine Anreicherung im Zellkern aufweist (B, Pfeil). Weder CG10252-eGFP noch CG12861-eGFP sind im Zellkern zu visualisieren und kommen daher weniger für eine Interaktion mit Mst77F im Chromatin in Frage. Da jedoch aber auch für Mst77F eine Expression in den Flagellen beschrieben ist (Jayaramaiah und Renkawitz-Pohl, 2005), ist es durchaus möglich, dass die Proteine möglicherweise in den Flagellen mit Mst77F interagieren.

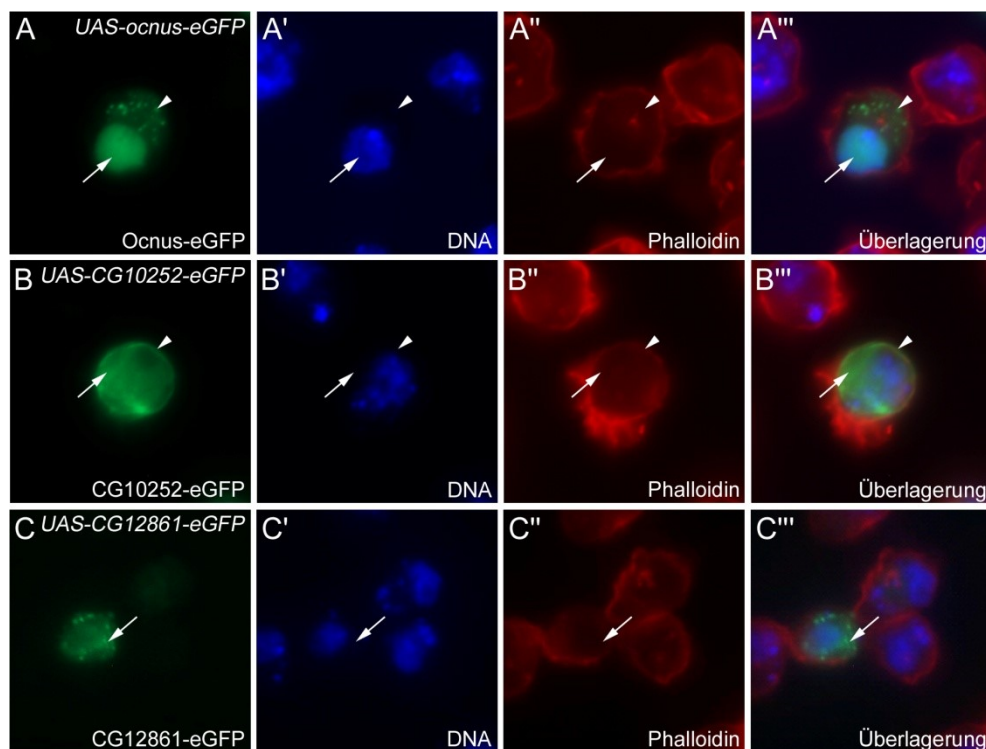


Abb. 5.25: Mit *UAS-ocnus-eGFP*, *UAS-CG10252-eGFP* und *UAS-CG12861-eGFP* transfizierte *Drosophila* SL2-Zellen weisen unterschiedliche eGFP-Expressionsmuster auf. Immunfluoreszenznachweis an transfizierten *Drosophila* SL2-Zellen. (A) In *UAS-ocnus-eGFP* transfizierten Zellen ist ein Signal im Zellkern zu detektieren (Pfeil), wie auch punktuell im Zytoplasma (Pfeilkopf). (B) Das Fusionsprotein CG10252-eGFP ist lediglich im Zytoplasma (Pfeil) und an der Zellmembran (Pfeilkopf) nachweisbar. (C) Mit *UAS-CG12861-eGFP* transfizierte Zellen zeigen eine Anreicherung von CG12861-eGFP Aggregaten im Zytoplasma (Pfeil). Eine Verteilung im Zellkern ist nicht aufzulösen. (A'-C') Visualisierung der DNA mit Hoechst und (A''-C'') des Aktinzytoskeletts mit Phalloidin. (A'''-C''') zeigt eine Überlagerung der Fluoreszenzkanäle. Maßstabsbalken: 5 μ m.

6 DISKUSSION

6.1 Die Endonukleasen CG31679, CG31682, CG32463 und CG4683, wie auch Squash und Squash-like sind nicht am Setzen von DNA-Brüchen zum Zeitpunkt des H-P-Wechsels beteiligt

In der Spermiogenese von *Drosophila* sind mit dem Wechsel von einer auf Histonen zu einer auf Protaminen basierenden Chromatinstruktur große Mengen an DNA-Brüchen zu detektieren und nachdem Topoisomerasen als Induktoren der Strangbrüche ausgeschlossen werden konnten, wurden erstmals Endonukleasen zum Setzen der Brüche in Betracht gezogen (Kaiser, Masterarbeit 2010).

6.1.1 Die Nukleasen CG31679, CG31682, CG32463 und CG4683 bilden Homologe der Endonuklease G und werden in mitochondrialen Derivaten exprimiert

in situ Hybridisierungen an *Drosophila* Testes zeigen eine Verteilung der Nukleasen-mRNAs von CG31679, CG31682, CG32463 und CG4683 im Zytoplasma von Spermatozyten bis in späte elongierende Stadien (Kaiser, Masterarbeit 2010). Da jedoch keine Informationen über das Expressionsmuster der Nukleasen vorhanden waren, wurden eGFP-Fusionsproteine generiert und deren Verteilung in *Drosophila* Testes analysiert. Die Fusionsproteine der Nukleasen werden jedoch nicht in den Spermatidenkernen des Kanustadiums exprimiert und damit auch nicht zum Zeitpunkt des Histon-Protamin-Wechsels (siehe Kapitel 5.1.1). Eine Funktion der Endonukleasen CG31679, CG31682 und CG4683 als mögliche Induktoren der DNA-Strangbrüche während der Umstrukturierung des Chromatins kann somit ausgeschlossen werden.

Stattdessen sind die Fusionsproteine jedoch in den Nebenkernen und über den Flagellen zu detektieren, in Geweben mit mitochondrialer (mt) DNA (siehe Kapitel 5.1.1). DeLuca und O'Farrell (2012) beschrieben kürzlich die Nukleasen CG31682, CG32463, CG31679 und CG4683 erstmals als Homologe Proteine zu der Endonuklease G (EndoG), mit der Bezeichnung EndoG-Like Proteine 1-4 (Tengl 1-4). Die Endonuklease G ist ein mitochon-

driales Enzym und während der Apoptose an der Degradation nukleärer DNA beteiligt (Temme et al., 2009). Zudem werden Funktionen in der mtDNA Replikation und mtRNA Prozessierung beschrieben (Côté und Ruiz-Carrillo, 1993; McDermott-Roe et al., 2011). Aufgrund der zellulären Lokalisation der Nukleasen Tengl 1-4 in den Bereichen der mitochondrialen Derivate werden somit auch für diese Proteine Funktionen in der mtDNA Replikation und mtRNA Prozessierung möglich. DeLuca und O'Farrell (2012) zeigten zudem, dass das Entfernen von mtDNA während der Individualisierung der Spermatischen Kerne abhängig von EndoG verläuft. In *EndoG* Mutanten wird die Eliminierung der mtDNA nicht vollzogen. Jedoch zeigt eine Deletion der vier EndoG Homologen keinen Effekt auf das Entfernen der mtDNA. Und auch der Phänotyp in *EndoG* Mutanten kann nicht durch die ektopische Expression von Tengl 1-4 gerettet werden (DeLuca und O'Farrell, 2012).

6.1.2 Squash und Squash-like werden nur in Spermatozyten transkribiert und auch das Squash-Fusionsprotein ist nur in mitotischen Zellen zu detektieren

Als weitere mögliche Nukleasen, welche als Induktoren der DNA-Strangbrüche während des Histon-Protamin-Wechsels wirken könnten, wurden die Nukleasen Squash und Squash-like (CG15484) untersucht. Doch sprechen erste Analysen gegen eine Rolle in der Histon-Protamin-Transition, da die Transkripte von *squash* und *squash-like* ausschließlich im Spermatozyten-Stadium zu detektieren sind (siehe Kapitel 5.1.2.1).

Auch der Nachweis von Squash mit Hilfe eines Antiserums zeigt eine Expression in Spermatozyten (siehe Kapitel 5.1.2.2, sowie Anhang Seite 128 Abb. 7.0). Zudem sind aber auch diffuse Signale bis hin zum Wechsel von Histonen zu Protaminen zu beobachten. Ob diese jedoch als echte Signale angesehen werden können, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Die Signale bis zum frühen Kanustadium können daher rühren, dass mit dem Wechsel der Chromatinstruktur, einhergehend mit der Kondensation des Chromatins, das Antiserum nicht mehr bzw. nicht mehr unspezifisch binden kann. Immunfluoreszenz-Nachweise an *squash*-defizienten Fliegen bzw. ein Blocken des Antiserums mit einem Squash-Peptid sind notwendig, um eine unspezifische Bindung des Antiserums auszuschließen. Ebenso könnte aber auch eine Affinitätsreinigung des Antiserums dienlich sein, um die Spezifität des Antikörpers zu erhöhen.

Um jedoch weitere Einblicke hinsichtlich des Expressionsmusters von Squash zu erhalten, wurde zudem die Verteilung eines Squash-eGFP Fusionsproteins untersucht. Dies kann stark im Zytoplasma von mitotischen Zellen detektiert werden und zeigt eine schwache Expression bis ins Zytoplasma von Spermatozyten (siehe Kapitel 5.1.2.2). Das Expressionsmuster weicht jedoch stark von der mittels des Antiserums ermittelten Proteinverteilung ab. Aus diesem Grund sollte zur Kontrolle ein weiteres Squash-eGFP Fusionsprotein generiert werden, welches einen längeren genregulatorischen Bereich und zudem eine genspezifische 3' UTR trägt. Damit wird versucht möglichst alle translationsrelevanten Sequenzen für Squash abzudecken und eine eventuelle duale Funktion in den frühen mitotisch aktiven Stadien gegenüber den Stadien mit jungen elongierenden Kernen mit einzuschließen.

Dennoch scheint das Expressionsmuster von Squash-eGFP in den frühen Spermatogenesestadien die tatsächliche Expression des wildtypischen Squash-Proteins widerzuspiegeln und eine Funktion von Squash im piRNA-Signalweg (PIWI-interagierende RNA Signalweg) aufzuzeigen. So besitzt das Fusionsprotein Squash-eGFP ein vergleichbares Färbemuster wie AGO3, einem PIWI Protein der Argonauten-Familie (Nagao et al., 2010). AGO3 bindet die Loci der piRNAs *Su(Ste)-4* und *AT-chX-1* (Williams und Rubin, 2002; Li et al., 2009), welche ihrerseits wiederum in *squash* Mutationen runter reguliert sind (Pane et al., 2007).

Zusammenfassen scheinen somit weder die EndonukleaseG-ähnlichen Proteine Teng1-4, noch die Nukleasen Squash und Squash-like am Induzieren der DNA-Brüche während des Histon-Protamin-Wechsels beteiligt zu sein. Wobei jedoch die zusätzlichen Untersuchungen zu einer möglichen Expression von Squash in postmeiotischen Stadien ausstehen. Dennoch aber bleiben Endoribonukleasen als mögliche Induktoren von DNA-Strangbrüchen von Interesse. So zeigen Transkriptom-Daten die Anreicherung weiterer Endoribonuklease-Kandidaten in den postmeiotischen Stadien der Spermatogenese, wie zum Beispiel für *CG2145*, *CG3303*, *CG9272* und *CG12917* (SpermPress: Vbranovski et al., 2009). Die Expressionsmuster sollten analysiert und eine mögliche Funktion in der Umstrukturierung des Chromatins untersucht werden.

6.2 UbcD6 als ein mögliches DNA-Reparaturprotein während des Histon-Protamin-Wechsels

Während des Wechsels von einer auf Histonen basierenden zu einer auf Protaminen basierenden Chromatinstruktur sind parallel zu den DNA-Brüchen, auch große Mengen des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms UbcD6 zu detektieren. In den folgenden Stadien sind weder DNA-Brüche, noch UbcD6 zu detektieren (Rathke et al., 2007).

6.2.1 Das Fusionsprotein UbcD6-eGFP ist nicht in den Spermatidenkernen des Kanustadiums zu detektieren

Zunächst sollte die Verteilung des Fusionsproteins UbcD6-eGFP während des Histon-Protamin-Wechsels analysiert werden. Jedoch ist das Protein lediglich in den Flagellen zu detektieren (siehe Kapitel 5.2.1). Eine Anreicherung im Kanustadium, ähnlich des Immunfluoreszenz-Nachweises in Rathke et al. (2007), konnte nicht beobachtet werden.

Da in der Spermatogenese von *Drosophila* die Translationskontrolle der Testis-spezifischen Gene meist über die 5' UTR und den Promotor erfolgt (Hempel et al., 2006), wurde die 3' UTR sowie das Polyadenylierungssignal im Konstrukt *UbcD6-eGFP* über den Transformationsvektor *pChabΔSalAlacZ* bereit gestellt. UbcD6 ist jedoch in der Fliege ubiquitär verteilt und wird auch in anderen Geweben exprimiert. Somit, besteht die Möglichkeit, dass für eine stadienspezifische Expression des Gens im Testis, neben der 5' UTR auch Elemente innerhalb der 3' UTR benötigt werden. Aus diesem Grund wurde ein Konstrukt kloniert, welches den Promotor und die 5' UTR, den vollständigen offenen Leserahmen und die 3' UTR von *UbcD6* trägt. Doch auch in Fliegen transgen für dieses Konstrukt, wird das UbcD6-Fusionsprotein lediglich in den Schwanz-Zystzellen exprimiert.

Für humanes RAD6A wurde neben der Funktion im Zellkern auch eine zytoplasmatische Komponente beschrieben (Zenkel et al., 2007). Interessanterweise zeigen zudem neueste *in vitro*, als auch *in vivo* Analysen von Haddad et al. (2013), dass das E2 Ubiquitin-konjugierende Enzym RAD6A den Pool an gesunden Mitochondrien erhält. RAD6A und Parkin bilden dabei einen funktionellen E2/E3 Komplex und induzieren die Ubiquitylierung defekter Mitochondrien (Haddad et al., 2013).

Drosophila defizient für *UbcD6* zeigen ebenfalls synaptische Defekte als Konsequenz von fehlerhaften Mitochondrien (Haddad et al., 2013). Somit kann auch die Detektion von

UbcD6-eGFP in den Flagellen, als Gewebe mitochondrialer Derivate, auf eine Funktion von UbcD6 in Mitochondrien zurückzuführen sein. Dafür spricht, dass auch in der Spermatogenese von *Drosophila* ein Homolog des Vertebraten Proteins Parkin, dParkin, exprimiert wird und dieses ebenfalls für die Mitochondrien-Morphologie in frühen und späten Spermio-genesephasen benötigt wird (Riparbelli und Callaini, 2007).

Doch sind mit dem Antikörper gegen UbcD6 an wildtypischen Testes zudem starke Färbungen in den Spermatidenkernen des Kanustadiums zu detektieren, welche mit den UbcD6-Fusionsproteinen nicht beobachtet werden können. Dass diese Färbungen jedoch als „echte“-Signale gewertet werden können, zeigt ein Kompetitionstest des Antikörpers mit einem Peptid, woraufhin der Antikörper keine Färbungen mehr zeigt (Rathke, Dissertation 2007). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Genregulation von *UbcD6* über verschiedene Promotoren verläuft und somit auch die Expression in verschiedenen Geweben reguliert wird. Duale Promotoren sind bereits für eine Reihe von Genen bekannt, wie z.B. für *antennapedia* (Jorgensen und Garber, 1987) und *gonadal* (Schulz et al., 1990 A, B). Dabei regulieren duale Promotorregionen nicht nur eine räumlich und zeitlich getrennte Aktivierung des Gens, sondern auch die Expression in der männlichen oder in der weiblichen Keimbahn. Um zu überprüfen, ob auch für die Expression von UbcD6 verschiedene cis-regulatorische Elemente benötigt werden, müsste somit ein weiteres eGFP-Fusionskonstrukt generiert werden, welches einen größeren Bereich stromaufwärts der 5' UTR trägt.

6.2.2 Die Reparatur der DNA-Brüche erfolgt nicht mit Hilfe von Komponenten der Rad6-Postreplikationsreparatur

Eine zentrale Rolle und den physischen Halt im Rad6-Signalweg bilden die Chromatin-assoziierten Ring Finger Proteine Rad18 und Rad5. Rad5 rekrutiert den Ubc13-Mms2 Komplex an die DNA, und durch die Assoziation seinerseits zu Rad18, erfolgt die Bindung an den Rad6-Rad18 Komplex. Die beiden Ring Finger Proteine leiten daraufhin die Bildung eines Komplexes aus Rad6 und Ubc13-Mms2 ein und koordinieren so den Prozess der Ubiquitylierung in *S. cerevisiae* (Ulrich und Jentsch, 2000).

Mit Hilfe verschiedener Datenbanken wurden die homologen *Drosophila* Gene *kua*, *CG7376*, *CG5524* und *CG3473* als Homologe zu den Genen *mms2*, *rad5*, *rad18* und *ubc13* aus Hefe identifiziert (siehe Kapitel 5.2.4). *in situ* Hybridisierungen zeigen die Transkripte der vier Komponenten im Zytoplasma von Spermatozyten, wobei die Transkripte von *CG5524* und *CG3473* zudem im Zytoplasma früher Spermatiden zu detektieren sind (siehe Kapitel

5.2.4). In Stadien mit elongierenden Spermatiden können keine Transkripte mehr detektiert werden und somit scheinen die untersuchten Homologen des PRR-Signalweges in *Drosophila* auch nicht an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen nach dem Wechsel von Histonen zu Protaminen beteiligt zu sein. Nach neuesten Analysen und Datenbankrecherchen wird das Gen *CG5524* zudem nicht mehr als mögliches *Drosophila* Homolog zu *rad18* aufgeführt und es kann auch kein weiteres homologes Protein für die E3 Ubiquitin-Ligase Rad18 identifiziert werden. Desweiteren zeigen auch Fliegen transgen für *CG3473-eGFP* (*CG3473* als homologes Gen zu *ubc13*) eine Expression des Fusionsproteins ausschließlich im Zytoplasma von Spermatozyten (Barckmann et al., unpublizierte Daten). Eine Reparatur der DNA-Brüche über den *RAD6-DNA-Reparaturweg* erscheint somit noch unwahrscheinlicher.

In der Literatur wird noch eine weitere Funktion von Rad6 im Prozess der Regulierung von DNA-Schäden beschrieben. Dabei bewirkt ein Zusammenspiel aus dem Vertebraten DOT1L (vom engl. disruptor of telomeric silencing 1-like, Homolog zu Dot1 in Hefen) und Rad6 die Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen. Die Monoubiquitinylierung von Histon H2B durch den Proteinkomplex Rad6/Bre1 ist hierbei essenziell für die Trimethylierung von Histon H3K79 durch die Methyltransferase Dot1, welche ihrerseits Bereiche im Chromatin für DNA-Brüche markiert und schließlich diverse DNA-Reparaturproteine rekrutiert (Dover et al., 2002; Schulze et al., 2009). Dabei führt die Dot1-vermittelte H3K79 Methylierung nicht nur zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen, sondern auch zur Reparatur anderer Formen von DNA-Schäden, wie zum Beispiel die Reparatur via Rekombination (RR), der Postreplikationsreparatur (PRR) oder auch der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (Übersichtsartikel: Nguyen und Zhang, 2011). Dies ist wiederum essenziell für die Reparatur der DNA in der *Drosophila* Spermiogenese, denn aufgrund der haploiden Situation des Genoms in postmeiotischen Spermatiden, ist eine Reparatur in Abhängigkeit von Schwesternchromatiden, und somit auch über eine homologe Rekombination, nicht möglich.

Interessanterweise wurde erst kürzlich ein homologes Gen zu *dot1*, das Gen *grappa* (*gpp*), in der Spermatogenese von *Drosophila* beschrieben (Dottermusch-Heidel et al., 2014). Es kodiert ebenfalls für eine Methyltransferase und zeigt eine hohe Sequenz-Identität zu DOT1L in Mammaliern. Immunfluoreszenz-Nachweise zeigen eine Expression der Methyltransferase im Nukleus von Spermatozyten und ein gepunktetes Muster in Spermatidenkernen des Kanustadiums (Dottermusch-Heidel et al., 2014). Die Expression von Gpp überlappt hier mit der Expression von UbcD6 (Rathke et al., 2007) und macht ein Zusammenspiel der Proteine UbcD6 und Gpp in der Regulierung von DNA-Schäden zum Zeitpunkt des Histon-Protamin-Wechsels möglich. Jedoch ist eine Monoubiquitinylierung von H2B durch die E3

Ubiquitin-Ligase Bre1 nur in der weiblichen Keimbahn beschrieben (Xuan et al., 2013) und auch Bre1 ist in der männlichen Keimbahn nur bis in die meiotischen Stadien zu detektieren (SpermPress: Vbranovski et al., 2009). Es stellt sich die Frage welches Substrat durch UbcD6 ubiquitinyliert wird, und ob dieser Vorgang von einer Ubiquitin-Ligase begleitet wird.

An der Reparatur von DNA-Strangbrüchen zum Zeitpunkt des Histon-Protamin-Wechsels können anstelle von UbcD6 aber auch weitere Enzyme, wie zum Beispiel Ligasen beteiligt sein. Ligasen bilden zwischen der 3'-Hydroxylgruppe und der 5'-Phosphatgruppe der DNA-Fragmente eine Phosphodiesterbindung und besitzen eine Funktion in der DNA-Replikation, wie aber auch in der Reparatur von Einzelstrangbrüchen (Lehman, 1974). So zeigten beispielsweise Prasad et al. (1996) eine Interaktion der DNA-Polymerase beta und der DNA-Ligase I in der Basenexzisionsreparatur (BER) in Testes von Rindern.

Weiterhin bleibt aber auch zu überprüfen, ob die Reparatur der DNA-Brüche erst nach der Befruchtung erfolgt. Es besteht die Möglichkeit, dass Strangbrüche im Spermium vorhanden sind, jedoch auf Grund des extrem kondensierten Chromatins, mit Hilfe der TUNEL-Reaktion nicht zu detektieren sind. Eine Reparatur dieser Brüche würde demnach erst in der Zygote, im Wechsel von Protaminen zu Histonen erfolgen. So konnte bereits gezeigt werden, dass in Spermien von Mäusen chemisch induzierte Strangbrüche in der Zygote über NHEJ repariert werden können (Derijck et al., 2008) und auch in Ratten DNA-Brüche des männlichen Genoms im Vorkern über γ H2AX erkannt und dadurch DNA-Reparatur Mechanismen eingeleitet werden können (Grenier et al., 2010).

Da jedoch bisher keine Informationen über einen solchen Mechanismus in *Drosophila* vorliegen, müssten zunächst jung befruchtete *Drosophila* Eier auf DNA-Brüche untersucht werden. So wird nach der Befruchtung der paternale Vorkern innerhalb von Minuten in eine Histon-basierende Form überführt (Jayaramaiah-Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Um die Frage zu klären, ob die Reparatur jedoch erst in der Oozyte, vor der Bildung des Zygotenkerns stattfindet, muss erst überprüft werden, ob es in diesem Zeitraum gelingt, den Tunnel-Assay durchzuführen.

6.3 Die Regulation der Transkription und Translation der Proteine Mst77F und ProtB erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen

Die Transkription von *protamine B* und *Mst77F* startet im frühen Spermatozytenstadium und erfolgt in direkter bzw. indirekter Abhängigkeit von Testis-spezifischen TAFs (tTAF) (Barckmann et al., 2013). So zeigen Chromatin Immunopräzipitations (ChIP) Daten, dass im Falle von *protB* das tTAF Sa direkt an den *protB*-Promotor bindet und auch autosomales *Mst77F* direkt von den tTAFs gebunden wird. Y-chromosomale Kopien von *Mst77F* (Krsticevic et al., 2010) werden hingegen wahrscheinlich unabhängig von den tTAFs exprimiert (Barckmann et al., 2013). Weiterhin ist bekannt, dass die *protB* mRNA innerhalb der 5' UTR ein Translationskontrollelement (TCE, vom engl. translational control element) trägt, dass die Translation in den Spermatozyten reprimiert. Dennoch wurde gezeigt, dass die 5' UTR von *protB* für die translationale Repression nicht ausreicht (Barckmann et al., 2013).

6.3.1 Die Translationsinitiation von Mst77F und Protamin B erfolgt auch über Bereiche im offenen Leserahmen

Die mRNAs der Testis-spezifischen Gene *protamine A/B* und *Mst77F* werden nicht über den 3' untranslatierten Bereich reguliert (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Übersichtsartikel: Renkawitz-Pohl, 2005). So unterliegt die Expression der in der Literatur beschriebenen eGFP-Fusionsproteine für ProtA/B und Mst77F einer translationalen Repression, obwohl sowohl 3' UTR, als auch Polyadenylierungssignal über den Transformationsvektor zur Verfügung gestellt werden.

Nachdem in Barckmann (Diplomarbeit 2005) erste Hinweise erbracht wurden, dass die Regulation der Translation von Mst77F weder über den Promotor und die 5' UTR, noch über die genspezifische 3' UTR kontrolliert wird, wurden regulierende Bereiche innerhalb des offenen Leserahmens von *Mst77F* immer wahrscheinlicher. Eine ähnliche Kontrolle konnte für das Testis-spezifische Gen *Mst84Db* gezeigt werden (Gigliotti et al., 1997). So bedingt der N-terminale Bereich des *Mst84Db* ORFs die Aktivierung der Transkription, gefolgt von einem Bereich welcher die translationale Repression reguliert. Um eine mögliche Funktion des *Mst77F* ORFs bezüglich der translationalen Kontrolle zu überprüfen, wurde ein Fusionsprotein generiert, welches den *Mst77F* ORF unter der genregulatorischen Region des

Gens *β2-tubulin* trägt (*β2t-Mst77F-eGFP*). Wildtypisches β 2-Tubulin wird ab dem Spermatozytenstadium exprimiert und ist auch in allen folgenden Stadien der *Drosophila* Spermatogenese zu detektieren (Michiels et al., 1989). Die Transkription des Gens *β2-tubulin* wird dabei über Sequenzen im Promotor und der 5' UTR reguliert (Santel et al., 2000) und kann auch mit dem Kontrollkonstrukt (*β2t-eGFP*), bestehend aus dem genregulatorischen Bereich von *β2t* fusioniert mit einem eGFP-Tag, widergespiegelt werden (siehe Kapitel 5.3.1.2). Betrachtet man jedoch Fliegen transgen für *β2t-Mst77F-eGFP*, ist das Fusionsproteins weiterhin nur in den späten postmeiotischen Stadien zu beobachten (siehe auch Schema Abbildung 6.0 C). Die translationale Repression/ Aktivierung des Proteins wird demnach scheinbar über Bereiche im ORF von *Mst77F* reguliert. Gleiches ist auch in transgenen Fliegen für *β2t-protB-eGFP* zu beobachten (siehe Kapitel 5.3.1.2, sowie Anhang Abb. 7.1). Die Expression des Fusionsproteins unterliegt einer translationalen Repression und wird auch hier scheinbar durch den ORF von *protB* ermöglicht.

Es wurden zudem Deletionskonstrukte generiert, denen 60 (*Mst77FΔ60C-eGFP*) bzw. 141 Aminosäuren (*Mst77FΔ141C-eGFP*) am C-Terminus deletiert wurden (siehe Kapitel 5.3.1.3). Die Expression der Konstrukte erfolgte unter dem Promotor und der 5' UTR von *Mst77F*. Die Testes beider Fliegenlinien zeigen wie zuvor eine Anreicherung der Fusionsproteine ausschließlich in Stadien später Spermatischen. Zwar weisen die Proteine durch einen Verlust der NLS nur eine zytoplasmatische Komponente auf (siehe Kapitel 5.3.1.3), doch scheint die translationale Repression in frühen Spermatogenesestadien weiterhin zu bestehen. Der für die Translationskontrolle notwendige Bereich kann somit auf die N-terminalen 222 bp eingegrenzt werden. Diese Beobachtung steht jedoch in Diskrepanz zu den Analysen, eines im weiteren Verlauf der Dissertation untersuchten *Mst77F*-Deletionskonstrukts mit einer N-terminalen Deletion von 100 Aminosäuren (siehe Kapitel 5.3.2.2.2). Das Fusionsprotein wird ebenfalls erst ab dem Kanustadium exprimiert und unterliegt einer Translationsrepression. Die beiden Konstrukte, *Mst77FΔ141C-eGFP* und *Mst77FΔ100N-eGFP*, weisen jedoch keine überlappenden Sequenzen auf, und somit kann die Translationskontrolle von *Mst77F* nicht allein über die N-terminalen 222 bp reguliert werden.

Aus diesem Grund wurde die Sequenz der prä-mRNA von *Mst77F* nochmals mit Hilfe der Datenbank regRNA (Huang et al., 2006) untersucht und nach möglichen regulatorischen RNA Motiven durchmustert. Interessanterweise konnten vier interne ribosomale Eintrittsstellen (IRES) identifiziert werden. Zwei dieser Motive liegen teilweise innerhalb der 5' UTR und überlappen mit Sequenzen des ORFs. Das erste IRES-Motiv befindet sich an Position +79 bis +175, bestehend aus Teilen der 5' UTR und dem AUG-Triplett. Das zweite IRES-Motiv liegt

an Position +103 bis +191, bestehend aus Teilen der 5' UTR sowie Teilen des ORFs. Das dritte Motiv befindet sich im Gegensatz zu den ersten beiden Motiven, im zweiten Exon des ORFs an Position +532 bis +630. Das vierte IRES-Motiv ist im Bereich der 3' UTR lokalisiert. Es scheint für die Translationskontrolle von Mst77F jedoch nicht von Interesse, da es in den untersuchten Fusionsproteinen nicht enthalten ist.

IRES bezeichnet eine Form der Cap-unabhängigen Translationsinitiation durch eine spezifische Faltung der mRNA, welche die Bindung an die Ribosomen ohne spezielle Initiationsfaktoren ermöglicht (Übersichtsartikel: Thompson, 2012). Für die Faltung der IRESs werden zelluläre Proteine, die IRES transaktivierenden Faktoren benötigt (ITAFs) (Pilipenko et al., 2000). Der Mechanismus wurde in Picornaviren entdeckt (Jang et al., 1988; Pelletier und Sonenberg, 1988) und dient unter anderem der Regulation zelltypspezifischer Translation (Créancier et al., 2000). In der Embryonalentwicklung von *Drosophila* findet sich ein Zusammenspiel der Cap-abhängigen und der Cap-unabhängigen Translationsinitiation in der Genaktivierung von *ultrabithorax* (Hart und Bienz, 1996), wohingegen die Prozesse in der Genregulation von *antennapedia* unabhängig voneinander verlaufen (Oh et al, 1992).

IRES-Motive lokalisieren meist in der 5' UTR der mRNAs und bilden Y-Typ ähnliche Haarnadelstrukturen (engl. stem-loops), gefolgt vom AUG-Triplett (Le und Maizel, 1997). Die IRES-abhängige Translationsinitiation ist dabei strikt abhängig von diesen Strukturen. Selbst kleinste Deletionen oder auch Insertionen, auch bedingt durch einzelne Nukleotide, können bereits die Funktionalität der IRES beeinflussen (Übersichtsartikel: López-Lastra et al., 2005).

Wie bereits erwähnt besitzt Mst77F vier IRES-Strukturelemente, und ein Zusammenhang zwischen IRES-Sequenzen und der Regulation der Translation von Mst77F scheint möglich. So sind in den verwendeten C- und N-terminalen Deletionskonstrukten jeweils zwei bzw. drei der IRES-Motive erhalten geblieben und die distinkte Translationsinitiation des Fusionsproteins in postmeiotischen Spermatiden. Im Gegensatz hierzu sind in den *Promotor-LacZ*-Konstrukten für *Mst77F* keine vollständigen IRES-Motiv enthalten und diese Testes weisen eine verfrühte Expression des Reporters auf. Zwar sind in den *Promotor-LacZ*-Konstrukten große Teile der ersten beiden IRES-Motive enthalten, doch befindet sich im IRES-Motiv, zwischen den Sequenzabschnitten in der 5' UTR und dem AUG-Triplett, eine Insertion von 12 bp (Barckmann, Diplomarbeit 2005). Da wie bereits erwähnt jedoch kleinste Änderungen in den Strukturelementen einen Einfluss auf die Funktion von IRES-Strukturen haben können, könnten die IRES-Strukturen in den *Promotor-LacZ*-Konstrukten gestört sein und eine zeitlich regulierte Initiation der Translation in postmeiotischen Stadien inhibiert sein. Erste

Hinweise auf eine Kontrolle der Translationsinitiation von Mst77F über interne ribosomale Eintrittsstellen scheinen somit gegeben, jedoch muss die Funktionalität der einzelnen potentiellen IRES-Elemente im genregulatorischen Bereich von Mst77F noch überprüft werden.

6.3.2 Mst77F wird keimbahnspezifisch exprimiert und unterliegt in Spermatozyten einer speziellen Translationsmaschinerie

Es wurde die Abhängigkeit der Translation von gewebespezifischen Faktoren untersucht. Hiefür wurde die Expression von Mst77F-eGFP in den Kernen von Speicheldrüsen getrieben. Die Zellen weisen nur ein schwaches Signal des Fusionsproteins auf und lassen auf eine geringe Translationseffizienz von Mst77F in somatischen Zellen schließen (siehe Kapitel 5.3.1.4). Eine geringe Transkriptionseffizienz und/oder Translationseffizienz bzw. Protein-stabilität von Mst77F ist auch in *Drosophila* SL2-Zellen zu beobachten (siehe Kapitel 5.3.4.1). Um zu überprüfen, ob die Translationrate gesteigert werden kann und möglicherweise über gewebsspezifische Faktoren reguliert wird, wurden Mst77F und ProtB anschließend in der männlichen Keimbahn getrieben (siehe Kapitel 5.3.1.5). Bei ektopischer Transkription von Mst77F in Spermatogonien ist zu beobachten, dass Mst77F-eGFP in der Keimbahn eine weitaus höhere Translationseffizienz aufweist als in somatischen Zellen. Die Expression von Mst77F-eGFP und ProtB-eGFP erfolgt in diesen Fliegen ausschließlich in späten Spermatogonien und mit dem Eintreten in das Spermatozytenstadium sind beide Fusionsproteine nicht mehr zu detektieren. Da jedoch die Transkripte für *Mst77F-eGFP* und *protB-eGFP* im Zytoplasma von Spermatogonien bis in Spermatischenstadien zu detektieren sind, scheint im Spermatozytenstadium die Translation der Proteine reprimiert und eine strikte Regulation der Translationsinitiation zu erfolgen (siehe Schema Abbildung 6.0 A). In Spermatogonien hingegen scheinen weder zelltypspezifische Faktoren für eine translationale Repression, noch für einen rapiden Proteinumsatz vorhanden zu sein, was eine Expression der beiden Proteine möglich macht.

Somit scheint die Expression von Mst77F und Protamin B auf unterschiedlichen Ebenen kontrolliert zu werden. Die Transkription der Gene erfolgt zunächst in Spermatozyten, jedoch wird die Translation durch zelltypspezifische Faktoren kontrolliert. Die mRNAs werden bis in späte Spermatischenstadien translational reprimiert und anschließend selektiv in die Translation entlassen. Es bleibt zu überprüfen, ob IRES-Strukturelemente die Translationsinitiation von

Mst77F begleiten, und ob auch die Translation von ProtB, neben der Cap-abhängigen Translationsinitiation, über IRES-Elemente induziert werden kann.

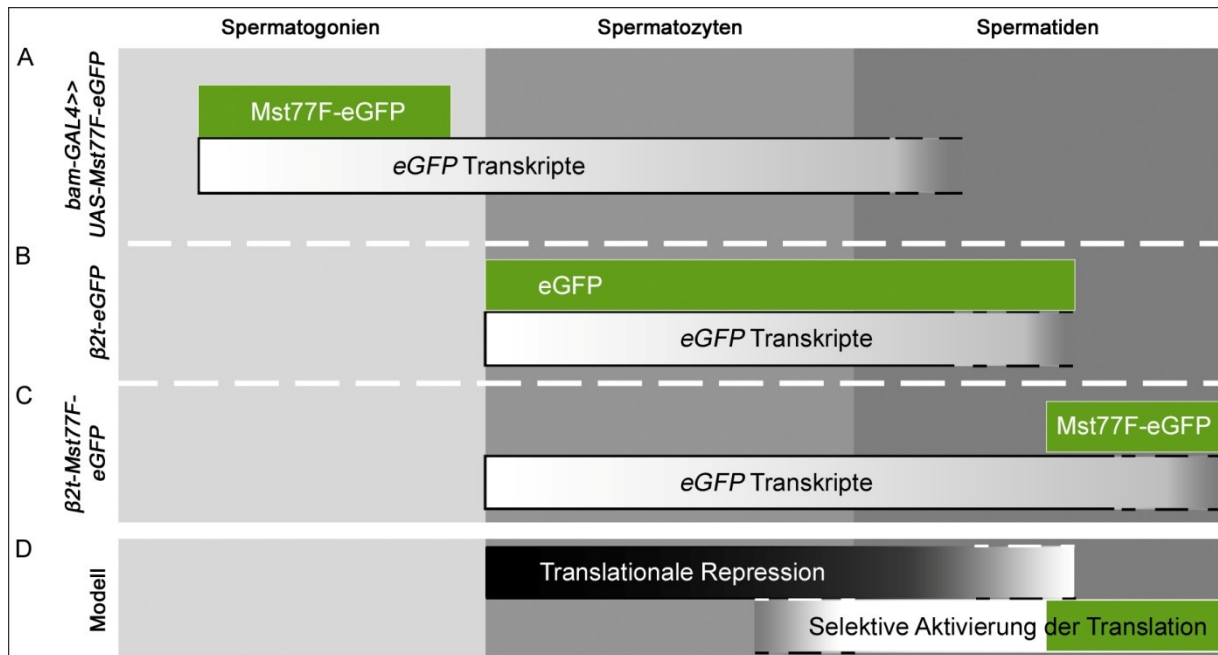


Abb. 6.0: Modell der translationalen Repression und selektiven Aktivierung der Translation von *Mst77F* mRNA. eGFP-Fluoreszenzsignale in grün und *eGFP* Transkripte in weiß dargestellt. (A) *Mst77F*-eGFP ist in Spermatogonien zu detektieren, wohingegen dessen Transkripte über Spermatozyten hinaus zu detektieren sind. (B) Unter dem *β2t*-Promotor zeigen *eGFP* Transkripte und eGFP-Fusionsprotein ein überlappendes Färbemuster. (C) *Mst77F*-eGFP Transkripte sind ab den Spermatozyten, das *Mst77F*-eGFP Fusionsprotein erst ab den späten Spermatischen zu detektieren. (D) Das Modell zeigt, dass in Spermatozyten zwar die mRNAs synthetisiert, doch anschließend selektiv translatiert werden. In grün ist *Mst77F*-eGFP als Beispiel gezeigt.

6.4 Mst77F und dessen Funktion in der Kompaktierung des Chromatins

Überraschenderweise sind mutante Fliegen homozygot für eine Deletion beider Protamine-Gene männlich fertil. Die Spermien sind um 21 % sensitiver gegenüber Röntgenstrahlung und etwa 20 % der Spermienkerne besitzen eine abnormale Kernform. Die Kompaktierung des Chromatins wird vollzogen und es stellte sich die Frage, ob Mst77F die Funktion der Chromatinkompaktierung kompensieren kann. Mst77F lokalisiert in *protA* Mutanten punktuell über den Kernen reifer Spermien und wird demnach unabhängig von den Protaminen eingebaut (Rathke, Barckmann et al., 2010).

Mst77F besitzt eine essenzielle Rolle in der Kernformung (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke, Barckmann et al., 2010), doch die molekulare Funktion und die Beteiligung von Mst77F als Chromatin-assoziiertes Protein im Prozess der Chromatinkondensation ist nicht näher beschrieben. Hinweise auf eine Funktion von Mst77F in der Kompaktierung des Chromatins liefern jedoch die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der ektopischen Expression von Mst77F-eGFP, unter eigenem Promotor und im wildtypischen Mst77F-Hintergrund. So wurden in Fliegen, transgen für zwei Kopien *Mst77F-eGFP*, erstmals einzelne Zysten identifiziert, welche Spermatiden mit einer abnormalen Kernform beinhalten (siehe Kapitel 5.3.2.1). Die Kerne haben den Histon-Protamin-Wechsel vollzogen und zeigen entweder eine „verkrümpelte“ Form oder sie sind klein und rund. In den seminalen Vesikeln sind nur Kerne mit einer normalen Morphologie enthalten, was darin begründet liegen mag, dass abnormale Spermatiden selten individualisieren (Tokuyasu et al., 1972).

Interessanterweise zeigen Fliegen nach einer gezielten Insertion von Mst77F-eGFP ins Genom, keine deformierten Spermien und das Mst77F-Fusionsprotein wird, ähnlich dem wildtypischen Mst77F-Proteins, in Form von Aggregaten exprimiert (siehe Kapitel 5.3.2.1). Das Expressionslevel von Mst77F-eGFP scheint hier geringer zu sein, als nach der ungerichteten Insertion des Konstrukts ins Genom. Dies wird möglicherweise bedingt durch das Fehlen von Enhancerelementen am Insertionsort, oder aber auch dadurch, dass das Chromatin am Insertionsort weniger aufgelockerte Strukturen besitzt.

Dass in Testes mit einer erhöhten Expression von Mst77F deformierte Spermienkerne auftreten, kann auf einen Dosiseffekt von Mst77F hindeuten und würde wiederum eine Funktion von Mst77F in der Chromatinkondensation untermauern. Erhöhte Mengen an Mst77F würden demnach zu einer stärkeren Kompaktierung des Chromatins führen.

6.4.1 Ein Zusammenspiel aus der Kernlokalisierung über den C-Terminus und mögliche Homodimerisierung über die N-terminalen Coiled-Coil Domäne, bedingt die abnormale Kernform nach einer ektopischen Expression von Mst77F

Nachdem Hinweise auf eine mögliche Funktion von Mst77F in der Kompaktierung des Chromatins existieren, wurde die Proteinstruktur von Mst77F analysiert und auf Domänen untersucht, welche den beschriebenen Phänotyp hervorrufen könnten. Hierfür wurde die Verteilung von Mst77F-eGFP Fusionsproteinen in Fliegen analysiert, welche homozygot Deletionen der C-terminalen 20-60 AS tragen.

Erste Analysen zeigten, dass mit dem Verlust der C-terminalen 60 Aminosäuren die Lokalisation von Mst77F im Zellkern verloren geht und auch keine Zysten mit abnormalen Spermatiden zu detektieren sind (siehe Kapitel 5.3.2.2.1). Der Verlust der Kernlokalisierung von Mst77F führt demnach zum Verlust des Phänotyps nach zusätzlicher Expression im Mst77F Muster. Der für die Kernlokalisierung notwendige Bereich konnte auf eine Region zwischen den Aminosäuren 153 bis 191 eingegrenzt werden, bestehend aus zwei Nukleus Konsensus-Sequenzen sowie drei Kernlokalisierungssignalen (siehe Kapitel 5.3.2.2.1). Zudem konnte gezeigt werden, dass nur das Vorhandensein aller Nukleus Konsensus-Sequenzen und Kernlokalisierungssignale dieser Region eine vollständige Lokalisation von Mst77F-eGFP im Zellkern gewährleisten.

Nachdem der C-Terminus des ORFs von *Mst77F* die Lokalisation des Proteins im Zellkern vermittelt, wurde am N-Terminus eine Coiled-Coil Domäne, ein wichtiges Motiv für homotypische und heterotypische Protein-Interaktionen (Übersichtsartikel: Vinson et al., 2006), identifiziert (siehe Kapitel 5.3.2.2.2). Um zu überprüfen ob die Coiled-Coil Domäne einen Einfluss auf eine mögliche Funktion von Mst77F in der Chromatinkondensation besitzt, wurden Fliegen transgen für ein Mst77F-Fusionsprotein mit einer Deletion der N-terminalen 100 AS analysiert. Das Fusionsprotein ist zwar gleichmäßig in den Kernen der Spermatiden verteilt, doch interessanterweise sind in den Testes, nach der Deletion der N-terminalen Coiled-Coil Domäne von Mst77F, frei von Zysten mit deformierten Spermatidenkernen.

Betrachtet man diese Beobachtungen im Hintergrund der potenziellen Funktion von Mst77F in der Kompaktierung des Chromatins, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass über den C-Terminus die Lokalisation von Mst77F im Zellkern und über die Regionen mit „low complexity“ die Assoziation zum Chromatin ermöglicht wird (Kost, Kaiser et al., in

Vorbereitung). Desweiteren scheint über die Coiled-Coil Domäne die Bindung einzelner Mst77F-Proteine untereinander oder auch zu andern Chromatin-assoziierten Proteinen zu erfolgen und dadurch die Aggregation oder auch Kondensation des Chromatins, und somit auch des Zellkerns zu ermöglichen (siehe Abbildung 6.1 A-A').

Mst77F ist in 3 Phasen der Spermiogenese zu detektieren...

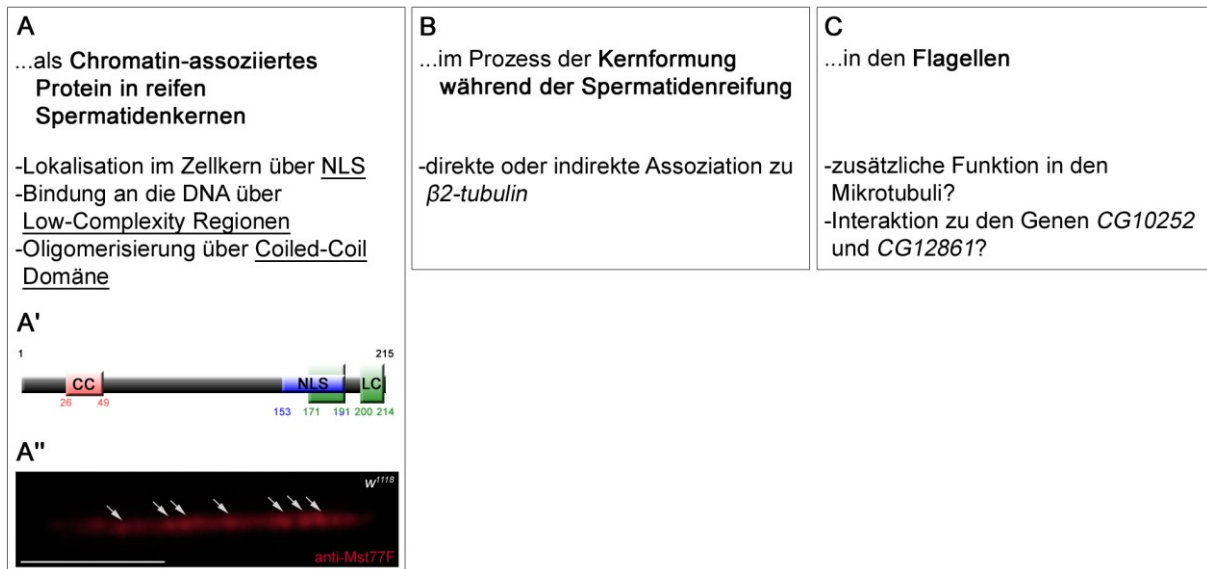


Abb. 6.1: Mst77F ist in verschiedenen Prozessen *Drosophila* Spermiogenese involviert. In der Übersicht sind drei Phasen der Spermiogenese abgebildet, in welchen Mst77F zu detektieren ist. (A) Mst77F bildet in reifen Spermatidenkernen ein Chromatin-assoziiertes Protein (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke, Barckmann et al., 2010). Die Lokalisation im Zellkern erfolgt dabei über NLS-Sequenzen (NLS) und die Bindung an die DNA höchstwahrscheinlich über Regionen mit „low complexity“ (LC). Eine Oligomerisierung wird über die Coiled-Coil Domäne ermöglicht (CC). (A') Schema der Proteinstruktur von Mst77F. (A'') Mst77F lokalisiert in Kernen reifer Spermien in distinkten Bereichen (Pfeile). (B) Mst77F assoziiert während der Kernformung mit *β2-tubulin* (Fuller et al., 1998; Rathke, Barckmann et al., 2010). (C) Mst77F ist in den Flagellen zu detektieren (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Eine Funktion zu den Mikrotubuli sowie eine Interaktion zu den Genen *CG10252* und *CG12861* sind möglich.

6.4.2 Der Import von Mst77F in den Zellkern erfolgt nicht über einen Keimbahn-spezifischen Kernimport-Mechanismus und auch unabhängig vom Importin-alpha Protein α Kap4

Mst77F besitzt ein dynamisches Expressionsmuster. Es assoziiert in frühen Stadien mit den Mikrotubuli und ist in späteren Stadien in den Zellkernen von Spermiden zu detektieren (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Barckmann et al., 2013). Daher könnte man

postulieren, dass es nach der Interaktion mit den Mikrotubuli, zu einem gegebenen Zeitpunkt, einen spezifischen Kernimport-Mechanismus. Der Import von Mst77F in den Zellkern wird dabei, wie bereits erwähnt, höchstwahrscheinlich über eine Region mit Kernlokalisierungssignalen im C-terminalen Bereich des ORFs reguliert (siehe Kapitel 5.3.2.2.1). Zudem zeigen die durchgeführten Zellkultur-Transfektionsexperimente an *Drosophila* SL2-Zellen, dass der Kernimport von Mst77F in somatischen Zellen gleichermaßen gewährleistet ist, wie in den Zellen der Keimbahn (siehe Kapitel 5.3.4.1). Der Import in den Zellkern erfolgt somit wahrscheinlich ohne einen speziellen Keimbahn-spezifischen Kernimport Mechanismus.

Der Transport von Substraten durch die Kernmembran erfolgt in der Regel über Importin-alpha Proteine. Diese erkennen die NLS-Sequenzen von Substraten und leiten den Import durch die Kernmembran ein. Für einen möglichen Kernimport von Mst77F wurden die Importine *Karyopherin-α3* (Giarrè et al., 2002) und dessen Retrogen *αKaryopherin-4* (Phadnis et al., 2012) in Betracht gezogen. Während *Kap-α3* eine starke Expression im Nukleoplasma elongierender Kerne zeigt (Giarrè et al., 2002), ist die Proteinverteilung von *αKap4* bisher nicht bekannt. Transkriptom-Daten für *αKap4* zeigen jedoch eine Genexpression bis in postmeiotische Stadien (SpermPress: Vbranovski et al., 2009) und mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten *in situ* Hybridisierungen konnten die Transkripte für *αKap4* speziell im Zytoplasma von Spermatozyten und bis in elongierende Stadien nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.3.3.2).

Es wurden männliche Fliegen mit mutanten Allelen der Importine *Kap-α3* und *αKap4* analysiert und der Einfluss auf die Verteilung des Mst77F Proteins untersucht. Während der Kernimport von Mst77F jedoch scheinbar unabhängig vom Importin-α Protein *αKap4* verläuft (siehe Kapitel 5.3.3.4), kann eine Abhängigkeit vom Importin-α Protein *Kap-α3* weder bestätigt, noch widerlegt werden. So sind Fliegen transgen für *Kap-alpha3*^{G8397} homozygot letal und somit mussten Tiere transgen für *Kap-alpha3*^{EY02572}, mit einer P-Elementinsertion 795 bp stromaufwärts des AUG-Translationsstarts, analysiert werden (siehe Kapitel 5.3.3.3). Mst77F wird in diesen Fliegen zwar wildtypisch exprimiert, doch kann der Einfluss des P-Elements auf die Promotorregion und somit auf Regulation des Gens *Kap-α3* nicht nachgewiesen werden. Dementsprechend kann auch keine Aussage über den Einfluss von *Kap-α3* auf den Import des Mst77F-Proteins getroffen werden. Kollokalisationsstudien in Form von einer Doppelfärbung von Mst77F und *Kap-alpha3* an *Drosophila* Testes, wie aber auch die Nachweise von Mst77F an weiteren *kap-alpha3* Mutanten, können dabei Aufschluss auf eine Funktion von *Kap-α3* im Kernimport des Mst77F-Proteins geben.

6.4.3 CG10252-eGFP und CG12861-eGFP bilden in den Flagellen von Spermatiden potenzielle Interaktionspartner von Mst77F

Es wurde bereits postuliert, dass über eine N-terminale Coiled-Coil Domäne, die Bindung einzelner Mst77F-Proteine untereinander oder auch zu weiteren Chromatin-bindenden Proteinen ermöglicht wird. Diese Bindung kann zu einer Formation einzelner Aggregate führen, ähnlich des wildtypischen Musters von Mst77F im reifen Spermium (siehe Abbildung 6.1 A"), oder zu einer Kompaktierung des Zellkerns über eine Kondensation des Chromatins. Hinweise auf eine Funktion von Mst77F in der Kompaktierung des Chromatins liefern zudem die phänotypischen Analysen einer Überexpression von Mst77F, resultierend in abnormal geformten bzw. kleinen runden Spermatidenkernen.

Die Expression der Fusionsproteine ProtA-eGFP und ProtB-eGFP startet zeitgleich mit der Expression von Mst77F-eGFP in den Spermatidenkernen des Kanustadiums, und auch in *Drosophila* SL2-Zellen werden die Fusionsproteine zusammen im Zellkern exprimiert (siehe Kapitel 5.3.4.1). Die Transkriptionseffizienz und/ oder die Translationseffizienz ist hier zwar vergleichsweise gering, dennoch aber besteht die Möglichkeit, dass Mst77F und die Protamine miteinander interagieren und somit den Prozess der Chromatinkompaktierung begleiten können. Jedoch besitzen die Protamine A und B, wie auch Tpl^{94D}, im Gegensatz zu Mst77F, eine HMG-Box und keine Coiled-Coil Domäne. Eine Bindung zwischen einer HMG-Box und einer Coiled-Coil Domäne ist bisher nicht beschrieben und somit erfolgt die Interaktion der Proteine scheinbar auch nur indirekt über mögliche Brückenproteine.

Als weitere potenzielle Interaktionspartner von Mst77F wurden die Gene *ocnus* (CG7929), *CG10252* und *CG12861* analysiert. Eine direkte Interaktion wird dabei zwischen Mst77F und *CG10252* beschrieben. Zunächst wurden jedoch *in situ* Hybridisierungen durchgeführt und die Transkripte der einzelnen Gene in allen Stadien der Spermatogenese, ab den Spermatozyten bis in späte Spermatidenstadien, visualisiert (siehe Kapitel 5.3.4.2.1). Betrachtet man daraufhin die Verteilung der Fusionsproteine *Ocnus*-eGFP, *CG10252*-eGFP und *CG12861*-eGFP, so werden diese in den Flagellen der Keimzellen exprimiert (siehe Kapitel 5.3.4.2.2.).

Über die zelluläre Verteilung des Proteins *CG12861* lagen bisher keine Informationen vor, doch scheint die Lokalisation von *CG10252*-eGFP dem homologen Protein aus Mammaliern, ODF3L2 (aus engl. outer dense fiber of sperm tails 3-like 2), zu ähneln, für welches eine zytoplasmatische sowie eine mitochondriale Komponente vorhergesagt wird. Da auch für

Mst77F neben der Expression im Zellkern von Spermatiden, eine Anreicherung über den Flagellen beschrieben wird (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005; Rathke, Barckmann et al., 2010), besteht somit die Möglichkeit, dass Mst77F im Bereich der Mikrotubuli, mit den Proteinen CG10252 sowie CG12861 interagiert (siehe Abbildung 6.1 C). Eine Interaktion der Proteine konnte in dieser Arbeit jedoch nicht verifiziert werden, da die Interaktionstests im Hefe-Zwei-Hybrid System negativ verliefen. So besitzen die Hefevektoren *pGADT7* wie auch *pGBKT7* jeweils eine N-terminal zum inserierten Konstrukt gelegene GAL4-Aktivierungsdomäne bzw. eine GAL4-DNA-Bindedomäne. Diese Domänen können wiederum einen Einfluss auf die Faltung des Proteins bzw. die Bindung weiterer Proteine an die Coiled-Coil Domäne von Mst77F besitzen und so zu einem negativen Interaktionsergebnis führen. Ebenfalls bleibt zu überprüfen, ob die untersuchten Fusionskonstrukte überhaupt in Hefen exprimiert werden

Im Gegensatz zu CG10252-eGFP und CG12861-eGFP, weist das Fusionsprotein Ocnus-eGFP in *Drosophila* SL2-Zellen, neben einer zytoplasmatischen Komponente, eine Lokalisation des Fusionsproteins im Zellkern auf. Doch kann *Drosophila* Testes, die in Parsch et al. (2001 B) beschriebenen Anreicherung des Proteins in den Kernen von Spermatiden nicht beobachtet werden. Ocnus-eGFP ist hier ausschließlich in den Flagellen zu detektieren. Es bleibt zu überprüfen, ob der für das Fusionsprotein klonierte genregulatorische Bereich zu kurz gewählt, und somit Promotorsequenzen für eine gewebespezifische Expression des Fusionsproteins in den Spermatidenkernen deletiert wurden.

Dennoch aber bleiben die Untersuchungen hinsichtlich einer Interaktion von Ocnus zu Mst77F von großem Interesse und werden Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein. So wird Ocnus Testis-spezifisch exprimiert und bildet ein kleines basisches Protein mit einer molekularen Masse von 16.89 kDa (Parsch et al., 2001 B). Da aus der Spermiogenese von *Drosophila* bekannt ist, dass während der Kompaktierung des Chromatins die Histone abgebaut und durch kleine basische Proteine ersetzt werden (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005), bleibt zu überprüfen, ob die Expression des Fusionsproteins Ocnus-eGFP eventuell doch in den Kernen der Spermatiden induziert werden kann. Dafür spricht auch, dass Ocnus strukturelle Ähnlichkeiten zu den Histonen aufweist und auch ein ähnliches Laufverhalten in Gelelektrophorese-Studien wie die Histone H2 und H3 besitzt (Parsch et al., 2001 B). Eine Funktion von Ocnus, eventuell in einer Verbindung mit Mst77F und/ oder den Protaminen, in der Kompaktierung des Chromatins ist möglich.

6.5 Ausblick

Es wird beschrieben, dass das Lösen von DNA-Bindestrukturen den Wechsel von einer auf Histonen zu einer auf Protaminen basierenden Chromatinstruktur ermöglicht. In dieser Arbeit wurden zum Setzen von DNA-Brüchen Endonukleasen in Betracht gezogen, doch mussten die Kandidaten als mögliche Induktoren von DNA-Strangbrüchen wieder ausgeschlossen werden. Es bleibt zu überprüfen, ob neben Endonukleasen auch Exonukleasen am Setzen von DNA-Strangbrüchen beteiligt sein können. Hierfür sollten die Expressionsmuster weiterer Nukleasen im Testis analysiert und somit mögliche Kandidaten identifiziert werden. Zudem können Inhibitorstudien mit Nuklease-Inhibitoren durchgeführt und der Einfluss auf die Verteilung von DNA-Brüchen während der Spermiogenese überprüft werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass parallel zu den DNA-Brüchen große Mengen des E2-Enzyms UbcD6 zu detektieren sind (Rathke et al., 2007). Jedoch konnte das Fusionsprotein UbcD6-eGFP nicht in den Kernen des Kanustadiums detektiert werden und es bleibt zu untersuchen, ob die Regulation des Gens über einen dualen Promotor verläuft, welcher eine räumliche wie auch zeitliche Aktivierung des Gens ermöglicht.

Neben der Genregulation von UbcD6 bleibt eine Beteiligung des Enzyms an der Reparatur von DNA-Strangbrüchen zu überprüfen. Da die Komponenten des RAD6-DNA-Reparaturweges jedoch lediglich in frühen Spermatogenesestadien transkribiert werden, ist die Analyse weiterer Reparaturmechanismen notwendig. So erfolgt die Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen in Vertebraten beispielsweise über Rad6 und DOT1L (Dover et al., 2002). Auch in der Spermatogenese von *Drosophila* existiert, wie bereits erwähnt, ein homologes Gen zu *dot1l*, *grappa* (*gpp*), (Dottermusch-Heidel et al., 2014). Doch müssen die zugrunde liegenden Mechanismen näher analysiert werden. So bilden in Vertebraten die Monoubiquitinylierung von Histone H2B durch Rad6/Bre1 die Basis für eine Trimethylierung von H3K79 durch die Methyltransferase Dot1, welche ihrerseits wiederum das Chromatin für die DNA-Reparatur markiert. Zum Zeitpunkt des Histon-Protamin-Wechsels sind bisher jedoch weder eine Monoubiquitinylierung von H2B noch die Ligase Bre1 (Übersichtsartikel: Rathke et al., 2014; SpermPress: Vbranovski et al., 2009) zu detektieren und es stellt sich die Frage, welches Substrat durch UbcD6 ubiquitinyliert wird, und ob dieser Vorgang von einer Ubiquitin-Ligase begleitet wird.

Neben den Analysen der Prozesse, welche die Chromatinumstrukturierung begleiten, sind weitere Untersuchungen des Chromatin-assoziierten Proteins Mst77F von zukünftigem Interesse. So konnte gezeigt werden, dass die Expression des Proteins auf unterschiedlichen

Ebenen reguliert wird und ein Zusammenhang zwischen IRES-Sequenzen und der zeitlich regulierten Initiation der Translation von Mst77F bestehen kann. Hierfür sollte die Funktionalität der vier potentiellen IRES-Elemente von Mst77F überprüft werden.

Zudem konnten in Mst77F verschiedene Domänen identifiziert werden, welche auf eine potenzielle Funktion von Mst77F in der Kompaktierung des Chromatins hindeuten. So kann über die C-terminale NLS-Region ein Transport von Mst77F in den Zellkern, über zwei Low-complexity Regionen die Bindung an die DNA und über die N-terminale Coiled-Coil Domäne, die Interaktion zu Proteinen und hierdurch die Aggregation des Chromatins ermöglicht werden. Ob der Import von Mst77F dabei über das Import- α Protein Kap-alpha3 erfolgt, muss jedoch noch weiter analysiert werden. Eine Doppelfärbung von Mst77F und Kap-alpha3 oder auch die Färbung von Mst77F an *kap-alpha3* Mutanten kann Hinweise darauf geben. Auch bleibt zu analysieren, ob über die Coiled-Coil Domäne eine Vernetzung von Mst77F-Proteinen untereinander erfolgen kann, oder hierüber die Bindung zu anderen Chromatin-assoziierten Proteinen erreicht wird. Ein wichtiger Bestandteil bildet hier die Analyse der potenziellen Interaktionspartner von Mst77F, wie z.B. Ocnus. So sollte zunächst die in der Literatur beschriebene Expression des Proteins in den Kernen der Spermatozoen mit Hilfe des Fusionsprotein Ocnus-eGFP überprüft werden. Ocnus bildet ein kleines basisches Protein mit strukturellen Ähnlichkeiten zu den Histonen. Eine Funktion von Ocnus, eventuell über eine Interaktion zu Mst77F und/ oder den Protaminen, in der Umstrukturierung und/ oder der Kompaktierung des Chromatins scheint möglich.

7 ANHANG

7.1 Ergänzende Abbildungen

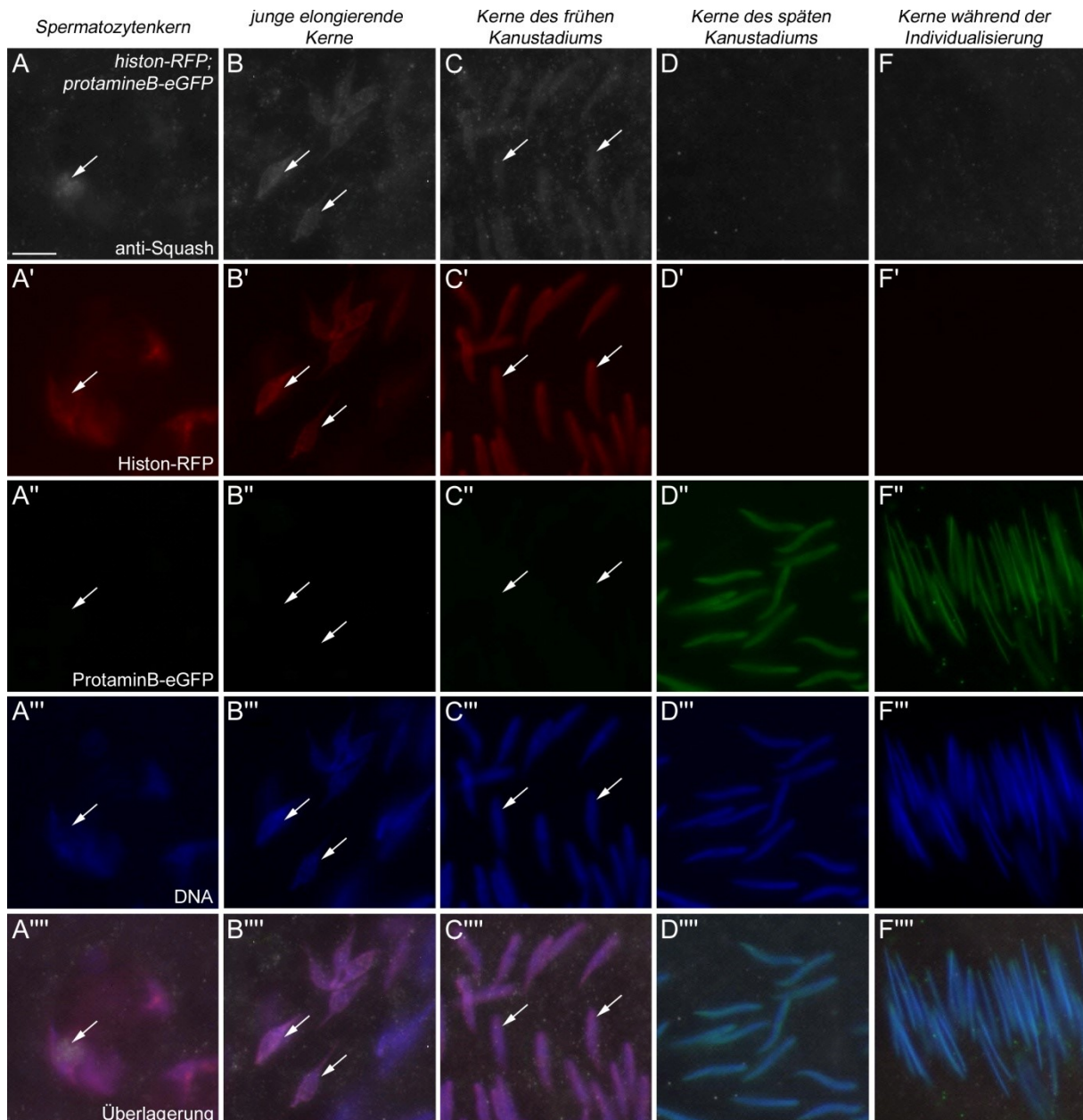


Abb. 7.0: Squash ist bis zum Histon-Protamin-Wechsel zu detektieren. Testes-Quetschpräparate transgener Fliegen für *histon-RFP;protamineB-eGFP*. (A) Squash ist im Zytoplasma und im Nukleolus (Pfeil) von Spermatozyten erkennbar. (B) In jungen elongierenden Kernen (Pfeile) sowie (C) in den Kernen des frühen Kanustadiums (Pfeile) zeigt Squash eine diffuse Verteilung. (D-E) In ProtB-positiven Kernen ist kein Squash mehr zu erkennen. (A'-F') Expression von Histon-RFP und (A''-F'') ProtaminB-eGFP sowie (A'''-F''') die Färbung der DNA mit Hoechst. (A''''-F''') zeigt eine Überlagerung der einzelnen Kanäle. Balken: 5 µm.

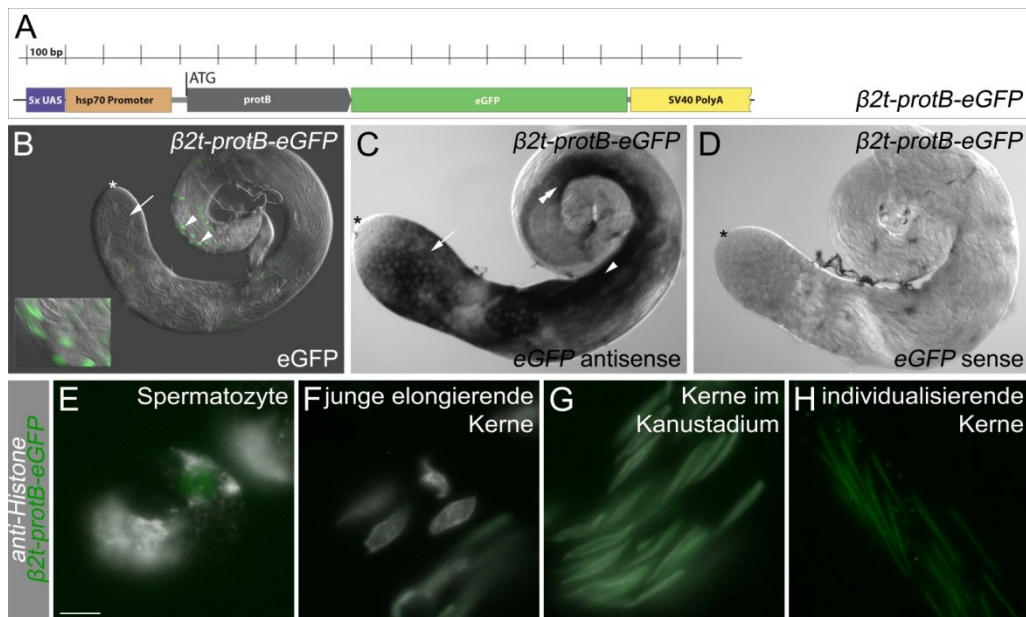


Abb. 7.1: Die Translation von ProtB ist von Bereichen im ORF abhängig. (A) Schematische Darstellung des Konstruktes. (B-H) *protB*-ORF unter der Kontrolle des genregulatorischen Bereichs von $\beta 2\text{-tubulin}$. (B) In Testis-Frischpräparaten ist das eGFP-Signal in späten Spermatiden detektierbar (Pfeilköpfe, sowie Vergrößerung). In den frühen Stadien ist kein Signal zu erkennen (Pfeil). (C-D) *in situ* Hybridisierungen. (C) eGFP Transkripte sind in Spermatozyten (Pfeil), frühen Spermatiden (Pfeilkopf) und bis in die späten Stadien (Doppelpfeil) nachweisbar. (D) Die sense-Sonde liefert kein Signal. (E,F,G,H) Testes-Quetschpräparate. Zum Unterscheiden der Stadien wurde mit einem Marker für Histone gefärbt. (E) Das ProtB-Fusionsprotein ist im Nukleolus von Spermatozyten detektierbar. (F) In jungen elongierenden Kerne ist kein GFP-Signal erkennbar. (G) In den Kernen des frühen Kanustadiums und (H) in individualisierenden Kernen ist $\beta 2t\text{-ProtB-eGFP}$ gleichmäßig über den Kernen verteilt. Balken: 5 μm .

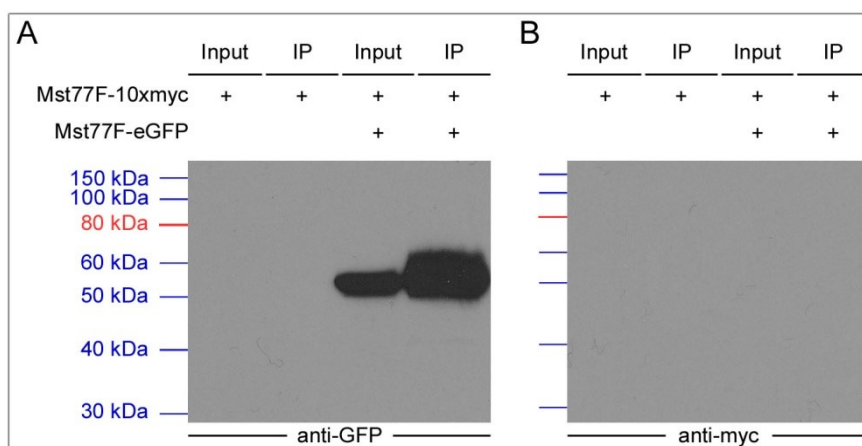


Abb. 7.2: Nachweis des Mst77F-eGFP Konstruktes mit Hilfe der Western Blot Analyse. Western Blot Analyse nach einer CoIP mit transfizierten *Drosophila* SL2-Zellen zum Test auf Selbstinteraktion zwischen Mst77F Proteinen. (A) Mit Hilfe eines gegen den GFP-Tag gerichteten Antikörpers, konnte im Input wie auch nach der CoIP, ein Signal für Mst77F-eGFP mit einer Größe von etwa 52 kDa detektiert werden. Zudem kann gezeigt werden, dass der GFP-Antikörper nicht mit dem Myc-Tag kreuzreagiert. (B) Mit einem Antikörper gegen den Myc-Tag können keine Signale nachgewiesen werden. Marker: Color Plus Prestained Ladder Broad Range.

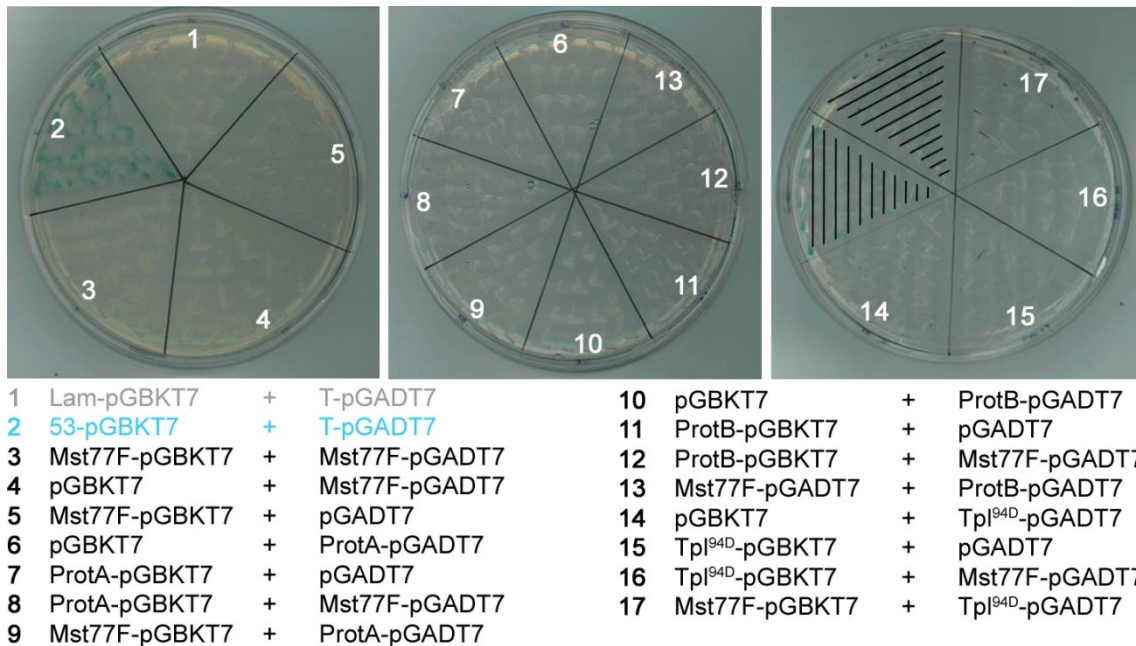


Abb. 7.3: Das Mst77F-Protein zeigt weder Selbstinteraktion noch eine Interaktion mit den Protaminen und Tpl^{94D} im Hefe-Zwei-Hybrid System. Interaktionstests mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems. (1) Negativkontrolle und (2) Positivkontrolle. Bei einer positiven Interaktion sind ein Wachstum und eine Blaufärbung der Kolonien ersichtlich. (3-17) Die ausgestrichenen Transformanten und Kotransformanten zeigen keine Blaufärbung und somit auch keine Interaktion der Fusionsproteine. (3) Mst77F-Proteine zeigen keine Selbstinteraktion und interagiert weder mit (8,9) Protamin A, (12,13) Protamin B, noch mit (16,17) Tpl^{94D}.

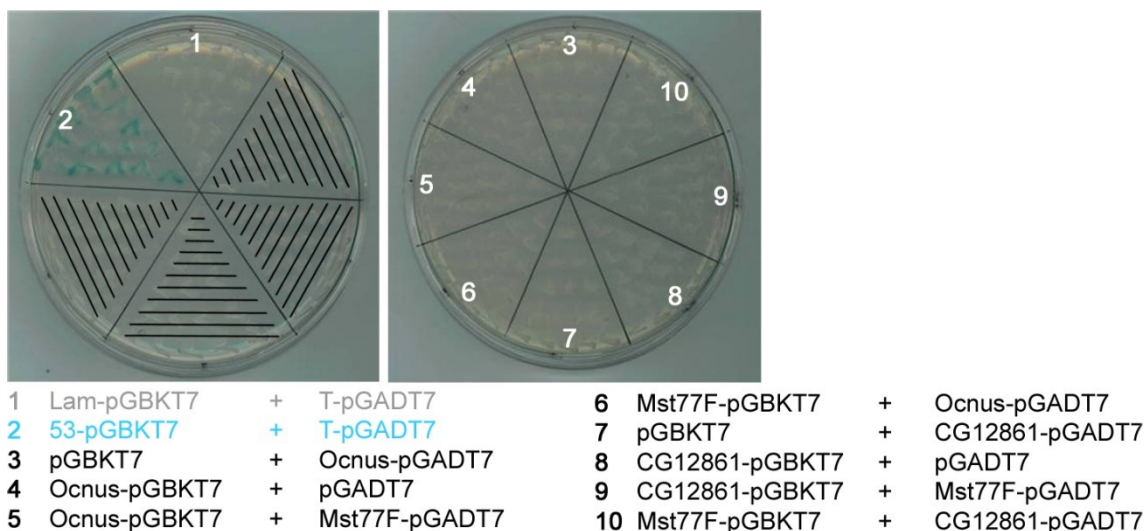


Abb. 7.4: Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems ist keine Interaktion von Mst77F mit Ocnus und CG12861 nachweisbar. Gezeigt sind Interaktionstests mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems. (1) zeigt die Negativkontrolle und (2) die Positivkontrolle. In der Positivkontrolle ist eine Interaktion der zu testeten Proteine durch ein Wachstum und eine Blaufärbung der Kolonien ersichtlich. (3-10) Die ausgestrichenen Kotransformanten weisen keine Blaufärbung der Kolonien auf und zeigen somit keine Interaktion der Fusionsproteine. Mst77F interagiert im Hefe-Zwei-Hybrid System nicht mit den Proteinen Ocnus und CG12861.

7.2 Liste der im Rahmen dieser Arbeit generierten Konstrukte

Tab. 7.0: Liste der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Konstrukte.

Klon #	Konstruktnamen	Konstruktumfang	Vektor	Template	Primer #
589	CG31679-eGFP	Prom+ORF CG31679	pUAS _{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
431	CG31682-eGFP	Prom+ORF CG31682	pUAS _{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
C91	CG4683-eGFP	Prom+ORF CG4683	pUAS _{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
489	Squash-Sonde	ORF Squash	pCR [®] -II-TOPO [®]	gDNA	SK80+SK60
497	CG15484-Sonde	ORF CG15484	pCR [®] -II-TOPO [®]	gDNA	SK62+SK63
396	Squash-TBI	KpnI-Prom+ORF Squash-SpeI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK73+SK76
420	Squash-eGFP	KpnI-Prom+ORF Squash-SpeI	pChab Δ Sal Δ lacZ-eGFP	gDNA	
1000	CG15484-pENTR	Prom+ORF CG15484	pENTR TM /D-TOPO [®]	gDNA	SK63+SK64
12	CG15484-eGFP	Prom+ORF CG15484	pUAS _{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
34	UbcD6-pENTR	Prom+ORF UbcD6	pENTR TM /D-TOPO [®]	gDNA	SK57+SK40
197	UbcD6-eGFP	Prom+ORF UbcD6	pUAS _{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
144	3'UTR UbcD6-TBI	SpeI-3'UTR UbcD6-XbaI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK130+SK131
161	UbcD6-TBI	KpnI-Prom+ORF UbcD6-SacII	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK53+SK154
173	eGFP-TBI	SacII-eGFP+Stopp-SpeI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]		SK152+SK153
366	UbcD6-eGFP+3'UTR	KpnI-Prom+ORF UbcD6-SacII-eGFP-SpeI-3'UTR UbcD6-XbaI	pChab Δ Sal Δ lacZ-eGFP	gDNA	
532	CG7376-Sonde	614 bp ExonII CG7376	pCR [®] -II-TOPO [®]	gDNA	SK98+SK99
577	CG5524-Sonde	608 bp Exon IV CG5524	pCR [®] -II-TOPO [®]	gDNA	SK94+SK95
535	CG3473-Sonde	ORF CG3473	pCR [®] -II-TOPO [®]	gDNA	SK90+SK91
83	LacZ-Sonde	624 bp LacZ	pBluescript II SK (+)		SK150+SK151
74	β 2t Prom-TA	EcoRI-Prom β 2-tubulin-KpnI	pCR [®] -II-TOPO [®]	gDNA	SK7+SK8
192	β 2t-eGFP	EcoRI-Prom β 2-tubulin-KpnI	pChab Δ Sal Δ lacZ-eGFP	gDNA	
817	ORF Mst77F-TBI	KpnI-ORF Mst77F-BamHI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK47+SK48
256	β 2t-Mst77F-pENTR	Prom β 2t - ORF Mst77F	pENTR TM /D-TOPO [®]	gDNA	SK65+SK69
519	β 2t-Mst77F-eGFP	Prom β 2t - ORF Mst77F	pPWG-eGFP	gDNA	
621	ORF ProtB-TA	KpnI-ORF ProtB-BamHI	pCR [®] -II-TOPO [®]	gDNA	SK45+SK46
654	β 2t-ProtB-eGFP	EcoRI-Prom β 2t-KpnI-ORF ProtB-BamHI	pChab Δ Sal Δ lacZ-eGFP	gDNA	
609	Mst77F Δ 60C-TBI	KpnI-Prom+ORF Mst77F Δ 60C-SpeI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK83+SK86
643	Mst77F Δ 60C-eGFP	KpnI-Prom+ORF Mst77F Δ 60C-SpeI	pChab Δ Sal Δ lacZ-eGFP	gDNA	
267	ORF Mst77F-pENTR	ORF Mst77F	pENTR TM /D-TOPO [®]	gDNA	SK121+SK69
468	UAS-Mst77F-eGFP	ORF Mst77F	pUAS _{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
13	Mst77F+Stopp-pENTR	ORF Mst77F+Stopp	pENTR TM /D-TOPO [®]	gDNA	SK121+SK149
210	UAS-eGFP-Mst77F	ORF Mst77F+Stopp	pUAS _{attB} -eGFP-rfa	gDNA	
373	3'UTR Mst77F-TBI	SpeI-3'UTR Mst77F-XbaI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK158+SK159
324	Prom Mst77F-TBI	EcoRI-Prom Mst77F-KpnI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK47+SK48
344	ORF Mst77F-TBI2	KpnI-ORF Mst77F-SacII	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK47+157
508	Mst77F-eGFP+3' UTR	EcoRI-Prom Mst77F-KpnI-ORF Mst77F-SacII-eGFP-SpeI-3'UTR	pChab Δ Sal Δ lacZ-eGFP	gDNA	

		Mst77F-XbaI			
453	Mst77F-pENTR	Prom+ORF Mst77F	pENTR TM /D-TOPO [®]	gDNA	SK226+SK227
561	Mst77F-eGFP	Prom+ORF Mst77F	pUAS ^{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
539	Mst77FΔ20C-TBI	KpnI-Prom+ORF Mst77FΔ20C-SpeI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK156+SK84
611	Mst77FΔ20C-eGFP	KpnI-Prom+ORF Mst77FΔ20C-SpeI	pChabΔSalΔlacZ-eGFP	gDNA	
545	Mst77FΔ40C-TBI	KpnI-Prom+ORF Mst77FΔ40C-SpeI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK156+SK85
627	Mst77FΔ40C-eGFP	KpnI-Prom+ORF Mst77FΔ40C-SpeI	pChabΔSalΔlacZ-eGFP	gDNA	
4	Mst77FΔ40C+NLS-TA	KpnI-Prom+ORF Mst77FΔ40C+NLS-SpeI	pCR [®] II-TOPO [®]	gDNA	SK122+SK124
175	Mst77FΔ40C+NLS-eGFP	KpnI-Prom+ORF Mst77FΔ40C+NLS-SpeI	pChabΔSalΔlacZ-eGFP	gDNA	
131	Prom Mst77F-TA	KpnI-Prom Mst77F-SacII	pCR [®] II-TOPO [®]	gDNA	SK122+SK157
21	ORF Mst77FΔ100N-TA	SacII-ORF Mst77F Δ100N-BamHI	pCR [®] II-TOPO [®]	gDNA	SK104+SK106
432	Mst77FΔ100N-eGFP	KpnI-Prom Mst77F-SacII-ORF Mst77F Δ100N-BamHI	pChabΔSalΔlacZ-eGFP	gDNA	
469	αKap4-Sonde	894 bp ExonII αKap4	pCR [®] II-TOPO [®]	gDNA	SK171+SK170
3	αKap4-TBI	KpnI-Prom+ORF αKap4-SacII	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK174+SK175
795	ORF ProtA-pENTR	ORF ProtA	pENTR TM /D-TOPO [®]	cDNA	SK221+SK222
807	ORF ProtB-pENTR	ORF ProtB	pENTR TM /D-TOPO [®]	cDNA	SK221+SK223
1025	ORF Tpl94D-pENTR	ORF Tpl94D	pENTR TM /D-TOPO [®]	gDNA	SK224+SK225
963	UAS-ProtA-eGFP	ORF ProtA	pUAS ^{attB} -rfa-eGFP	cDNA	
1001	UAS-ProtB-eGFP	ORF ProtB	pUAS ^{attB} -rfa-eGFP	cDNA	
1094	UAS-Tpl94D-eGFP	ORF Tpl94D	pUAS ^{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
940	UAS-Mst77F-10xmyc	ORF Mst77F	pUAS ^{attB} -rfa-10xmyc	gDNA	
603	ORF Mst77F-TBI 3	EcoRI-ORF Mst77F+Stop-BamHI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	cDNA	SK48+SK107
205	ORF ProtA-TBI	EcoRI-ORF ProtA+Stop-BamHI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	cDNA	SK207+SK208
197	ORF ProtB-TBI	EcoRI-ORF ProtB+Stop-BamHI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	cDNA	SK209+SK210
1034	ORF Tpl94D-TBI	NdeI-ORF Tpl94D+Stop-BamHI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	cDNA	SK211+SK212
735	Mst77F-pGADT7	EcoRI-ORF Mst77F+Stop-BamHI	pGADT7	cDNA	
734	Mst77F-pGBKT7	EcoRI-ORF Mst77F+Stop-BamHI	pGBKT7	cDNA	
377	ProtA-pGADT7	EcoRI-ORF ProtA+Stop-BamHI	pGADT7	cDNA	
581	ProtA-pGBKT7	EcoRI-ORF ProtA+Stop-BamHI	pGBKT7	cDNA	
370	ProtB-pGADT7	EcoRI-ORF ProtB+Stop-BamHI	pGADT7	cDNA	
361	ProtB-pGBKT7	EcoRI-ORF ProtB+Stop-BamHI	pGBKT7	cDNA	
1061	Tpl94D-pGADT7	NdeI-ORF Tpl94D+Stop-BamHI	pGADT7	cDNA	
1079	Tpl94D-pGBKT7	NdeI-ORF Tpl94D+Stop-BamHI	pGBKT7	cDNA	
297	Ocnus-Sonde	211 bp ExonI	pCR [®] II-TOPO [®]		SK160+SK161
405	CG10252-Sonde	265 bp ExonIV	pCR [®] II-TOPO [®]		SK162+SK163
79	CG12861-Sonde	370 bp	pCR [®] II-TOPO [®]		SK168+SK169
314	Ocnus-TBI	KpnI-Prom+ORF Ocnus-SpeI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK191+SK192
276	CG10252-TBI	KpnI-Prom+ORF CG10252-SpeI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK193+SK194
326	CG12861-TBI	KpnI-Prom+ORF CG12861-SpeI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK195+SK196
645	Ocnus-eGFP	KpnI-Prom+ORF Ocnus-SpeI	pChabΔSalΔlacZ-eGFP	gDNA	
655	CG10252-eGFP	KpnI-Prom+ORF CG10252-SpeI	pChabΔSalΔlacZ-eGFP	gDNA	
665	CG12861-eGFP	KpnI-Prom+ORF CG12861-SpeI	pChabΔSalΔlacZ-eGFP	gDNA	

823	ORF Ocnus-pENTR	ORF Ocnus	pENTR TM /D-TOPO [®]	cDNA	SK215+SK216
813	ORF CG10252-pENTR	ORF CG10252	pENTR TM /D-TOPO [®]	gDNA	SK217+SK218
1041	ORF CG12861-pENTR	ORF CG12861	pENTR TM /D-TOPO [®]	gDNA	SK219+SK220
993	UAS-Ocnus-eGFP	ORF Ocnus	pUAS _{attB} -rfa-eGFP	cDNA	
937	UAS-Ocnus-10xmyc	ORF Ocnus	pUAS _{attB} -rfa-10xmyc	cDNA	
939	UAS-CG10252-eGFP	ORF CG10252	pUAS _{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
1105	UAS-CG12861-eGFP	ORF CG12861	pUAS _{attB} -rfa-eGFP	gDNA	
433	ORF Ocnus-TB1	NdeI-ORF Ocnus+Stop-EcoRI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	cDNA	SK199+SK200
421	ORF CG12861-TB1	NdeI-ORF CG12861+Stop-SalI	pCR [®] -Blunt II-TOPO [®]	gDNA	SK203+SK204
549	Ocnus-pGADT7	NdeI-ORF Ocnus+Stop-EcoRI	pGADT7	cDNA	
560	Ocnus-pGBKT7	NdeI-ORF Ocnus+Stop-EcoRI	pGBKT7	cDNA	
889	CG12861-pGADT7	NdeI-ORF CG12861+Stop-SalI	pGADT7	gDNA	
539	CG12861-pGBKT7	NdeI-ORF CG12861+Stop-SalI	pGBKT7	gDNA	

In der ersten Spalte ist die laborinterne Nummer des Klons angegeben und in der zweiten Spalte der Name des Konstrukts. In der dritten Spalte ist das genetische Fragment mit eventuell vorhandenen Schnittstellen verzeichnet. In Spalte vier sind die Vektoren angegeben und in Spalte fünf die für die jeweilige PCR verwendete DNA (gDNA = genomische DNA; cDNA = komplementäre DNA). In der rechten Spalte sind gegebenenfalls verwendete Primer in Form der laborinternen Nummerierung aufgeführt.

8 LITERATUR

- Ahmed, E.A.; Sfeir, A.; Takai, H.; Scherthan, H.** (2013) Ku70 and non-homologous end joining protect testicular cells from DNA damage. *Journal of cell science* 126(Pt 14): 3095-104.
- 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. *Journal of andrology* 27(6): 890-8.
- Awe, S.** (2010) Histone-Acetylierung ist essentiell für die Spermatidenentwicklung von histonbasiertem zu protaminbasiertem Chromatin in *Drosophila melanogaster* - Dissertation. Entwicklungsbiologie, Philipps-Universität Marburg.
- Awe, S.; Renkawitz-Pohl, R.** (2010) Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone- to a protamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Systems biology in reproductive medicine* 56(1): 44-61.
- Baarends, W.M.; Hoogerbrugge, J.W.; Roest, H.P.; Ooms, M.; Vreeburg, J. et al.** (1999) Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Developmental biology* 207(2): 322-33.
- Baarends, W.M.; van der Laan, R.; Grootegoed, J.A.** (2000) Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *Journal of endocrinological investigation* 23(9): 597-604.
- Baarends, W.M.; Wassenaar, E.; Hoogerbrugge, J.W.; van Cappellen, G.; Roest, H.P. et al.** (2003) Loss of HR6B ubiquitin-conjugating activity results in damaged synaptonemal complex structure and increased crossing-over frequency during the male meiotic prophase. *Molecular and cellular biology* 23(4): 1151-62.
- Barckmann, B.** (2005) Analyse der Transkriptions- und Translationskontrolle zur Synthese des Mst77F-Proteins, einer Komponente des kondensierten Chromatins des Spermiums in *Drosophila melanogaster* - Diplomarbeit. Entwicklungsbiologie, Philipps-Universität Marburg.
- Barckmann, B.** (2010) Regulation der Transkription und Translation von Mst77F und der Protamine und die Funktion der Protamine während der Spermiogenese von *Drosophila* - Dissertation. Entwicklungsbiologie, Philipps-Universität Marburg.
- Barckmann, B.; Chen, X.; Kaiser, S.; Jayaramaiah-Raja, S.; Rathke, C. et al.** (2013) Three levels of regulation lead to protamine and Mst77F expression in *Drosophila*. *Developmental biology* 377(1): 33-45.
- Barreau, C.; Benson, E.; Gudmannsdottir, E.; Newton, F.; White-Cooper, H.** (2008) Post-meiotic transcription in *Drosophila* testes. *Development (Cambridge, England)* 135(11): 1897-902.
- Bendena, W.G.; Ayme-Southgate, A.; Garbe, J.C.; Pardue, M.L.** (1991) Expression of heat-shock locus hsr-omega in nonstressed cells during development in *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology* 144(1): 65-77.
- Bergink, S.; Jentsch, S.** (2009) Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. *Nature* 458(7237): 461-7.
- Birnboim, H.C.; Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7(6): 1513-23.

- Bischof, J.; Maeda, R.K.; Hediger, M.; Karch, F.; Basler, K.** (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9): 3312-7.
- Boutanaev, A.M.; Mikhaylova, L.M.; Nurminsky, D.I.** (2007) Up-regulation of the Ku heterodimer in *Drosophila* testicular cyst cells. *FEBS letters* 581(9): 1707-15.
- Brand, A.H.; Manoukian, A.S.; Perrimon, N.** (1994) Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods in cell biology* 44:635-54.
- Brand, A.H.; Perrimon, N.** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)* 118(2): 401-15.
- Braun, R.E.; Peschon, J.J.; Behringer, R.R.; Brinster, R.L.; Palmiter, R.D.** (1989) Protamine 3'-untranslated sequences regulate temporal translational control and subcellular localization of growth hormone in spermatids of transgenic mice. *Genes and development* 3(6): 793-802.
- Braun, R.E.** (1998) Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis. *Seminars in cell and developmental biology* 9(4): 483-9.
- Braun, R.E.** (2001) Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nature genetics* 28(1): 10-2.
- Cabrero, J.; Palomino-Morales, R.J.; Camacho, J.P.M.** (2007) The DNA-repair Ku70 protein is located in the nucleus and tail of elongating spermatids in grasshoppers. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 15(8): 1093-100.
- Chang, T.; Huang, H.; Hsu, J.B.; Weng, S.; Horng, J. et al.** (2013) An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. *BMC bioinformatics* 14 Suppl 2S4.
- Chen, D.; McKearin, D.** (2003) Dpp signaling silences bam transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells. *Current biology : CB* 13(20): 1786-91.
- Chen, H.Y.; Sun, J.M.; Zhang, Y.; Davie, J.R.; Meistrich, M.L.** (1998) Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *The Journal of biological chemistry* 273(21): 13165-9.
- Chintapalli, V.R.; Wang, J.; Dow, J.A.T.** (2007) Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nature genetics* 39(6): 715-20.
- Cho, C.; Jung-Ha, H.; Willis, W.D.; Goulding, E.H.; Stein, P. et al.** (2003) Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biology of reproduction* 69(1): 211-7.
- Cho, C.; Willis, W.D.; Goulding, E.H.; Jung-Ha, H.; Choi, Y. C. et al.** (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature genetics* 28(1): 82-6.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N.** (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* 1(2): 581-5.
- Conti, E.; Uy, M.; Leighton, L.; Blobel, G.; Kuriyan, J.** (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94(2): 193-204.
- Cote, J.; Ruiz-Carrillo, A.** (1993) Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science (New York, N.Y.)* 261(5122): 765-9.
- Creancier, L.; Morello, D.; Mercier, P.; Prats, A. C.** (2000) Fibroblast growth factor 2 internal

ribosome entry site (IRES) activity *ex vivo* and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *The Journal of cell biology* 150(1): 275-81.

DeLuca, S. Z.; O'Farrell, P.H. (2012) Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Developmental cell* 22(3): 660-8.

Derijck, A.; van der Heijden, G.; Giele, M.; Philippens, M.; de Boer, P. (2008) DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of *de novo* mutation. *Human molecular genetics* 17(13): 1922-37.

Dockendorff, T.C.; Tang, Z.; Jongens, T.A. (1999) Cloning of karyopherin- α 3 from *Drosophila* through its interaction with the nuclear localization sequence of germ cell-less protein. *Biological chemistry* 380(11): 1263-72.

Dorus, S.; Busby, S.A.; Gerike, U.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F. et al. (2006) Genomic and functional evolution of the *Drosophila melanogaster* sperm proteome. *Nature genetics* 38(12): 1440-5.

Dottermusch-Heidel, C.; Gärtner, S.M.K.; Tegeder, I.; Rathke, C.; Barckmann, B. et al. (2014) H3K79 methylation: a new conserved mark that accompanies H4 hyperacetylation prior to histone-to-protamine transition in *Drosophila* and rat. *Biology open*, doi:10.1242/bio.20147302

Dover, J.; Schneider, J.; Tawiah-Boateng, M.A.; Wood, A.; Dean, K. et al. (2002) Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *The Journal of biological chemistry* 277(32): 28368-71.

Flicek, P.; Amode, M.R.; Barrell, D.; Beal, K.; Brent, S. et al. (2011) Ensembl 2011. *Nucleic acids research* 39(Database issue): D800-6.

Franceschini, A.; Szklarczyk, D.; Frankild, S.; Kuhn, M.; Simonovic, M. et al. (2013) STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic acids research* 41(Database issue): D808-15.

Fuller, M.T.; Regan, C.L.; Green, L.L.; Robertson, B.; Deuring, R. et al. (1989) Interacting genes identify interacting proteins involved in microtubule function in *Drosophila*. *Cell motility and the cytoskeleton* 14(1): 128-35.

Fuller, M.T. (1993) Spermatogenesis. 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. *Seminars in cell and developmental biology* 9(4): 433-44.

Ghildiyal, M.; Zamore, P.D. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews. Genetics* 10(2): 94-108.

Giarre, M.; Torok, I.; Schmitt, R.; Gorjanacz, M.; Kiss, I. et al. (2002) Patterns of importin- α expression during *Drosophila* spermatogenesis. *Journal of structural biology* 140(1-3): 279-90.

Gigliotti, S.; Balz, V.; Malva, C.; Schafer, M.A. (1997) Organisation of regulatory elements in two closely spaced *Drosophila* genes with common expression characteristics. *Mechanisms of development* 68(1-2): 101-13.

Goldfarb, D.S.; Corbett, A.H.; Mason, D.A.; Harreman, M. T.; Adam, S.A. (2004) Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends in cell biology* 14(9): 505-14.

Gorjanacz, M.; Adam, G.; Torok, I.; Mechler, B.M.; Szlanka, T. et al. (2002) Importin- α 2 is

- critically required for the assembly of ring canals during *Drosophila* oogenesis. *Developmental biology* 251(2): 271-82.
- Grenier, L.; Robaire, B.; Hales, B.F.** (2010) Paternal exposure to cyclophosphamide affects the progression of sperm chromatin decondensation and activates a DNA damage response in the prepronuclear rat zygote. *Biology of reproduction* 83(2): 195-204.
- Gruss, O.J.; Carazo-Salas, R.E.; Schatz, C.A.; Guarguaglini, G.; Kast, J. et al.** (2001) Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* 104(1): 83-93.
- Haddad, D.M.; Vilain, S.; Vos, M.; Esposito, G.; Matta, S. et al.** (2013) Mutations in the intellectual disability gene *Ube2a* cause neuronal dysfunction and impair parkin-dependent mitophagy. *Molecular cell* 50(6): 831-43.
- Hammel, M.; Yu, Y.; Mahaney, B.L.; Cai, B.; Ye, R. et al.** (2010) Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *The Journal of biological chemistry* 285(2): 1414-23.
- Hart, K.; Bienz, M.** (1996) A test for cell autonomy, based on di-cistronic messenger translation. *Development (Cambridge, England)* 122(3): 747-51.
- Hempel, L.U.; Rathke, C.; Jayaramaiah Raja, S.; 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. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235(4): 1053-64.
- Hicks, J.L.; Deng, W.M.; Rogat, A.D.; Miller, K.G.; Bownes, M.** (1999) Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in *Drosophila*. *Molecular biology of the cell* 10(12): 4341-53.
- Hiller, M.; Chen, X.; Pringle, M. J.; Suchorolski, M.; Sancak, Y. et al.** (2004) Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program. *Development (Cambridge, England)* 131(21): 5297-308.
- Hiller, M.A.; Lin, T.Y.; Wood, C.; Fuller, M. T.** (2001) Developmental regulation of transcription by a tissue-specific TAF homolog. *Genes and development* 15(8): 1021-30.
- Hime, G.R.; Brill, J.A.; Fuller, M.T.** (1996) Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. *Journal of cell science* 109 (Pt 12)2779-88.
- Hochstrasser, M.** (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics* 30405-39.
- Hogarth, C.A.; Calanni, S.; Jans, D.A.; Loveland, K.L.** (2006) Importin alpha mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235(1): 253-62.
- Huang, H.; Chien, C.; Jen, K.; Huang, H.** (2006) RegRNA: an integrated web server for identifying regulatory RNA motifs and elements. *Nucleic acids research* 34(Web Server issue): W429-34.
- Huyen, Y.; Zgheib, O.; Ditullio, R.A.J.; Gorgoulis, V.G.; Zacharatos, P. et al.** (2004) Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* 432(7015): 406-11.
- 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. *Biology of reproduction* 70(5): 1239-45.
- James, P.; Halladay, J.; Craig, E.A.** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144(4): 1425-36.
- Jang, S.K.; Krausslich, H.G.; Nicklin, M.J.; Duke, G.M.; Palmenberg, A.C. et al.** (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *Journal of virology* 62(8): 2636-43.
- 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. *Molecular and cellular biology* 25(14): 6165-77.
- Jorgensen, E.M.; Garber, R.L.** (1987) Function and malfunction of the two promoters of the *Drosophila* Antennapedia gene. *Genes and development* 1(6): 544-55.
- Kaiser, S.** (2010) Die Induktion von DNA-Strangbrüchen und deren Reparatur während der Umstrukturierung des Chromatins in der Spermiogenese von *Drosophila melanogaster* - Masterarbeit. Entwicklungsbiologie, Philipps-Universität Marburg.
- Karess, R.E.; Rubin, G.M.** (1984) Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* 38(1): 135-46.
- Kempe, E.; Muhs, B.; Schafer, M.** (1993) Gene regulation in *Drosophila* spermatogenesis: analysis of protein binding at the translational control element TCE. *Developmental genetics* 14(6): 449-59.
- Kibbe, W.A.** (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic acids research* 35(Web Server issue): W43-6.
- Kierszenbaum, A.L.; Tres, L.L.** (1975) Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *The Journal of cell biology* 65(2): 258-70.
- Kim, V. N. ; Han, J. ; Siomi, M. C.** (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10(2): 126-39.
- Kohler, M.; Ansieau, S.; Prehn, S.; Leutz, A.; Haller, H. et al.** (1997) Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS letters* 417(1): 104-8.
- Koken, M.; Reynolds, P.; Bootsma, D.; Hoeijmakers, J.; Prakash, S. et al.** (1991B) Dhr6, a *Drosophila* homolog of the yeast DNA-repair gene RAD6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(9): 3832-6.
- Koken, M.H.; Hoogerbrugge, J.W.; Jasper-Dekker, I.; de Wit, J.; Willemsen, R. et al.** (1996) Expression of the ubiquitin-conjugating DNA repair enzymes HHR6A and B suggests a role in spermatogenesis and chromatin modification. *Developmental biology* 173(1): 119-32.
- Koken, M.H.; Reynolds, P.; Jaspers-Dekker, I.; Prakash, L.; Prakash, S. et al.** (1991A) Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(20): 8865-9.
- Krsticevic, F.J.; Santos, H.L.; Januario, S.; Schrago, C.G.; Carvalho, A.B.** (2010) Functional copies of the Mst77F gene on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 184(1): 295-307.

- Kuchta, K.; Barszcz, D.; Grzesiuk, E.; Pomorski, P.; Krwawicz, J.** (2012) DNATraffic--a new database for systems biology of DNA dynamics during the cell life. *Nucleic acids research* 40(Database issue): D1235-40.
- Kusano, A.; Staber, C.; Ganetzky, B.** (2002) Segregation distortion induced by wild-type RanGAP in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(10): 6866-70.
- Laberge, R.; Boissonneault, G.** (2005) On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biology of reproduction* 73(2): 289-96.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A. et al.** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23(21): 2947-8.
- Le, S.Y.; Maizel, J.V.J.** (1997) A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic acids research* 25(2): 362-69.
- Leduc, F.; Maquennehan, V.; Nkoma, G.B.; Boissonneault, G.** (2008) DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biology of reproduction* 78(2): 324-32.
- Lehman, I.R.** (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science (New York, N.Y.)* 186(4166): 790-7.
- Letunic, I.; Doerks, T.; Bork, P.** (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic acids research* 40(Database issue): D302-5.
- Li, C.; Vagin, V.V.; Lee, S.; Xu, J.; Ma, S. et al.** (2009) Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell* 137(3): 509-21.
- Lindsley, D. & Tokuyasu, K.T.** (1980) Spermatogenesis. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (Eds.), *Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 2d. *Academic Press*, New York, USA, 225-294
- Lippai, M.; Tirian, L.; Boros, I.; Mihaly, J.; Erdelyi, M. et al.** (2000) The Ketel gene encodes a *Drosophila* homologue of importin-beta. *Genetics* 156(4): 1889-900.
- Lopez-Lastra, M.; Rivas, A.; Barria, M.I.** (2005) Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biological research* 38(2-3): 121-46.
- Marcon, L.; Boissonneault, G.** (2004) Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biology of reproduction* 70(4): 910-8.
- Markstein, M.; Pitsouli, C.; Villalta, C.; Celniker, S.E.; Perrimon, N.** (2008) Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nature genetics* 40(4): 476-83.
- Mason, D.A.; Fleming, R.J.; Goldfarb, D.S.** (2002) *Drosophila melanogaster* importin alpha1 and alpha3 can replace importin alpha2 during spermatogenesis but not oogenesis. *Genetics* 161(1): 157-70.
- Mason, J.M.; Arndt, K.M.** (2004) Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 5(2): 170-6.
- Mathe, E.; Bates, H.; Huikeshoven, H.; Deak, P.; Glover, D.M. et al.** (2000) Importin-alpha3 is required at multiple stages of *Drosophila* development and has a role in the completion of oogenesis.

Developmental biology 223(2): 307-22.

- McDermott-Roe, C.; Ye, J.; Ahmed, R.; Sun, X.; Serafin, A. et al.** (2011) Endonuclease G is a novel determinant of cardiac hypertrophy and mitochondrial function. *Nature* 478(7367): 114-8.
- McEntyre, J.; Lipman, D.** (2001) PubMed: bridging the information gap. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 164(9): 1317-9.
- McPherson, S.M.; Longo, F.J.** (1993) Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Developmental biology* 158(1): 122-30.
- Metcalf, C.E.; Wassarman, D.A.** (2007) Nucleolar colocalization of TAF1 and testis-specific TAFs during *Drosophila* spermatogenesis. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 236(10): 2836-43.
- 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. *The EMBO journal* 8(5): 1559-65.
- Morris, C.A.; Benson, E.; White-Cooper, H.** (2009) Determination of gene expression patterns using in situ hybridization to *Drosophila* testes. *Nature protocols* 4(12): 1807-19.
- Murawska, M.; Brehm, A.** (2012) Immunostaining of *Drosophila* polytene chromosomes to investigate recruitment of chromatin-binding proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 809:267-77.
- Nagao, A.; Mituyama, T.; Huang, H.; Chen, D.; Siomi, M. C. et al.** (2010) Biogenesis pathways of piRNAs loaded onto AGO3 in the *Drosophila* testis. *RNA (New York, N.Y.)* 16(12): 2503-15.
- Nakai, K.; Horton, P.** (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in biochemical sciences* 24(1): 34-6.
- Nguyen, A.T.; Zhang, Y.** (2011) The diverse functions of Dot1 and H3K79 methylation. *Genes and development* 25(13): 1345-58.
- Oh, S.K.; Scott, M.P.; Sarnow, P.** (1992) Homeotic gene Antennapedia mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding. *Genes and development* 6(9): 1643-53.
- Pane, A.; Wehr, K.; Schupbach, T.** (2007) zucchini and squash encode two putative nucleases required for rasiRNA production in the *Drosophila* germline. *Developmental cell* 12(6): 851-62.
- Parsch, J.; Meiklejohn, C.D.; Hartl, D.L.** (2001A) Patterns of DNA sequence variation suggest the recent action of positive selection in the janus-ocnus region of *Drosophila simulans*. *Genetics* 159(2): 647-57.
- Parsch, J.; Meiklejohn, C.D.; Hauschteck-Jungen, E.; Hunziker, P.; Hartl, D.L.** (2001B) Molecular evolution of the ocnus and janus genes in the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Molecular biology and evolution* 18(5): 801-11.
- Pelletier, J.; Sonenberg, N.** (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334(6180): 320-5.
- Phadnis, N.; Hsieh, E.; Malik, H.S.** (2012) Birth, death, and replacement of karyopherins in *Drosophila*. *Molecular biology and evolution* 29(5): 1429-40.
- Pilipenko, E.V.; Pestova, T.V.; Kolupaeva, V.G.; Khitrina, E.V.; Poperechnaya, A.N. et al.**

- (2000) A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes and development* 14(16): 2028-45.
- Pirotta, V.** (1986). Cloning *Drosophila* genes. *Curr. Biol* 10, 81-83.
- Pittoggi, C. ; Renzi, L. ; Zaccagnini, G. ; Cimini, D. ; Degrassi, F. et al.** (1999) A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *Journal of cell science* 112(20): 3537-48.
- Prakash, L.** (1981) Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations. *Molecular and general genetics : MGG* 184(3): 471-8.
- Prasad, R.; Singhal, R.K.; Srivastava, D.K.; Molina, J.T.; Tomkinson, A.E. et al.** (1996) Specific interaction of DNA polymerase beta and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis. *The Journal of biological chemistry* 271(27): 16000-7.
- Rangan, P.; DeGennaro, M.; Jaime-Bustamante, K.; Coux, R.; Martinho, R.G. et al.** (2009) Temporal and spatial control of germ-plasm RNAs. *Current biology : CB* 19(1): 72-7.
- Rathke, C.** (2007) Chromatinveränderungen während der Spermienentwicklung von *Drosophila melanogaster* - von Histonen zu Protaminen - Dissertation. Entwicklungsbiologie, Philipps-Universität Marburg.
- Rathke, C.; Baarends, W.M.; Awe, S.; Renkawitz-Pohl, R.** (2014) Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1839(3): 155-68.
- Rathke, C.; Baarends, W.M.; Jayaramaiah-Raja, S.; Bartkuhn, M.; Renkawitz, R. et al.** (2007) Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *Journal of cell science* 120(Pt 9): 1689-700.
- Rathke, C.; Barckmann, B.; Burkhard, S.; Jayaramaiah-Raja, S.; Roote, J. et al.** (2010) Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *European journal of cell biology* 89(4): 326-38.
- Renkawitz-Pohl, R.; Hollmann, M.; Hempel, L. ; Schäfer, M. A.** (2005). Spermatogenesis. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology*. Vol 1 Elsevier, Oxford UK, 157-178.
- Riggleman, B.; Wieschaus, E.; Schedl, P.** (1989) Molecular analysis of the armadillo locus: uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *Drosophila* segment polarity gene. *Genes and development* 3(1): 96-113.
- Riparbelli, M.G.; Callaini, G.** (2007) The *Drosophila* parkin homologue is required for normal mitochondrial dynamics during spermiogenesis. *Developmental biology* 303(1): 108-20.
- Ripp, C.** (2009). Chromatin remodelling during spermiogenesis: characterization of the *Drosophila* mutant snowballs and analyses of topoisomerase expression during the switch from histones to protamines – Masterarbeit. Entwicklungsbiologie, Philipps-Universität Marburg,
- Roest, H.P.; van Klaveren, J.; de Wit, J.; van Gurp, C.G.; Koken, M.H. et al.** (1996) Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell* 86(5): 799-810.
- Rubin, G.M.; Spradling, A.C.** (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science (New York, N.Y.)* 218(4570): 348-53.

- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R. et al.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239(4839):487-91.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor
- Sarcevic, B.; Mawson, A.; Baker, R.T.; Sutherland, R.L.** (2002) Regulation of the ubiquitin-conjugating enzyme hHR6A by CDK-mediated phosphorylation. *The EMBO journal* 21(8): 2009-18.
- Sassone-Corsi, P.** (2002) Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 296(5576): 2176-8.
- Schafer, M.; Nayernia, K.; Engel, W.; Schafer, U.** (1995) Translational control in spermatogenesis. *Developmental biology* 172(2): 344-52.
- Schneider, I.** (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology* 27(2): 353-65.
- Schulz, R.A.; Miksch, J.L.; Xie, X.L.; Cornish, J.A.; Galewsky, S.** (1990) Expression of the *Drosophila* gonadal gene: alternative promoters control the germ-line expression of monocistronic and bicistronic gene transcripts. *Development (Cambridge, England)* 108(4): 613-22.
- Schulz, R.A.; Xie, X.L.; Miksch, J.L.** (1990) cis-acting sequences required for the germ line expression of the *Drosophila* gonadal gene. *Developmental biology* 140(2): 455-8.
- Schulze, J.M.; Jackson, J.; Nakanishi, S.; Gardner, J.M.; Hentrich, T. et al.** (2009) Linking cell cycle to histone modifications: SBF and H2B monoubiquitination machinery and cell-cycle regulation of H3K79 dimethylation. *Molecular cell* 35(5): 626-41.
- Schupbach, T.; Wieschaus, E.** (1991) Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations blocking oogenesis or altering egg morphology. *Genetics* 129(4): 1119-36.
- Shaman, J.A.; Prisztoka, R.; Ward, W.S.** (2006) Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. *Biology of reproduction* 75(5): 741-8.
- Snel, B.; Lehmann, G.; Bork, P.; Huynen, M.A.** (2000) STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic acids research* 28(18): 3442-4.
- Sotolongo, B.; Huang, T.T.F.; Isenberger, E.; Ward, W.S.** (2005) An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *Journal of andrology* 26(2): 272-80.
- Spradling, A.C.; Rubin, G.M.** (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science (New York, N.Y.)* 218(4570): 341-7.
- St Pierre, S.E.; Ponting, L.; Stefancsik, R.; McQuilton, P.** (2014) FlyBase 102--advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic acids research* 42(1): D780-8.
- Steger, K.** (2001) Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs. *Anatomy and embryology* 203(5): 323-34.
- Steller, H.; Pirrotta, V.** (1986) P transposons controlled by the heat shock promoter. *Molecular and cellular biology* 6(5): 1640-9.
- Stewart, M.** (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature reviews*.

Molecular cell biology 8(3): 195-208.

- Stros, M.; Launholt, D.; Grasser, K.D.** (2007) The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64(19-20): 2590-606.
- Temme, C.; Weissbach, R.; Lilie, H.; Wilson, C.; Meinhart, A. et al.** (2009) The *Drosophila melanogaster* Gene cg4930 Encodes a High Affinity Inhibitor for Endonuclease G. *The Journal of biological chemistry* 284(13): 8337-48.
- Thompson, S.R.** (2012) Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends in microbiology* 20(11): 558-66.
- Thummel, C. S. ; Boulet, A. M. ; Lipshitz, H. D.** (1988) Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* 74(2): 445-56.
- Tokuyasu, K. T. ; Peacock, W. J. ; Hardy, R. W.** (1972) Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948)* 124(4): 479-506.
- Torok, I.; Strand, D.; Schmitt, R.; Tick, G.; Torok, T. et al.** (1995) The overgrown hematopoietic organs-31 tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes an Importin-like protein accumulating in the nucleus at the onset of mitosis. *The Journal of cell biology* 129(6): 1473-89.
- Tsuji, L.; Takumi, T.; Imamoto, N.; Yoneda, Y.** (1997) Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS letters* 416(1): 30-4.
- Tweedie, S.; Ashburner, M.; Falls, K.; Leyland, P.; McQuilton, P. et al.** (2009) FlyBase: enhancing *Drosophila* Gene Ontology annotations. *Nucleic acids research* 37(Database issue): D555-9.
- Ulrich, H.D.; Jentsch, S.** (2000) Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *The EMBO journal* 19(13): 3388-97.
- Vibranovski, M.D.; Chalopin, D.S.; Lopes, H.F.; Long, M.; Karr, T.L.** (2010) Direct evidence for postmeiotic transcription during *Drosophila melanogaster* spermatogenesis. *Genetics* 186(1): 431-3.
- Vibranovski, M.D.; Lopes, H.F.; Karr, T.L.; Long, M.** (2009) Stage-specific expression profiling of *Drosophila* spermatogenesis suggests that meiotic sex chromosome inactivation drives genomic relocation of testis-expressed genes. *PLoS genetics* 5(11): e1000731.
- Vinson, C. ; Acharya, A. ; Taparowsky, E. J.** (2006) Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochimica et biophysica acta* 1759(1-2): 4-12.
- Wente, S.R.; Rout, M.P.** (2010) The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(10): a000562.
- White-Cooper, H.** (2010) Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. *Reproduction (Cambridge, England)* 139(1): 11-21.
- White-Cooper, H. ; Davidson, I.** (2011) Unique aspects of transcription regulation in male germ cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(7): a002626
- 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 (Cambridge, England)* 125(1): 125-34.
- Williams, R.W.; Rubin, G.M.** (2002) ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(10): 6889-94.
- Wouters-Tyrou, D.; Martinage, A.; Chevaillier, P.; Sautiere, P.** (1998) Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 80(2): 117-28.
- Wu, J.; Feng, L.; Hsieh, T.** (2010) *Drosophila* topo IIIalpha is required for the maintenance of mitochondrial genome and male germ-line stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(14): 6228-33.
- Xuan, T.; Xin, T.; He, J.; Tan, J.; Gao, Y. et al.** (2013) dBre1/dSet1-dependent pathway for histone H3K4 trimethylation has essential roles in controlling germline stem cell maintenance and germ cell differentiation in the *Drosophila* ovary. *Developmental biology* 379(2): 167-81.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(18): 10546-51.
- Yanicostas, C.; Vincent, A.; Lepesant, J.A.** (1989) Transcriptional and posttranscriptional regulation contributes to the sex-regulated expression of two sequence-related genes at the janus locus of *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology* 9(6): 2526-35.
- Yanicostas, C. ; Lepesant, J. A.** (1990) Transcriptional and translational cis-regulatory sequences of the spermatocyte-specific *Drosophila* janusB gene are located in the 3' exonic region of the overlapping janusA gene. *Molecular and general genetics : MGG* 224(3): 450-8.
- Yano, R.; Oakes, M.; Yamagishi, M.; Dodd, J.A.; Nomura, M.** (1992) Cloning and characterization of SRP1, a suppressor of temperature-sensitive RNA polymerase I mutations, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 12(12): 5640-51.
- Yano, R.; Oakes, M.L.; Tabb, M.M.; Nomura, M.** (1994) Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/beta-catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(15): 6880-4.
- Yepiskoposyan, H.; Egli, D.; Fergestad, T.; Selvaraj, A.; Treiber, C. et al.** (2006) Transcriptome response to heavy metal stress in *Drosophila* reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. *Nucleic acids research* 34(17): 4866-77.
- Zenkel, M.; Kruse, F.E.; Naumann, G.O.H.; Schlotzer-Schrehardt, U.** (2007) Impaired cytoprotective mechanisms in eyes with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma. *Investigative ophthalmology and visual science* 48(12): 5558-66.
- Zhao, J.; Klyne, G.; Benson, E.; Gudmannsdottir, E.; White-Cooper, H. et al.** (2010) FlyTED: the *Drosophila* Testis Gene Expression Database. *Nucleic acids research* 38(Database issue): D710-5.
- Zhong, J.; Peters, A.H.; Kafer, K.; Braun, R.E.** (2001) A highly conserved sequence essential for translational repression of the protamine 1 messenger rna in murine spermatids. *Biology of reproduction* 64(6): 1784-9.

9 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
ca.	circa
CC	Coiled-Coil Domäne
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	engl. <i>enhanced GFP</i>
et al.	et alii, und andere
°C	Grad Celsius
g	Gramm
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i>
HMG-Box	engl. <i>high mobility group box</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kap	Kapitel
kb	Kilobasen
kDA oder kD	Kilodalton
Levamisol	L(-)-2,3,5,6-Tetrahydro-6-phenylimidazol[2,1-6]-thiazol
M	Molar
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger-RNA, Boten-RNA
mt	mitochondrial
NLS	Kernlikalisationssignal (engl. <i>nuclear localization signal</i>)
OD	optische Dichte

ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Proteinextrakt
piRNA	PIWI-interagierende RNA
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TAF	engl. <i>TBP associated factor</i>
tTAF	Testis-spezifisch exprimierter TAF
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBSTT	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 und Triton-X
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
TUNEL-Assay	engl. <i>terminal dUTP transferase nick end labeling assay</i>
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
U	Units
UAS	Upstream Activating Sequence
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volumen
v/v	engl. <i>volume per volume</i>
w/v	engl. <i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-thio-galaktosid
X- α -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- α -D-thio-galaktosid
X-Phosphat/ BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Y2H	Hefe-Zwei-Hybrid (engl. <i>yeast-two-hybrid</i>)

10 ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„In der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* wird das Chromatin-assoziierte Protein Mst77F in seiner Translation, in seiner Kernlokalisation und in seiner Chromatin-kompaktierenden Funktion über distinkte Bereiche kontrolliert.“

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe. Die vorliegende Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

(Sophie Kaiser)