

Das RNA-bindende Protein Orb2 und seine
regulatorische Funktion in der Spermatogenese
von *Drosophila melanogaster*

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)
im Fachbereich 18 Naturwissenschaften
der Universität Kassel

vorgelegt von Holger Starck
Kassel, im November 2007

Tag der Disputation: 17.12.2007

Referentin: Prof. Dr. M. A. Schäfer
Koreferent: Prof. Dr. W. Nellen

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als in der Dissertation angegebene Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil der Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, im November 2007

Holger Starck

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	1
1.	Einleitung	3
1.1.	Translationsregulation	3
1.2.	Die Spermatogenese bei <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.3.	An der Translationskontrolle sind spezifische Elemente beteiligt	10
1.4.	Das cytoplasmatische Polyadenylierungs Element Bindungsprotein (CPEB)	12
1.5.	Das <i>Drosophila</i> Orb ist ein CPEB homologes Protein	17
	Zielsetzung der Arbeit:	19
2.	Ergebnisse	21
2.1.1.	Das <i>Drosophila orb2</i> codiert für vier Transkripte und zwei Proteine	21
2.1.2.	Eine Sonde gegen <i>orb2</i> zeigt zwei prominente Banden in den Hoden	23
2.1.3.	Beide RNAs aus Hodengewebe lassen sich eindeutig zuordnen	24
2.1.4.	Das Transkript mit Exon 1b lässt sich durch RT-PCR nachweisen	26
2.1.5.	Ein interner poly(A)-Bereich lässt die Bestimmung der Länge des poly(A)-Endes von <i>orb2</i> nicht zu	27
2.1.6.	Der 3'-UTR von <i>orb2</i> ist länger als in Flybase angegeben	29
2.1.7.	<i>orb2</i> wird schon in männlichen Larven des 3. Stadiums transkribiert	30
2.1.8.	P-Element Remobilisierung führt zu einer männchensterilen <i>orb2</i> -Linie	31
2.1.9.	Der männchensterilen Linie Jump out 10 (Jo10) fehlt das große der beiden <i>orb2</i> Transkripte	34
2.1.10.	Männchen der Jump out Linie 10 zeigen keine motilen Spermien	35
2.1.11.	Defizienzkreuzungen bestätigen Veränderungen im Bereich des Gens <i>orb2</i>	37
2.1.12.	Ein Transgen, das das große Protein kodiert, rettet den sterilen Phänotyp	39
2.1.13.	Das Transgen bildet ein 4,1 kb großes Transkript	41

2.1.14.	Eine größere Menge an kleinem Transkript kann das große ersetzen	42
2.1.15.	Eine PCR auf DNA von Wildtyp und Jump out-Linien zeigte keinen Unterschied	44
2.1.16.	Sequenzierung der PCR-Produkte der Jo-Linien	46
2.1.17.	Der 5'-Bereich von <i>orb2</i> zeigt keine Veränderung in der Sequenz	47
2.1.18.	Zwei neue P-Element Linien zeigen den gleichen Phänotyp wie Jo10	47
2.1.19.	<i>Orb2</i> mRNA findet sich in Spermatozyten	49
2.1.20.	RNAi und AS Linien von <i>orb2</i> führen zu sterilen Männchen	50
2.1.21.	Auch eine Kombination von <i>orb2</i> antisense und Jo10 Mutation führte nur zur weiteren Verringerung der RNA-Menge	54
2.1.22.	Erzeugung eines Fusionsproteins von <i>orb2</i> (pET41a und pBAD)	55
2.1.23.	Das Fusionsprotein läßt sich mit Enterokinase schneiden	56
2.1.24.	Versuch zur Rückfaltung des in Einschlußkörpern vorliegenden Fusionsproteins	57
2.1.25.	Die Orb2 Proteine finden sich in allen Stadien der Spermatogenese	59
2.1.26.	Das große Orb2 Protein findet sich in allen Stadien der Spermatogenese	60
2.1.27.	Das große Orb2-GFP-Fusionsprotein rettet den mutanten Phänotyp	62
2.1.28.	Das kleine Orb2-Protein ist schwächer exprimiert, persistiert aber länger	64
2.1.29.	Die Translation von <i>protamin A</i> und <i>B</i> scheint durch Orb2 kontrolliert zu werden	66
2.1.30.	Auch <i>mst77F</i> zeigt eine verfrühte Translation im <i>orb2</i> mutanten Hintergrund	70
2.1.31.	In <i>orb2</i> -Mutanten kommt es zu Co-Lokalisation von Histonen und Protaminen	71
2.1.32.	Die <i>protamin</i> -Gene und <i>mst77F</i> enthalten CPEs in ihren 5'-UTR	73
2.1.33.	Ein CoIP-Experiment mit ganzen Fliegen führt zu sehr komplexen Ergebnissen	74
2.1.34.	In der CoIP mit Hoden werden einige RNA-bindende Proteine entdeckt	75
2.1.35.	Die <i>protamin</i> -Transkripte lassen sich durch RT-PCR auf CoIP mRNA nachweisen	75
2.1.36.	<i>Protamin</i> mRNA zeigt sekundäre Polyadenylierung	77

2.2.	Ein genomweiter two-hybrid-screen identifiziert mögliche Interaktoren von Orb2	78
2.2.1.	Tob, ein möglicher Interaktionspartner von Orb2	79
2.2.2.	<i>Drosophila melanogaster</i> besitzt ein hodenspezifisches <i>tob</i> -Transkript	80
2.2.3.	<i>tob</i> antisense-Linien sind männchensteril	82
2.2.4.	Hoden der <i>tob</i> antisense-Linien zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die <i>orb2</i> -Mutanten	83
2.2.5.	Männchen mit <i>tob</i> antisense-Konstrukt im <i>orb2</i> -mutanten Hintergrund zeigen nur einen leicht verstärkten Phänotyp	85
2.2.6.	Das Protein Tob befindet sich in elongierenden Bündeln und reifen Spermien	88
2.2.7.	Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierungen zeigen eine postmeiotische Tob Transkription	90
2.2.8.	Im <i>orb2</i> mutanten Hintergrund liegt die <i>tob</i> mRNA verringert vor	92
2.3.	Ein möglicher Interaktionspartner von Orb2: Das Protein Gap	93
2.3.1.	Das <i>gap</i> Transkript läßt sich mittels Northern-Analysen kaum nachweisen	94
2.3.2.	Homozygote <i>gap</i> antisense-Männchen sind steril	95
2.3.3.	<i>gap</i> antisense-Männchen zeigen keine motilen Spermien	97
2.3.4.	Transheterozygote <i>gap</i> antisense-Männchen sind teilweise steril	98
2.3.5.	Das Gap Protein findet sich auf den Spermatidenbündeln und reifen Spermien	100
2.4.	Ein möglicher Interaktionspartner von Orb2: Das Protein Cup	102
2.4.1.	Eine Sonde gegen <i>cup</i> zeigt zwei Banden in Hoden- und eine in Ovarien- mRNA	103
2.4.2.	Das Cup Protein findet sich in allen Stadien der Spermatogenese	104
2.4.3.	Männchen einer <i>cup</i> RNAi-Linie sind steril	106
2.4.4.	<i>cup</i> RNAi-Männchen zeigen keine reifen Spermien	107

3.	Diskussion	109
3.1.	<i>Orb2</i> mutante Männchen zeigen Defekte in der Individualisierung der Spermatiden sowie Kerndefekte	109
3.2.	Auswirkungen des RNAi-Konstruktes von <i>orb2</i> auf <i>orb</i>	113
3.3.	Im <i>orb2</i> mutanten Hintergrund werden die Protamine und Mst77F zu früh translatiert	114
3.4.	Warum erfolgt die Fehlexpression der Protamine nicht schon viel früher?	115
3.5.	Kontrolliert Orb2 eine Fülle von mRNAs ?	116
3.6.	Mit massenspektrometrischen Untersuchungen konnten bisher keine Interaktionspartner von Orb2 im Hoden nachgewiesen werden	119
3.7.	Eine Interaktion von Orb2 und Tob erscheint wahrscheinlich	121
3.8.	Eine Interaktion von Orb2 mit Gap und Cup kann nicht ausgeschlossen werden	123
4.	Methoden	126
4.1.	Fliegenzucht	126
4.1.1.	Fliegenstämme	126
4.1.2.	Zuchtbedingungen und Herstellung des Fliegenbreis	126
4.1.3.	Präparation von Organen	127
4.1.4.	Fertilitätstest	127
4.1.5.	Überprüfung der Spermienmotilität	127
4.2.	DNA Klonierungstechniken	128
4.2.1.	Verwendete Vektoren	128
4.2.2.	Single-Fly-DNA Extraktion	128
4.2.3.	Isolierung genomischer DNA aus ganzen Fliegen	129
4.2.4.	PCR Techniken	130
4.2.5.	RT-PCR (Abgene, Reverse iT One-Step RT-PCR Kit)	131
4.2.6.	PCR-Produkt-Reinigung	132
4.2.7.	Anhängen von Adenosinen an PCR-Produkte	133
4.2.8.	„Polishing“ von PCR-Produkten	133

4.2.9.	Behandlung mit alkalischer Phosphatase	133
4.2.10.	Ligation	133
4.2.11.	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	134
4.2.12.	Überprüfung von kompetenten Zellen	135
4.2.13.	Transformation von DNA in <i>Escherichia coli</i>	135
4.2.14.	Transformation in <i>E. coli</i> Novablue GigaSingles	135
4.2.15.	Transformation in elektrokompente <i>E. coli</i> DH5 α	136
4.2.16.	Blau-Weiß-Selektion	136
4.2.17.	Plasmid-Minipräparation	137
4.2.18.	Plasmid Midipräparation mit EZNA-Kit	138
4.2.19.	Plasmid Midipräparation Quiagen-Kit	138
4.2.20.	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	138
4.2.21.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	138
4.2.22.	DNA-Fragment-Isolierung aus Agarosegelen	139
4.2.23.	DNA-Sequenzierung	139
4.3.	RNA-Techniken	142
4.3.1.	Isolierung von poly(A)-RNA	142
4.3.2.	Isolierung von poly(A)-RNA aus Larve 3	143
4.3.3.	Auftrennung von RNA Fragmenten in denaturierenden Formaldehyd- Agarosegelen	143
4.3.4.	Transfer von RNA auf Nylonmembranen	144
4.3.5.	<i>In vitro</i> -Transkription	145
4.3.6.	Hybridisierung an Northern-Transfers	145
4.3.7.	Entfernung von Signalen auf Northern-Membranen	146
4.3.8.	RNaseH Northern	147
4.4.	Proteinchemische Methoden	147
4.4.1.	Fällung mit Trichloressigsäure	147
4.4.2.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	148
4.4.3.	Comassiefärbung	149
4.4.4.	Silberfärbung	149
4.4.5.	“Semidry”- Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran	150

4.4.6.	Ponceau S-Färbung	150
4.4.7.	Antikörpernachweis mittels Chemilumineszenz	151
4.4.8.	Expression von rekombinanten Proteinen	151
4.4.9.	Enterokinasebehandlung des Fusionsproteins	153
4.4.10.	Bindung von Fusionsprotein an S-Tag Agarose	153
4.4.11.	Aufreinigung des Fusionsproteins an Magne His Magnetpartikel	154
4.4.12.	Proteinexpression im Retikulozythenlysät	154
4.4.13.	Formaldehyd-Crosslink	155
4.4.14.	Proteinextraktion aus <i>Drosophila</i> -Gewebe	155
4.4.15.	Co-Immunpräzipitation (Co-IP) mit ganzen Tieren zur Isolierung gebundener Proteine	155
4.4.16.	Co-Immunpräzipitation mit Hoden zur Isolierung mit Orb2 gebundener Proteine	157
4.4.17.	Co-Immunpräzipitation zur Isolierung von Orb2 gebundenen mRNAs	158
4.5.	P-Element-vermittelte Keimbahntransformation	158
4.5.1.	Ernte von Embryonen	159
4.5.2.	Vorbereitung der DNA und Injektion	159
4.5.3.	Etablierung transgener Linien	160
4.6.	Histochemische Nachweismethoden	161
4.6.1.	<i>In situ</i> -Hybridisierung	161
4.6.2.	Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung von Organen	161
4.6.3.	X-Gal-Färbung von Organen	163
4.6.4.	Hoechst / Phalloidin-Färbung von Hodengewebe	163
4.6.5.	Antikörperfärbung an Hoden Quetschpräparaten	164
4.7.	Verwendete Marker	165
5.	Literatur	166
6.	Abkürzungen	184

7.	Anhang	187
7.1.	Proteine aus den CoIP-Experimenten, die vermutlich an Regulationsmechanismen in der Spermatogenese beteiligt sind	187
7.2.	Ergebnisse des Co-Immunpräzipitationsexperimentes mit ganzen Tieren	190
7.3.	Ergebnisse des Co-Immunoprecipitationsexperimentes mit Hoden	196
7.4.	Sequenzvergleich Orb2 Jo10 mit Wildtyp (Oregon R) Sequenz	201
7.5.	Lage der Primer, die für die Untersuchung des Proteins Orb2 verwendet wurden	202
7.6.	Lage der Primer, die für die Untersuchung des Proteins Tob verwendet wurden	206
7.7.	Lage der Primer, die für die Untersuchung des Proteins Gap verwendet wurden	208
7.8.	Lage der Primer, die für die Untersuchung des Proteins Cup verwendet wurden	210
7.9.	Schematische Darstellung des Testis expression Vektors	212

Danksagung

Zusammenfassung

Das Protein Orb2, welches zum *Xenopus* CPEB homolog ist, erfüllt während der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* eine wesentliche Funktion. Das teilweise Ausschalten von orb2 führt zu Störungen in der Individualisierung der Spermatiden, Veränderung in der Morphologie und Lokalisation der Spermatidenkerne und damit verbunden zu männlicher Sterilität. Der weit gestreute Phänotyp spricht für eine regulatorische Funktion des Proteins, wie es aufgrund der Homologie zu CPEB zu erwarten ist. Orb2 mutante Weibchen zeigen dagegen keinen Phänotyp. Die Sterilität konnte mit spezifischen Rettungskonstrukten rückgängig gemacht werden, wobei die beiden Proteinformen in ihrer Funktion höchstwahrscheinlich äquivalent sind, da eine größere Menge an kleinem Protein das Fehlen des größeren ausgleichen kann. Beide Proteinformen lokalisieren in fast alle Stadien der Spermatogenese, wobei nur das kleinere auch in reifen Spermien persistiert.

Zur Untersuchung der regulatorischen Funktion des Proteins Orb2 wurden zunächst drei mögliche Protein-Interaktionskandidaten analysiert. Obwohl ähnliche mutante Phänotypen in Gap und Cup ausgelöst wurden, lässt sich eine Interaktion bis jetzt mit diesen Kandidaten weder ausschließen noch bestätigen. Daneben zeigte das Protein Tob eine ähnliche Lokalisierung und einen deutlich ähnlicheren mutanten Phänotyp, wie er für Orb2 beschrieben wurde. Besonders auffällig ist die Lokalisation der Tob mRNA an die Spermatidenenden und die Verringerung der Transkriptmenge in der orb2-Mutante. Ob dieser Phänotyp durch den Verlust der regulatorischen Funktion von Orb2 hervorgerufen wird oder durch den späten Zeitpunkt der Transkription bedingt ist, muß in späteren Experimenten geklärt werden.

Mit Hilfe eines Co-Immünpräzipitations-Experimentes wurde nach weiteren Proteininteraktionspartnern sowie nach Ziel-mRNAs gesucht, die durch Orb2 reguliert werden könnten. Dabei ergaben die massenspektrometrischen Analysen zwar Proteine, die mit der Translation selbst in Zusammenhang stehen, sowie einige regulatorische RNA-bindende Proteine, wiesen aber auch in Gestalt eines häufig nachgewiesenen Anhangsdrüsenproteins auf deutliche systematische Probleme hin.

Auf genetischem Wege war bereits der Nachweis gelungen, dass die Protamine und *mst77F*, die strukturelle Komponenten der kompaktierten Kern-DNA sind, durch Orb2 in ihrer Translation reprimiert werden. Dieses Ergebnis wurde zum Teil bestätigt durch den Nachweis der Protamin mRNAs in den Eluaten aus dem Co-Immunitätspräzipitationsexperiment. Damit konnte zum ersten Mal in der *Drosophila* Spermatogenese das regulatorische Protein zu einer translationskontrollierten mRNA identifiziert werden.

1. Einleitung

1.1. Translationsregulation

Translationsregulation ist ein wichtiger Bestandteil der Genregulation, die eine Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen bei Eukaryoten kontrolliert, wie z.B. die Eisen-Homöostase in Säugetieren oder das Umschalten von Spermien- zur Oocytenentwicklung in *Caenorhabditis elegans* (Gray und Wickens, 1998; Dean *et al.*, 2002). In den dotterreichen Eiern der Metazoen, in denen die frühen embryonalen Stadien ablaufen, bevor die embryonale Transkription startet, wird die Entwicklung durch eine zeitlich und räumlich gesteuerte Translation von maternal gelieferten mRNAs vorangetrieben. Diese müssen bis zu ihrer Verwendung reprimiert werden (Groisman *et al.*, 2001). Auch in *Drosophila melanogaster* wird eine Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen durch Translationsregulation gesteuert. Zu diesen gehören unter anderem die Embryogenese, der Fettmetabolismus und die Dosiskompensation, die durch das Protein Sex-lethal kontrolliert wird (Penalva und Sanchez, 2003). Das Protein dFMR1, das ein Homolog zum humanen fragile X mental retardation protein darstellt, kontrolliert die Translation von verschiedenen mRNAs, die im Nervensystem und den Hoden eine Rolle spielen (Morales *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). Während der Embryogenese ist für die Entwicklung der Körpermusterung eine koordinierte Translation von *oskar*, *gurken* und *nanos* mRNAs in unterschiedlichen Bereichen des Embryos essentiell (zusammengefasst in Wilhelm und Smibert, 2005).

Translationskontrolle spielt immer dann eine wichtige Rolle, wenn das Genom für die Transkription nicht zur Verfügung steht, wie z. B. nach der DNA-Kompaktierung in der Spermatogenese von *Drosophila* (Dean *et al.*, 2002). Da bei der Spermatogenese die Transkription nach der meiotischen Prophase weitestgehend endet, sind die Prozesse der meiotischen Teilungen und der Spermiogenese angewiesen auf vorsynthetisierte mRNAs (Olivieri und Olivieri, 1965). So benötigen die komplexen morphologischen Prozesse, die zur Bildung eines reifen funktionsfähigen Spermiums durchlaufen werden, eine große Anzahl von Proteinen, die zur richtigen Zeit am richtigen Ort translatiert werden müssen (zusammengefasst in Renkawitz-Pohl *et al.*, 2005). Somit muss eine große Anzahl an mRNAs nach ihrer Synthese gelagert, unter Translationskontrolle gehalten und selektiv zu spezifischen Zeitpunkten während der

Spermiogenese translationell aktiviert werden. Dies lässt vermuten, dass Translationsrepression ein sehr generelles Phänomen während der Spermatogenese ist und es allgemeine Kontrollelemente (*cis*- und *trans*-agierend) gibt, die für viele mRNAs verwendet werden (zusammengefasst in Renkawitz-Pohl *et al.*, 2005). Da die Hoden von *Drosophila* leicht zu präparieren und Mutationen, die zu Spermatogenesedefekten führen, gut mikroskopisch zu untersuchen sind, stellt die Spermatogenese in *Drosophila* ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der Translationskontrolle dar.

1.2. Die Spermatogenese bei *Drosophila melanogaster*

Der männliche Reproduktionsapparat von *Drosophila melanogaster* besteht aus zwei Hodenschläuchen, die einen geraden apikalen und einen gewundenen basalen Bereich besitzen (Abb. 1). In ihnen findet die Keimzellentwicklung statt. Sie sind jeweils mit einer Samenblase verbunden, in der die reifen Spermien bis zur Begattung aufbewahrt werden (Abb. 1). Die Samenblasen münden in einen Ausführgang, in den ebenfalls die Anhangsdrüsen, die Paragonien, münden. Diese liefern ein Sekret, das zusammen mit den Spermien abgegeben wird und deren Fertilität erhöht.

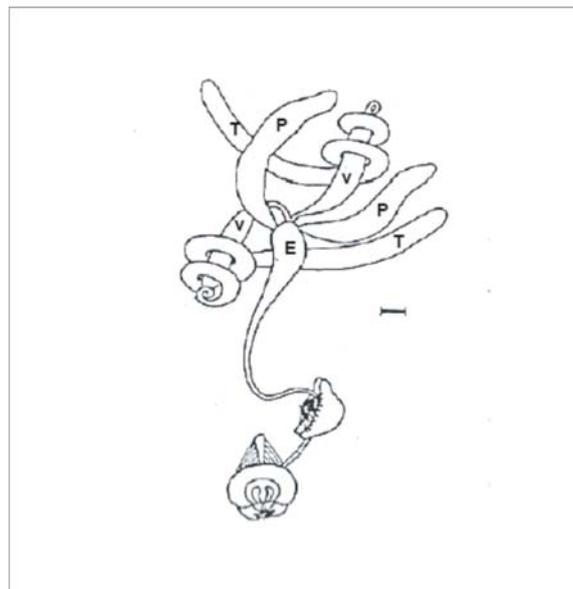


Abb. 1: Der männliche Reproduktionsapparat von *Drosophila melanogaster* (aus Lindsley und Tokuyasu, 1980, verändert). T= Hodenschlauch, V= Samenblase, P= Paragonium (Anhangsdrüse), E= Ausführgang. Der Balken repräsentiert 0,1 mm.

Durch bestimmte Proteine, besonders das Sexpeptid, die sich in diesem Sekret befinden, beeinflusst das Männchen für eine kurze Zeit das Verhalten und die Physiologie des Weibchens. Die Weibchen zeigen eine erhöhte Eiablage, was durch das Accessory gland protein 26Aa und das Sexpeptid ausgelöst wird, ein geringeres Interesse an einer erneuten Paarung, ebenfalls durch das Sexpeptid gesteuert und eine geringere Lebenserwartung. Zudem speichert das Weibchen die Spermien des Partners im Receptaculum seminis und den Spermatheken, hervorgerufen durch das Protein Acp35DE (zusammengefasst in Wolfner, 1997).

Die Hoden von *Drosophila* enthalten eine kleine Anzahl von Keimbahnstammzellen (16 bis 18 in den Larven, 5 bis 9 in den Adulten). In der apikalen Spitze des adulten Hodenschlauchs sind die Keimbahnstammzellen von einer Gruppe von spezialisierten somatischen Zellen, die als Stammzellnische oder Hub bezeichnet werden, umgeben (Hardy *et al.*, 1979). Nach der Teilung der Stammzellen verbleibt eine Tochterzelle als Stammzelle, während die andere zur Spermatogonie wird. Die Keimbahn-Stammzellen sind umgeben von somatischen Stammzellen, die als Zystenvorläuferzellen bezeichnet werden, auch mit dem hub im Kontakt stehen und sich ebenfalls asymmetrisch teilen, um neue Zystenvorläuferzellen und Zystenzellen zu produzieren. Zum Erhalt des Stammzellcharakters beider Zelllinien wird die Funktion des Jak-Stat-Signalwegs (Janus kinase signal transducers and activators of transcription) benötigt (Kiger *et al.*, 2001, Tulina und Matunis, 2001). Dieser Signalweg ist hoch konserviert und bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt. Der Jak Ligand unpaired (Upd) wird in den somatischen Hub-Zellen exprimiert und aktiviert den Jak-Stat-Signalweg in der angrenzenden Stammzell-Tochter durch die Bindung an den Upd Rezeptor domeless (Dome), welcher die Janus-Kinase hopscotch (Hop) und den Transkriptionsfaktor Stat92E aktiviert. Diese Aktivierung veranlaßt die Zelle dazu, ihren Stammzellcharakter zu behalten (zusammengefasst in Renkawitz-Pohl *et al.*, 2005). Jede Spermatogonie wird von zwei Zystenzellen umgeben. Diese Zystenzellen teilen sich nicht mehr, differenzieren allerdings mit den Keimzellen und ihren mitotischen und meiotischen Nachkommen während der gesamten Spermatogenese. Die Gesamtheit zweier Zystenzellen mit den Nachkommen einer Spermatogonie wird als Zyste bezeichnet und ist die Basiseinheit der Keimzellentwicklung. Die Zystenzellen von *Drosophila* können als Äquivalent zu den Sertoli-Zellen in Säugetieren angesehen werden. Wie die Sertoli-

Zellen durchlaufen die Zystenzellen eine Differenzierung, die an der Expression von stadienspezifischen Genen festgestellt werden kann, während die Keimzellen die Spermatogenese durchlaufen (Jung *et al.*, 2007). Die Keimzellen entfernen sich von der Spitze, wenn neue Zellen gebildet werden, und beginnen mit der Meiose in dem Bereich, in dem die Windung des Hodenschlauchs anfängt. Während der Elongation der Spermatiden dehnen sich ihre Schwänze im Lumen zum apikalen Ende hin aus, während sich die Kerne auf das basale Ende hin bewegen. So füllen späte Spermatiden fast den gesamten Hodenschlauch aus (zusammengefasst in Fuller, 1998). Die Keimzellentwicklung in *Drosophila* ist sehr ähnlich zur Spermatogenese in Säugetieren. Bei beiden teilt sich eine Gruppe von selbsterneuernden Stammzellen während des gesamten reproduktiven Lebens des Organismus, um eine Stammzell-Population aufrechtzuerhalten und um Spermatogonien zu bilden. Die Spermatogenese von *Drosophila* beginnt mit vier synchronen mitotischen Teilungen, aus denen eine Zyste mit 16 Spermatogonien, eingeschlossen in zwei Zystenzellen, resultiert (Abb. 2). Die Zytokinese ist bei diesen Teilungen unvollständig, so dass die Keimzellen durch stabile interzelluläre Brücken verbunden bleiben, die als Ringkanäle bezeichnet werden (Lindsley und Tokuyasu, 1980). Eine membranreiche Struktur, die Spektrin enthält und Fusom genannt wird, erstreckt sich durch die interzellulären Brücken in jede Keimzelle der Zyste. Die stabilen Brücken sind möglicherweise notwendig, um den Zellzyklus und die Synchronie in der Entwicklung unter den Keimzellen einer Zyste aufrechtzuerhalten. In Organismen, in denen Transkripte während der haploiden Phase der Spermatogenese gebildet werden, sind die interzellulären Brücken wichtig, damit jede Zelle die gleichen Genprodukte erhält (Caldwell und Handel, 1991). Nach den vier Teilungen beenden die 16 miteinander verbundenen Zellen die Mitosen und beginnen das meiotische Programm. Das Umschalten von Mitose zu Meiose ist in *Drosophila* abhängig von den Genen *bam* (*bag of marbles*) und *bgcn* (*benign gonial cell neoplasm*) in den Keimzellen und TGF β (transforming growth factor β) signaling der Zystenzellen (Ayyar *et al.*, 2003; zusammengefasst in Renkawitz-Pohl *et al.*, 2005). Die Zellen durchlaufen synchron die prämeiotische S-Phase und beginnen die meiotische Prophase als primäre Spermatozyten. Die Phase als primäre Spermatozyten dauert in *Drosophila melanogaster* ungefähr 3,5 Tage (Lindsley und Tokuyasu, 1980). Während dieser Zeit wächst der Zellkern um das 25-fache und es findet extensive Genexpression statt. Es kommt zur Ausbildung von Lampenbürstenschleifen am Y-Chromosom, die

essentiell für die Fertilität sind (zusammengefasst in Hackstein und Hochstenbach, 1995). Am Ende des Wachstums der primären Spermatozyten endet die Transkription fast vollständig und die 16 Spermatozyten durchlaufen synchron die Meiose I und II, was zu einer Zyste mit 64 untereinander verbundenen Spermatiden führt (Abb. 2). Danach durchlaufen die Spermatiden einen Differenzierungsprozess mit starken morphologischen Veränderungen, die fast alle zellulären Komponenten betreffen (Lindsley und Tokuyasu, 1980) (Abb. 2).

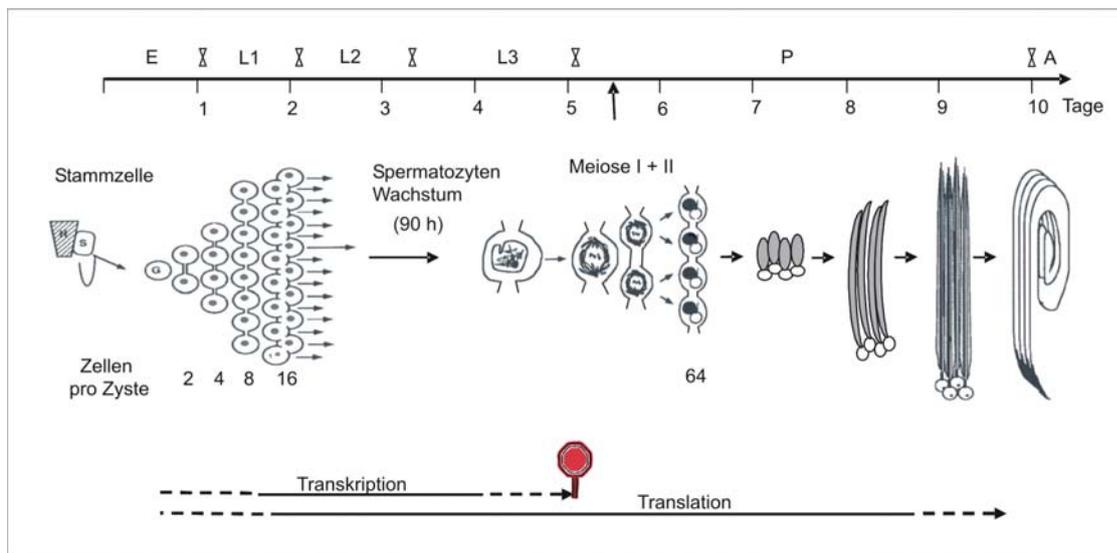


Abb. 2: Spermatogenese bei *Drosophila melanogaster* (modifiziert nach Fuller, 1993)
(E= Embryo, L1-L3= Larve 1-3, P= Puppe, A= Adult)

Der Beginn der Spermatidendifferenzierung wird reguliert durch ein stadien- und gewebsspezifisches Transkriptionsprogramm, welches durch die Gene *aly* (always early), *can* (cannonball), *mia* (meiotic arrest) und *sa* (spermatocyte arrest) kontrolliert wird (White-Cooper *et al.*, 1998; Jiang und White-Cooper, 2003). Die DNA kondensiert und der Zellkern nimmt eine nadelförmige Struktur an (Lindsley und Tokuyasu, 1980; Tokuyasu, 1974). Dabei werden die Histone zuerst durch Transitionsproteine und dann durch Protamine ersetzt (zusammengefasst in Rathke *et al.*, 2007). Nach Abschluß der Chromatinkondensation und der Kernverlängerung hat sich das Kernvolumen im Vergleich zur frühen Spermatide um das zweihundertfache reduziert (Tates, 1971). Während der zwei meiotischen Teilungen werden die Mitochondrien gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Nach der Telophase II aggregieren die Mitochondrien jeder frühen Spermatide zu zwei Riesenmitochondrien, die schichtweise ineinandergelagert werden, so dass ihre Struktur im Querschnitt zwiebelartig wirkt (Lindsley und Tokuyasu, 1980). Die fusionierten Mitochondrien werden als

Nebenkern bezeichnet, da sie in ihrer Größe mit dem Zellkern vergleichbar sind. Während der Phase der Elongation bildet jedes Spermatid ein Flagellum aus, das das Axonem enthält und für die Beweglichkeit zuständig ist. Das Axonem ist eine komplexe Mikrotubuli-basierte Organelle, die aus einem einzelnen Basalkörper an der Basis des Kerns entsteht. Während dieser Phase trennen sich die beiden Riesenmitochondrien wieder und verlängern sich als großes und kleines Mitochondrienderivat entlang des Axonems, vermutlich über die gesamte Länge des Spermischwanzes von 1,8 mm (Lindsley und Tokuyasu, 1980). Beide Mitochondrien durchlaufen ein anderes Schicksal (Tates, 1971; Tokuyasu, 1974). Während das große in den reifen Spermien zu finden ist, wird das kleine während der Individualisierung entfernt (Tokuyasu *et al.*, 1972). An der Basis des Hodenschlauchs inserieren die Kopfzystenzellen und die Spermatidenkerne in einem spezialisierten Gewebe, dem Terminalepithel (Lindsley und Tokuyasu, 1980). Da die Spermatozyten sich, wie oben beschrieben wurde, in einem Syncytium entwickeln und reifen, erfordert das letzte Stadium der Spermatogenese die Auflösung der Zyste in einzelne Gameten durch das Umgeben jeder einzelnen Spermatide mit einer eigenen Plasmamembran. Ein Prozess, der als Individualisierung bezeichnet wird (Lindsley und Tokuyasu, 1980; Kierszenbaum, 1994).

Die Individualisierung geschieht durch eine Struktur, die als „investment cone“ bezeichnet wird und die auf Aktin/ Myosin VI basiert (Hime *et al.*, 1996; Hicks *et al.*, 1999). Innerhalb des Komplexes co-lokalisiert Myosin VI mit dem „actin polymerization regulatory protein cortactin“ und dem actin related protein 2/3 (Arp2/3) (Fabrizio *et al.*, 1998). Der Individualisierungs-Komplex (IC) besteht aus einem koordinierten Zusammenschluß der einzelnen „investment cones“, die sich um die Spermatidenkerne bilden (Tokuyasu *et al.*, 1972; Fabrizio *et al.*, 1998). Ein dichtes Netzwerk von Aktin lokalisiert an die kegelförmige Struktur, die sich um jedes Axonem innerhalb der IC bildet (Hicks *et al.*, 1999; Noguchi und Miller, 2003) (Abb. 3). Jedes Spermatid wird dabei von einem einzelnen „investment cone“ individualisiert. Der IC bildet eine Ausbuchtung in der Zyste (cystic bulge) (Abb. 3), verursacht durch eine Anhäufung von Cytoplasmamaterial. Dieses wird zwischen den Spermatidenschwänzen entfernt, während der IC sich entlang der Spermatidenbündel bis zum Ende der Schwänze bewegt. Der IC entfernt überschüssiges cytoplasmatisches Material durch die Aktivierung von Caspasen und

Apoptose-ähnlichen Vorgängen und remodeliert die Membranen während der Wanderung (Arama *et al.*, 2003). Der „cystic bulge“ ist zunächst klein, nimmt mit fortlaufender Individualisierung an Größe zu und dabei eine runde Struktur an. Die runde Struktur ist der sogenannte „waste bag“, der das gesamte abgestreifte Cytoplasma und Organellen der syncytialen Spermatiden enthält. Die „waste bags“ lösen sich von den reifen, individualisierten Spermatiden, wenn sie das Ende der Schwänze erreicht haben (Noguchi und Miller, 2003). Nach Aufknäulung der Spermatiden und Auflösung der Zystenzellen wird der waste bag wahrscheinlich im Lumen der Hodenschläuche degradiert (Tokuyasu *et al.*, 1972). Die Individualisierung dauert 10 Stunden und die Durchschnittsgeschwindigkeit der Bewegung der IC beträgt 3 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Noguchi und Miller, 2003).

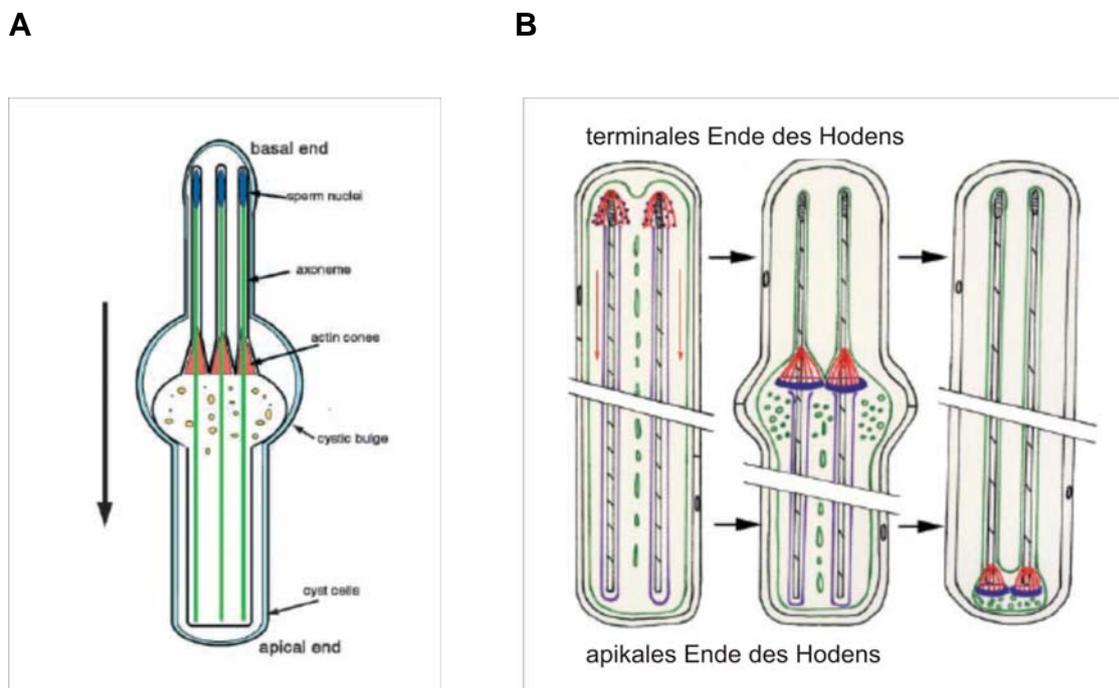


Abb. 3: Schematische Darstellung der Wanderung der IC entlang der Spermatidenbündel

A: Schematische Darstellung einer elongierten Zyste (aus Noguchi und Miller, 2003). **B:** Schematische Darstellung der Wanderbewegung der Individualisierungskomplexe (aus Hicks *et al.* 1999).

Die große Anzahl an männchensterilen Mutanten, die einen späten Block in der Spermatogenese zeigen, und bei denen stark verlängerte Zysten nicht individualisiert werden, lässt vermuten, dass dieser Prozess eine Vielzahl von Genaktivitäten benötigt. Die massive Reorganisation des Cytoplasmas in der Zyste während der Individualisierung deutet darauf hin, dass eine Vielzahl von Funktionen ablaufen, die eine sehr gute Koordination im Cytoplasma erfordern. *Drosophila* ist ein exzellenter Modellorganismus zur Untersuchung der Individualisierung, da jede Zyste gut von

den anderen unterschieden werden kann, alle Entwicklungsstadien zur gleichen Zeit vorhanden sind und ihre räumliche Verteilung das Stadium ihrer Entwicklung widerspiegelt. Zudem läuft der Vorgang der Individualisierung synchron ab (zusammengefasst in Fuller, 1993).

Der gesamte Prozess der Spermatogenese dauert etwa 10 Tage (Abb. 2). Dabei liegen im adulten Wildtyphoden ständig alle Spermatogenesestadien vor, wobei einige wegen ihrer kurzen Dauer in geringerer Zahl vorliegen als andere (Fuller, 1993).

1.3. An der Translationskontrolle sind spezifische Elemente beteiligt

Von einer Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen in der Spermatogenese ist bekannt, dass sie unter Translationskontrolle stehen. Wie sie kontrolliert werden und welche Faktoren daran beteiligt sind, ist in vielen Fällen allerdings unklar. Die ersten Gene von denen bekannt war, dass ihre Transkripte kontrolliert werden, war die *Mst(3)CGP*-Familie, die aus sieben Mitgliedern besteht und für Proteine aus dem Spermischwanz codiert. Sie werden alle in dem Spermatozytenstadium transkribiert, aber erst zu einem späten Stadium der Spermatogenese translatiert, wenn die Spermatisen sich vollständig elongiert haben (Schäfer *et al.*, 1990, 1993; Kuhn *et al.*, 1991). Die Gene dieser Familie enthalten im 5'-UTR ein 12 Nukleotide langes Translations-Kontroll-Element (TCE), das Regulation auf der DNA und RNA Ebene zulässt (Kempe *et al.*, 1993). Dieses Element ist an der Translationsrepression und an der Aktivierung der Transkription beteiligt. Dementsprechend erfolgt die Bindung von Proteinen an das TCE auf der DNA- und auf der RNA-Ebene (Kempe *et al.*, 1993). Ein Verlust des Elementes führt zu einer verfrühten Translation. Proteine, die an der Bindung dieses Elementes beteiligt sind und die Translationsrepression vermitteln, konnten bisher aber nicht identifiziert werden. Einhergehend mit der translationellen Aktivierung ist die Verlängerung des poly(A)-Endes der mRNAs (Schäfer *et al.*, 1990; Juge *et al.*, 2002). Diese sogenannte sekundäre (oder cytoplasmatische) Polyadenylierung ist bei einer Reihe von mRNA mit der Translation verknüpft (zusammengefasst in Richter, 1999). Vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass bestimmte Sequenzen im 3'-UTR von spezifischen mRNAs Polyadenylierung und Translationsaktivierung in reifenden Oozyten von Fröschen und Mäusen

vermitteln. So führt die Verlängerung des poly(A)-Endes der mRNA zu einer Translationsaktivierung, während die Deadenylierung zu einer Inaktivierung führt. Die Oozyten fast aller Organismen enthalten viel mehr mRNAs als tatsächlich für die sofortige Proteinbiosynthese benötigt wird. Ein großer Teil dieser mRNA, der ruhend oder maskiert vorliegt, wird erst nach der Fertilisation benötigt. Zu diesem Zeitpunkt sowie zu späteren Zeiten in der Embryogenese werden verschiedene mRNA an Polysomen in einer sequenzspezifischen und oft auch ortsspezifischen Art und Weise rekrutiert. Normalerweise besitzen ruhende mRNA in den Oozyten von *Xenopus*, wie z.B. *mos* und *cyclin B1*, relativ kurze poly(A)-Enden, mit 20-40 Nukleotiden. Während der Reifung der Oozyten wächst das Ende von spezifischen mRNAs auf 80 bis 150 Nukleotide und die Translation beginnt. Andere mRNA wiederum, die einen poly(A)-Schwanz von 100 bis 200 Nukleotiden besitzen, werden während der Oozytenreifung deadenyliert, was zur Translationsrepression führt (zusammengefasst in Richter, 1999). Zwei Elemente im 3'-UTR von kontrollierten mRNAs sind wichtig für die sekundäre Polyadenylierung. Dies ist zum einen ein Polyadenylierungssignal mit der Konsensussequenz AAUAAA, welches ebenfalls wichtig für das Schneiden und die Polyadenylierung von prä-mRNA im Zellkern ist (McGrew und Richter, 1990; zusammengefasst in Richter, 1999). Das zweite beteiligte Element besteht aus einer U-reichen Sequenz, die sich häufig 20 Nukleotide 5' vor dem Polyadenylierungssignal befindet und die Konsensussequenz UUUUUUAU besitzt. Dieses Element wird als Cytoplasmatisches-Polyadenylierungs-Element (CPE) bezeichnet (zusammengefasst in Mendez, 2001) und wird in *Xenopus* vom Protein CPEB (Cytoplasmatisches-Polyadenylierungs-Element-Bindungsprotein) gebunden (Hake und Richter, 1994; Stebbins-Boaz *et al.*, 1996).

1.4. Das cytoplasmatische Polyadenylierungs Element Bindungsprotein (CPEB)

CPEB enthält zwei RNA-Erkennungsmotive und ein Zinkfingermotiv, die alle drei für die Bindung an CPE tragende mRNAs benötigt werden (Hake *et al.*, 1998).

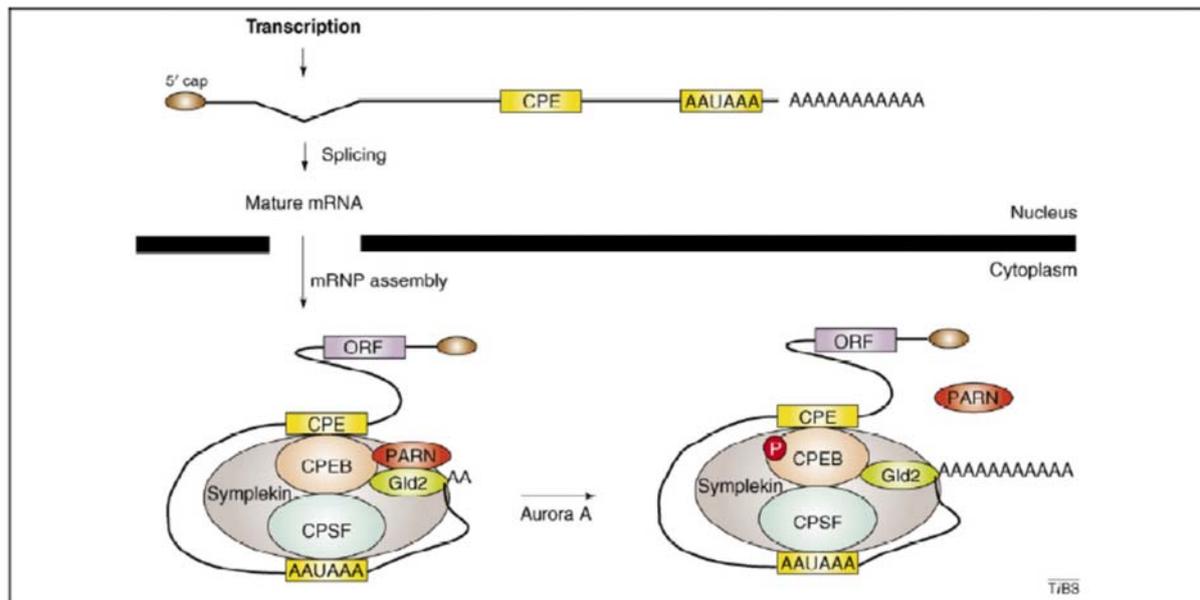


Abb. 4: CPEB regulierte sekundäre Polyadenylierung (Richter, 2007)

(mRNP= messenger ribonucleoprotein; ORF= open reading frame; CPEB= Cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element-Bindungsprotein; CPE= Cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element; CPSF= „Cleavage and polyadenylation specificity factor“; Gld2= poly(A)-Polymerase; P= Phosphat)

CPEB bildet eine Familie von Sequenz-spezifischen RNA-bindenden Proteinen, die zuerst durch ihre Rolle in der Lokalisation und Translationsregulation in der Gametogenese identifiziert wurden (Lantz *et al.*, 1992; Hake und Richter, 1994). Die meisten mRNA erhalten bevor sie den Zellkern verlassen ein langes poly(A)-Ende. Nach dem Kernexport interagieren aber nur die mRNA, die ein CPE enthalten mit dem Protein CPEB und anderen Interaktoren, die das meiste des poly(A)-Endes entfernen. Zu diesen Faktoren gehören Symplekin (Abb. 4), das ein mögliches Plattform Protein ist, auf dem sich Multiprotein-Komplexe aufbauen können und CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor), das an das Polyadenylierungssignal der mRNA bindet (Abb. 4) (Wilusz *et al.*, 1990; Barnard *et al.*, 2004). Des weiteren binden in dem Komplex die poly(A)-Ribonuklease (PARN), die deadenylierende Eigenschaft hat und GLD-2 (germ-line-development factor 2), eine poly(A)-Polymerase (Abb. 4) (Barnard *et al.*, 2004; Rouhana und Wickens, 2007). Sowohl PARN als auch GLD-2 sind aktiv, aber da PARN eine höhere Aktivität zeigt, wird der poly(A)-Schwanz entfernt, sobald er durch GLD-2 ergänzt wurde (Kim und Richter, 2006). So werden

die poly(A)-Enden von CPE enthaltene mRNA entfernt und verbleiben kurz. Nach der Phosphorylierung am Serin an der Position 174 und damit verbundener Aktivierung von CPEB durch die Kinase Aurora A, wird PARN aus dem Komplex entfernt, wodurch die Verlängerung des poly(A)-Endes durch GLD-2 erhalten bleibt (Kim und Richter, 2006).

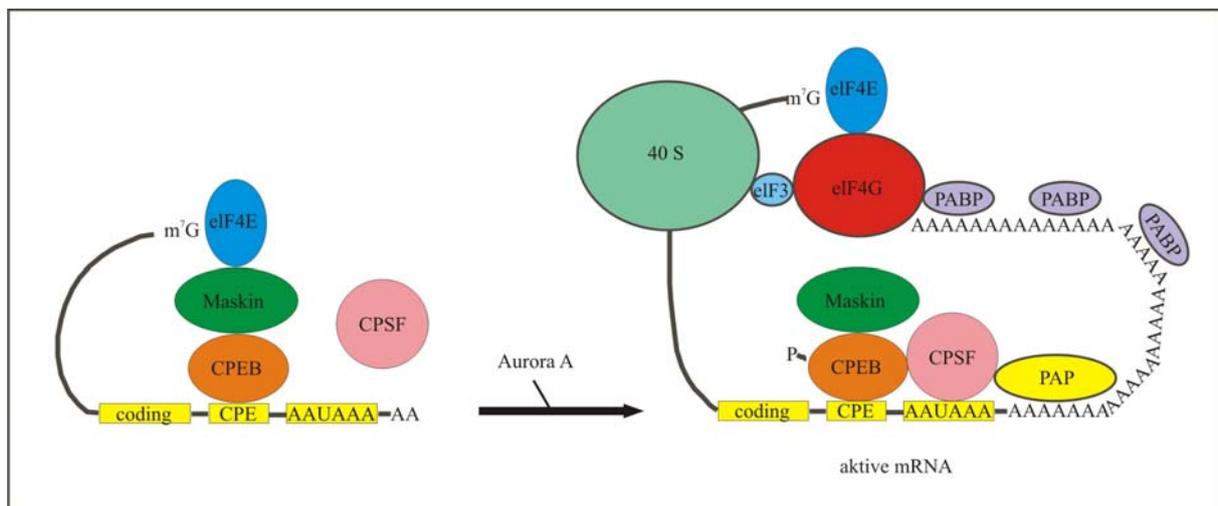


Abb. 5: Translationskontrolle in *Xenopus* durch CPEB (nach Cao und Richter, 2002)

(eIF4E= eukaryotischer Initiationsfaktor 4E; CPEB= Cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element-Bindungsprotein; CPE= Cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element; CPSF= Cleavage and polyadenylation specificity factor; 40S= ribosomaler Untereinheit 40S; PAP= Poly(A)-Polymerase; PABP= Poly(A)-Bindungsprotein; eIF4G= eukaryotischer Initiationsfaktor 4G; eIF3= eukaryotischer Initiationsfaktor 3; m⁷G=Cap-Struktur (7 methyl-Guanin); P= Phosphat)

Neben der Bindung an das CPE bindet CPEB an ein Protein, das Maskin, welches wiederum an den Cap-binding Faktor eIF4E bindet (Abb. 5) (Barnard *et al.*, 2005). Maskin enthält eine kurze Aminosäuresequenz, die ähnlich der in eIF4G und anderen eIF4E-Bindungsproteinen ist. So unterbindet Maskin die Interaktion von eIF4E mit eIF4G, welche essentiell für die Translationsinitiation ist, da sie die 40S ribosomale Untereinheit rekrutiert (zusammengefasst in Cao und Richter, 2002). Mit dieser Konfiguration von Faktoren (CPEB-Maskin-eIF4E) ist die Translation inaktiviert (Abb. 5). Die mRNA von Maskin unterliegt selbst der translationellen Kontrolle und zeigt eine schwache Bindung an CPEB (Meijer *et al.*, 2007). In *Xenopus* wird die Polyadenylierung induziert durch Progesteron, das an seinem Rezeptor bindet, der möglicherweise auf der Zellmembran sitzt (Bayaa *et al.*, 2000, Tian *et al.*, 2000). Diese Interaktion aktiviert die Kinase Aurora A (auch bekannt als Eg2) welche wiederum CPEB an Serin 174 phosphoryliert. Dies führt dazu, dass CPEB das Protein CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) rekrutiert und bindet, welches dann an das Polyadenylierungssignal binden kann und die

Poly(A)-Polymerase (PAP) an das Ende der mRNA lockt (Abb. 5) (Mendez *et al.*, 2000; Cao und Richter, 2002). PAP katalysiert die Verlängerung des poly(A)-Schwanzes, an den dann das PABP (poly(A) Bindungsprotein) bindet, welches wiederum mit eIF4G assoziiert und gemeinsam mit diesem das Maskin vom eIF4E verdrängt (zusammengefasst in Mendez und Richter, 2001). Dies erlaubt die Bindung von eIF4G an eIF4E und führt zur Translationsinitiation. So ist das CPEB sowohl verantwortlich für die Maskierung und Translationsrepression von mRNAs, als auch für deren Aktivierung (zusammengefasst in Richter 1999, Cao und Richter, 2002). An einem zweiten Aktivierungsmechanismus des CPEB während der Meiose sind die Proteine XGef und MAPK beteiligt (Martinez *et al.*, 2005; Keady *et al.*, 2007).

Das Protein CPEB ist hoch konserviert in Invertebraten und Vertebraten und an vielen unterschiedlichen Prozessen beteiligt. So ist CPEB in *Xenopus* und in Muscheln assoziiert mit der DEAD-box Helikase p54 (XP54, Clam P54) (Minshall *et al.*, 2001). Mitglieder der DEAD-box Helikasen sind beteiligt an einer Vielzahl von unterschiedlichen Prozessen, zu denen Spleißen, Ribosom-biogenese, RNA-Transport, Degradation und Translation gehört. Diese Enzyme verwenden NTP- (meist ATP-) Hydrolyse, um RNA-Duplices aufzulösen, um große RNA-Strukturen oder Protein-RNA-Interaktionen zu verändern (Minshall *et al.*, 2001). XP54 ist ein integraler Bestandteil von gespeicherten mRNP in Oozyten der Muschel, liegt in konstanten Mengen während der gesamten Oogenese vor und ist ein Shuttle-Protein, das zum Zellkern zu naszierenden Transkripten rekrutiert wird (zusammengefasst in Minshall und Standart, 2004). Die XP54 Helicase ist beteiligt an der Translationsrepression. In Oozyten werden mRNA, die ein CPE enthalten, reprimiert durch XP54, welches an CPEB gebunden ist (Minshall *et al.*, 2001). Dabei konnte in Abwesenheit von mRNA gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen CPEB und XP54 direkt ist (Minshall und Standart, 2004). Das *Drosophila* Homolog ist das Protein Me31B, das ebenfalls Funktionen in der Oogenese ausübt. Unter anderem ist es beteiligt an der translationellen Inaktivierung von *oskar* und *BicaudalD* mRNA (Nakamura *et al.*, 2001).

In den Neuronen von verschiedenen Invertebraten und Vertebraten kontrolliert CPEB die Translation und ist an der synaptischen Plastizität beteiligt und damit am Lernen und Erinnern. Es wird dabei vom NMDA (N-methyl-D-aspartate)-Rezeptor-Signalweg

durch Phosphorylierung am Threonin an Position 171 aktiviert (Huang *et al.*, 2002, 2006; Du und Richter, 2007). In Neuronen von Vertebraten interagiert es mit den molekularen Motoren Dynein und Kinesin zur Kontrolle von mRNA Bewegungen in den Dendriten (Huang *et al.*, 2003). Die Lokalisierung von mRNAs zu verschiedenen funktionellen Domänen innerhalb eines Neurons ist die Voraussetzung für den Prozess der Erinnerung. In den sensorischen Neuronen von *Aplysia* häuft sich *syntaxin* mRNA an den Axonhügelchen an neu gebahnten Synapsen von sensorischen Motorneuronen an. Syntaxin ist wichtig für die Funktion der Synapsen. Es ist beteiligt an der Freisetzung von Transmittern, der Vesikelfusion und der Aufrechterhaltung der Polarität (zusammengefasst in Liu *et al.* 2006). Der 3'-UTR von *syntaxin* enthält zwei Elemente, ein cytoplasmatisches Polyadenylierungselement (CPE), das mit dem CPEB interagiert, und eine Struktur, die einen Doppelstrang ausbildet, an den das Protein Staufen binden kann. Staufen ist ein RNA-bindendes Protein, das essentiell ist für die Entwicklung in *Drosophila*. Dort verteilt es mRNA im Ei und in teilenden Neuroblasten (zusammengefasst in Liu *et al.* 2006). Wird die Interaktion von *syntaxin* mit seinen RNA-bindenden Proteinen blockiert, kommt es nicht zu seiner Anhäufung am Axonhügel und nicht zu einer neuen Bildung von Synapsen. CPEB wird durch Serotonin hochreguliert und wird in den Neuronen benötigt, um *syntaxin* mRNA vom Zellkörper zum Axonhügel zu transportieren (zusammengefasst in Liu *et al.* 2006). Während CPEB für den Transport verantwortlich ist, übernimmt das Protein Staufen die Lokalisation von *syntaxin* an die Axonhügel (zusammengefasst in Liu *et al.* 2006). Auch im Mäusegehirn konnten zwei Mitglieder der CPEB-Familie gefunden werden (Theis *et al.*, 2003).

In den CPEB-Proteinen von Invertebraten findet sich ein ungewöhnlicher langer Bereich mit Glutamin-Resten (polyQ). Die Präsenz von polyQ in einer Sequenz kann zu einer Prion-Formation führen. Dies ist ein Protease-resistentes Protein-Polymer, das einige Krankheiten wie Alzheimer oder Huntington hervorruft. Das CPEB von *Aplysia* enthält solch eine Q-reiche Region, so dass die Hypothese aufgestellt werden kann, dass es dort als Prionen-ähnliche Struktur an Synapsen als Tag funktioniert, der erfahrene von unerfahrenen Synapsen unterscheidet (zusammengefasst in Richter, 2007).

Sowohl in Invertebraten wie in Vertebraten reguliert CPEB außerdem die Keimzellentwicklung. In Mäusen enthalten die mRNA für SCP1 und SCP3 (synaptonemal complex protein 1 und 3) CPEs und werden translatiert, wenn das CPEB an Threonin 171 (äquivalenter Rest zu Ser174 in *Xenopus*) phosphoryliert wird (Tay J. und Richter J.D., 2001). In Mäusen wird auch die Translation der mRNA von GDF-9 (germ-cell-derived factor 9) einem Mitglied der TGF β (transforming growth factor β) Familie durch CPEB kontrolliert. GDF9 wird benötigt für die Koordination der Entwicklung von Oozyte und Follikel (Loveland und Himes, 2005; Racki und Richter, 2006).

In der Spermatogenese bei Mäusen ist CPEB2 vermutlich an der Kontrolle von *sc32*-, *sc38*- und *actin*-mRNA in runden Spermatischen beteiligt. Diese enthalten CPE oder CPE-ähnliche Sequenzen im 3'-UTR, was für eine CPE-abhängige Translationsregulation in der Spermatogenese spricht (Kashiwabara *et al.*, 2002; Kurihara *et al.*, 2003).

In *Caenorhabditis elegans* ist das CPEB Homolog das Protein FOG-1. Es ist an der Bildung von Spermien beteiligt und kontrolliert deren Anzahl. Normalerweise existiert der Nematode als selbstbefruchtender XX Hermaphrodit oder als XO Männchen. Die Keimbahn der Hermaphroditen produziert zunächst Spermien und dann Oozyten. Dabei entsteht eine reproduzierbare Anzahl an Spermien, bevor zur Oogenese umgeschaltet wird. Die Entscheidung, ob Spermatogenese oder Oogenese durchgeführt wird, wird beeinflusst durch die Gene *fog-1* und *fog-3*, wobei letzteres ein Mitglied der Tob Genfamilie ist (Lamont und Kimble, 2007). Da sowohl *fog-1* wie auch *fog-3* CPE ähnliche Sequenzen im 3'-UTR enthalten, ist es möglich, dass beide mRNAs durch FOG-1 kontrolliert werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass FOG-1 und FOG-3 gemeinsam das Spermischicksal bestimmen oder aber auch dass sie in parallelen Signalwegen agieren (Lamont und Kimble, 2007).

CPEB co-lokalisiert in Säugetieren mit Argonaute in dcp-Bodies und eIF3 in Stress Partikeln. Beide Strukturen sind an der Aufbewahrung von mRNA und/oder an der Degradation beteiligt (Wilczynska *et al.*, 2005). Dies lässt vermuten, dass CPEB zusammen mit miRNAs an Translationsrepression beteiligt ist. Argonaute ist die Schlüsselkomponente von RISC (RNA-induced silencing complex) und prozessiert

ruhende mRNAs (Parker *et al.*, 2006). eIF3 ist mit verschiedensten Faktoren assoziiert, darunter eIF4G und der 40S ribosomalen Untereinheit während der Translationsinitiation (Hinnebusch, 2006). Sowohl in den „dcp-bodies“ wie auch „den stress granules“ befindet sich auch das rck/p54 DEAD box Protein, das wie oben beschrieben ein Interaktionspartner von CPEB in *Xenopus* und *Spisula* ist (Wilczynska *et al.*, 2005).

1.5. Das *Drosophila* Orb ist ein CPEB homologes Protein

Das homologe Protein von CPEB in *Drosophila* ist das Protein Orb (oo18 RNA-binding protein). Es ist ein Keimbahn-spezifisches RNA-bindendes Protein und eines der Gründungsmitglieder der CPEB-Familie von Translationsrepressoren (Costa *et al.*, 2005). Orb wird in der Oogenese benötigt für die Bildung der 16 Zell-Zyste, der Oozytendifferenzierung und der Bildung der dorsoventralen sowie der anterior-posterio Achse im Ei und Embryo (zusammengefasst in Costa *et al.* 2005). Es ist in der Oogenese an der cytoplasmatischen Polyadenylierung von *oskar* mRNA beteiligt und stimuliert die Translation, so dass eine große Menge von Oskar Protein vorliegt. Oskar vermittelt die posteriore Musterung und die Bildung der Keimbahn (Lantz *et al.*, 1992; Castagnetti und Ephrussi, 2003). Orb ist eines der ersten Proteine, die in der Oozyte lokalisiert werden. Zur Ausbildung der posterioren Achse wird im Stadium 8-9 *oskar* (*osk*) mRNA von dem Doppelstrang-RNA bindenden-Protein Staufen zum posterioren Pol transportiert. Bei der Ankunft von *osk* befindet sich Orb schon in großen Mengen dort, um dessen Translation zu aktivieren (Chang *et al.*, 1999; zusammengefasst in Tan *et al.*, 2001). Bei der Abwesenheit von Orb, wird das Osk Protein nicht synthetisiert und die *osk* mRNA diffundiert weg. Orb scheint auch eine ähnliche Rolle bei der Bildung der dorsoventralen Polarität zu spielen. Hier kontrolliert es die Translation von *K(10)* und *gurken* (*grk*) mRNA (zusammengefasst in Tan *et al.*, 2001). In beiden Polaritätswegen befindet sich Orb schon an der richtigen Stelle bevor die mRNAs, die für die Achsenfestlegung benötigt werden, ankommen (Lantz *et al.*, 1994). Orb reguliert seine eigene Expression durch Sequenzen im 3'-UTR. Diese Selbstregulation sorgt dafür, dass große Mengen an Orb Protein an der benötigten Stelle vorliegen (Tan *et al.*, 2001). Dabei assoziiert Orb mit dem *Drosophila* Fragile X Mental Retardation (dFMR1) Protein, als ein Teil eines Ribonucleoprotein-Komplexes. dFMR1 wirkt dann als Repressor der orb

mRNA Translation (Costa *et al.*, 2005). Mutationen in *orb* führen zu einer frühen Blockierung der Oogenese (Lantz *et al.*, 1994).

Das Gen *orb* wird nur in der Keimbahn exprimiert und zeigt ovarien- und hodenspezifische Transkripte. Es enthält wie das CPEB von *Xenopus* zwei RRMs und ein Zinkfinger-Motif. Im Hoden akkumuliert die *orb* mRNA in den primären Spermatozyten und an den Schwanzenden der Spermatidenbündel (Lantz *et al.*, 1992). In den Ovarien zeigt das *orb* Transkript eine ungewöhnliche Verteilung. Zuerst läßt sich die *orb* mRNA in der Region 2 des Germariums entdecken, in Eikammern des 7. Stadiums ist es posterior in der Oozyte lokalisiert und während der Stadien 8-10 im anterioren Bereich der Oozyte asymmetrisch verteilt entlang der dorso-ventral Achse. In Embryonen häuft sich das Transkript im posterioren Teil an und wird in die Polzellen eingeschlossen (Lantz *et al.*, 1992).

```

Mus m.  GERIERFSRKVFVGGGLPPD IDEDEITASFRRFGPLVVDWPHKAESKSYFPPKGY
D.me l.  GDGTARFSRKVFVGGGLPPD IDEDEITTSFRRFGPLVVDWPHKAESKSYFPPKGY
Orb      YSPKVFLGGIPWDISEQSLIQIFKPFSGIKVEWEGKEQQAQ-PKGY

Mus m.  AFLLFQEESSVOALIDACIHE DGKLYLCVSSPTIKDKPVQIRPWNLSDSDFVMD
D.me l.  AFLLFQEESSVQQLIDSCITDEDKLYLCVSSPTIKDKAVQIRPWRLADADYVLD
Orb      VYIIFESDKQVKALLSACCLQVDNYFFKISSRRIKSKDVEVIPWI IADSNFVRS

Mus m.  GSQFLDPRTIFVGGVPRPLRAVELAMIMDRLYGGVCYAGIDTDPELKYPKGAGR
D.me l.  ATMSLDPRKVFVGGVPRPLKAFELAMIMDRLYGGVCYAGIDTDPELKYPKGAGR
Orb      SSQKLDPTKVFVGGALHGKLTAEGLGNIMDDLFDGVLVYAGIDTD-KYKYPIGSGR

Mus m.  VAFS NQOSYIAA ISARFVQLQHGDIDKRVEVKPYVLD DQMCDEC QGARC GGKFA
D.me l.  VAFS NQOSYIAA ISARFVQLQHGDIDKRVEVKPYVLD DQMCDECE GQRC GGKFA
Orb      VTFS NFRSYMKA VSAAF IEIRTTKFTKKVQVDPY-LEDALCSIC-----GVQHG

Mus m.  PFFCANVTCLOYYCEFCWANIHSRAGREFHKPLVKEGADRPRQIHFRW
D.me l.  PFFCANVTCLOYYCEHCWAVIHSRPGREYHKPLVKEGADRPRAVPFRW
Orb      PYYCRELSCFRYFCRSCWQWQHSCDIVKNHKPLTR

```

Abb. 6: Sequenzvergleich der C-terminalen Region von *Mus musculus* (*Mus m.*) CPEB2, *Drosophila* (*D. mel*) *Orb2* und von *Drosophila Orb*.

(In grün dargestellt sind die beiden RRMs, in gelb das zink finger Motif. Die grauen Bereiche stellen übereinstimmende Bereiche außerhalb der funktionellen Domänen dar.)

Ein weiteres CPEB Homolog in *Drosophila melanogaster* ist das Protein Orb2. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zeigte, dass es im Bereich der RNA-bindenden funktionellen Domänen eine wesentlich größere Homologie aufweist zu dem CPEB 2 von *Mus musculus*, als das in der Oogenese von *Drosophila* gut untersuchte Protein Orb.

Zielsetzung der Arbeit:

Da für das Gen CG5735/*orb2* von *Drosophila melanogaster* in Flybase sehr viele ESTs aus Hoden vorliegen und es eine große Homologie zu CPEB in *Xenopus* zeigt, sprach vieles für eine regulatorische Funktion dieses Proteins in der männlichen Keimbahn. Daher sollte zunächst eine allgemeine Transkriptanalyse erfolgen und auf diesen Ergebnissen aufbauend, mit spezifischen Sonden die Expression der verschiedenen Transkripte von Orb2 im Hodengewebe analysiert werden. Da das Gen *orb2* für zwei unterschiedliche Proteine kodiert, kann durch Erzeugung von transgenen GFP-Fusionslinien untersucht werden, in welchem Bereich sie lokalisieren und ob es Unterschiede im Verteilungsmuster gibt.

Um einen Einblick in die Funktion des Proteins Orb während der Spermatogene zu bekommen, sollten durch P-Element-Remobilisierung, antisense- und RNAi-Techniken mutante Fliegenlinien erzeugt werden. Ausgehend von den Aufgaben, die homologe Proteine in anderen Organismen ausüben, stellte sich die Frage, ob Orb2 ebenfalls eine generelle regulatorische Funktion hat und eine größere Zahl von mRNAs kontrolliert. Dazu werden durch kreuzungsgenetische Experimente mögliche Ziel-mRNAs von Orb2 gesucht. Eine mögliche Kontrolle durch Orb2 könnte sich im mutanten Hintergrund durch Veränderungen im Translationsmuster zeigen lassen.

Viele Kontrollaufgaben werden in Organismen durch Proteinkomplexe mit Bindungspartnern erfüllt. Mögliche Interaktionspartner von Orb2 sollten mit Hilfe eines Co-Immunpräzipitations-Experiments mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse gefunden werden. Zudem sollten co-präzipitierte, von Orb2 gebundene mRNAs isoliert und diese mit Hilfe von RT-PCR nachgewiesen werden.

In einem genomweiten two-hybrid-screen in *Drosophila* wurden die Proteine Tob und Gap als mögliche Interaktionspartner von Orb 2 gefunden (Giot *et al.*, 2003). Diese sollten, wie auch das Protein Cup, das mit dem Protein Orb in der Oogenese interagiert, auf Transkript- und Proteinebene analysiert und durch Erzeugung von mutanten Linien auf ihre Funktion in der Spermatogenese getestet werden.

2. Ergebnisse

2.1.1. Das *Drosophila orb2* codiert für vier Transkripte und zwei Proteine

Eine Vielzahl von Prozessen in Eukaryoten werden auf der Ebene der Translation reguliert. Zu diesen gehören unter anderem die männliche und weibliche Keimzellentwicklung und die Embryonalentwicklung. Ein an der Translationskontrolle beteiligtes, gut untersuchtes Protein ist das CPEB aus *Xenopus laevis*. Es spielt dort eine wichtige Rolle bei der Oogenese, in der es die Translation von mRNAs wie *mos* und *cyclin B1* kontrolliert (de Moor *et al.*, 1999). Auch in weiteren Organismen wie *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Aplysia californica* ist es gut untersucht und übernimmt neben Aufgaben in der Oogenese, Funktionen bei der Zellalterung, der synaptischen Plastizität in Neuronen und damit verbunden dem Lernen und Erinnern (Richter, 2007). Auch in der Spermatogenese spielt CPEB eine Rolle, wie Untersuchungen an *C. elegans* zeigten (Luitjens *et al.*, 2000; Lamont und Kimble, 2007). In *Drosophila melanogaster* ist ein homologes Protein zum *Xenopus* CPEB das Protein Orb. Es ist gut analysiert in der Oogenese, bei der es mRNAs lokalisiert und ihre Translation kontrolliert (Lantz *et al.*, 1992, Castagnetti und Ephrussi, 2003). Das zweite bisher nicht analysierte homologe Protein zu CPEB mit dem Namen Orb2 zeigt viele ESTs aus Hodengewebe, aber keine aus Ovarien. Die Vielzahl von Hoden ESTs führte uns zu der Frage, ob Orb2 eine Funktion in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* ausübt. Das Gen *orb2* befindet sich auf dem linken Arm des Chromosoms 3 an Position 66E4 und hat auf genomischer Ebene eine Größe von 12 kb. In der Datenbank Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu>) sind vier unterschiedliche Transkripte von *orb2* angegeben, denen allen das fünfte Exon gemein ist (Abb. 7). Zwei dieser Transkripte zeigen nur geringe Unterschiede im Exon 1 gefolgt von den anderen 4 Exons des Gens. Diese sind laut Datenbank 3207 nt (Orb-RC) und 3185 nt (Orb-RD) lang. Ein drittes Transkript enthält ein völlig anderes Exon 1 und die anderen 4 Exons des Gens bei einer Länge von 3292nt (Orb-RB). Diese drei möglichen Transkripte weisen somit in etwa die gleiche Länge auf. Das kleinste der vier Transkripte hat ebenfalls ein eigenes Exon 1 (1c) und enthält daneben nur das 5. Exon bei einer Länge von 2342 nt (Orb-RA) (Abb. 7). Eine Analyse der ESTs zeigte, dass 50 von 68 ESTs aus Hodengewebe stammen. Die übrigen ESTs stammen aus embryonalen und larvalen Geweben und aus Köpfen. Die Transkripte codieren für

zwei unterschiedliche Proteine mit einer Größe von 704 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 74 kDa Dalton bzw. 551 Aminosäuren und 59 kDa. Das größere Protein enthält im N-terminalen Bereich 162 Aminosäuren, die das kleinere Protein nicht besitzt. Das kleinere Protein besitzt im N-terminalen Bereich 9 Aminosäuren, die das größere nicht enthält. Der Translationsstart des größeren Proteins befindet sich in Exon 2, der des kleineren in Exon 1c. Beide enthalten in der C-terminalen Region funktionelle Domänen, die eine Bindung von mRNA möglich machen. Es sind zwei RNA-Erkennungsmotive (RRM) und ein Zinkfinger-Motiv (Abb. 7). Diese Domänen sind hoch konserviert zwischen *Caenorhabditis elegans* und *Homo sapiens*, wie Sequenzvergleiche mit unterschiedlichen Organismen zeigten.

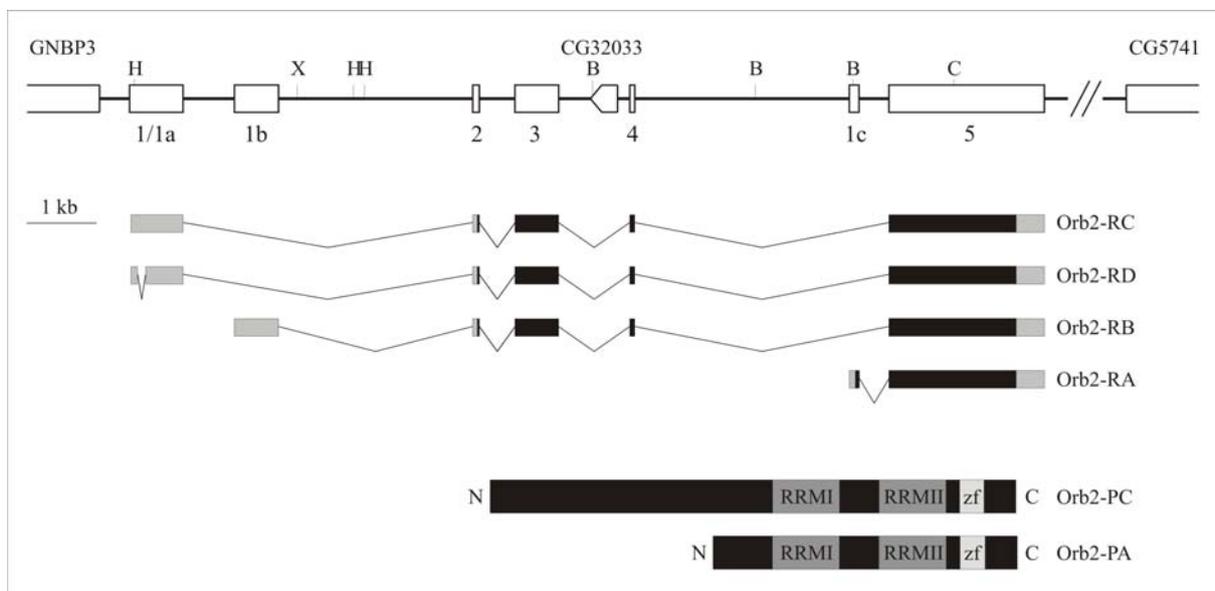


Abb. 7: Übersicht über die Genstruktur, die Transkripte und die Proteine von Orb2.

Das Gen *orb2* besteht aus sieben Exons und sechs Introns, wobei drei Transkripte ein unterschiedliches erstes Exon besitzen. In unmittelbarer Nachbarschaft abwärts befindet sich das Gen GNBP3, in 5 kb Entfernung aufwärts das Gen CG5741 (durch schräge Striche getrennt). Zwischen dem dritten und vierten Exon liegt auf dem Gegenstrang das Gen CG32033. (H=*Hind*III, B=*Bsr*GI, X=*Xho*I, C=*Cl*aI). Drei Transkripte codieren für ein Protein, welches das Startcodon im zweiten und das Stopcodon im fünften Exon hat. Das kleinste Transkript codiert für ein Protein mit dem Startcodon in seinem ersten Exon und dem gleichen Stopcodon wie das große Protein (Die grauen Bereiche in den Transkripten stellen die UTR dar, schwarz sind die offenen Leseraster). Beide Proteine unterscheiden sich nur im N-terminalen Bereich, der C-terminale Bereich mit den funktionellen Domänen ist identisch. Die grauen Bereiche in den Proteinen stellen die funktionellen Domänen dar. (RRM= RNA recognition motif, zf= zinkfinger motif).

2.1.2. Eine Sonde gegen *orb2* zeigt zwei prominente Banden in den Hoden

Zunächst sollte nun durch eine Northern-Analyse geklärt werden, in welchen Geweben von *Drosophila melanogaster* Transkripte von *orb2* zu finden sind und ob evtl. einzelne Transkripte gewebespezifisch auftreten. Da alle vier in der Datenbank angegebenen Transkripte das fünfte Exon besitzen, wurde eine RNA-Sonde erstellt, die an Teile dieses Exons hybridisieren sollte (Abb. 8 B). Die Sonde deckt ca. 1,3 kb des 3'-Bereiches der *orb2* mRNA ab. Hybridisiert wurde die Sonde auf eine Membran mit poly(A)-RNA aus verschiedenen Geweben von adulten Männchen und Weibchen des Wildtyps *Oregon R* (Abb. 8 A).

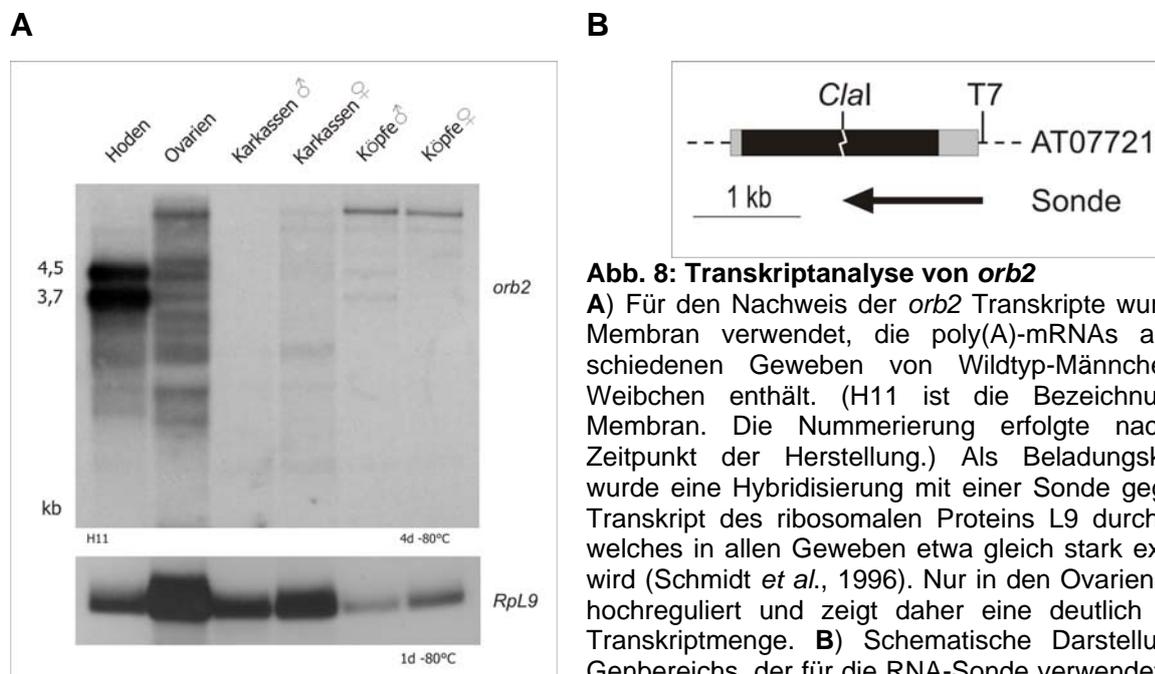


Abb. 8: Transkriptanalyse von *orb2*

A) Für den Nachweis der *orb2* Transkripte wurde eine Membran verwendet, die poly(A)-mRNAs aus verschiedenen Geweben von Wildtyp-Männchen und Weibchen enthält. (H11 ist die Bezeichnung der Membran. Die Nummerierung erfolgte nach dem Zeitpunkt der Herstellung.) Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt, welches in allen Geweben etwa gleich stark exprimiert wird (Schmidt *et al.*, 1996). Nur in den Ovarien wird es hochreguliert und zeigt daher eine deutlich erhöhte Transkriptmenge. **B)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA-Sonde verwendet wurde. Als Template für die RNA-Sonde wurde der *Clal* geschnittene cDNA Klon AT07721 (in Vektor pOTB7, <http://flybase.bio.indiana.edu>) eingesetzt. Bei der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase wurde der antisense-Strang mit radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

Wie die Vielzahl von ESTs aus Hodengewebe schon vermuten ließ, konnten mit dieser unspezifischen Sonde Transkripte von *orb2* in den Hoden nachgewiesen werden (Abb. 8 A). Trotz einer geringeren Menge an mRNA in der Hodenspur im Vergleich zu den Ovarien und den Karkassen beider Geschlechter (siehe RpL9

Hybridisierung), zeigten sich hier zwei sehr starke Banden mit einer Größe von 4,5 und 3,7 kb. Diese Banden zeigten sich auch in schwacher Ausprägung in den Köpfen der Männchen. In den Spuren mit mRNA aus Restkörpern, die alle eine höhere Menge an mRNA enthalten, waren sie nicht nachweisbar. Die in den Ovarien auf etwa der gleichen Höhe vorhandenen Banden sind in deutlich geringeren Mengen vorhanden verglichen mit der Gesamtmenge (Abb. 8 A). Die relativ hohe Anzahl an Banden in den Ovarien stellen vermutlich Kreuzhybridisierungen dar, da sie größtenteils nicht mit den erwarteten Transkriptlängen übereinstimmen und bei späteren vergleichbaren Experimenten nicht mehr feststellbar waren (siehe Abb. 12 A). Es zeigte sich somit, dass *orb2* im Gegensatz zu *orb*, welches in den Ovarien und den Hoden vorliegt, hauptsächlich in den Hoden transkribiert wird. Da mit der unspezifischen Sonde gegen das fünfte Exon nur zwei der vier möglichen Transkripte nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, ob alle angegebenen Transkripte tatsächlich gebildet werden. Zudem sollte geklärt werden, welche der vier Transkripte aus der Datenbank den beiden starken Banden aus dem Hodengewebe entsprechen.

2.1.3. Beide RNAs aus Hodengewebe lassen sich eindeutig zuordnen

Mit spezifischen Sonden für die einzelnen Transkripte sollte diese Frage geklärt werden. Dafür wurden unterschiedliche Bereiche von *orb2* amplifiziert, die dann als Template dienten. Als Template für eine Exon 1 Sonde diente das in den pGEM-T-Vektor einklonierte ungefähr 250 nt lange PCR-Fragment CP-TRA-2 – CP-RACE-5 (siehe Sequenz im Anhang), welches nur Sequenzbereiche des Exon 1 enthält. Vor der *in vitro* Transkription wurde das Template mit *NcoI* linearisiert, um unspezifische Hybridisierung durch Vektorsequenzen zu vermeiden. Zur Transkription des antisense-Strangs von *orb2* wurde die T7 RNA-Polymerase verwendet. Die Sonde hat eine Größe von ungefähr 250 nt. Hybridisiert wurde auf eine Membran, die mRNA von Oregon R-Männchen und -Weibchen enthält. Wie in Abb. 9 A zu sehen ist, wird mit dieser Sonde nur die größere der beiden bekannten Banden nachgewiesen, die Weibchenspur zeigte kein Signal (Daten nicht gezeigt). Als Template für eine spezifische Sonde für Exon 1c diente das PCR-Produkt von CP-Exon 1c-1 und CP-Exon 1c-2. Nach der Einklonierung wurde der Vektor pGEM-T mit *PstI* geschnitten, so dass mit der T7 RNA-Polymerase der antisense-Strang (100 nt)

erzeugt werden konnte. Die Hybridisierung erfolgte auf eine Membran, die in der Beladung der oben beschriebenen entspricht (H28b). Mit dieser Sonde konnte das kleinere *orb2* Transkript nachgewiesen werden (Abb. 9A). Auch hier zeigte die Weibchenspur keine Banden (Daten nicht gezeigt). Das Template für eine spezifische Sonde gegen das Exon 1b wurde mit den Primern CP-Exon 1b-1 und CP-Exon 1b-2 erzeugt und in den Vektor pGEM-T inkloniert. Mit der Sonde, deren Template vor der Transkription mit *Sac*II linearisiert und die mit der SP6 RNA-Polymerase transkribiert wurde, konnte auf verschiedenen Northern-Membranen mit unterschiedlichen Geweben keine spezifische Bande nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass dieses Transkript nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung auftritt und aus diesem Grund bisher nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Sonde gegen Exon 1b auf einen sogenannten Entwicklungs-Northern hybridisiert, der poly(A)-RNA von Embryonen, Larven des 3. Stadiums, Puppen und Adulten enthält. Auch bei diesem Experiment konnten mit der Sonde keine Transkripte von *orb2* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

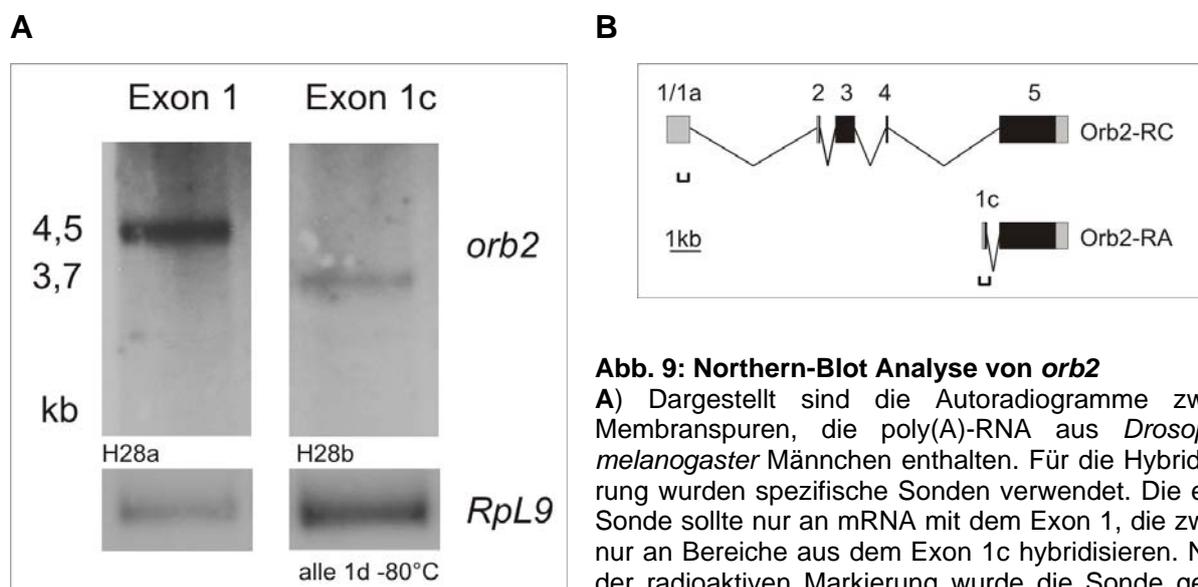


Abb. 9: Northern-Blot Analyse von *orb2*

A) Dargestellt sind die Autoradiogramme zweier Membranspuren, die poly(A)-RNA aus *Drosophila melanogaster* Männchen enthalten. Für die Hybridisierung wurden spezifische Sonden verwendet. Die erste Sonde sollte nur an mRNA mit dem Exon 1, die zweite nur an Bereiche aus dem Exon 1c hybridisieren. Nach der radioaktiven Markierung wurde die Sonde gegen Exon 1 auf die Membran 28a und die für Exon 1c auf die Membran H28b hybridisiert. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt.

B) Schematische Darstellung der Transkripte von Exon 1 und Exon 1c. Die Bereiche, die für die spezifischen Sonden verwendet wurden, sind mit Klammern gekennzeichnet.

Da sich die beiden möglichen Transkripte von Exon 1 nur in 107 Nukleotiden unterscheiden, und eine Unterscheidung der beiden Transkripte in diesen Größen-

ordnungen mittels Northern-Blot-Analysen nicht möglich wäre, wurde auf eine spezifische Sonde für das größere der beiden Transkripte verzichtet. Durch die oben beschriebenen Experimente konnten die beiden Banden aus dem Hodengewebe bestimmten Transkripten zugeordnet werden. Die größere der beiden Banden entspricht entweder dem Transkript mit Exon 1 oder Exon 1a, die kleinere Bande entspricht dem Transkript mit Exon 1c. Ob beide Transkripte von Exon 1 und 1a wirklich existieren, konnte auf diesem Weg nicht geklärt werden. Die Expression des Transkriptes von Exon 1b blieb ebenfalls weiterhin ungeklärt.

2.1.4. Das Transkript mit Exon 1b lässt sich durch RT-PCR nachweisen

RT-PCR stellt eine andere Möglichkeit dar, Transkripte in Geweben nachzuweisen. Diese Methode ist sensitiver als der Nachweis mittels einer Northern-Blot-Analyse, hat aber den Nachteil, dass eine Längenbestimmung der Transkripte nicht möglich ist. Da der Nachweis des *orb2* Transkriptes von Exon 1b durch Northern-Blot-Analysen nicht möglich war, wurde nun mittels RT-PCR untersucht, ob dieses Transkript überhaupt exprimiert wird. Eine RT-PCR mit den Primern CP-Exon 1b-1 und CP-Exon 1b-2, die schon zur Herstellung der RNA Sonde verwendet wurden, auf poly(A)-RNA aus Männchen von *Oregon R* zeigte eine Bande in der erwarteten Größe bei 0,4 kb (Abb. 10 A). Somit wird das Transkript von Exon 1b exprimiert, aber wahrscheinlich in so geringen Mengen, dass es in Northern-Blot-Untersuchungen nicht nachweisbar ist.

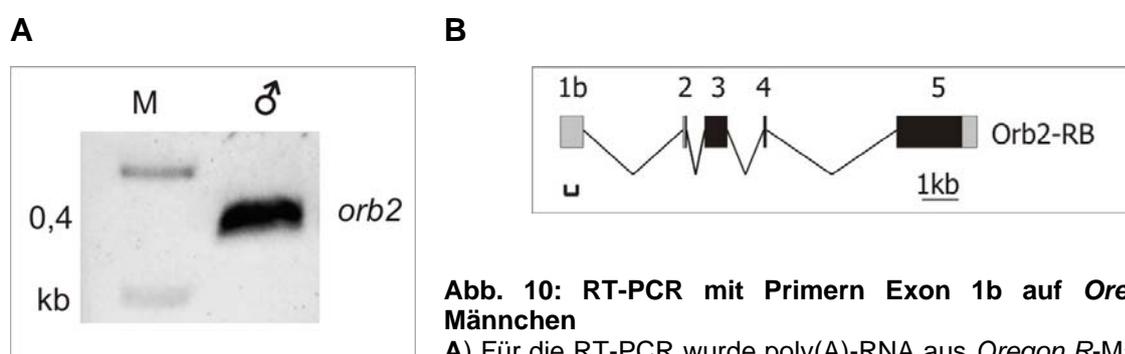


Abb. 10: RT-PCR mit Primern Exon 1b auf *Oregon R*-Männchen

A) Für die RT-PCR wurde poly(A)-RNA aus *Oregon R*-Männchen isoliert. Die Reaktion wurde mit den gleichen spezifischen Primern durchgeführt, mit der auch die Northern Sonde erstellt wurde. Durch die Reaktion konnte eine Bande mit der erwarteten Größe von 0,4 kb erzeugt werden. **B)** Schematische Darstellung des Transkriptes mit Exon 1b. Der Bereich an dem die Primer hybridisieren, ist mit einer Klammer gekennzeichnet.

2.1.5. Ein interner poly(A)-Bereich lässt die Bestimmung der Länge des poly(A)-Endes von *orb2* nicht zu

Hybridisierungen mit Sonden gegen *orb2* ergaben bei mehreren Experimenten für die beiden im Hoden vorkommenden Transkripte eine Größe von 4,5 und 3,7 kb (Abb. 8 A). Dies war nicht in Übereinstimmung zu bringen mit den Größen, die in Flybase für diese beiden Transkripte angegeben sind (3,2 kb und 2,3 kb). Ein Grund für diesen Längenunterschied kann der poly(A)-Schwanz sein, der nach der Transkription an die mRNA angehängt wird und der bei den in der Datenbank angegebenen Transkriptlängen nicht berücksichtigt wird. Da die Länge des poly(A)-Schwanzes bei verschiedenen mRNAs variiert, sollte zunächst einmal die Länge der Transkripte ohne poly(A)-Schwanz festgestellt werden. Dazu wurde ein RNaseH Northern-Experiment durchgeführt. Das Enzym RNaseH schneidet nur den RNA-Strang von RNA-DNA-Duplexen. Damit ist es möglich, nach Hybridisierung eines oligo(dT)-Primers an einen poly(A)-Schwanz, diesen vom restlichen Transkript abzuschneiden und somit die Länge des Transkriptes ohne poly(A)-Schwanz auf einer Northern-Membran zu bestimmen. Als Proben wurde poly(A)-RNA vom Wildtyp, sowie der Jump out Linie 10 (Jo10), die in einem Remobilisierungsexperiment (siehe 2.1.8) erzeugt wurde, unbehandelt sowie behandelt eingesetzt (Abb. 11 A). Das Autoradiogramm zeigte in den unbehandelten Spuren die beiden bekannten Banden bei 4,5 kb und 3,7 kb, bzw. im Fall der Linie Jo10 nur die Bande bei 3,7 kb. Die RNaseH behandelte Wildtypspur zeigte zwei Banden, eine bei 3,0 und eine bei 2,4 kb. Die behandelte Jo10 Spur zeigte eine Bande bei 2,4 kb (Abb. 11 A). Die 4,5 kb Bande ist also um 1,5 kb kleiner und die 3,7 kb Bande um 1,3 kb kleiner als vor der Behandlung. Dieses Ergebnis überraschte, da die verdauten Teile zu groß für einen poly(A)-Schwanz sind und die in der Literatur für poly(A)-Enden bei *Drosophila melanogaster* von 70-170 nt weit überschreiten (Izquierdo und Bishop, 1979). Eine Sequenzanalyse zeigte, dass es im Bereich des in Flybase angegebenen Endes der Transkripte von *orb2* einen poly(A)-reichen Bereich (AAAAGAAAAAAAAAAGGAA) gibt, der wahrscheinlich ausreicht, um von der RNaseH erkannt und geschnitten zu werden. Dass ein Stück von 16 Adenosinen ausreicht, konnte schon gezeigt werden (Jung, 1998). Da dies aber noch immer nicht ausreichte, um die Ergebnisse aus dem RNaseH-Experiment zu erklären, lag die Vermutung nahe, dass die Transkripte größer sind, als in Flybase angegeben.

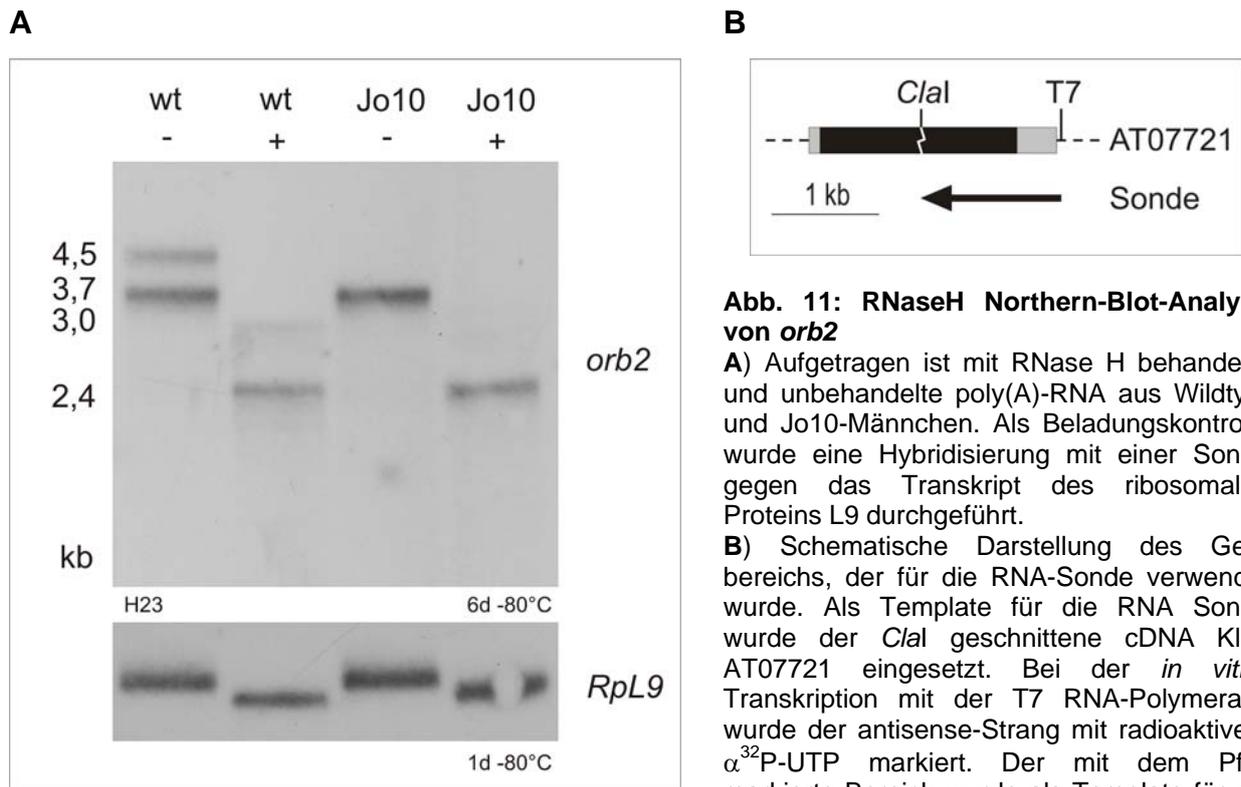


Abb. 11: RNaseH Northern-Blot-Analyse von *orb2*

A) Aufgetragen ist mit RNase H behandelte und unbehandelte poly(A)-RNA aus Wildtyp- und Jo10-Männchen. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt.

B) Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA-Sonde verwendet wurde. Als Template für die RNA Sonde wurde der *Clal* geschnittene cDNA Klon AT07721 eingesetzt. Bei der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase wurde der antisense-Strang mit radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

Um das Ende eines Transkriptes zu finden, sucht man in der Regel nach einem Polyadenylierungssignal. Dieses hat die Konsensussequenz AAUAAA und findet sich in einer Entfernung von 12-30 nt vom Transkriptende entfernt (Proudfoot und Brownlee, 1976). Eine Analyse der genomischen Sequenz zeigte kein Polyadenylierungssignal in der Nähe des in Flybase angegebenen 3'-Endes der Transkripte. Das erste Signal lag ca. 950 Nukleotide entfernt (Abb. 12 B). Diese Analyse unterstützte unsere Vermutung, dass die Transkripte wirklich länger sind als in Flybase angegeben und könnte somit das Ergebnis der RNaseH Northern-Blot-Analyse erklären. Somit stellte das nächste Ziel der Untersuchung die Frage dar, ob das Gen wirklich länger ist, als in Flybase angegeben.

2.1.6. Der 3'-UTR von *orb2* ist länger als in Flybase angegeben

Um unsere Vermutung zu überprüfen, wurde mit den Primern CP-TRA-6 und CP-TRA-8 auf genomischer DNA ein 600 nt großes PCR-Produkt aus einem Bereich erzeugt, der hinter den in Flybase angegebenen Enden der Transkripte liegt, und in den Vektor pGEM-T einkloniert. Um die Sonde eindeutig außerhalb des Gens zu lokalisieren, wurde das Template vor der *in vitro* Transkription mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III geschnitten. Diese Sonde erkennt so nur Bereiche, die in Flybase als nicht mehr zum Gen *orb2* gehörend angegeben sind (Abb. 12 B), also hinter dem fünften Exon aber vor dem Polyadenylierungssignal liegen. Auf dem Autoradiogramm zeigten sich die beiden aus dem Hoden bekannten Transkripte von *orb2*. Die Weibchenspur zeigte keine Bande (Abb. 12 A). Dieses Ergebnis bestätigte unsere Vermutung, dass die Transkripte länger sind als in Flybase angegeben. Rechnet man zu den nun festgestellten Längen noch den poly(A)-Schwanz hinzu, kann davon ausgegangen werden, dass die auf den Autoradiogrammen ermittelten Transkriptlängen von 4,5 und 3,7 kb stimmen. Aufgrund dieser Ergebnisse muß auch das Transkriptschema von *orb2*, das in Abb. 7 dargestellt wurde, überarbeitet werden. Die Entfernung zum benachbarten Gen CG5741 ändert sich von 5 kb auf 4 kb. Das überarbeitete Transkriptschema ist in Abb. 14 dargestellt.

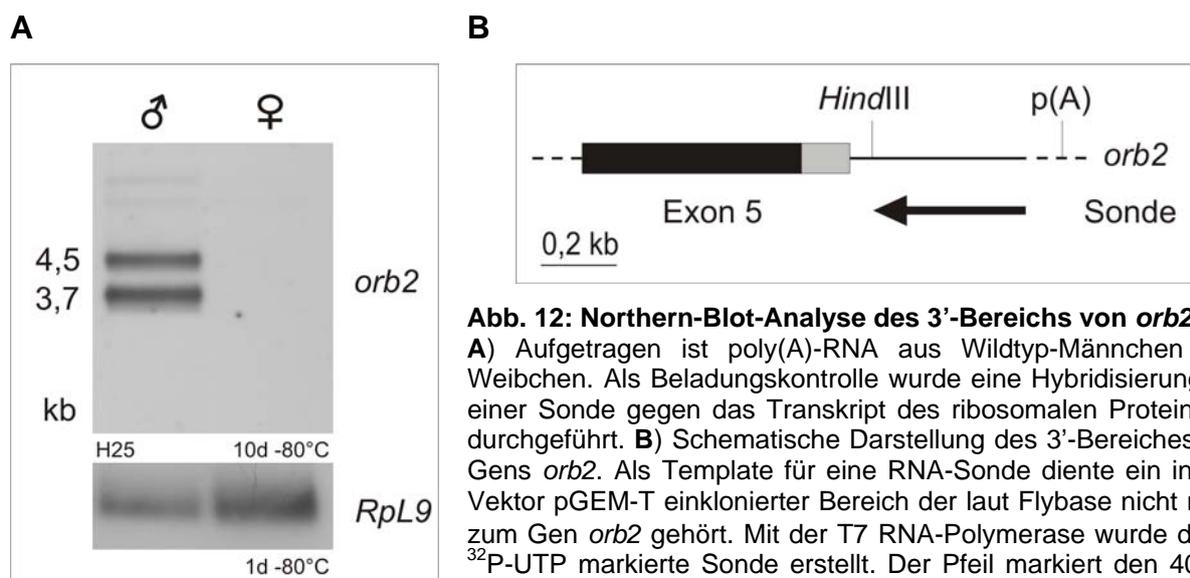


Abb. 12: Northern-Blot-Analyse des 3'-Bereichs von *orb2*

A) Aufgetragen ist poly(A)-RNA aus Wildtyp-Männchen und Weibchen. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung des 3'-Bereiches des Gens *orb2*. Als Template für eine RNA-Sonde diente ein in den Vektor pGEM-T einklonierter Bereich der laut Flybase nicht mehr zum Gen *orb2* gehört. Mit der T7 RNA-Polymerase wurde die α -³²P-UTP markierte Sonde erstellt. Der Pfeil markiert den 400 nt langen Bereich, der als Template für die Transkription verwendet wurde. Der schwarze Balken markiert das offene Leseraster, der graue den 3'-UTR von *orb2*. Die durchgezogene Linie stellt den laut Flybase *orb2* flankierenden Bereich der DNA dar. (p(A)=Polyadenylierungssignal)

2.1.7. *orb2* wird schon in männlichen Larven des 3. Stadiums transkribiert

Ein Protein, das an der Translationskontrolle in der Spermatogenese beteiligt ist, sollte schon in den Larven vorhanden sein, da in den prämeiotischen Stadien larvaler Hoden eine starke Transkriptionsleistung erfolgt (zusammengefasst in Fuller, 1998) und in dieser Phase mRNAs gebildet werden, die für die spätere Entwicklung der Spermien benötigt werden. Ob diese Annahme auch für das Protein Orb2 zutrifft, sollte anhand seines Transkriptlevels in verschiedenen Stadien der *Drosophila*-Entwicklung festgestellt werden. Für dieses Experiment wurde eine Membran verwendet, die poly(A)-RNA aus männlichen und weiblichen Larve 3, Puppen und Adulten enthält (Abb. 13). Zur Sicherstellung des Geschlechts der Puppen wurden Larven des 3. Stadiums nach Männchen und Weibchen sortiert, getrennt in Fliegenröhrchen gegeben und nach der Verpuppung zur poly(A)-RNA Isolierung eingesetzt. Als Sonde wurde der *Clal* geschnittene cDNA-Klon AT07721 eingesetzt, mit dem beide Transkripte aus den Hoden detektiert werden können. In allen drei Entwicklungsstadien zeigten sich in den Männchenspuren beide Transkripte von *orb2* in etwa der gleichen Menge im Vergleich zum ribosomalen Protein L9 (Abb. 13). Dies legt die Vermutung nahe, dass auch das Protein schon zu diesem Stadium translatiert wird und seine Funktion erfüllt. In den Weibchen konnten bei diesem Experiment in keinem der drei Entwicklungsstadien Signale nachgewiesen werden.

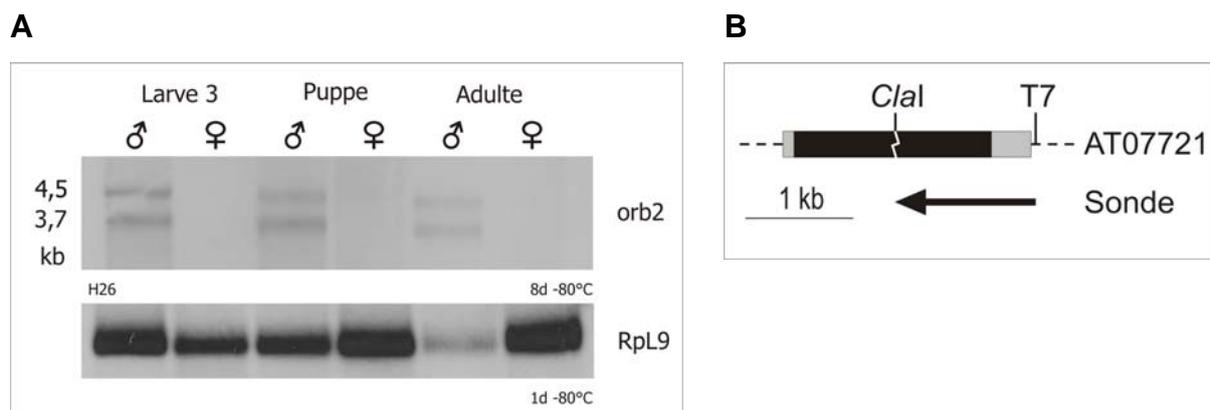


Abb. 13: Northern-Blot-Analyse von *orb2*

A) Aufgetragen ist poly(A)-RNA von Männchen und Weibchen von Larve3, Puppe und Adulte. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA Sonde verwendet wurde. Als Template wurde der *Clal* geschnittene cDNA Klon AT07721 eingesetzt und bei der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase der antisense-Strang mit radioaktiven α^{32} -P-UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

2.1.8. P-Element Remobilisierung führt zu einer männchensterilen *orb2*-Linie

Nach der Erkenntnis, dass *orb2* hauptsächlich in den Hoden transkribiert wird, stellte sich die Frage, welche Funktion es dort erfüllt. Zur Klärung einer solchen Frage werden in der Regel Mutationen erzeugt, die die Genexpression beeinflussen, um durch auftretende Störungen Hinweise auf die Funktion zu erhalten. Da zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Mutante von *orb2* vorlag, mußte eine solche Fliegenlinie erst erzeugt werden. Um gezielte Mutationen in einem Gen bei *Drosophila melanogaster* auszulösen, werden im allgemeinen P-Element-Insertionslinien verwendet. P-Elemente sind transponierbare Elemente, wie sie in vielen Organismen vorkommen. Sie bestehen aus einem 2907 Basenpaaren großen Stück DNA, beiderseits eingerahmt durch sogenannte „Inverted Repeats (IR)“ bestehend aus 31 Basenpaaren (O’Hare und Rubin, 1983). Diese bleiben im Genom solange stabil, bis durch eine andere Fliegenlinie eine Transposase (Robertson *et al.*, 1988) eingebracht wird, die unter Verwendung der „Inverted Repeats“ das P-Element remobilisieren kann. Häufig führt die Integration eines P-Elementes zu einem mutanten Phänotyp. In anderen Fällen integriert es in einen codierenden Bereich, ohne einen Effekt zu haben. In einem solchen Fall kann durch eine Remobilisierung des P-Elementes versucht werden, einen mutanten Phänotyp zu erzeugen. Ergebnisse eines solchen Experimentes können Deletionen oder Punktmutationen sein, die zu einem Funktionsverlust eines Gens führen. Es ist aber auch möglich, dass es an der gleichen Stelle inseriert, es nicht zu remobilisieren ist oder es ohne einen Effekt auszulösen, entfernt wird. In unserem Fall konnte aus dem *Drosophila* Stock Center in Bloomington (USA) ein Stamm erhalten werden, der ein P-Element im Gen *orb2* enthält. Diese P-Elementlinie ($w^{1118}; P\{w^{+mgt}=GT1\}orb2^{BG02373}$) vereinfacht geschrieben als *orb2^P* trägt die Insertion im Intron zwischen dem Exon 1 und dem Exon 1b (Abb. 14). Sie zeigt trotz Insertion des P-Elementes keinen Phänotyp und verhält sich somit wie der Wildtyp.

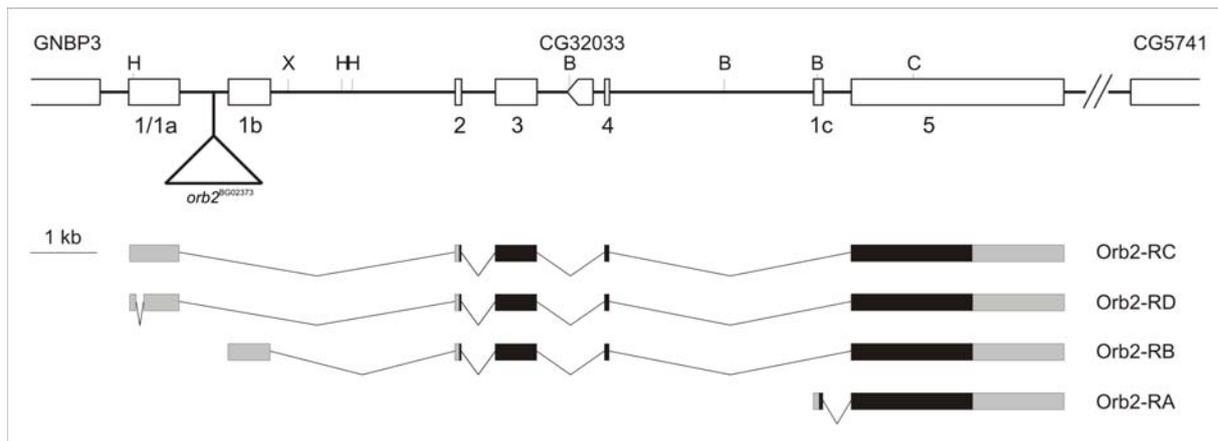


Abb. 14: Schematische Lage des P-Elementes im Bereich des *orb2* Gens

Die Fliegenlinie $w^{1118}; P\{w^{+mgt}=GT1\}orb2^{BG02373}$ trägt ein P-Element, das zwischen dem Exon 1 und Exon 1b inseriert ist. Diese Fliegenlinie zeigt keinen Unterschied zu Wildtypfliegen, so dass zur erhofften Erzeugung einer Mutation das P-Element remobilisiert werden mußte. Durch die neuen Erkenntnisse über die Transkriptlängen von *orb2* (Siehe 2.1.6.) konnte das Schema aus Abb. 7 überarbeitet werden. Das Exon 5 ist ungefähr 1 kb länger und liegt damit ca. 4 kb entfernt vom Gen CG5741. Die grauen Bereiche in den Transkripten stellen die UTR dar, schwarz sind die offenen Leseraster. (H=*Hind*III, B=*Bsr*GI, X=*Xho*I, C=*Cl*aI).

Zur Erzeugung einer *orb2* mutanten Linie mußte das P-Element zunächst durch die Transposase remobilisiert werden. Dazu wurden in einem ersten Kreuzungsschritt homozygote Weibchen mit den Männchen einer Fliegenlinie gekreuzt, die die Transposase exprimiert (Abb. 15). Nach erfolgter Transposition wurde in einem zweiten Kreuzungsschritt die Transposase wieder entfernt. Dieser Schritt ist sehr wichtig, da es ansonsten immer wieder zu unkontrollierten Transpositionseignissen kommen würde und der Stamm nicht stabil zu halten wäre. Um die einzelnen Transpositionseignisse zu vermehren, wurden Einzelpaarzuchten angelegt. Die Nachkommen dieser Zuchten wurden untereinander gekreuzt, um Tiere zu erhalten, die homozygot für das Remobilisierungsereignis waren (Abb. 15). Um bei den Kreuzungen jederzeit den Überblick zu behalten, welche Chromosomen von den Elterntieren an die Nachkommen weiter gegeben werden, werden bei *Drosophila melanogaster* sogenannte Balancerchromosomen eingesetzt. Diese tragen eine bis mehrere Mutationen, die mit bloßem Auge oder unter dem Mikroskop klar erkannt werden können. Diese Balancer sind in der Regel homozygot letal. Außerdem weisen sie Inversionen auf, so dass es nicht zu Rekombinationsereignissen kommen kann. Die für dieses Experiment durchgeführten Kreuzungsschritte sind im oben beschriebenen Schema dargestellt (Abb. 15). Ob es durch dieses Experiment zu einer Remobilisierung gekommen ist, kann nach dem vierten Kreuzungsschritt untersucht werden. Insgesamt konnten durch diese Kreuzungen 40 verschiedene Linien erzeugt werden.

1. Kreuzung: Einkreuzen der Transposase

$$w^{1118} / w^{1118}; orb2^P / orb2^P \times + / Y; MKRS, Sb, \Delta 2-3(ry^+) / TM2, Ubx, \Delta 2-3(ry^+)$$

$$w^{1118} / Y; orb2^P / MKRS, Sb, \Delta 2-3(ry^+)$$

2. Kreuzung: Transposition und Auskreuzen der Transposase

$$w^{1118} / w^{1118}; TM3 Ser / Antp \times w^{1118} / Y; orb2^P / MKRS, Sb, \Delta 2-3(ry^+)$$

$$w^{1118} / Y; TM3 Ser / orb2$$

3. Kreuzung: Einzelpaarzuchten zur Vermehrung eines Ereignisses

$$w^{1118} / w^{1118}; TM3 Sb / + \times w^{1118} / Y; TM3 Ser / orb2$$

$$w^{1118} / Y; TM3 Sb / orb2$$

4. Kreuzung: Geschwisterkreuzungen zur Etablierung eines Stammes

$$w^{1118} / w^{1118}; TM3 Sb / orb2 \times w^{1118} / Y; TM3 Sb / orb2$$

Abb. 15: Kreuzungsschema: P-Element Remobilisierung

Damit alle Mutationen verfolgt werden können, werden alle Chromosomen markiert. Balancerchromosomen verhindern das Überdauern von Crossovern und sind erkennbar an dominanten Mutationen. Unter jeder Generation ist in fett dargestellt der Genotyp, der in der nächsten Generation verwendet wurde. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und weil es für diese Kreuzung keine Rolle spielt, wurde das zweite Chromosom im Schema weggelassen. (P= P-Element, Sb= *Stubble*, ry= *rosy*, Ser= *Serrate*, Antp= *Antennapedia*, Ubx= *Ultrabithorax*, TM3= *third multiple 3* Balancerchromosom, MKRS= Balancerchromosom, $\Delta 2-3$ = auch im Soma aktive Transposase)

Die Tiere aus den Geschwisterkreuzungen wurden zunächst daraufhin untersucht, ob es bei dem Experiment zur Erzeugung von letalen Allelen gekommen war. Dazu wurden Männchen und Weibchen auf ihre Vitalität untersucht. Sollte das P-Element nach der Mobilisierung in ein für die Vitalität wichtiges Gen integriert worden sein und dieses dabei zerstört haben, so sollten keine homozygoten Tiere zu finden sein. Mit Ausnahme der Linien Jump out (Jo) 5 und Jo 39 zeigten alle Linien sowohl homozygote wie heterozygote Nachkommen. Bei der Jo Linie 5 waren nur etwa 5% der geschlüpften Tiere homozygot, diese schlüpfen auch erst 4 bis 5 Tage später als ihre heterozygoten Geschwister. Die Jo Linie 39 zeigte unter 500 ausgezählten Nachkommen überhaupt keine homozygoten Tiere, was auf eine letale Insertion des P-Elementes ins Genom schließen ließ. Da aus den Northern-Blot-Analysen bekannt war, dass *orb2* hauptsächlich in den Hoden exprimiert wird, lag es nahe, die homozygoten Männchen auf ihre Fertilität zu testen. Getestet wurden 40 unterschiedliche Jump out-Männchen, von denen sich nur eine, die Jo Linie 10, als männchensteril herausstellte. Keine der untersuchten Linien zeigte eine Sterilität bei den Weibchen.

2.1.9. Der männchensterilen Linie Jump out 10 (Jo10) fehlt das große der beiden *orb2* Transkripte

Ob sich die oben beschriebenen Auswirkungen der P-Element Remobilisierung auf die Jump out Linien 5 und 10 auch auf der Transkriptebene beobachten lassen, sollte in einer Northern-Blot-Analyse geklärt werden (Abb. 16).

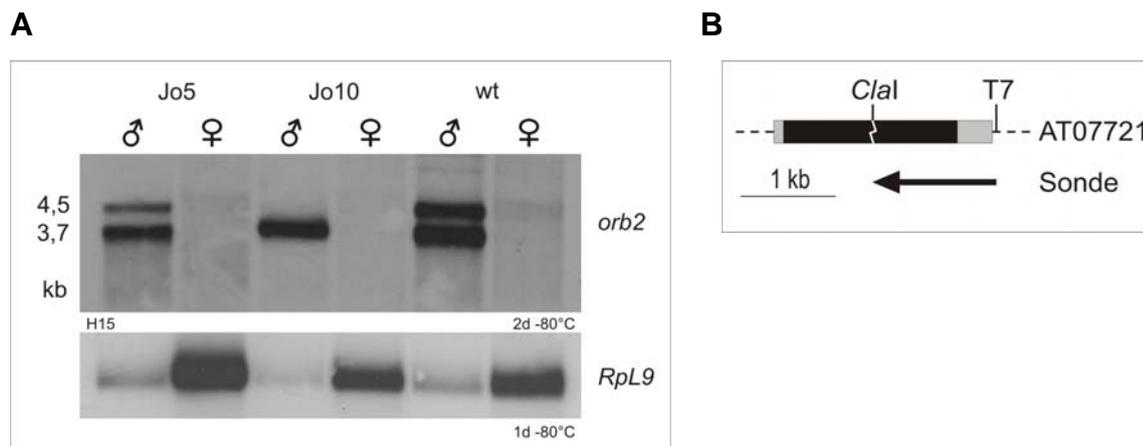


Abb. 16: Northern-Blot-Analyse von *orb2*

A) Aufgetragen ist poly(A)-RNA von Wildtyp-Männchen und Weibchen der Jo-Linien 5 und 10, und des Wildtyps. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA Sonde verwendet wurde. Als Template wurde der *Clal* geschnittene cDNA Klon AT07721 eingesetzt und bei der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase der antisense-Strang mit radioaktiven α^{32} -P-UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

Für dieses Experiment wurde poly(A)-RNA aus Männchen und Weibchen der Jump out-Linien 5 und 10 und als Kontrolle des Wildtyps *Oregon R* verwendet. Zum Nachweis der *orb2*-Transkripte wurde die unspezifische Sonde verwendet, die beide aus den Hoden bekannte Transkripte von *orb2* nachweist. Das Ergebnis dieses Versuches zeigte, dass die Jump out Linie 5 eine zum Wildtyp deutlich verringerte Transkriptmenge bei vergleichbarer Menge eingesetzter mRNA aufweist. Dabei waren beide *orb2*-Transkripte etwa gleich stark reduziert (Abb. 16 A). Eine wesentlich aufregendere Auswirkung hatte die Remobilisierung des P-Elementes auf die Jump out Linie-10. Diese zeigte nur das kleinere der beiden nachweisbaren Transkripte. Dieses liegt in etwa der gleichen Menge vor wie das Wildtyptranskript (Abb. 16 A). Das größere der beiden Transkripte war auch nach einer längeren Expositionszeit von ungefähr drei Wochen auf dem Röntgenfilm nicht zu erkennen. Das Ergebnis lässt vermuten, dass der Verlust des größeren Transkriptes der Grund

für die Sterilität der homozygoten Männchen dieser Linie sein könnte. Die Weibchen zeigten, wie in den vorhergehenden Experimenten schon beschrieben, keine *orb2* Transkripte (Abb. 16 A).

2.1.10. Männchen der Jump out Linie 10 zeigen keine motilen Spermien

Ob bzw. welche Auswirkungen das Fehlen des großen *orb2* Transkriptes auf die Spermatogenese hat, sollte dann durch licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen geklärt werden (Abb 17). Dafür wurden Hoden von homozygoten Männchen der Linie Jump out 10 (*orb2*^{Jo10}) präpariert. Für die Färbung von Kern-DNA wurden die Hoden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt. Um das F-Aktin zu färben, wurde TRITC-gekoppeltes Phalloidin verwendet. Eine lichtmikroskopische Untersuchung zeigte, dass sich die Hodenschläuche der sterilen Männchen nicht in ihrer Größe und Morphologie von Hodenschläuchen des Wildtyps unterscheiden. Die Hoden der sterilen Jo-Tiere zeigen bis hin zum Terminalepithel alle Stadien der Spermatogenese. Sowohl prämeiotische, wie postmeiotische Stadien sind eindeutig zu erkennen (Abb. 17 d). Die Spermatozyten und auch die elongierenden Spermatisden lassen keinen Unterschied zum Wildtyp erkennen (Abb. 17 a, b). Am Terminalepithel beginnen die Spermien sich aufzuknäulen, werden dann aber nicht wie im Wildtyp in die Samenblase abgegeben, sondern degenerieren. Die Samenblasen der *orb2*^{Jo10}-Tiere sind frei von reifen Spermien. Unter dem Lichtmikroskop war dafür kein Auslöser zu entdecken. Durch die Färbung der DNA lassen sich die ausgelösten Defekte besser beobachten. Im Wildtyphoden bleiben die elongierenden 64 Spermatisden einer Zyste bis zu ihrer vollständigen Entwicklung und Abgabe in die Samenblase durch Cytoplasmabrücken miteinander verbunden (Tokuyasu *et al.*, 1972). Während der Elongation der Spermatisden kompaktiert deren DNA, die Histone werden durch Protamine ersetzt und der Kern nimmt eine nadelförmige Struktur an (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Diese bleiben als Bündel bis hin zum Terminalepithel miteinander verbunden (Abb. 17 b). Diese Bündel lassen sich im *orb2*-mutanten Hintergrund nur sehr selten oder gar nicht beobachten. Die Spermatisden scheinen sich früh voneinander zu trennen und die Kerne liegen nicht nebeneinander, sondern sind im Hodenschlauch verteilt, nehmen aber zum Teil auch eine nadelförmige Struktur an (Abb. 17 e).

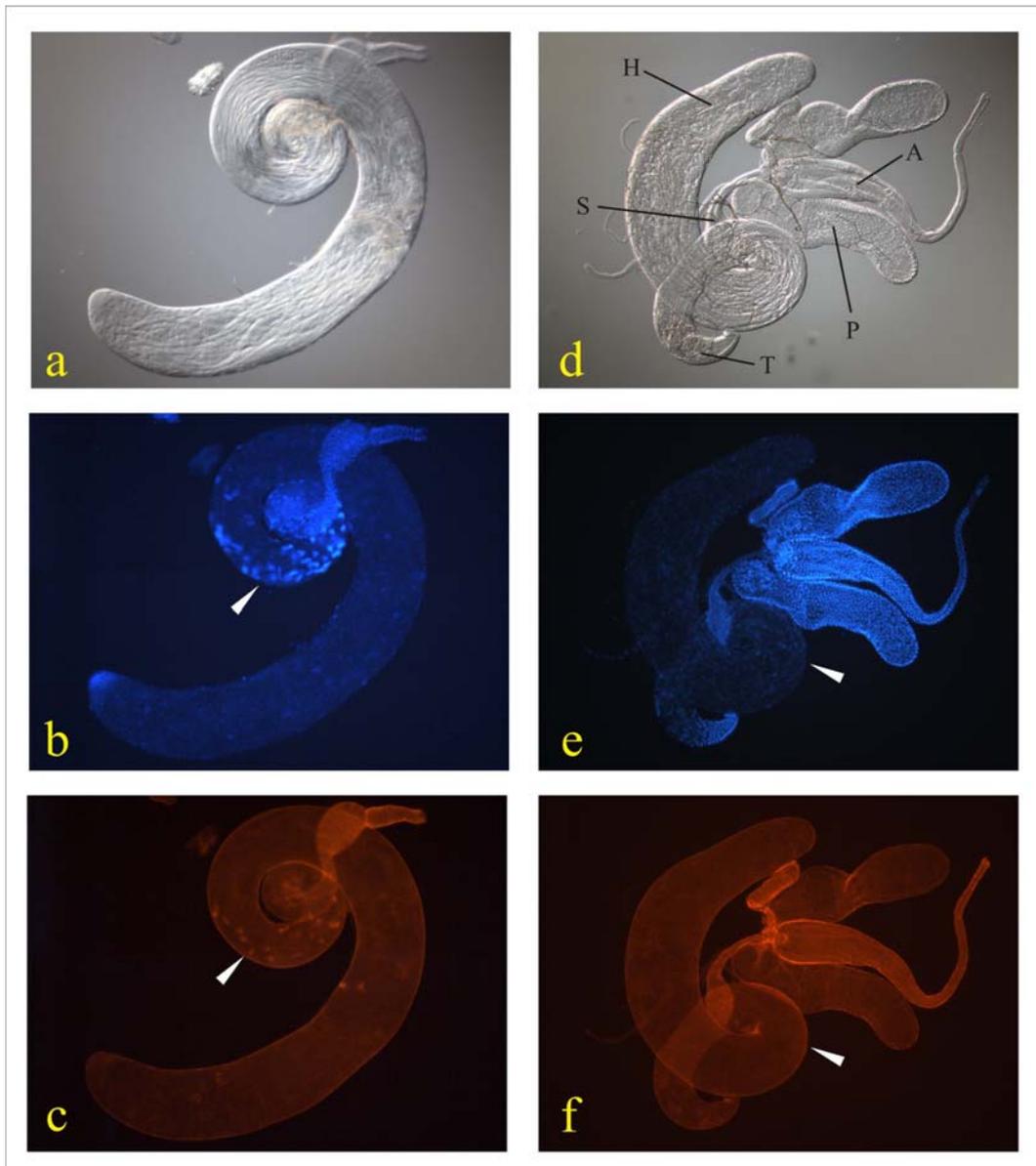


Abb. 17: Mikroskopische Untersuchung der Hoden mutanter *orb2* Linien

Durch Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sollte geklärt werden, warum die Männchen der Jump out Linie 10 steril sind. Zur Markierung der DNA und des F-Aktins wurden Hoden mit Hoechst 33258 und TRITC gekoppelten Phalloidin gefärbt. (a-c: Hoden des Laborwildtyps w^{1118} ; d-f: Hoden der Mutante $orb2^{J010}$) a) DIC-Aufnahme eines Hodenschlauches. b) Die Hoechstfärbung zeigt eine Vielzahl von Spermatidenbündeln (Pfeilspitze). c) Mehrere Individualisierungskomplexe markiert durch Phalloidin liegen im Wildtyp vor (Pfeilspitze). d) DIC-Aufnahme (H= Hodenschlauch, T= Terminalepithel, S= Samenblase, P= Paragonium, A= Ausführgang). e) Die Kernfärbung zeigt keine Spermatidenbündel. Die Pfeilspitze zeigt den Bereich, in dem im Wildtyp die Bündel vorliegen. f) Es liegen keine Individualisierungskomplexe vor in vergleichbaren Regionen zum Wildtyp (Pfeilspitze).

Durch eine Aktinfärbung lassen sich im Hoden die Individualisierungskomplexe nachweisen (Abb. 17 c). Diese wandern die Spermatidenbündel herab und streifen dabei überschüssiges Material ab. Während dieses Prozesses werden auch die Cytoplasmabrücken zwischen den einzelnen Spermien geschlossen und die Spermien so voneinander getrennt (zusammengefasst in Fuller, 1998; Renkawitz-Pohl *et al.*, 2005). Im mutanten Hintergrund lassen sich im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls

keine oder nur sehr wenige Individualisierungskomplexe beobachten (Abb. 17 f). In der Vergrößerung kann man deutlich die beim Wildtyp vorliegenden Bündel nadelförmiger Kerne beobachten (Abb. 18 a), während sie sich in der *orb2*-Mutante zu früh voneinander trennen (Abb. 18 b).

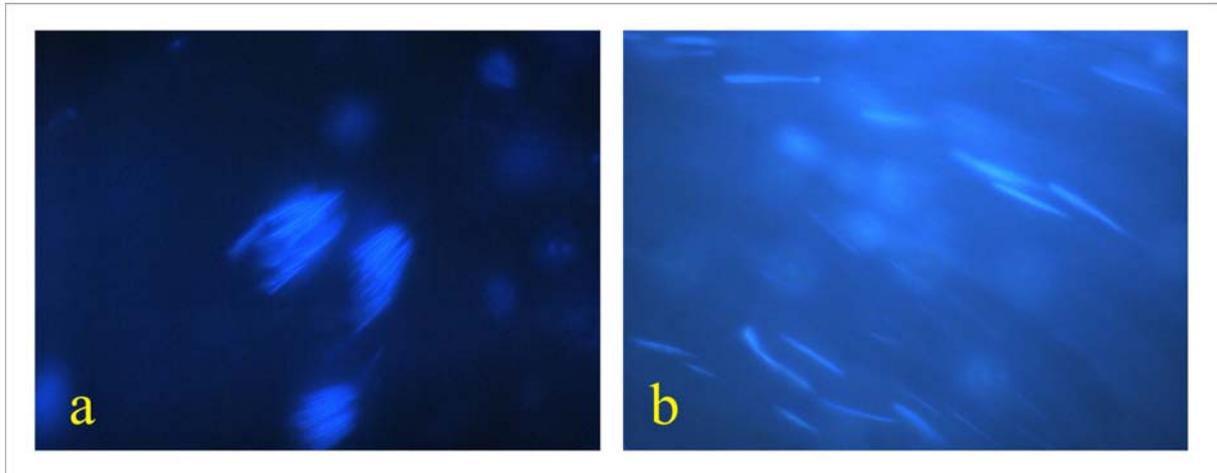


Abb. 18: Hoechst 33258-Färbung von Spermatischen Bündeln des Wildtyps und der Mutante *orb2*^{lo10}

a) Spermatischen Bündeln des Wildtyps. Hier liegen die Kerne der Spermatischen dicht nebeneinander. b) In der Mutante liegen die Kerne nicht parallel und weiter voneinander entfernt im Hodenschlauch vor.

2.1.11. Defizienzkreuzungen bestätigen Veränderungen im Bereich des Gens *orb2*

Durch das Remobilisierungsexperiment könnte das P-Element aus dem *orb2* Gen herausgeschnitten worden sein, kurzfristig in ein anderes Gen, welches ebenfalls eine Funktion in der Spermatogenese ausübt, integriert und dann wieder aus diesem entfernt worden sein. So konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der oben beschriebene Phänotyp durch eine Mutation in einem anderen Gen ausgelöst wurde. Zum Beweis, dass die Veränderung in *orb2* und keine andere Auslöser für den mutanten Phänotyp verantwortlich war, wurden die Jump out Linien 5, 10, 39 und als Kontrolle eine Revertante mit drei verschiedenen Defizienzlinien gekreuzt (Abb. 19). Diesen drei Linien fehlten verschiedene Sequenzbereiche im und um den *orb2*-Genlocus. Eine Defizienz, die in den Bereich des Gens *orb2* kartiert, sollte mit der Mutante auf dem anderen Chromosom zu einem gleichen Effekt oder stärker führen, wie er bei den homozygoten mutanten Tieren zu beobachten ist. Sollte das P-Element bei der Remobilisierung ein anderes Gen zerstört haben, so sollte mit den Defizienzlinien kein mutanter Phänotyp feststellbar sein. Eine Defizienz (BL4500,

Df(3L)Scf-R6) kartiert direkt in den *orb2* Genlocus (Abb. 19). Die anderen beiden liegen direkt davor (BL3024, Df(3L)h-i22) oder direkt hinter *orb2* (BL4499, Df(3L)Scf-R11). Für diese Kreuzungen wurden heterozygote Jump out-Männchen mit Jungfrauen der Defizienzlinien gekreuzt. Deren Nachkommen wurden auf die unter Punkt 2.1.10. beschriebenen Phänotypen untersucht.

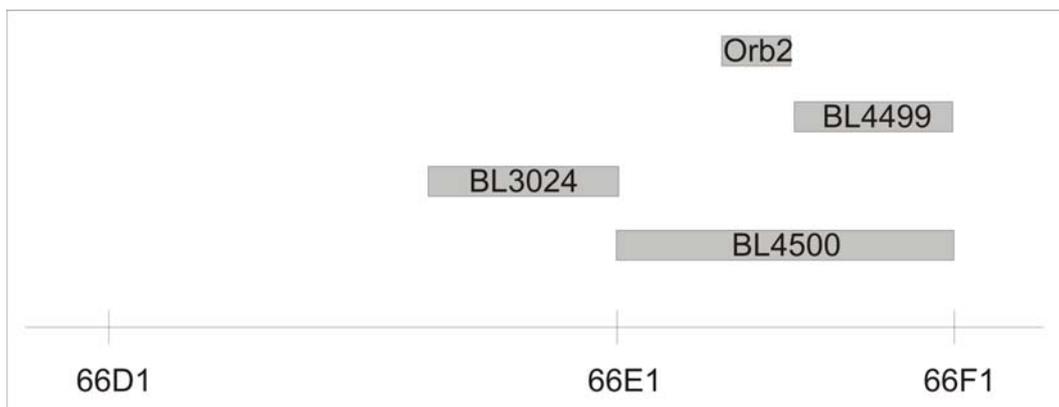


Abb. 19: Lage der Defizienzen in der Region 66 D/F

Zur Klärung der Frage, ob *orb2* wirklich bei der Remobilisierung des P-Elementes betroffen wurde, wurden die Jump out-Linien 5, 10 und 39 mit Linien gekreuzt, die je eine Defizienz im oder in der Nähe des Gens *orb2* tragen. Verwendet wurden die Stämme BL4499, BL3024 und BL4500, die aus dem *Drosophila* Stock Center in Bloomington (USA) bestellt wurden.

Tiere, die das Jo-Allel 5 oder 39 und gleichzeitig die Defizienz BL4500 oder BL4499 trugen, schlüpften gleichzeitig mit Tieren, die nur eines der beiden Chromosomen trugen. Bei der Kreuzung mit der Defizienzlinie BL3024 zeigten sich in beiden Fällen keine homozygoten Fliegen. Das P-Element scheint nach der Remobilisierung in diesen Genbereich integriert worden zu sein oder dort eine Veränderung hervorgerufen zu haben. Da dieser Bereich außerhalb der Region von *orb2* liegt, werden diese beiden Linien nicht weiter untersucht, da der Defekt nichts mit einer Veränderung des *orb2* zu tun hat. Die männchensterile Linie Jo 10 wurde mit allen drei Defizienzstämmen gekreuzt und die aus dieser Kreuzung hervorgegangenen hemizygoten Männchen mit Jungfrauen der Linie w^{1118} auf ihre Fertilität getestet. Männchen, die entweder die Defizienz von BL4499 oder von BL3024 trugen, waren fertil, während die Männchen, die die Defizienz von BL4500 trugen, steril waren. Da die Defizienzlinie BL4500 den Bereich des Gens *orb2* abdeckt, kann davon ausgegangen werden, dass durch das Remobilisierungsexperiment eine Mutation im Bereich des Gens *orb2* verursacht wurde.

2.1.12. Ein Transgen, das das große Protein kodiert, rettet den sterilen Phänotyp

Durch die Kreuzung mit der Defizienzlinie BL4500 wurde nur bewiesen, dass die Sterilität der Jump out Linie auf eine Mutation im Bereich des Gens *orb2* zurückzuführen ist. Da diese Linie aber eine größere Genregion und nicht nur die von *orb2* abdeckt, sollte mit einem Rettungskonstrukt die große Proteinform ersetzt und damit die endgültige Bestätigung erbracht werden, dass *orb2* wirklich durch das Remobilisierungsexperiment betroffen wurde (Abb. 20). Dieses Konstrukt wurde dann durch P-Element vermittelte Keimbahntransformation im Genom von w^{1118} -Fliegen integriert. Insgesamt konnten 6 verschiedene Linien mit diesem Konstrukt erzeugt werden.

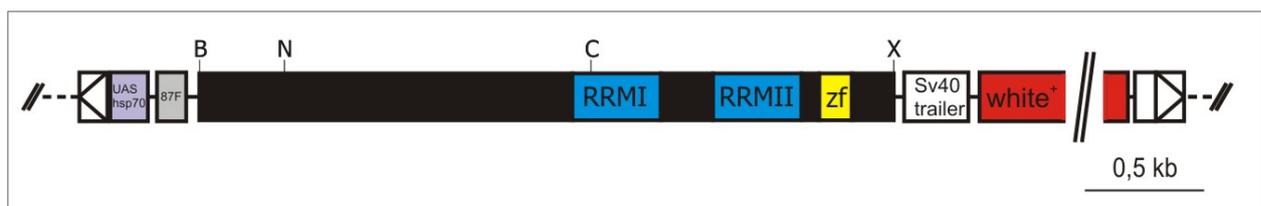


Abb. 20: Schematische Darstellung des großen Rettungskonstruktes von *orb2*

Für die Klonierung des Rettungskonstruktes wurde das offene Leseraster aus dem cDNA Klon LP05645 mit *Bgl*I und *Xho*I ausgeschnitten und in den Testis-Expression-Vektor einkloniert (Klon 263). Dieser Vektor enthält den Spermatogenese-spezifischen Promotor von *Mst87F* (M. Hollmann pers. Mitteilung, Karte siehe Anhang), der die Expression des Rettungskonstruktes in den männlichen Keimzellen ermöglicht. Die Skizze zeigt den ORF in schwarz dargestellt, blau sind die RRM's und in gelb das Zinkfinger Motif. Das in rot dargestellte *miniwhite*⁺-Gen ist verkleinert gezeichnet, seine tatsächliche Größe beträgt ca 5 kb. (B= *Bgl*I; N= *Nco*I; C= *Cl*I; X= *Xho*I)

Da *orb2* auf Chromosom 3 lokalisiert ist, konnten für das Einkreuzen des Rettungskonstruktes in die mutante Linie nur Tiere verwendet werden, die das Konstrukt entweder auf Chromosom 2 oder auf dem X-Chromosom tragen. Da bei Integrationen auf dem X-Chromosom nur ein Rettungskonstrukt eingebracht werden kann, wurden Linien mit der Integration auf dem 2. Chromosom bevorzugt. Insgesamt konnten durch die Keimbahntransformation 6 verschiedene Linien (2.6, 8.2, 39.1, 54.1, 59.2, 65.3) etabliert werden, die das Rettungskonstrukt auf dem 2. Chromosom tragen. Sechs weitere Linien trugen das Rettungskonstrukt auf dem dritten Chromosom und wurden verworfen. Eine Integration auf dem X-Chromosom fand nicht statt. Von den Linien mit der Integration auf dem 2. Chromosom wurden zwei für Kreuzungen in die mutante Linie Jump out 10 verwendet (2.6 und 54.1). Ziel der nachfolgenden Kreuzungsschritte war es, Männchen zu erhalten, die homozygot für die Mutation

und heterozygot oder homozygot für das Rettungskonstrukt sind (Abb. 21). Zur Kontrolle der Kreuzungsschritte wurden sowohl die Tiere der Jump out-Linie 10, als auch die transgenen Linien mit Balancerchromosomen versehen. So trugen die Weibchen der Jump out Linie-10 das Balancerchromosom *CyO* (*Cy*: eingerollte Flügel) auf dem 2. Chromosom und *TM3* mit *Serrate* (*Ser*: zerfranste Flügel) auf dem 3. Chromosom. Die Männchen der Rettungskonstruktlinien trugen neben dem Rettungskonstrukt *Glazed* (*Gla*: kleine, glänzende Augen) auf dem 2. Chromosom und das Balancerchromosom *TM3* mit *Stubble* (*Sb*: kurze Borsten) auf dem 3. Chromosom.

1. Erzeugen von Tieren mit Balancerchromosomen für Chromosom 2 und 3

$$w/w; CyO/Gla; +/+ \times w/Y; +/+; TM3 Sb / TM3 Ser$$

w / Y ; CyO / + , TM3 Ser / +

2a. Einkreuzen des Balancerchromosoms für das Chromosom 2

$$w/w; +/+; orb2^{Jo10} / TM3 Sb \times w/Y; CyO / +; TM3 Ser / +$$

w / w ; CyO / + ; orb2^{Jo10} / TM3 Ser

2b. Einkreuzen des Balancerchromosoms für das Chromosom 3

$$w/w; P\{CG5735;w^+\}/+; Sb/+ \times w/Y; P\{CG5735;w^+\}/Gla; +/+ \text{ (aus laufender Krzg.)}$$

w/Y ; P\{CG5735;w^+\}/Gla ; TM3 Sb/+

3. Kombination von Jo Allel mit Rettungskonstrukt

$$w/w; CyO / +; orb2^{Jo10} / TM3 Ser \times w/Y; P\{CG5735;w^+\};w^+ / Gla; TM3 Sb / +$$

w /w und w/Y ; P\{CG5735;w^+\} / CyO ; orb2^{Jo10} / TM3 Sb

4. Erzeugung homozygoter Tiere

$$w/w; P\{CG5735;w^+\} / CyO ; orb2^{Jo10} / TM3 Sb \times w/Y; P\{CG5735;w^+\} / CyO ; orb2^{Jo10} / TM3 Sb$$

w / Y ; P\{CG5735;w^+\} / P\{CG5735;w^+\}; orb2^{Jo10} / orb2^{Jo10}

Abb. 21: Kreuzungen Rettungskonstrukt mit mutantern Phänotyp Orb

Damit alle Mutationen verfolgt werden können, werden alle Chromosomen markiert. Balancerchromosomen verhindern das Überdauern von Crossovers und sind erkennbar an dominanten Mutationen. Unter jeder Generation ist in fett dargestellt der Genotyp, der in der nächsten Generation verwendet wurde. (*Sb*= *Stubble*, *Ser*= *Serrate*, *Gla*= *Glazed*, *CyO*= *Curly derivative of Oster*, *TM3*= *third multiple 3 Balancerchromosom*)

Aus der letzten Kreuzung gingen Tiere hervor, die homozygot für das Jo 10-Allel waren und (eine oder) zwei Kopien des Rettungskonstruktes trugen. Diese Tiere

besitzen rote Augen, die vom *miniwhite*⁺-Gen (Pirotta, 1989) des Rettungskonstruktes herrühren, normale oder eingerollte Flügel und Borsten wie der Wildtyp. Um ihre Fertilität zu testen, wurden die Männchen mit w¹¹¹⁸-Jungfrauen gepaart. Mit der Rettungskonstruktlinie 2.6 konnte der mutante Phänotyp der Linie Jo10 gerettet werden. Alle Männchen, die das Rettungskonstrukt homozygot oder heterozygot auf dem 2. Chromosom trugen und das Jo-Allel homozygot auf dem 3. Chromosom waren fertil und zeigten alle Stadien der Spermatogenese bis hin zu fertigen motilen Spermien. Es wurden insgesamt 18 Männchen auf ihre Fertilität getestet. Eine Rettung gelang auch mit der Rettungskonstruktlinie 54.1, allerdings schlüpfen in diesem Fall nur sehr wenige Fliegen, so dass nur drei Tiere auf ihre Fertilität getestet werden konnten.

2.1.13. Das Transgen bildet ein 4,1 kb großes Transkript

Um die Rettung auch auf der Transkriptebene darzustellen und um mögliche Fehler bei der Kreuzung auszuschließen, wurde die unspezifische Sonde gegen *orb2* eingesetzt, die sämtliche Transkripte und so auch das Rettungskonstrukt erkennen kann (Abb. 22 B). Diese wurde auf eine Northern-Membran hybridisiert, die poly(A)-RNA von je 30 Männchen der Linien w¹¹¹⁸, Jo 10, P-Element Linie *orb2*³⁷⁰²⁷ (siehe S. 27) und Rettungskonstrukt in *orb2*^{Jo10} (2.6/2.6;Jo10/Jo10) enthielt (Abb. 22). Der Northern-Blot zeigte in den *orb2*^{Jo10} Männchen mit Rettungskonstrukt eine Bande bei 4,1 kb, die der errechneten Größe des Rettungskonstruktes entspricht. Die 4,5 kb Bande des Wildtyps zeigte sich in dieser Linie nicht, was beweist, dass das Rettungskonstrukt funktionell ist und dass die Fertilität der Männchen nicht auf Fehler bei den Kreuzungsschritten zurückzuführen ist (Abb. 22 A). Zudem beweist die erfolgreiche Rettung endgültig, dass *orb2* durch das Remobilisierungsexperiment betroffen wurde und die Sterilität der Männchen auf diese Veränderung zurückzuführen ist. Die zur Kontrolle eingesetzten Linien zeigten das in den vorhergehenden Experimenten beschriebene Ergebnis.

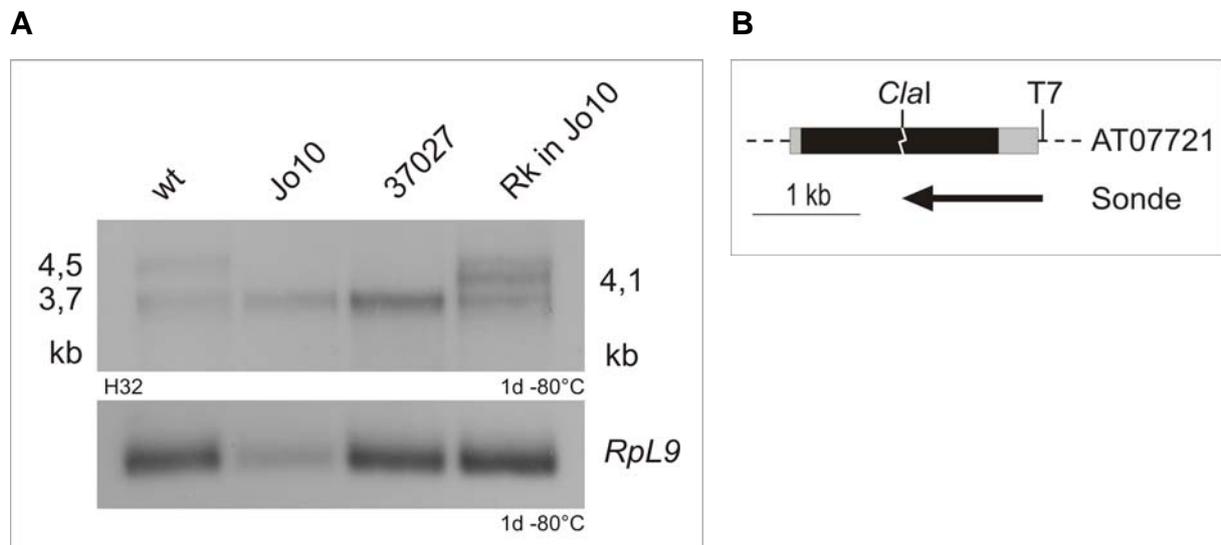


Abb. 22: Northern-Blot Analyse der Rettungskonstruktlinie in der *orb2*-Mutante

A) Aufgetragen ist poly(A)-RNA von Männchen des Wildtyps, der Jo-Linie 10, der P-Element-Linie 37027 (siehe S. 27) und mit Rettungskonstrukt (RK) im Jo10-mutanten Hintergrund. In der Wildtypspur sind beide Transkripte von *orb2* nachweisbar, die Jo-Linie 10 und die P-Element-Linie 37027 zeigen nur das kleinere. In der Rettungskonstruktlinie im mutanten Hintergrund ist das Transkript des Rettungskonstruktes bei 4,1 kb nachweisbar. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA-Sonde verwendet wurde. Als Template für die RNA Sonde wurde der *Clal* geschnittene cDNA Klon AT07721 eingesetzt. Bei der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase wurde der antisense-Strang mit radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

2.1.14. Eine größere Menge an kleinem Transkript kann das große ersetzen

Beide Proteinformen von *orb2* unterscheiden sich im N-terminalen Bereich, sind aber in der Region der funktionellen Domänen identisch. Dies ließ vermuten, dass sie ähnliche Aufgaben erfüllen und sich möglicherweise gegenseitig ersetzen können. Um diese Annahme zu testen, wurde ein Rettungskonstrukt für die kleinere Proteinform kloniert. Dieses Konstrukt enthält die geneigene Promotorregion, das offene Leseraster und den 3' Bereich des kleinen Transkriptes (Abb. 23). Mittels P-Element vermittelter Keimbahntransformation wurde das Konstrukt in die Fliegenlinie w^{1118} eingebracht. Insgesamt konnten so acht verschiedene Linien erzeugt werden. Wie oben beschrieben, mußte sich auch hier das Rettungskonstrukt für die nachfolgende Kreuzung in den mutanten Hintergrund auf dem 2. Chromosom befinden.

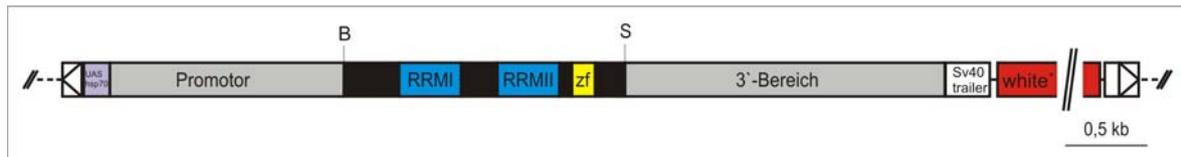


Abb. 23: Schematische Darstellung des kleinen *orb2* Rettungskonstruktes

Das Rettungskonstrukt für das kleine Protein besteht aus dem geneigenen Promotorbereich, dem offenen Leseraster und dem 3'-UTR. Der Promotorbereich mit einer Größe von 1,3 kb wurde mit den Primern CP-Prom-3 und CP-Exon-1d2 mit *Taq* Polymerase auf genomischer DNA erzeugt. Das ORF mit einer Größe von ca. 2 kb wurde mit den Restriktionsenzymen *BsrGI* und *SmaI* aus dem cDNA-Klon AT07721 (inVektor pOTB7; <http://flybase.bio.indiana.edu>) ausgeschnitten. Der 3'-Bereich mit einer Größe von 2 kb wurde mit den Primern CP-Tail-3 und CP-Tail-5 mit *Taq*-Polymerase auf genomischer DNA erzeugt. Der Promotorbereich und das 3'-Ende wurden in pGEM-T zwischenkloniert, mit Restriktionsenzymen geschnitten und über *BsrGI* und *SmaI* mit dem ORF verknüpft und in den P-Element Vektor P{CaSpeR4} (Pirota,1988) einkloniert. Das ORF ist in schwarz dargestellt, die RNA Erkennungsmotive in blau, das Zinkfinger Motif in gelb, grau sind die 5'- und die 3'-UTR, der Promotorbereich ist als Linie dargestellt. Das in rot dargestellte *miniwhite*⁺-gene ist verkleinert gezeichnet, seine tatsächliche Größe beträgt ca 5 kb. (B= *BsrGI*; S= *SmaI*).

Es konnten insgesamt sechs unterschiedliche Integrationslinien (5.1, 5.3, 19.1, 30.1, 30.2, 35.1) etabliert werden, bei denen dies der Fall war. Von diesen wurden drei Linien in den mutanten Hintergrund gekreuzt. Die Kreuzungen in den mutanten Hintergrund erfolgten wie unter Punkt 2.1.12. beschrieben. Die aus dem letzten Kreuzungsschritt stammenden Männchen, die homozygot für das Jump out Allel und heterozygot oder homozygot für das kleine Rettungskonstrukt waren, wurden mit Jungfrauen des Stammes w^{1118} verpaart und auf ihre Fertilität getestet. Unserer Annahme entsprechend, dass sich aufgrund der Ähnlichkeit im C-terminalen Teil die Proteine ersetzen können, zeigte sich, dass ca. 70% der männlichen Fliegen fertil waren. Unter dem Lichtmikroskop konnten in den Hoden der geretteten Tiere alle Stadien der Spermatogenese einschließlich motiler Spermien angesprochen werden. Eine größere Menge an kleinem Transkript ist somit in der Lage, den mutanten Phänotyp zu retten. Da somit vermutlich die Gesamtmenge an *orb2* Protein in diesen Tieren erhöht wurde, scheint die Funktion von Orb2 dosisabhängig zu sein. Da das kleine Rettungskonstrukt genau die gleiche Größe besitzt wie das endogene Transkript, war es mit einer Northern-Blot-Analyse nur sehr schwer nachweisbar. Auf dem Autoradiogramm in Abb. 24 konnte aber gezeigt werden, dass die Menge an kleinem Transkript in Spur 3 gegenüber den kleineren Banden im Wildtyp und in der Jump out Mutante deutlich erhöht ist. Zudem zeigte dieses Bild, dass die Kreuzung so verlaufen war wie geplant, es wurde nicht das große der beiden Transkripte wieder hineingekreuzt, so dass die Rettung des mutanten Phänotyps eindeutig auf das Rettungskonstrukt zurückzuführen ist.

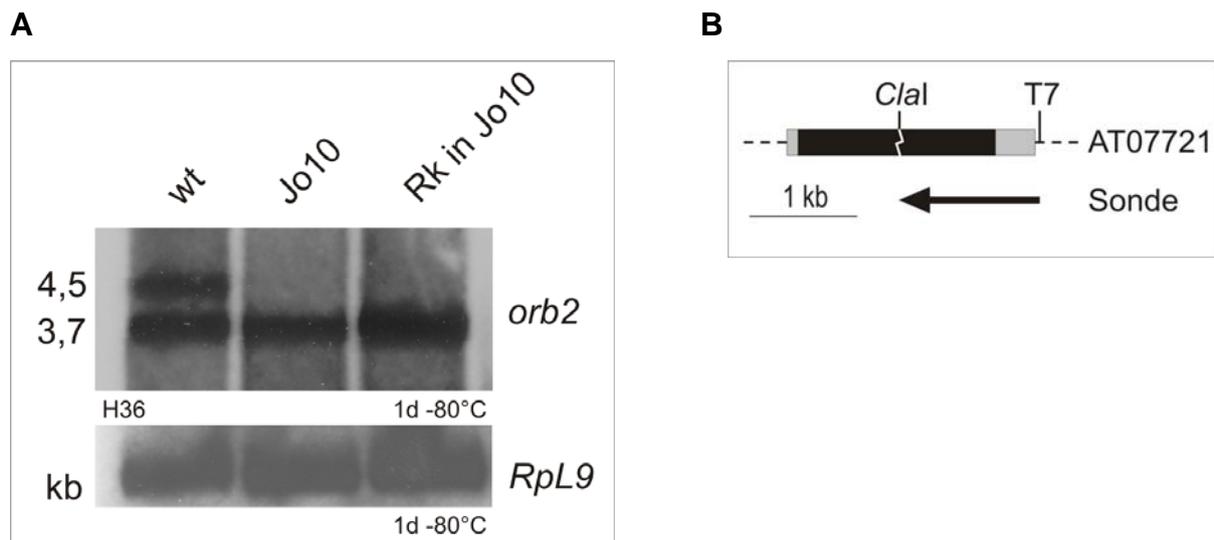


Abb. 24: Northern-Blot-Analyse an dem kleinen Rettungskonstrukt von *orb2*

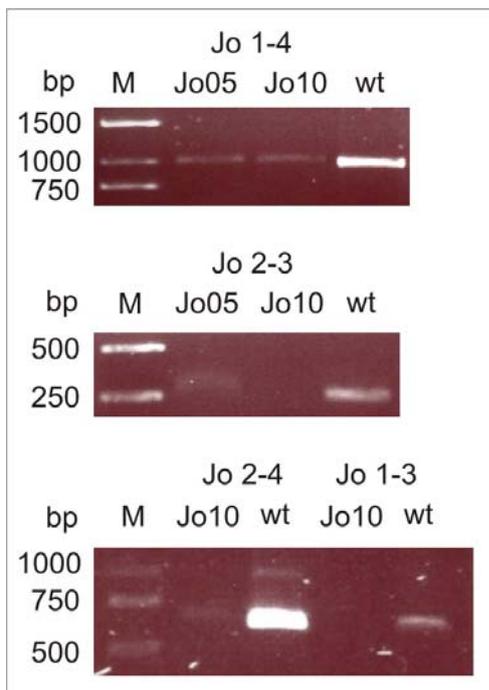
A) Zum Nachweis des kleinen Rettungskonstruktes wurde mRNA der Linien w^{1118} , Jo 10 und des kleinen Rettungskonstruktes (RK) in Jo10 isoliert. Die beiden zur Kontrolle eingesetzten Linien zeigen das erwartete Ergebnis. Da das kleine Rettungskonstrukt die gleiche Größe hat, wie das endogene Transkript, sind diese beiden auf der Membran nicht zu unterscheiden. Man kann aber eine deutliche Zunahme des kleinen Transkriptes beobachten. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA Sonde verwendet wurde. Als Template wurde der *Clal* geschnittene cDNA Klon AT07721 eingesetzt. Bei der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase wurde der antisense-Strang mit radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

2.1.15. Eine PCR auf DNA von Wildtyp und Jump out-Linien zeigte keinen Unterschied

Um zu klären, welche Auswirkungen das Remobilisierungs-Experiment auf die DNA im Bereich des P-Elementes hatte, wurde genomische DNA aus den Jo-Linien 5, 10 und als Kontrolle aus dem Wildtyp isoliert. Mit zwei unterschiedlichen Primerpärchen (Abb. 25 B) wurden dann Bereiche amplifiziert, die ca. 100 bis 500 kb in beide Richtungen von der P-Element-Insertionsstelle entfernt liegen (Umgebung der P-Insertionsstelle, siehe Anhang). Als Ergebnis des Jump out-Experimentes erwartet man normalerweise Deletionen, diese sollten sich schon an der Größe der PCR-Fragmente im Vergleich zum Wildtyp erkennen lassen. Da es von der Jo-Linie 5 nur wenige homozygote Tiere gab, wird in diesem Fall die Methode der „Single Fly DNA Extraction“ eingesetzt. Hierbei wird aus einer einzelnen Fliege genug DNA gewonnen, um eine bis mehrere PCRs durchzuführen. Eine PCR mit den Primern CPJo1 und CPJo4 (Abb. 25 A oben) zeigte bei beiden Jump out-Linien Produkte, die etwas größer waren als das des Wildtyps von 988 nt. Dies könnte bedeuten, dass

das P-Element bei diesen beiden Linien nicht vollständig herausgesprungen ist. Ein größeres PCR-Produkt im Vergleich zum Wildtyp (268nt) zeigt sich auch bei der PCR auf die genomische DNA der Jo-Linie 5 mit den Primern CPJo2 und CPJo3 (Abb. 25 A mitte). Mit dieser Primerkombination konnte auf genomischer DNA aus homozygoten Tieren Jump out-Linie 10 auch nach mehreren Versuchen kein Produkt erhalten werden (Abb. 25 A mitte).

A



B

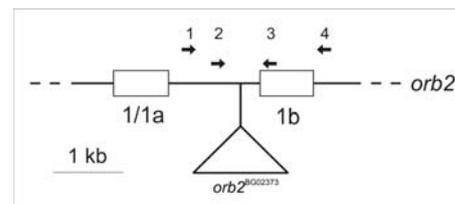


Abb. 25: PCR auf Bereiche der *orb2* P-Insertionsstelle

A) Um festzustellen, ob durch die Remobilisierung des P-Elementes Deletionen entstanden sind, wurden verschiedene Primer verwendet, die um den Bereich des P-Elementes herum hybridisieren. Als Template diente DNA der Jump out Linien-5 (Jo05) und 10 (Jo10) und vom Wildtyp (wt). Die Reaktion erfolgte mit der *Taq* DNA-Polymerase. Die oben dargestellte PCR erfolgte mit den Primern 1 und 4 (Jo1-4). Die in der Mitte dargestellte PCR erfolgte mit den Primern 2 und 3 (Jo 2-3) mit den gleichen Templates. Für die unten gezeigte PCR wurden die Primerkombinationen 2 mit 4 und 1 mit 3 verwendet (Jo 2-4; Jo 1-3). Als Template diente DNA der Jump out-Linie 10 (Jo10) und des Wildtyps (wt). **B)** Schematische Darstellung der Lage der Primer an der P-Insertionsstelle. Die Zahlen stehen für die Primer CPJo1 bis 4. Die Pfeile stellen die Orientierung der Primer dar und zeigen den Bereich an den sie hybridisieren. Der Sequenzbereich mit den Primern ist im Anhang zu finden.

Auch weitere PCR-Experimente auf genomische DNA der Mutante, bei denen der Primer CPJo3 verwendet wurde, ergaben kein Produkt, wohingegen die Primerkombination CPJo2 mit CPJo4 ein Produkt in der erwarteten Größe von 633 nt ergab (Abb. 25 A unten). Dies könnte bedeuten, dass im Bereich des Primers CPJo3 eine Veränderung in der genomischen Sequenz der Jump out -Linie 10 vorliegt, die eine Bindung dieses Primers unmöglich machte.

2.1.16. Sequenzierung der PCR-Produkte der Jo-Linien

Um mögliche Defekte in der DNA-Sequenz im Bereich des Gens *orb2* der Jump out-Linien zu finden, wurden PCR-Produkte mit den oben beschriebenen Primern (2.1.15.) unter Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase erzeugt und in den Vektor pBluescriptII KS einkloniert. Die *Pfu* DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* wurde verwendet, da sie im Vergleich zur *Taq* DNA-Polymerase über eine zusätzliche 3'-5'-Exonuclease- Aktivität verfügt, die eine Korrekturaktivität ermöglicht und so eine wesentlich geringere Fehlerhäufigkeit aufweist. Nach erfolgter Klonierung wurden die PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte von Jump out-Linie 5 mit den Primern CPJo2 und CPJo3 (siehe Anhang) zeigte keinen Unterschied in der Sequenz im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnte heißen, dass das P-Element korrekt herausgesprungen ist und der Defekt, der dazu führt, dass es nur sehr wenige homozygote Tiere gibt (siehe 2.1.8.) in einem anderen Sequenzbereich liegt. Die Sequenzierung des mit den Primern CPJo1 und CPJo4 auf genomischer DNA von Jump out-Linie 10 erzeugten PCR-Produktes ergab im Vergleich zum Wildtyp (Programm Align, Pearson *et al.*, 1997) drei Punktmutationen und eine Deletion eines Nukleotids. Zudem sind 38 Nukleotide des P-Elementes nach der Remobilisierung in der Sequenz verblieben, wie eine Blast Analyse ergab (siehe Anhang). Da das P-Element selber aber keinen Phänotyp auslöste, kann davon ausgegangen werden, dass der verbliebene Rest auch keine Auswirkung hat. Die Deletion liegt in der Mitte des Sequenzbereiches, an den der Primer CPJo3 hybridisiert, was erklären könnte, warum mit diesem Primer bei der PCR auf die Jump out-Linie kein Produkt erhalten werden konnte. Die drei Nukleotidaustausche liegen verstreut und nicht direkt nebeneinander (siehe Anhang). Dieses Ergebnisse sprechen für eine regulatorische Sequenz in diesem Bereich, die durch das Remobilisierungs-Experiment und den damit verbundenen Punktmutationen außer Funktion gesetzt wurde.

2.1.17. Der 5'-Bereich von *orb2* zeigt keine Veränderung in der Sequenz

Da durch das Remobilisierungsexperiment nur das Transkript betroffen wurde, welches mit dem Exon 1 beginnt, sollte in einer weiteren Analyse geprüft werden, ob die Sequenz im Bereich des Exons 1 Veränderungen aufweist.

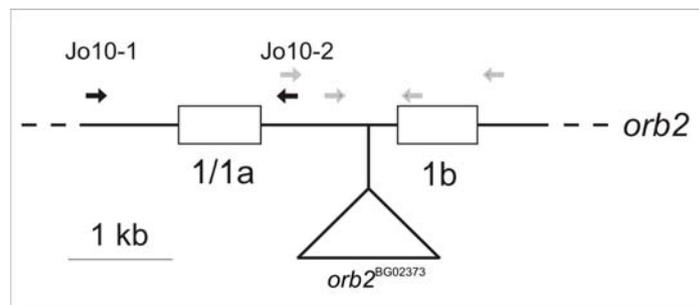


Abb. 26: Lage der Primer für die Sequenzierung des Exon 1 der *orb2* Mutante

Mit den Primern Jo10-1 und Jo10-2 wurde der Bereich des Exon 1/1a untersucht. Die Pfeile stellen die Orientierung der Primer dar und zeigen den Bereich an den sie hybridisieren. Der Sequenzbereich mit den Primern ist im Anhang zu finden. (Unbeschriftete Pfeile siehe Abb. 25 B).

Dazu wurde ein 1143 nt großes Stück aus diesem Bereich vor dem Primer CPJO1 mittels PCR mit den Primern CP-Jo10-1 und CP-Jo10-2 mit *Pfu*-Polymerase auf genomische DNA aus homozygoten Männchen der Jump out-Linie 10 erzeugt (Abb. 26), in den Vektor pPCR-Script Amp kloniert und zur Firma Genterprise (Mainz) zum Sequenzieren geschickt. In dem hier untersuchten Bereich konnten bei einer BLAST Analyse keine Veränderungen in der Sequenz im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Warum das große Transkript bei der Jump out Linie 10 fehlt, konnte durch diese Untersuchung nicht geklärt werden.

2.1.18. Zwei neue P-Element Linien zeigen den gleichen Phänotyp wie Jo10

Nachdem die vorher beschriebenen Untersuchungen an der männchensterilen Linie Jump out 10 beendet waren, erhielten wir zwei neue P-Elementlinien *orb2*^{HD/H-EP37027} und *orb2*^{HD/H-EP32189}, deren P-Elemente ebenfalls in das Gen *orb2* inserieren. Diese wurden auf ihre Fertilität getestet und zeigten bei beiden Linien homozygot sterile Männchen. Anders als bei der Jump out Linie-10, bei der der sterile Phänotyp durch eine Mobilisierung des P-Elementes hervorgerufen wurde, führte in diesen beiden Fällen die Insertion des P-Elementes bereits zum mutanten Phänotyp. Die Insertionsstellen liegen bei allen drei Linien aber nur wenige Nukleotide auseinander. Kreuzungen der beiden neuen P-Elementlinien mit den Defizienzlinien führten zum

gleichen Ergebnis wie bei der männchensterilen Jump out Linie-10. Nur in Kombination mit der Defizienzlinie BL4500 kam es zu hemizygot sterilen Männchen. Eine Northern-Blot-Analyse zeigte, dass auch diesen beiden Linien das größere der beiden Transkripte fehlt (Abb. 27 A). Die Menge an kleinerem Transkript unterscheidet sich zwischen den drei Linien leicht. Im Vergleich mit dem Transkript des ribosomalen Protein L9 zeigte sich, dass BL37027 und die Jump out-Linie etwa vergleichbare Mengen enthalten, während die P-Element Linie 32189 die geringste Menge an kleinem Transkript enthält (Abb. 27 A). Licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten den gleichen Phänotyp, wie er schon bei der Jump out-Linie 10 beobachtet werden konnte (Bilder nicht gezeigt).

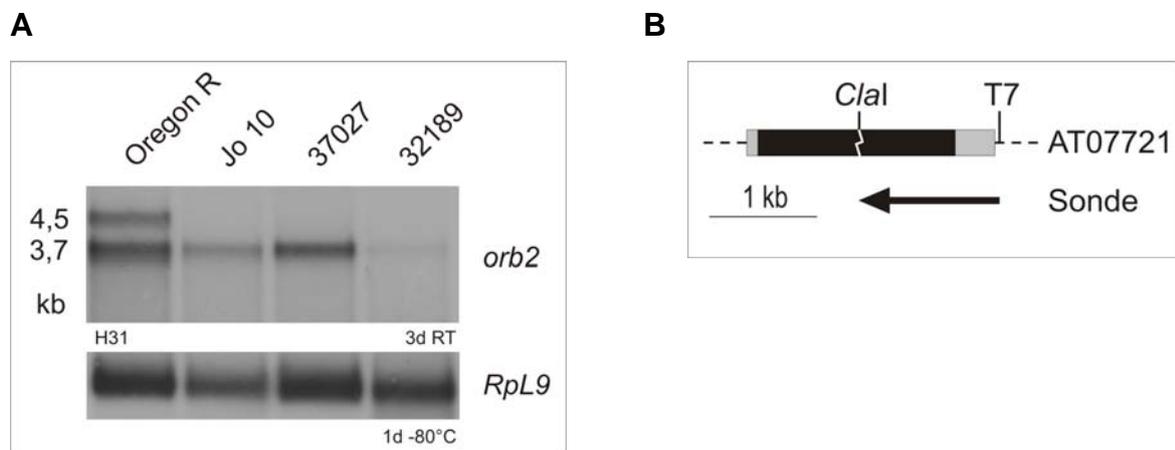


Abb. 27: Northern-Blot-Analyse der P-Element Linien orb2^{HD/H-EP37027} und orb2^{HD/H-EP32189}
A) Aufgetragen sind poly(A)-RNAs aus Männchen des Wildtyps, der Jump out-Linie 10 und aus den beiden P-Element Linien 37027 und 32189. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA Sonde verwendet wurde. Als Sonde wurde der *Clal* geschnittene cDNA Klon AT07721 eingesetzt und bei der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase der antisense-Strang mit radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

Auch hier bestätigte sich, dass die P-Element Linie BL32189 wie schon bei der Northern-Blot-Analyse beobachtet, den stärksten Phänotyp zeigt. Eine Hoechstfärbung zeigte, dass bei dieser Linie überhaupt keine Bündel von nadelförmigen Kernen vorlagen. Die Kerne lagen verstreut innerhalb der Zysten vor. Auch Individualisierungskomplexe waren durch eine Färbung mit TRITC gekoppeltem Phalloidin nicht nachweisbar.

2.1.19. *Orb2* mRNA findet sich in Spermatozyten

Da aus der vorausgehenden Northern-Untersuchung hervorging, dass *orb2* im Hoden exprimiert wird, war es nun von Interesse herauszufinden, in welchem Teil des Hodens man die mRNA nachweisen kann. Dies sollte durch eine whole mount *in situ*-Hybridisierung geklärt werden. Mit dieser Methode (nach Tautz und Pfeiffle, 1989) können Transkripte in Geweben mit spezifischen Sonden nachgewiesen werden. Als Template für die Hybridisierungssonde diente das Insert des cDNA-Klons AT07721. Die Sonde wurde mit Digoxigenin markiert und die Konzentration mit Hilfe eines Dot-Blots überprüft. Nach dem Abstoppen der Färbereaktion zeigte sich unter dem Lichtmikroskop, dass *orb2* im Cytoplasma der Spermatozyten exprimiert wird (Abb. 28 a u. b). Alle anderen Spermatogenesestadien und die Kerne zeigten keine Färbung. Dieses Ergebnis läßt vermuten, dass *orb2* sehr früh translatiert wird und stimmt mit der Vermutung überein, dass Orb2 die Translation von bestimmten mRNAs kontrolliert. Da die Transkription mit Beginn der Meiose fast vollständig endet, müssen alle danach benötigten Transkripte im Stadium der Spermatozyten exprimiert werden (Oliveri und Oliveri, 1965; zusammengefasst in Renkawitz-Pohl *et al.*, 2005). Aus diesem Grund muß ein regulatorisches Protein, das an Transkripte bindet, zu diesem Stadium schon vorhanden sein.

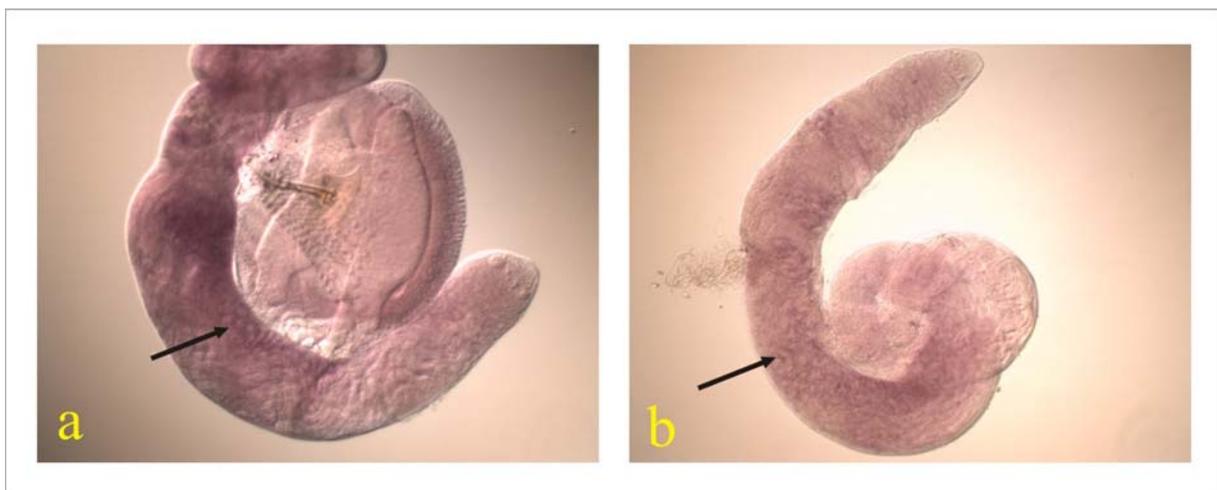


Abb. 28: Whole mount *in situ*-Hybridisierung von *orb2*

Als Sonde wurde die Digoxigenin markierte Sequenz des cDNA Klons AT07721 verwendet. Die Spermatozyten zeigen eine Färbung im Cytoplasma. Die Kerne zeigen keine Färbung (siehe Pfeile).

2.1.20. RNAi und AS Linien von *orb2* führen zu sterilen Männchen

Beim RNAi induzierten Ausschalten von Transkripten werden lange Transkripte von doppelsträngiger RNA in kleine Stücke (siRNA) von spezifischer Länge und Struktur zerlegt (Elbashir *et al.*, 2001). Diese führen zu einer sequenzspezifischen Degradation von mRNAs, die homolog zur Sequenz der siRNAs sind (Tuschl *et al.*, 2002). Die langen doppelsträngigen RNAs werden von dem RNase III Enzym Dicer (*dcr-2* in *Drosophila*) geschnitten und als 21-23 nt kleine Bruchstücke zum RISC Komplex geliefert. Es konnte gezeigt werden, dass der antisense-Strang mit der 5'-PO₄ Gruppe in den aktiven RISC-Komplex eingebaut wird, um die Zielsequenz zu schneiden. Der sense-Strang hingegen wird degradiert (Kavi *et al.*, 2005, zusammengefasst in Behura, 2007). Der zweite Dicer in *Drosophila* (*drc-1*) ist beteiligt an der Biogenese von microRNAs (miRNAs). Diese entstehen im Zellkern aus Vorläufern, die eine Länge von 70-80 nt haben. Das RNase III Protein Drosha bildet miRNA-Vorläufer aus primären Transkripten, die von der RNA-Polymerase II synthetisiert wurden. Drosha bildet einen Komplex mit dem Protein Pasha, das doppelsträngige RNA binden kann. Die von ihnen gebildeten prä-miRNA Hairpins werden durch Exportin-5 aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert, wo sie vom Enzym Dicer in 22 nt kurze miRNAs geschnitten und dann in einen Komplex eingebaut werden, der dem RISC-Komplex ähnlich ist (Wienholds *et al.*, 2005; zusammengefasst in Behura, 2007). Während siRNAs perfekte komplementäre Bindungen an den Ziel-mRNAs ausbilden und zu deren Degradation führen, binden miRNAs zum Teil nicht hundertprozentig an ihre Ziel-mRNA (Schwartz *et al.*, 2002). Perfekte Komplementarität zur Ziel-mRNA führt zu Degradation, wohingegen partielle Übereinstimmungen Translationsinhibition auslöst (Wienholds *et al.*, 2005). Da die Translationsinhibition reversibel ist, sind miRNAs direkt an der Translationskontrolle beteiligt. Da in den *orb2* Mutanten aus dem Remobilisierungs-Experiment und den P-Integrationslinien jeweils nur das größere der beiden *orb2* Hodentranskripte betroffen und so eine Restfunktion von Orb2 vorhanden war, sollte mit Hilfe von antisense- und RNAi-Konstrukten versucht werden, beide Transkripte auszuschalten. Dafür wurden zwei verschiedene antisense-Konstrukte und ein RNAi-Konstrukt erzeugt. Als Template für alle drei Konstrukte dienten Bereiche aus dem fünften Exon, so dass beide in den Hoden vorkommenden Transkripte ausgeschaltet werden müssten. Das antisense-Konstrukt (CP-AS-1-2) enthält zusätzlich noch Sequenzbereiche aus dem

Exon 1d, welches nur im kleineren der beiden Transkripte vorkommt. Das erste antisense-Konstrukt wurde mit den Primern CP-AS-1 und CP-AS-2 und das zweite mit den Primern CP-AS-3 und CP-AS-4 mit *Taq* DNA-Polymerase von dem cDNA Klon AT07721 als Template erzeugt (siehe Abb. 29). Die PCR-Produkte hatten eine Größe von 895 nt bzw. 783 nt. Beide PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM-T (Promega) zwischenkloniert und dann gerichtet mit den Restriktionsenzymen *Bgl*III und *Not*I in den entsprechend geschnittenen Testis-Expression-Vektor einkloniert, der wie oben beschrieben eine Expression in den männlichen Keimzellen ermöglicht. Die *orb2* Sequenz ist so im Vektor orientiert, dass bei der Transkription der antisense-Strang erzeugt wird. Der Sequenzbereich für das RNAi-Konstrukt für *orb2* wird mit den Primern CP-RNAi-1 und CP-RNAi-2 mit *Taq* DNA-Polymerase auf dem cDNA Klon AT07721 als Template erzeugt und hat eine Größe von 972 nt (siehe Abb. 29). Nach der Zwischenklonierung in den Vektor pGEM-T wird es mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Kpn*I ausgeschnitten und zuerst mit einem *Hind*III geschnittenen 500 nt großen Stück der GFP-Kassette ligiert, das nach erfolgter Transkription die Haarnadelstruktur des Doppelstranges des RNAi-Konstruktes bildet. Nach erfolgreicher Ligation wurde das nun aus zwei *orb2*-Sequenzen mit dem GFP-Stück in der Mitte bestehende Konstrukt in den Vektor pZerO zwischenligiert und dann mit *Kpn*I ausgeschnitten und in den ebenso geschnittenen Testis-Expression-Vektor einligiert.

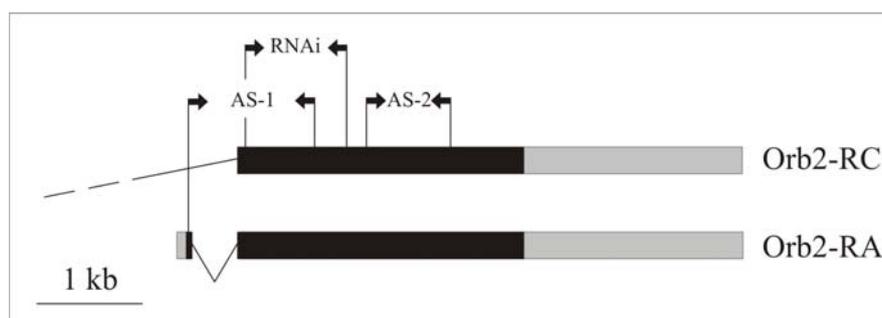


Abb. 29: Lage der Primer für die antisense- und RNAi-Konstrukte

Als Template für alle drei Konstrukte dienten Bereiche aus dem fünften Exon. Das antisense-Konstrukt (AS-1) enthält zusätzlich noch Sequenzbereiche aus dem Exon 1d. Das erste antisense-Konstrukt (AS-1) mit einer Größe von 895 nt wurde mit den Primern CP-AS-1 und CP-AS-2 und das zweite (AS-2) mit einer Größe von 783 nt mit den Primern CP-AS-3 und CP-AS-4 erzeugt. Der Sequenzbereich für das RNAi-Konstrukt (972 nt) gegen das *orb2* Transkript wurde mit den Primern CP-RNAi-1 und CP-RNAi-2 erzeugt. Alle drei PCR-Fragmente wurden mit *Taq* DNA-Polymerase auf dem cDNA Klon AT07721 als Template erzeugt und vor der weiteren Klonierung in den Vektor pGEM-T einligiert. In schwarz dargestellt sind Teile des ORF, in grau das 5'-UTR des Transkriptes Orb2-RA und die 3'-UTR der Transkripte. Die Pfeile stellen die Lage der Primer dar.

Sowohl die beiden antisense-Konstrukte wie auch das RNAi-Konstrukt wurden mittels P-Element vermittelter Keimbahntransformation ins Genom der Fliegen integriert. Die Ausbeute an erfolgreichen Integrationen war bei allen drei Injektionen sehr gering, so konnten mit den beiden antisense-Konstrukten nur jeweils eine Linie (AS-1 32.3 und AS-2 32.1) und zwei Linien mit dem RNAi-Konstrukt (RNAi 24.3 und 26.2) erzeugt werden. Allerdings waren sowohl die Männchen mit dem antisense- wie auch mit dem RNAi-Konstrukt bereits heterozygot steril. Die Weibchen dieser Linien zeigten dagegen keinen Defekt. Eine Northern-Blot-Analyse zeigte, dass beide Hodentranskripte in deutlich verringerter Menge vorliegen, aber nicht gänzlich verschwunden sind (Abb. 30 A und B).

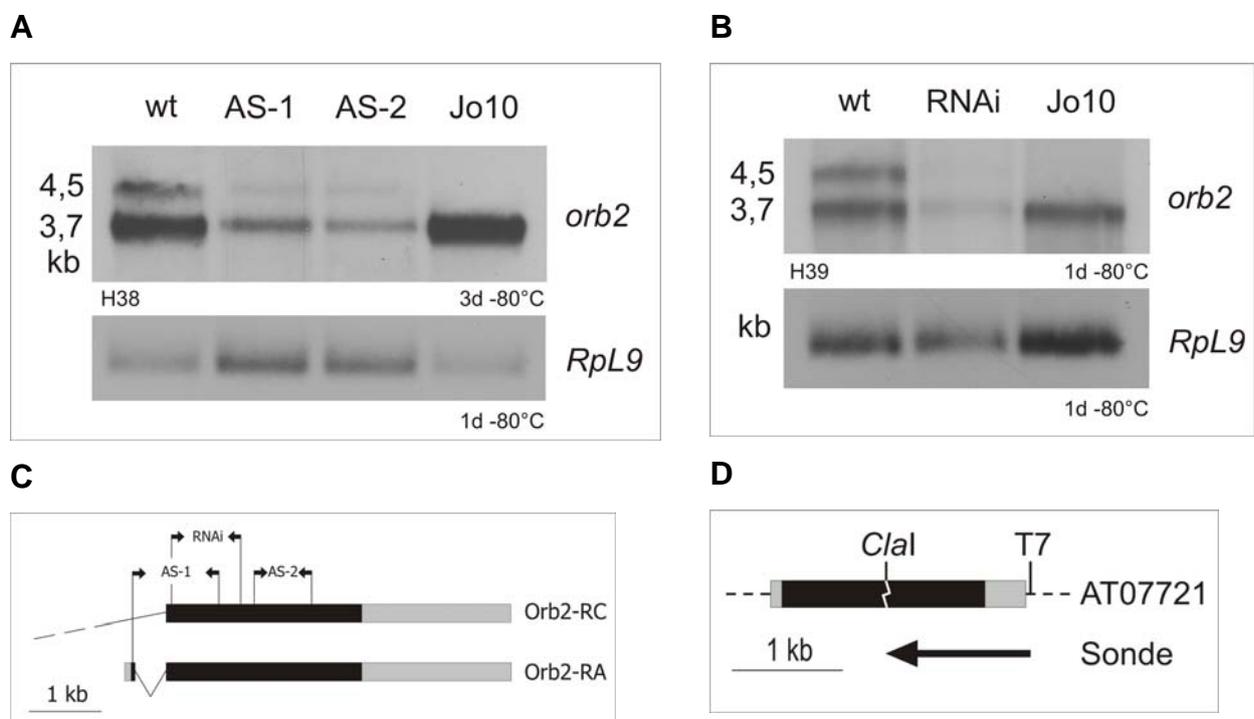


Abb. 30: Northern-Blot Analyse der antisense- und RNAi-Linien von *orb2*

A) Im Vergleich zum Wildtyp liegen beide *orb2* Transkripte stark reduziert vor, wurden aber nicht gänzlich ausgeschaltet. **B)** Auch das RNAi-Konstrukt verringert die Menge beider Transkripte, ohne sie ganz auszuschalten. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **C)** Lage der Primer für die antisense- und RNAi-Konstrukte. **D)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA Sonde verwendet wurde. Als Sonde wurde der *ClaI* geschnittene cDNA Klon AT0721 eingesetzt und bei der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase der antisense-Strang mit radioaktiven α^{32} -P-UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro* Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

Im Gegensatz zur Remobilisierungslinie und den beiden P-Element-Linien war in diesen Fällen das größere Transkript nach vorhanden. Offensichtlich reicht diese Transkriptmenge aber nicht aus, um genügend Protein zur Aufrechterhaltung der

Funktion von Orb2 herzustellen. Die Menge an *orb2* Transkripten und damit auch der Proteinmenge scheint offensichtlich wichtig für eine korrekte Funktion zu sein. Vergleicht man die Menge der Transkripte mit der des ribosomalen Proteins L9, so scheint das RNAi-Konstrukt am besten zu funktionieren, da dort im Verhältnis am wenigsten Transkripte zu sehen sind (Abb. 30 B). Ob durch die antisense-Konstrukte und das RNAi-Konstrukt der mutante Phänotyp verstärkt werden konnte, wurde durch licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen geklärt. Im Lichtmikroskop sind die leeren Samenblasen und die degenerierten Zellen im Bereich des Terminalepithels gut zu erkennen (Abb. 31 a). Alle anderen Stadien der Spermatogenese unterscheiden sich nicht von der Situation im Wildtyp.

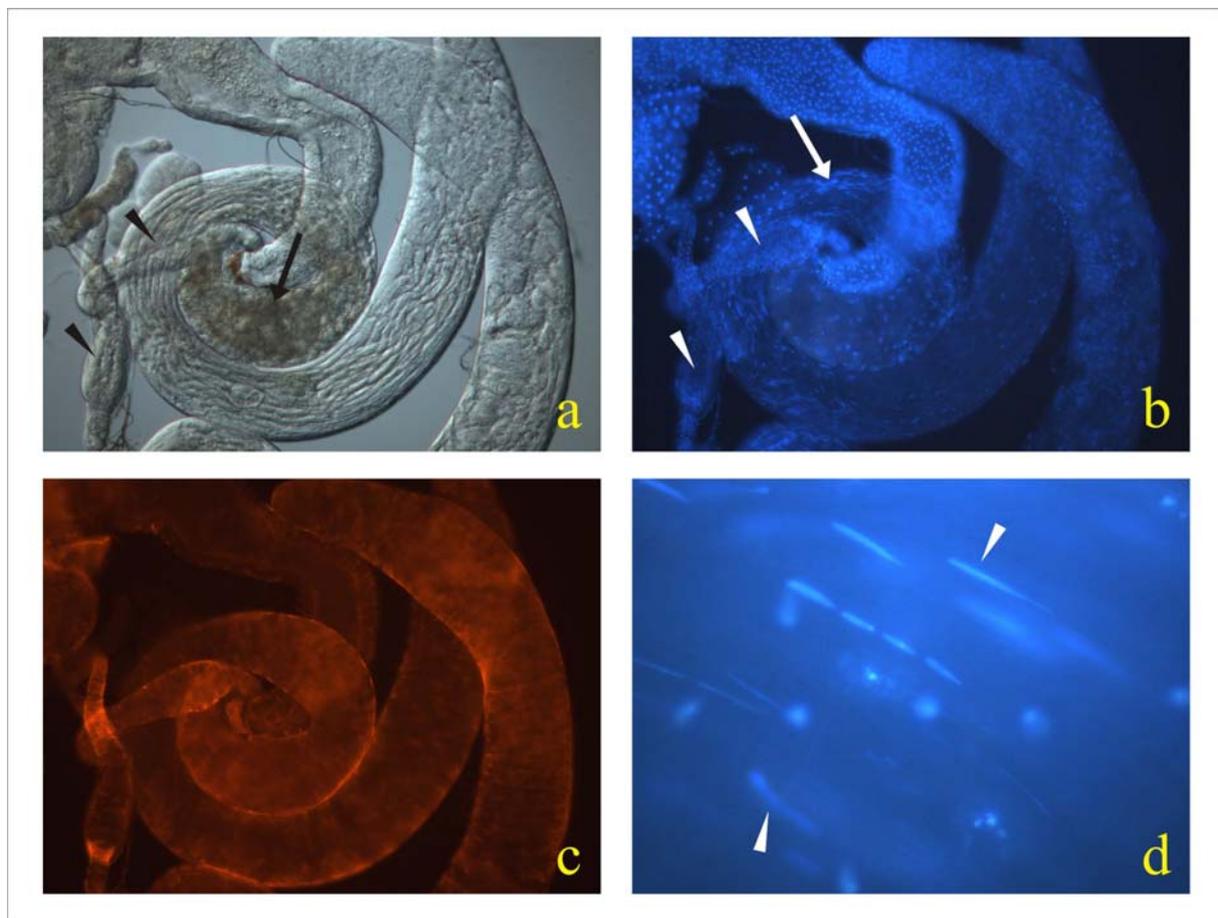


Abb. 31: Mikroskopische Untersuchungen von Hoden der *orb2* RNAi-Linien

a) Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigte alle Stadien der Spermatogenese, aber keine reifen Spermien. Die Samenblase war leer (Pfeilspitzen). Der Bereich um das Terminalepithel zeigte Degenerationsprodukte (Pfeil). **b)** Nach der Kernfärbung waren keine Bündel von Spermatidenkernen feststellbar. Die Spermatidenkerne lagen ungeordnet in den Zysten vor (Pfeil). In der Samenblase lagen keine Kerne vor (Pfeilspitzen) **c)** Durch die Färbung des F-Aktins konnten keine Individualisierungskomplexe nachgewiesen werden. **d)** Vergrößerung der ungeordnet liegenden Kerne der Spermatiden (Pfeilspitzen).

Eine Kernfärbung mit Hoechst 33258 zeigte allerdings keine Bündel von Spermatidenkernen (Abb. 31 b u. d). Die nadelförmig elongierten Kerne liegen ungeordnet in den Zysten und sind näher an der Hodenschlauchspitze zu finden, als die Kernbündel in der Wildtypsituation. Nach der Färbung mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin waren außerdem keine Individualisierungskomplexe feststellbar (Abb. 31 c). Der schon aus der Remobilisierungslinie und den P-Element Linien bekannte Phänotyp konnte mit diesen Konstrukten wiederholt werden, war aber im Vergleich zu diesen nur geringfügig stärker. In der Abbildung 31 sind die Hoden einer RNAi-Linie dargestellt. Da der Phänotyp bei den antisense-Männchen vergleichbar war, werden sie hier nicht gesondert gezeigt.

2.1.21. Auch eine Kombination von *orb2* antisense und Jo10 Mutation führte nur zur weiteren Verringerung der RNA-Menge

Da es weder mit den antisense-Konstrukten noch mit dem RNAi-Konstrukt gelang, das kleine Transkript von *orb2* vollständig abzubauen und so eine Restfunktion des Proteins auszuschließen, wurden nun antisense-Konstrukte in die männchensterile Linie *orb2*^{Jo10} eingekreuzt. Auf diese Weise sollte sich der Phänotyp noch verstärken lassen.

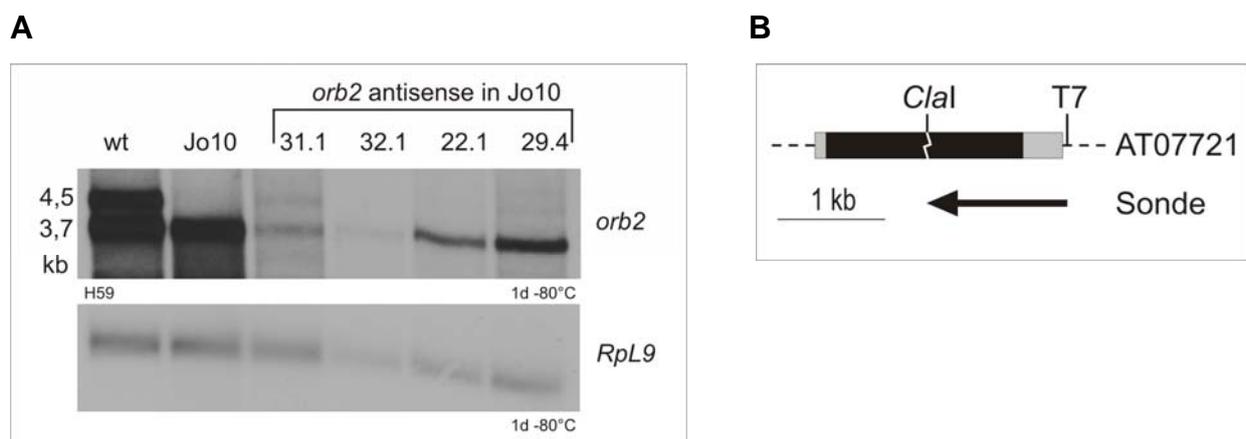


Abb. 32: *orb2* antisense-Linien in Jo10 Mutante

A) Auf die Membran wurde poly(A)-RNA von Männchen des Wildtyps, der Jump out-Linie 10 (Jo10), der *orb2* antisense-Linie 31.1, der antisense-Linie 32.1 in Jo10, der antisense-Linie 22.1 in Jo10 und der antisense-Linie 29.4 in Jo10. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA Sonde verwendet wurde. Als Template wurde der *Clal* geschnittene cDNA Klon AT07721 eingesetzt und bei der *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase der antisense-Strang mit radioaktiven $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

Die Kreuzung wurde mit verschiedenen antisense-Linien (31.1, 32.1, 22,1 und 29.4)) durchgeführt und führte zu einer unterschiedlich starken Reduktion des kleinen Transkriptes bei etwa gleicher Beladungskontrolle (Abb. 32 vergleiche Jo10 und 31.1). Ein vollständiges Ausschalten konnte aber auch mit diesem Versuchsansatz nicht erreicht werden. Bei der mikroskopischen Analyse konnte bei keiner der hier untersuchten Linien eine Verstärkung über den oben beschriebenen Phänotyp hinaus festgestellt werden (Bilder nicht gezeigt).

2.1.22. Erzeugung eines Fusionsproteins von *orb2* (pET41a und pBAD)

Zur Erzeugung eines Antikörpers und für Shift-Experimente sollte ein Fusionsprotein von *orb2* in *E. coli* Bakterien exprimiert werden. Dafür wurde der gesamte offene Leseraster des großen *orb2* Proteins verwendet. Da die Expression eines rekombinanten Proteins in *E. coli* extrem variabel und keine triviale Angelegenheit ist und für jedes Protein die Kulturbedingungen, sowie Vektoren, Bakterienstämme u.a. optimiert werden müssen, wurden zwei verschiedene Expressionssysteme parallel ausprobiert. Verwendet wurde das pET-System der Firma Promega und das pBAD-System der Firma Novagen, die unterschiedliche Domänen an das Protein fusionieren, mit denen ein Nachweis bzw. eine Aufreinigung möglich wird. In beide Vektoren wurde das offene Leseraster ohne Rasterverschiebung inkloniert und dann die Expression gestartet. Dabei zeigte sich, dass mit dem pET-System von Novagen ein *orb2*-Fusionsprotein in der erwarteten Größe induziert werden konnte. Dieses lag aber nicht löslich in den Bakterien vor, sondern bildete sogenannte Einschlußkörper (Abb. 33). Einschlußkörper sind unlösliche große Proteinkomplexe, die in rekombinanten Bakterien bei einer hohen Expressionsrate eines Plasmid codierten Gens auftreten (Carrió *et al.*, 2001). Sie können bei hohen Expressionsraten den kompletten Durchmesser der *E. coli*-Zelle ausfüllen und entstehen aus unterschiedlichen Gründen (Rudolph und Lilie, 1996). Zum einen ist der Stoffwechsel der Bakterien, durch die Bildung einer großen Menge zellfremder Proteine gestört. Zum anderen fehlen den Bakterien einige Hilfsproteine, die bei der Faltung von Proteinen benötigt werden und nur in eukaryotischen Organismen vorkommen. Proteine, die sich nicht allein falten, laufen so Gefahr in Einschlußkörpern zu verklumpen. Zur Erzeugung der rekombinanten Proteine wurden folgende verschiedene Bakterienstämme getestet: *E. coli* BL21DE3, *E.coli* BL21DepLysS, *E.*

coli XL1-blue, und *E. coli* DH5 α . Die Expression erfolgte für unterschiedlich lange Zeiten, bei verschiedenen IPTG Konzentrationen und bei unterschiedlichen Temperaturen. Bei keiner der verschiedenen Bedingungen gelang es, ein lösliches Fusionsprotein zu erhalten. Die einzige Möglichkeit, das Protein in Lösung zu bekommen, war eine ausgiebige Behandlung mit Ultraschall in einem Puffer mit 8 M Harnstoff. Mit dem pBAD Vektor Expressionssystem konnte auch bei zahlreichen Versuchen, mit unterschiedlichen Versuchsbedingungen kein Fusionsprotein erzeugt werden (Daten nicht gezeigt).

2.1.23. Das Fusionsprotein läßt sich mit Enterokinase schneiden

Der für die Expression verwendete Vektor pET41a besitzt zwischen der sogenannten „multiple cloning site“ und dem Bereich mit verschiedensten Anhängen eine Enterokinaseschnittstelle. Mittels rekombinanter Enterokinase sollte ein Teil der Domänen mit einer Größe von 30 kDa vom Fusionsprotein abgeschnitten werden, und dieses dann mit dem verbliebenen im N-terminalen Bereich liegenden His-Domäne aufzureinigen. Die Überlegung war, dass der große Anhang mit zur Unlöslichkeit beiträgt, und dass ein kleineres Protein möglicherweise leichter in Lösung geht. Durch Vorversuche konnte gezeigt werden, dass die Enterokinase in der Lage ist, von dem unlöslichen Orb2 Expressionsprotein den Anhang abzuschneiden. Die so behandelten Fusionsproteine wurden anschließend an Magnetpartikel gebunden, die spezifisch His-getagte Proteine binden können. Nach mehreren Waschschritten wurden sie eluiert und auf einer SDS-PAGE analysiert (Abb. 33). Allerdings war dieser Prozess auch nach 16 stündiger Inkubation nicht vollständig, so dass ein Anteil des Fusionsproteins weiterhin mit den angehängten Domänen vorlag (Abb. 33). Da aber auch die so behandelten Proteine, nicht in lösliche Form zu bringen waren, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

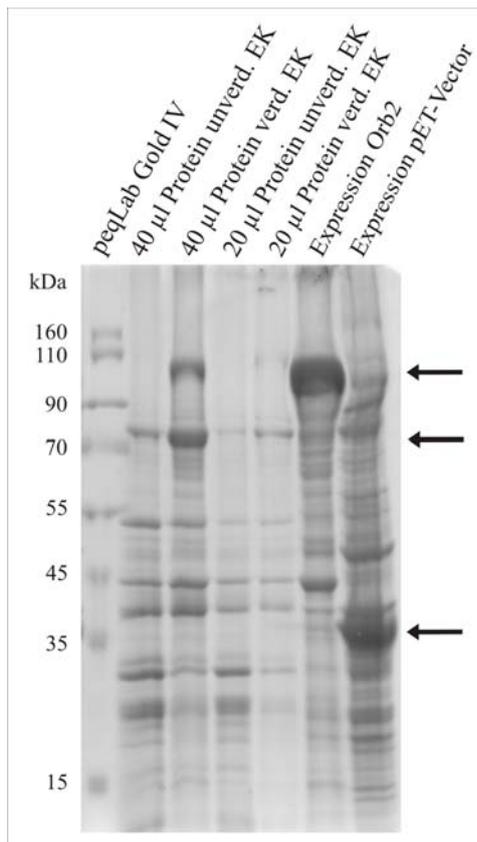


Abb. 33: Behandlung des Fusionsproteins mit rekombinanter Enterokinase

Aufgetragen wurden je 2 unterschiedliche Mengen an Proteinen aus Bakterienlysat nach der Expression des orb2 Proteins, die jeweils mit unverdünnter (1,7 units) und verdünnter (1:10) Enterokinase inkubiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Enterokinase in der Lage ist, auch von unlöslichen Proteinen den Anhang abzuschneiden (siehe Pfeil bei 70 kDa), wenn auch unvollständig (siehe Pfeil zwischen 90 und 100 kDa). In der vorletzten Spur ist als Kontrolle ungedautes Fusionsprotein, in der erwarteten Höhe von ca 100 kDa, in Bakterienlysat und in der letzten Spur induzierter leerer pET-Vektor. Bei ca. 30 kDa liegt der durch die Expression erzeugte Anhang (Pfeil). (EK=Enterokinase; verd.= verdünnt).

2.1.24. Versuch zur Rückfaltung des in Einschlußkörpern vorliegenden Fusionsproteins

Das orb2-Fusionsprotein lag trotz unterschiedlicher Expressionsbedingungen immer nur in unlöslicher Form in sogenannten Einschlußkörpern vor. Da die Proteine in der unlöslichen Form nicht funktionell sind, wurde versucht, sie in eine native Form zurückzufalten. Dieser Prozess benötigt meist ausgiebige Versuche, da die idealen Bedingungen für jedes Protein neu ermittelt werden müssen. Die Rückfaltung der Proteine ist keine einzelne Reaktion, sondern konkurriert mit anderen Reaktionen, wie Fehlfaltung oder Aggregation, die zu inaktiven Proteinen führen (Tsumoto *et al.*, 2003). Eine Möglichkeit, Proteine zurückzufalten, wurde von Carrió *et al.* (2001) beschrieben. Dabei wurde nach erfolgter Expression die Proteinbiosynthese durch Zugabe eines Antibiotikums unterbrochen. Hierzu wurde Chloramphenicol verwendet, das durch die bakterielle Plasmamembran diffundiert und an die ribosomale 50S-Untereinheit bindet. Es kommt dadurch zur Blockade der Aminoacyl-tRNA-Akzeptorstelle und somit zum Stop der Proteinbiosynthese (Carrió *et al.*, 2001). Man kann sich vorstellen, dass es während der durch die Induktion stark gesteigerten Proteinbiosynthese zu einem Engpass an Proteinen kommt, die zur Faltung von neu

gebildeten Proteinen benötigt werden. So wird ein Großteil der neu gebildeten Proteine als nicht- oder fehlgefaltete Proteine abgelagert. Dieser Prozess kann dann wieder umgekehrt werden, wenn genug Chaperone zur Verfügung stehen. Dies ist am wahrscheinlichsten zum Zeitpunkt, an dem die Neusynthese gestoppt wird (Carrió *et al.*, 2001). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die unlöslichen Proteine zuerst durch starke denaturierende Lösungen, wie 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidin-HCl in lösliche Form zu bringen (Misawa *et al.*, 1999). Diese denaturierenden Lösungen werden dann durch schrittweise Dialyse wieder entfernt, da in ihnen die Proteine zwar gelöst, aber nicht nativ vorliegen. Durch die vorsichtige Dialyse sollen den Proteinen Zeit gegeben werden, sich in ihre native Form zu falten und nicht wieder zu unlöslichen Einschlusskörpern zu werden. Auch bei dieser Methode müssen die Rückfaltungsbedingungen für jedes einzelne Protein optimiert werden (Misawa *et al.*, 1999). Bei einer weiteren Methode werden die aus den Bakterien gereinigten Einschlusskörper in durch Ultraschall frisch lysiertes Bakterienlysat gelöst und dann für mehrere Stunden inkubiert (Carrió *et al.*, 2001). Die Idee hinter diesem Versuch ist, dass bakterieller Zellextrakt in der Lage ist, Einschlusskörper zu nativen Proteinen zu überführen. Dazu werden Bakterien verwendet, die nicht zur Expression benutzt wurden. In diesem frischen Lysat sollten alle zur korrekten Faltung benötigten Proteine vorliegen, um die unlöslichen Proteine in eine native Form zu überführen (Carrió *et al.*, 2001). Die hier beschriebenen Methoden wurden alle auf das mit dem pET-Expressionssystem erzeugte *orb2* Fusionsprotein angewendet. Zunächst wurde versucht, die Proteinbiosynthese zu unterbrechen. Nach der Induktion wurde die Expression nach 4 Stunden durch das Pelletieren der Bakterien und Entfernen des LB-Mediums mit Ampicillin beendet. Durch diesen Schritt wurde auch das IPTG entfernt, mit dem die Induktion erfolgte. Durch das Lösen des Bakterienpellets in LB-Medium mit Chloramphenicol wurde dann die Proteinbiosynthese gestoppt, was mit dem Ende der Zellteilungen einhergeht. Dieses wurde durch das Messen der optischen Dichte (OD_{600}) überprüft. Die Zellen wurden nachfolgend für mehrere Stunden bis über Nacht bei 37°C inkubiert, wobei in regelmäßigen Abständen Aliquots entnommen wurden. Die Bakterien aus den Aliquots wurden lysiert und die Proteine auf einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 34).

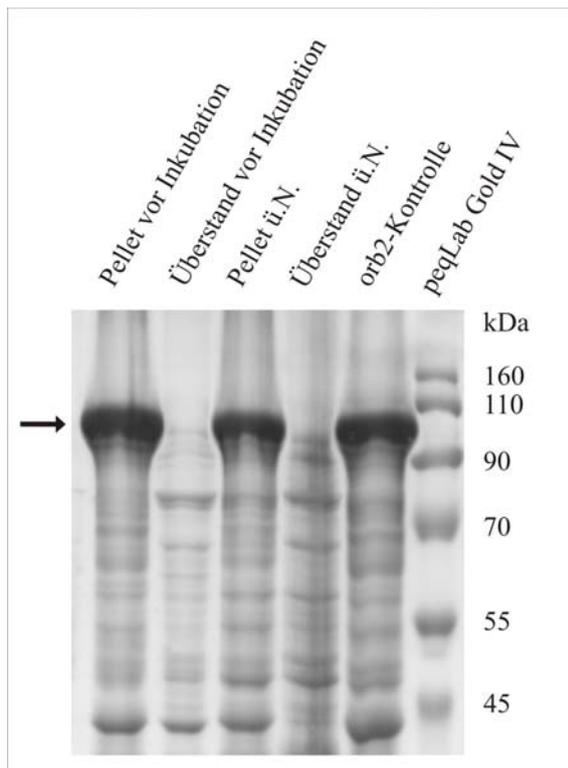


Abb. 34: Versuch zur Rückfaltung des Orb2- Expressionsproteins

In der ersten Bahn ist die unlösliche Proteinfraction nach der Expression in *E.coli* BL21DE3 aufgetragen. Deutlich ist das Fusionsprotein bei ca. 100 kDa zu erkennen. Im Überstand findet sich in dieser Höhe nur eine sehr schmale Bande. Nach der Inkubation in bakteriellem Lysat liegt wiederum die Hauptmenge des Fusionsproteins in unlöslicher Form vor. Im Überstand nach der Inkubation ist eine leichte Zunahme der Gesamtproteinmenge zu beobachten. In der letzten Spur ist als Kontrolle unlösliches Protein aus einer früheren Expression aufgetragen.

Dabei zeigte sich in allen Fraktionen, dass das *orb2* Fusionsprotein weiterhin nur in Einschlußkörpern vorlag. Eine Umwandlung in lösliches Protein konnte leider nicht festgestellt werden (Abb. 34). Auch eine mehrstündige Inkubation in bakteriellem Zelllysat und die mehrere Tage dauernde schrittweise Dialyse der gelösten Einschlußkörper von 8 M Harnstoff zu 1 M Harnstoff führten zu keinem positiven Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Da diese Versuche sehr zeitaufwendig waren, wurde von weiteren Versuchen zur Rückfaltung des *orb2*-Fusionsproteins Abstand genommen. Es wurde des weiteren versucht, das Fusionsprotein im Retikulozytenlysat zu erzeugen. Leider führte dies aber nicht zur Erzeugung eines Proteins in der richtigen Größe (Daten nicht gezeigt).

2.1.25. Die Orb2 Proteine finden sich in allen Stadien der Spermatogenese

Zur Klärung der Lokalisation der Orb2 Proteine im Hoden wurden GFP- und RFP-Konstrukte erstellt. Um beide Proteine im Hoden unterscheiden zu können, sollten für beide Transkripte je ein Konstrukt mit einem grün fluoreszierenden und einem rot fluoreszierenden Anteil versehen werden. Je eine rotleuchtende und eine grünleuchtende Fusion der beiden Proteine sollten zusammengekreuzt werden und auf eine

mögliche Co-Lokalisation hin untersucht werden. Lokalisieren beide Orb2 Proteine gleich, so sollte dies am Fluoreszenzmikroskop in der Überlagerung zu sehen sein.

2.1.26. Das große Orb2 Protein findet sich in allen Stadien der Spermatogenese

Das GFP-Fusionsprotein für die große Orb2 Proteinform besteht aus dem geneigenen Promotorbereich und dem offenen Leseraster. An diese wird durch die im P-Element Vektor P{UAST}Green befindliche GFP-Kassette der fluoreszierende Proteinanteil aus *Aequorea victoria* angehängt (Abb. 35). Durch das Anhängen der GFP-Kassette, die eine Größe von 621 nt hat, besitzt das Transkript des Orb2-GFP-Fusionsproteins eine Größe von ca. 4,6 kb bei einer Proteingröße von ca. 104 kDa. Das fertige Konstrukt wurde zusammen mit dem Transposase-tragenden Helferplasmid durch Mikroinjektion in w^{1118} -Embryonen injiziert. Auf diesem Weg konnten neun unabhängige Orb2-GFP-Linien etabliert werden. Diese Linien waren alle homozygot fertil und vital, was darauf schließen ließ, dass die Integration des Fusionsproteins in das Fliegen-genom ohne Beeinflussung eines anderen Gens erfolgte.



Abb. 35: Schematische Darstellung des großen orb2-GFP Konstrukts

Der Promotorbereich mit einer Größe von 1567 nt wurde mittels der *Taq* DNA-Polymerase und den Primern CP-GFP-1 und CP-GFP-2 auf dem Klon CP-Prom-1- CP-Prom-2 (in pGEM-T), der aus der Klonierung des 4,5 kb Rettungskonstruktes stammt, amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert. Das offene Leseraster mit einer Größe von 2437nt wurde mit den Primern CP-GFP-3 und CP-GFP-4 mittels der *Taq* DNA-Polymerase erzeugt und in den Vektor pGEM-T kloniert. Als Template diente der cDNA Klon LP05645, der das komplette ORF enthält. Verknüpft wurden beide Teile über die Schnittstelle *NheI* und dann mittels der an den Primer CP-GFP-1 angehängten Schnittstelle *BglII* und der an CP-GFP-4 angehängten Schnittstelle *SacI* in den P-Element-Vektor P{UAST}Green inkloniert, wodurch sich an das ORF eine GFP-Kassette anschließt, die eine Größe von 621 nt besitzt. Die Überprüfung der Einzelteile erfolgte durch Restriktionsanalysen. Eine mögliche Rasterverschiebung zwischen der *orb2*-Sequenz und der GFP-Kassette wurde durch eine Sequenzierung dieses Bereiches ausgeschlossen. Grau: 5'-UTR, schwarz: ORF, blau: RNA Erkennungsmotive, gelb: Zinkfinger Motif, grün: GFP-Kassette, Strich: Promotorbereich. Das in rot dargestellte *miniwhite*⁺-Gen ist verkleinert gezeichnet, seine tatsächliche Größe beträgt ca 5 kb. (B=*BglII*, N= *NcoI*, S= *SacI*).

Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein schon in den prämeiotischen Stadien der Hoden im 3. Larvalstadium zu beobachten ist (Abb. 36 b). Aufgrund der vermuteten Funktion in der Translationskontrolle war dieses Ergebnis auch zu erwarten. Zu diesem Zeitpunkt der Spermatogenese

werden viele mRNAs gebildet, die für die spätere Entwicklung der Spermien benötigt werden. Da nach der Meiose keine oder nur sehr eingeschränkte Transkription stattfindet (Olivieri und Olivieri, 1965; Gould-Somero und Holland, 1974), müssen bis zu diesem Zeitpunkt diese mRNAs hergestellt werden und dann bis zu ihrem Gebrauch aufbewahrt werden. Aus diesem Grund sollten Proteine, die diese mRNAs kontrollieren, schon in den larvalen Hoden nachweisbar sein. Der larvale Hoden ist von Fettzellen umgeben, die im Phasenkontrast grau-bräunlich wirken (Abb. 36 a). Der Bereich der Fettzellen zeigt kein GFP-Signal, nur eine leicht gelbliche Hintergrundstrahlung. Das GFP-Signal ist eindeutig im Cytoplasma der primären Spermatozyten zu sehen, die Zellkerne und Nebenkern (Mitochondrien) sind frei von Fluoreszenz (Abb. 36 b). Dies zeigte, dass das große Protein von *orb2* im Cytoplasma von larvalen Hoden lokalisiert ist. Eine Assoziation mit Membranen oder Organellen war nicht zu beobachten.

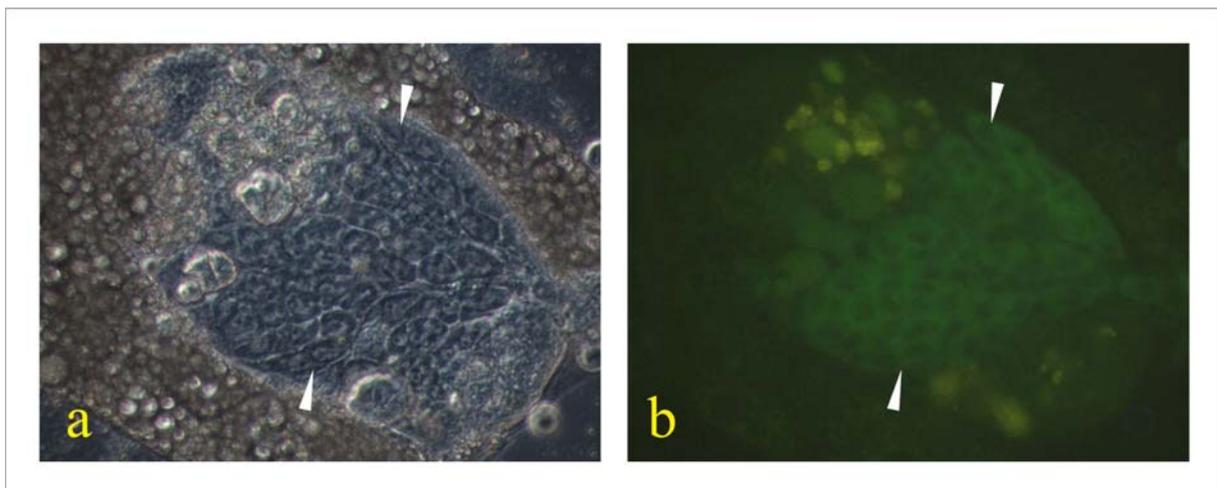


Abb. 36: Lokalisation des großen Orb2-GFP Fusionsproteins im dritten Larvalstadium

a) Phasenkontrastaufnahme eines larvalen Hodens einer transgenen Linie. Umgeben von grauen Fettzellen liegen die primären Spermatozyten (Pfeilspitzen) des larvalen Hodens. **b)** Das GFP-Fusionsprotein ist im Cytoplasma der Spermatozyten lokalisiert (Pfeilspitzen).

In den Hoden adulter Tiere zeigte sich somit die Fluoreszenz des GFP-Proteins schon in den primären Spermatozyten nahe der Hodenschlauchspitze (Abb. 37 b). Das Fusionsprotein lässt sich in den Bündeln der elongierenden Spermatischen feststellen, wobei es ein besonders starkes Signal im Bereich der sogenannten waste bags gibt (Abb. 37 a), was auf einen erhöhten Orb2 Proteinanteil schließen lässt. Wie schon in den larvalen Hoden beobachtet wurde, zeigte sich auch in den adulten Hoden das Fusionsprotein nur im Cytoplasma, aber nicht in den Kernen und auch nicht in den Nebenkernen (Mitochondrien-Derivaten) (Abb. 37 c, d). Im Bereich des Terminalepithels beginnen die Spermien sich aufzuknäulen. In diesen Stadien

war kein GFP-Signal festzustellen (Abb. 37 d). Auch die in den Samenblasen lokalisierten reifen Spermien zeigten keine Fluoreszenz (Abb. 37 a). Das große *orb2*-Protein ist somit in allen Stadien der Spermatogenese mit Ausnahme der reifen Spermien lokalisiert.

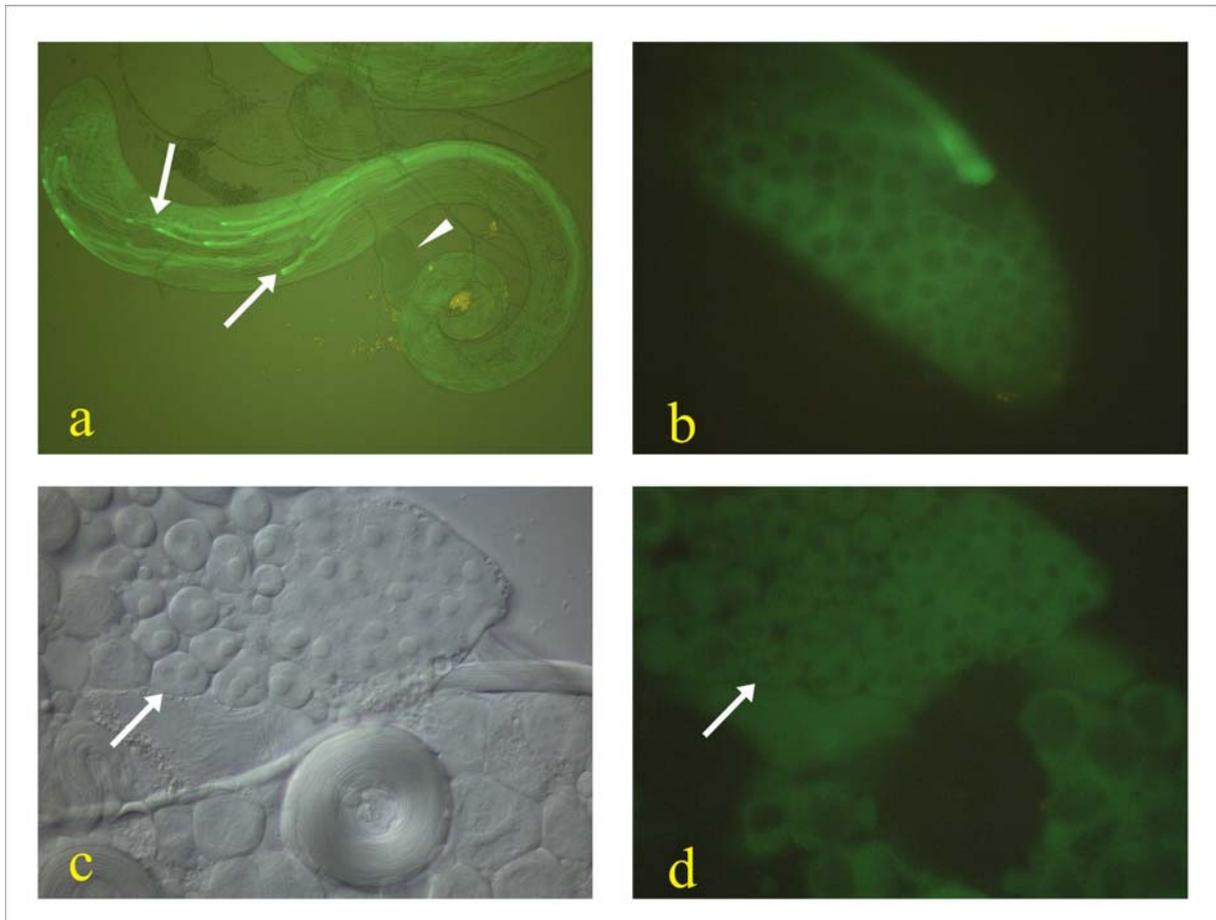


Abb. 37: Lokalisation des großen Orb2-GFP-Fusionsproteins

a) In der Übersicht ist zu erkennen, dass das Fusionsprotein in allen Stadien der Spermatogenese vorliegt. Eine Ausnahme bilden die reifen Spermien. In der Samenblase ist keine Fluoreszenz zu beobachten (Pfeilspitze). Ein besonders starkes Signal findet sich an den Enden der Spermatidenbündel, einem Bereich, der als „waste bags“ angesprochen werden kann (Pfeile). **b)** Das Fusionsprotein findet sich schon im Cytoplasma der primären Spermatocyten. Die Kerne (schwarz) zeigen kein Signal. **c)** und **d)** Während das Cytoplasma der Spermatocyten fluoresziert, liegt in den Kernen und Nebenkernen kein Fusionsprotein vor (Pfeil). Die aufgeknäulten Spermien zeigen ebenfalls kein Fluoreszenzsignal.

2.1.27. Das große Orb2-GFP-Fusionsprotein rettet den mutanten Phänotyp

Zur Überprüfung der Funktionalität des Orb2-GFP-Fusionsproteins wurde es in die männchensterile Jump out Linie 10 eingekreuzt (siehe Kreuzungsschema 2.1.12.). Für die Kreuzung wurden zwei verschiedene Orb2-GFP-Linien (18.2 und 36.1) verwendet, die das Fusionsprotein auf dem zweiten Chromosom trugen. Männchen mit einer oder zwei Kopien des GFP-Konstruktes im *orb2* mutanten Hintergrund

waren fertil. Allerdings hatten Männchen mit zwei Kopien stets deutlich mehr Nachkommen als Tiere, die nur eine Kopie trugen. Dieses Ergebnis zeigte, dass das Orb2-GFP-Fusionsprotein funktionell ist und die Verteilung des Fluoreszenzsignals im Hoden die Verteilung des Orb2 Proteins im Wildtyp widerspiegelt. Somit konnte das Fusionsprotein für später beschriebene Co-Immunpräzipitationsversuche verwendet werden, da es mit den gleichen Proteinen und Nukleinsäuren interagieren müsste wie das Wildtyp-Protein. Eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dieser Linien zeigte, dass auch im mutanten Hintergrund die gleiche Verteilung des Fusionsproteins zu beobachten ist wie im Wildtyp (Abb. 38 a und b).

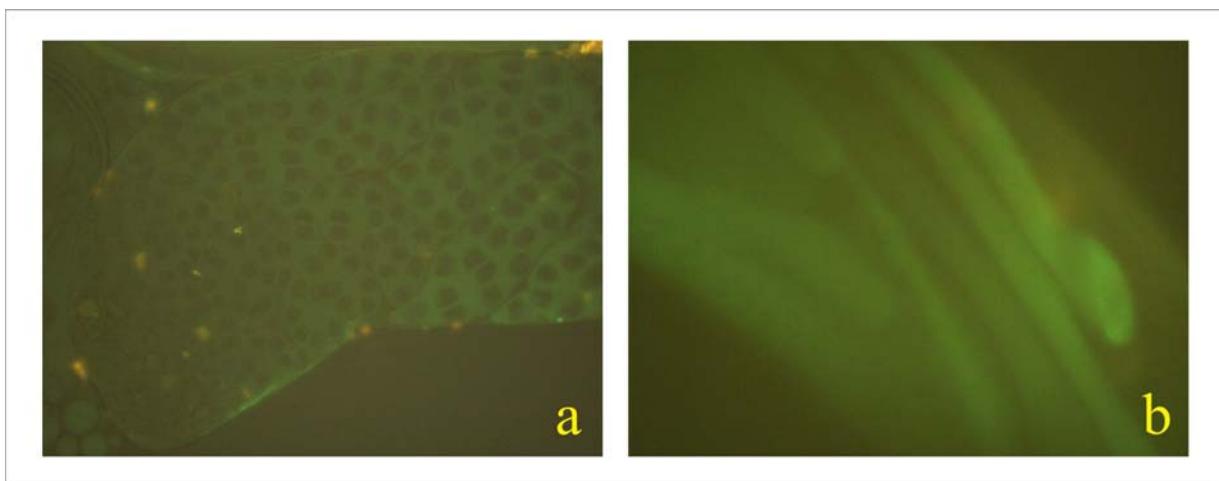


Abb. 38: 4,5 GFP Rettungskonstrukt in *orb2*^{Jo10} Hintergrund

a) Das Fusionsprotein liegt in den primären Spermatozyten vor. Die Kerne (schwarz) zeigen keine Fluoreszenz. b) Auch die elongierenden Spermatidenbündel zeigen das Fluoreszenzsignal.

Zum Nachweis des GFP-Konstruktes in der *orb2* Mutante wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Wildtyp-Männchen, homozygote Jo10 Männchen und Tiere verwendet, die homozygot für das Jo10-Allel und heterozygot oder homozygot für das Rettungskonstrukt waren. Wie Abb. 39 zeigt, konnte das GFP-Konstrukt in den mutanten Hintergrund eingekreuzt werden. Das Orb2-GFP-Konstrukt bildet wie oben beschrieben eine RNA von ca. 4,6 kb und ist damit von der Wildtyp-RNA nicht zu unterscheiden. Allerdings wurden alle Kreuzungsschritte mittels Balancerchromosomen verfolgt, was ein versehentliches Einkreuzen des Wildtypparallels unwahrscheinlich macht. Der Befund, dass Männchen, die nur eine Kopie des Rettungskonstruktes im mutanten Hintergrund besaßen, weniger Nachkommen erzeugten, als Männchen mit zwei Kopien, ist ein weiterer Hinweis dafür, dass sich nur die große Orb2-GFP-Konstrukt RNA und nicht die endogene große RNA in diesen transgenen Männchen befindet.

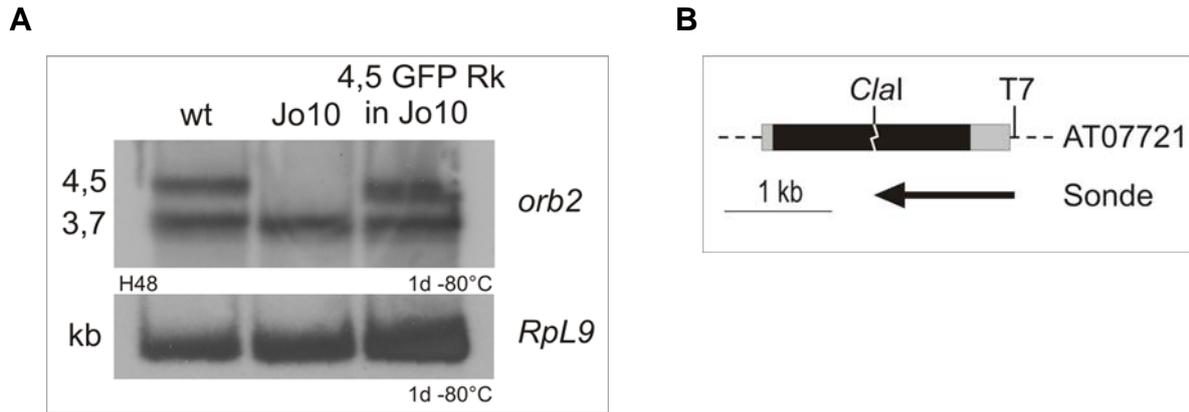


Abb. 39: Nachweis des 4,5 kb GFP Rettungskonstruktes in Jump out 10

A) Auf der Northern Membran wurde poly(A)-RNA von Männchen des Wildtyps, der *orb2* Jump out-Linie 10 und des 4,5 kb Orb2-GFP-Konstrukts in Jump out Linie 10 (4,5 GFP Rk in Jo10) aufgetragen. Die Spuren des Wildtyps und von *orb2*^{Jo10} zeigen das oben beschriebene Bandenmuster. In der dritten Spur ist das Transkript des Orb2-GFP-Konstrukts im mutanten Hintergrund zu sehen. Da es eine Größe von 4,6 kb hat, kann es auf der Membran nicht vom Wildtyptranskript unterschieden werden. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA Sonde verwendet wurde. Als Template für die RNA-Sonde wurde der *Clal* geschnittene cDNA Klon- AT07721 eingesetzt. Bei der *in vitro* Transkription mit der T7 RNA-Polymerase wurde der antisense-Strang mit radioaktivem $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP markiert. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro* Transkription eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt.

2.1.28. Das kleine Orb2-Protein ist schwächer exprimiert, persistiert aber länger

Auch zum Nachweis der Lokalisation des kleineren Orb2-Proteins wurde ein GFP-Fusionsprotein erzeugt. Das GFP-Konstrukt besteht aus dem geneigenen Promotorbereich, dem offenen Leseraster und der GFP-Kassette (Abb. 40).

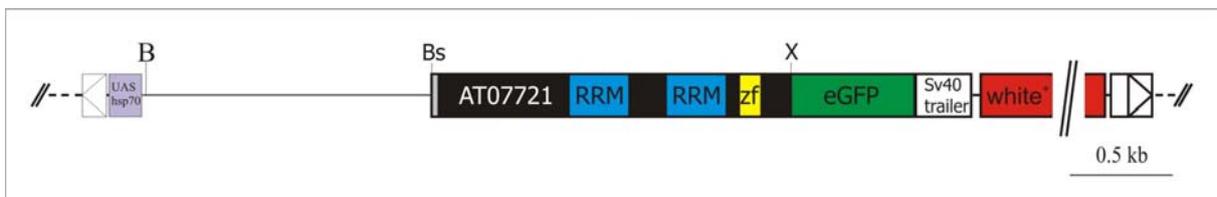


Abb. 40: Schematische Darstellung des kleinen Orb2-GFP-Konstrukts

Der Promotorbereich wurde mit *Taq*-Polymerase auf dem Klon CP-Prom-4 – CP-Exon 1d-2 in pGEM-T (Promotorbereich kleines Rettungskonstrukt) als Template, mit den Primern CP-GFP-5 und CP-Exon 1d-2 erzeugt. Der so erzeugte Promotorbereich besitzt eine Größe von 1395 nt. Das offene Leseraster mit einer Größe von 1747 nt wurde durch PCR mit *Taq* DNA-Polymerase mit den Primern CP-Exon 1d-1 und CP-GFP-4 erzeugt, als Template diente der cDNA-Klon AT07721. Beide Teile werden in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert, mit der Schnittstelle *BsrGI* verknüpft und in den Vektor P{UAST}Green mit den Schnittstellen *BglII* und *XhoI* einkloniert. Der 5'-UTR ist in grau, das offene Leseraster in schwarz dargestellt, die dünne Linie ist ein Teil des vermuteten Promotorbereiches. Die RNA Erkennungsmotive sind in blau, das Zinkfinger Motif in gelb und die angehängte GFP-Kassette in grün dargestellt. Das in rot dargestellte *miniwhite*⁺-Gen ist verkleinert gezeichnet, seine tatsächliche Größe beträgt ca 5 kb. (B= *BglII*, Bs= *BsrGI*, X= *XhoI*).

Zusammen mit der GFP-Kassette hat das kleinere *orb2* Transkript eine Größe von 3763 nt, was in etwa der Größe des endogenen Transkripts entspricht. Das Fusionsprotein hat eine Größe von ca. 90 kDa. Das Konstrukt wurde zusammen mit dem Transposase-Helferplasmid durch Mikroinjektion in *w¹¹¹⁸*-Embryonen injiziert. Insgesamt konnten acht verschiedene Integrationslinien erzeugt werden. Alle homozygoten Tiere waren vital und fertil. Das kleinere *orb2*-GFP-Konstrukt zeigte sich wie auch schon das große in allen Stadien der Spermatogenese. Sowohl primäre Spermatozyten wie auch elongierende Spermatiden zeigten ein Fluoreszenzsignal. Auch hier konnte eine besondere Anhäufung des Fusionsproteins im Bereich der „waste bags“ festgestellt werden (Abb. 41 c).

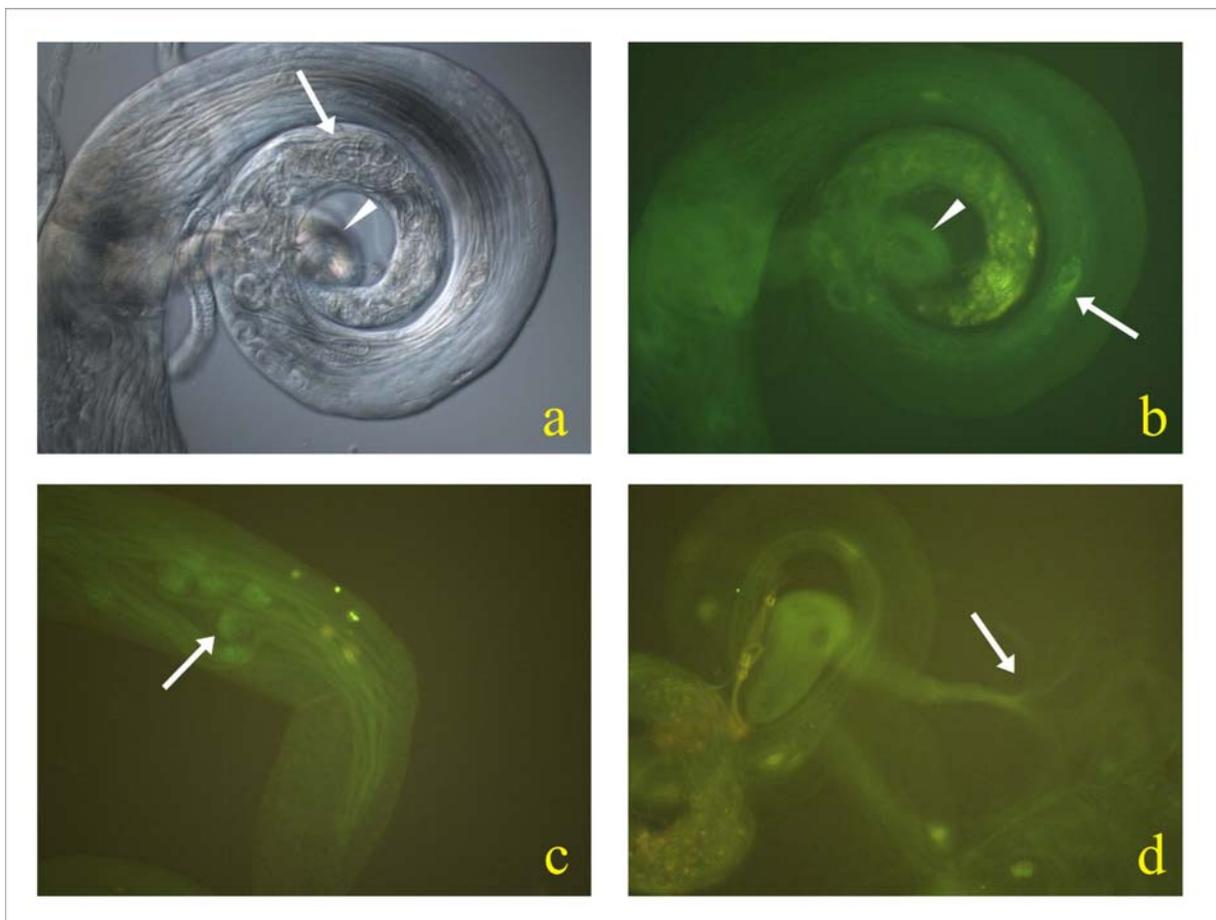


Abb. 41: Lokalisation des kleinen *orb2*-GFP-Konstruktes

a) Lichtmikroskopische Aufnahme des Hodenschlauches einer *orb2*-GFP-Linie. In der Mitte sind der Bereich des Terminalepithels mit den aufknäulenden Stadien (Pfeil) und die gefüllte Samenblase (Pfeilspitze) gut zu erkennen. **b)** Die Fluoreszenz ist gut auf den Spermatidenbündeln (Pfeil) und den reifen Spermien in der Samenblase (Pfeilspitze) zu beobachten. Die leicht gelblich gefärbten Bereiche stellen Degradationsprodukte dar. **c)** Eine starke Fluoreszenz ist in den waste bags zu beobachten (Pfeil). **d)** Auch reife, motile Spermien (Pfeil) enthalten das kleine Orb2-GFP-Fusionsprotein.

Im Gegensatz zum großen Orb2-Fusionsprotein ist das kleinere auch an aufgeknaulten Stadien und reifen Spermien in den Samenblasen lokalisiert (Abb. 41

d). Das Fluoreszenzsignal ist insgesamt gesehen allerdings etwas schwächer als beim großen Orb2-GFP-Konstrukt. Von beiden Proteinen wurden jeweils auch RFP-Fusionskonstrukte erstellt, um eine mögliche Co-Lokalisation der beiden Orb2-Proteine nachzuweisen. Dazu wurden die gleichen Genfragmente verwendet wie für die GFP-Fusionsproteine und in den P-Element-Vektor p{UAST}Red (Schäfer, 2003) einkloniert. Eine Sequenzierung durch die Firma Genterprise (Mainz) ergab, dass beide Konstrukte ohne Rasterverschiebung einkloniert werden konnten. Für beide Konstrukte konnten acht (4,5 kb) bzw. sechs (3,7 kb) transgene Fliegenlinien erzeugt werden. Alle untersuchten Linien waren homozygot vital und fertil. Unglücklicherweise war unter dem Fluoreszenzmikroskop in den Hoden bei beiden transgenen Linien sowohl bei heterozygoten wie bei homozygoten Männchen kein RFP-Signal zu entdecken. Wie sich später herausstellte, zeigte dieser RFP-Vektor auch bei anderen Fusionen kein oder nur ein sehr schwaches Signal.

2.1.29. Die Translation von *protamin A* und *B* scheint durch Orb2 kontrolliert zu werden

Um Kandidaten-mRNAs zu identifizieren, die von Orb2 in *Drosophila* kontrolliert werden, wurden Kreuzungen mit verschiedenen *LacZ*-Fusionslinien durchgeführt, von denen bekannt ist, dass sie unter Translationskontrolle stehen. Zu diesen Linien gehörten *mst87F* (Kuhn *et al.*, 1988), *don juan* (Santel *et al.*, 1997; Hempel *et al.*, 2006) und *priapos* (Renkawitz-Pohl R., pers. Mitteilung). Diese Linien zeigen eine β -Galactosidasefärbung erst in späteren Stadien der Spermatogenese. Der larvale Hoden zeigte keine Färbung. Sollte die Translation dieser mRNAs von Orb2 kontrolliert werden, so sollten sie in einem *orb2* mutanten Hintergrund schon in frühen Stadien eine Färbung zeigen. Dies war allerdings bei keiner der hier getesteten Linien der Fall. Als Beispiel ist die β -Galactosidasefärbung einer *mst87F*-Linie im heterozygoten und homozygoten *orb2* mutanten Hintergrund dargestellt. Bei beiden Linien war die Färbung erst ab den elongierenden Spermatozyten feststellbar. Die Spermatozyten zeigten keine Färbung (Abb.42).

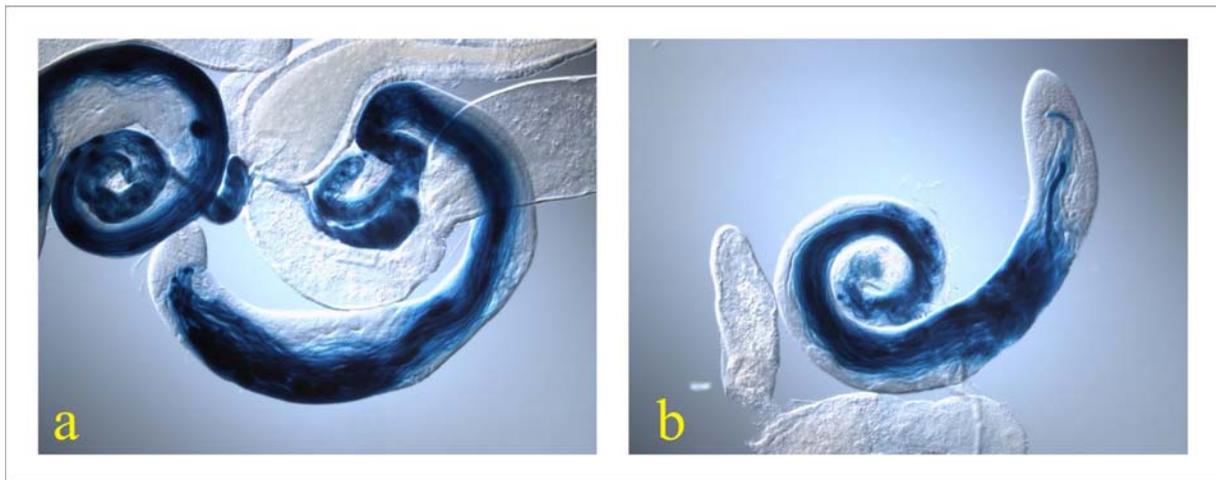


Abb. 42: β -Galactosidasefärbung der (-102 +201 30/Y)

a) *Mst87F-lacZ*-Fusion in heterozygoter Jump out 10 Linie. Eine Färbung ist ab den elongierenden Spermatiden zu beobachten. **b)** *Mst87F-lacZ*-Fusion in homozygoter Jump out 10 Linie. Es ist kein Unterschied in der Färbung zu beobachten.

Als weitere mögliche mRNA-Kandidaten, deren Translation kontrolliert wird, lagen Protamine als GFP-Fusionen vor (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Protamine ersetzen in einer späten Phase der Spermatogenese die Histone und ermöglichen eine starke Kompaktierung der Spermien DNA, die sich in einer Hoechst-Färbung als Veränderung von einer runden Form zu einer nadelförmigen Struktur des Kerns darstellt (Lindsley und Tokuyasu, 1980; Tokuyasu, 1974; Braun, 2001). In *Drosophila melanogaster* sind zwei verschiedene Protamine (A und B) bekannt, die zu 94 % identisch sind. Beide Formen werden erst bei der Elongation der Spermatiden translatiert und bis zu diesem Zeitpunkt kontrolliert. Die *trans* und *cis* wirkenden Faktoren sind allerdings unbekannt (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Die Protamin A-eGFP und Protamin B-eGFP Linien wurden so mit der mutanten *orb2*³²¹⁸⁹ P-Element-Linie gekreuzt, dass Tiere vorlagen, die sowohl homozygot für das GFP-Konstrukt als auch für die *orb2* Mutation waren (siehe Kreuzungsschema unter 2.1.12.). Hoden dieser Tiere wurden präpariert und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Männchen, die das Protamin B-eGFP-Konstrukt im *orb2* mutanten Hintergrund trugen, zeigten verglichen mit dem Wildtyp (Abb. 43 a) eine verfrühte Expression des Fusionsproteins. Dieses zeigte sich nicht erst in den Spermispitzen kurz vor Ende der Individualisierung, sondern schon in früheren Spermatogenesestadien. So konnte das Protein schon in runden Kernstadien beobachtet werden, in denen die Protamine im Wildtyp noch nicht vorliegen (Abb. 43 b und e). Neben diesen Beobachtungen zeigte sich der in den *orb2* Mutanten schon beschriebene Phänotyp. Die Bündel von nebeneinander liegenden,

nadelförmigen Kernen der Spermatisden, die im Wildtyp kurz vor dem Terminalepithel in großer Menge zu beobachten sind, fehlen im mutanten Hintergrund völlig (Abb. 43 c und f).

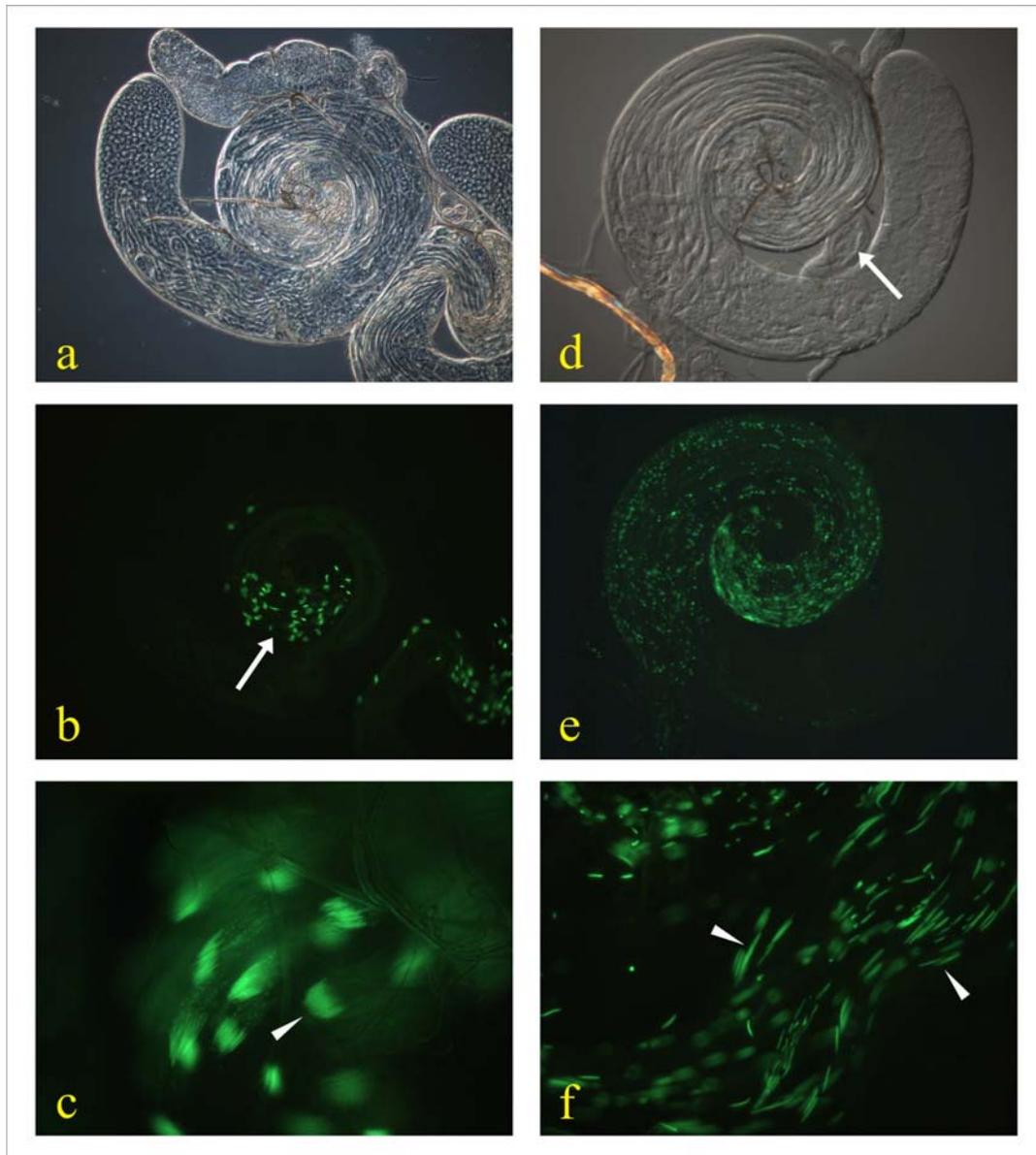


Abb. 43: Protamin B im *orb2* mutanten Hintergrund

a-c) Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Hodenschlauches eines Protamin B-eGFP-Männchens. Das GFP-Fusionsprotein ist erst in den nadelförmigen Kernen der Spermatisden im Bereich des Terminalepithels zu sehen (Pfeil in b). Deutlich sind in der Detailaufnahme die aneinanderliegenden Spermatisdenkerne eines Bündels zu sehen (Pfeilspitze in c). **d-f)** Hodenschlauch der P-Element Linie Orb232189 mit eingekreuztem Protamin B-eGFP-Konstrukt. In der lichtmikroskopischen Aufnahme ist die leere Samenblase (Pfeil in d) zu erkennen. Im Unterschied zum Wildtyp zeigt sich hier die Fluoreszenz schon in runden Kernstadien. Die Detailaufnahme zeigt, dass die nadel- und punktförmigen fluoreszierenden Kerne in einer Zyste vorliegen, die außerdem in einem eher lockeren Verband, aber nicht parallel angeordnet sind (Pfeilspitzen in f).

Einen ähnlichen Phänotyp zeigt auch das Protamin A-eGFP-Konstrukt im *orb2* mutanten Hintergrund. Es fluoreszieren allerdings wesentlich weniger runde Kerne

als beim Protamin B eGFP-Konstrukt (Abb. 43 a). Das Fluoreszenzsignal ist wie oben beschrieben schon in runden Kernen zu finden. Neben runden Kernen finden sich auch solche, die dem Kanu-Stadium zugeordnet werden können (Abb. 44 d Ausschnitt). Zu diesem Zeitpunkt beginnt normalerweise die Translation der Protamine. Der Defekt, dass runde und elongierte Kerne ein Fluoreszenzsignal zeigen, müsste von der Mutante kommen und bei beiden gleich sein. Der Beginn der Fluoreszenz könnte aber von den Protaminen herrühren und deshalb verschieden sein.

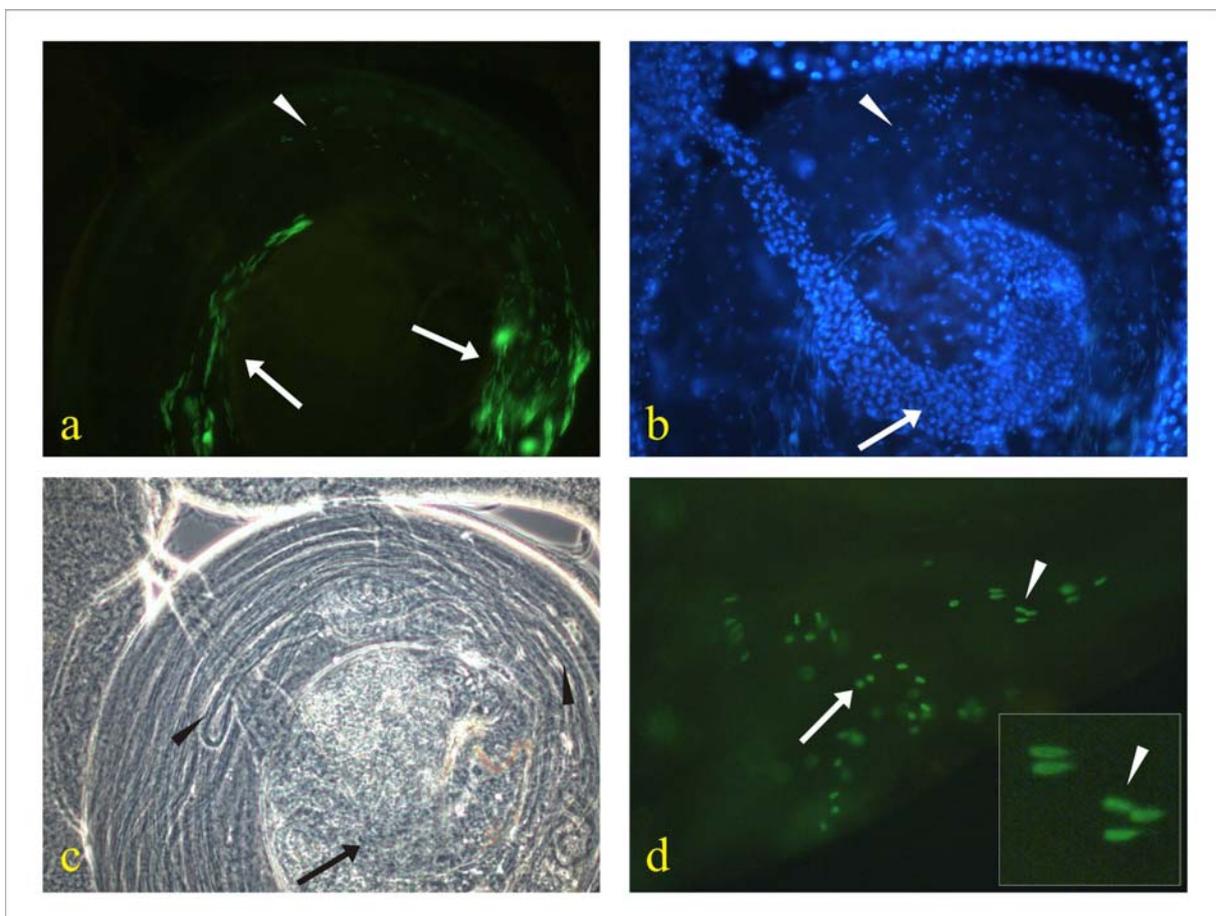


Abb. 44: Protamin A im Orb2 mutanten Hintergrund

a) Die Kerne der Spermatiden liegen einzeln in den Cysten und nicht im Paket vor (Pfeile). Außerdem sind sie schon in einem Bereich gefärbt, in dem sie im Wildtyp noch kein Protamin enthalten. Zudem liegen runde Stadien vor, in denen das Protamin A-eGFP-Fusionsprotein vorliegt (Pfeilspitze). **b)** Die Hoechstfärbung zeigt, dass die runden grünen Stadien in Bild a wirklich Kerne darstellen (Pfeilspitze). In der Bildmitte sind in dichter Zahl die Kerne der Samenblase zu sehen. Es lassen sich keine nadelförmigen Kerne reifer Spermien in der Samenblase feststellen (Pfeil). **c)** Lichtmikroskopische Aufnahme des Hodenschlauches. Die elongierenden Spermatidenbündel sehen in dieser Aufnahme aus, wie es sich auch im Wildtyp beobachten lässt (Pfeilspitzen). Die Samenblase ist leer (Pfeil). **d)** Schon runde Stadien enthalten das Fusionsprotein (Pfeil). Auf der rechten Seite liegen Kerne vor, die ihrer Morphologie nach dem Kanu-Stadium zugeordnet werden können (Pfeilspitze, Vergrößerung). Während dieses Stadiums beginnt normalerweise im Wildtyp die Translation der Protamine.

2.1.30. Auch *mst77F* zeigt eine verfrühte Translation im *orb2* mutanten Hintergrund

Zum gleichen Zeitpunkt, zu dem die Protamine translatiert werden, findet sich ein weiteres Protein in den Kernen von elongierenden Spermatiden, welches unter Translationskontrolle steht. Das Protein Mst77F ist ein entfernter Verwandter der Histon H1/H5-Familie und es wird vermutet, dass es entweder eine Funktion als Transitionsprotein oder als Ersatzprotein bei der Kompaktierung der Spermien-DNA hat (Meistrich *et al.*, 2003; Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Im Wildtyp-hintergrund findet sich das GFP-Fusionsprotein in den nadelförmigen Kernen der elongierenden Bündel (Abb. 45 a). Im *orb2* mutanten Hintergrund findet sich auch hier die Fluoreszenz schon in runden Kernen. Allerdings liegt im *orb2* mutanten Hintergrund sehr viel weniger GFP-Fusionsprotein vor als im Wildtyp. Im 5'-UTR von *mst77F* findet sich wie auch bei *protaminA* nur ein CPE, während das 5'-UTR von *protamin B* zwei enthält. Vielleicht rührt die geringere Menge an Fusionsprotein in den Mutante im Vergleich zum Wildtyp daher, dass *mst77F* und *protamin A* mit nur einem CPE wesentlich schlechter vom verbliebenen Orb2 Protein gebunden und deshalb stärker degradiert werden.

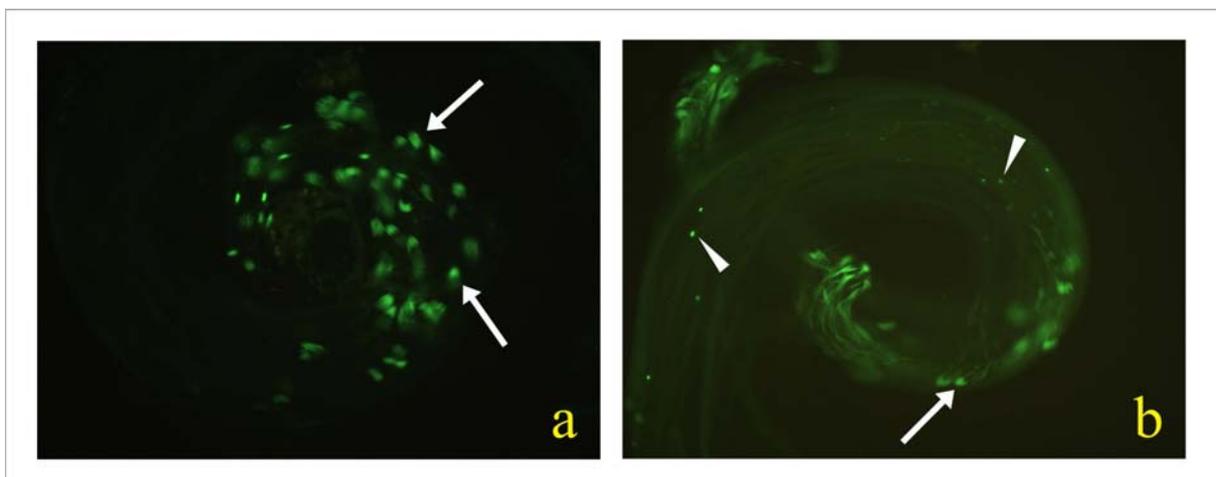


Abb. 45: Mst77F eGFP in *orb2* Mutante

a) Verteilung von Mst77F eGFP im Wildtyp. Die Fluoreszenz ist wie bei den Protaminen in den nadelförmigen Kernen zu beobachten (Pfeile) **b)** Im Orb2 mutanten Hintergrund finden sich nur wenige Bündel von nadelförmigen Kernen (Pfeil). Vereinzelt zeigen runde Kerne ein Fluoreszenzsignal (Pfeilspitzen).

2.1.31. In *orb2*-Mutanten kommt es zu Co-Lokalisation von Histonen und Protaminen

Histone werden während der Spermatogenese erst durch Transitionsproteine und dann durch Protamine ersetzt (Rathke *et al.*, 2007). Dies lässt sich durch Färbungen der Histone und durch Protamin eGFP Konstrukte zeigen. So zeigen runde Spermatiden Histone, die am Beginn der Elongation der Kerne nicht mehr zu sehen sind. Die Protamine lassen sich erst beobachten, wenn die Elongation anfängt, in einem Stadium, das als Kanu bezeichnet wird (Rathke *et al.*, 2007). So liegen Histone und Protamine nie gleichzeitig vor.

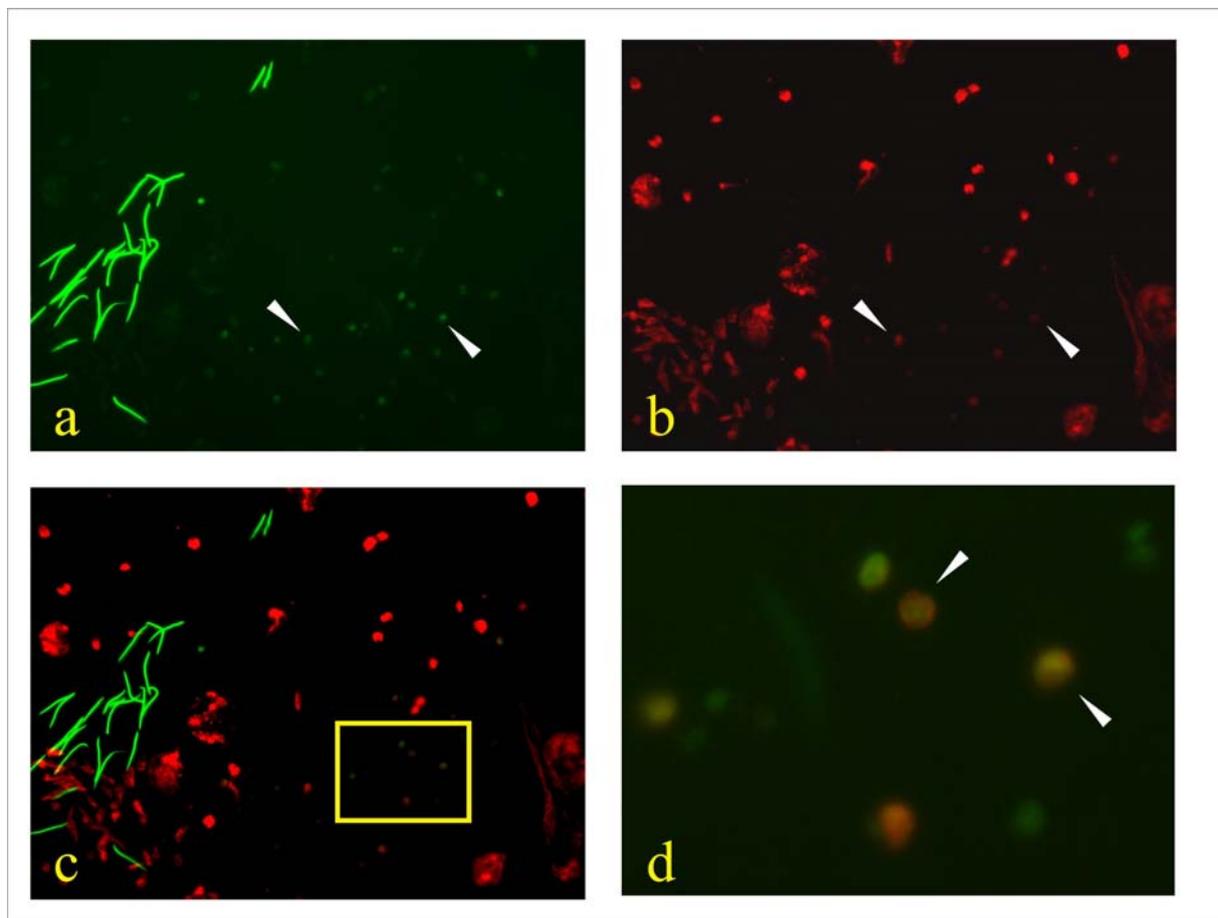


Abb. 46: Testis-Quetschpräparate der sterilen P-Element Linie BL32189 mit Protamin A-eGFP-Transgen

a) Das Protamin A-eGFP Konstrukt ist schon in runden Kernen zu beobachten (Pfeilspitzen). **b)** Nachweis der Histone mit einem anti-Histon Antikörper. In den runden Stadien finden sich Histone, kurz bevor sie im Wildtyp von Protaminen ersetzt werden (Pfeilspitzen). **c)** In der Überlagerung sieht man, dass Protamine und Histone im *Orb2* mutanten Hintergrund gleichzeitig vorliegen. **d)** Die Vergrößerung zeigt deutlich die Überlagerung von Histonen und Protaminen (Pfeilspitzen) gegenüber solchen Kernen, die nur Protamin enthalten.

Sollten die beiden Protamine in der *orb2*- Mutante wirklich zu früh translatiert werden, so müssten Histone und Protamine zur gleichen Zeit zu beobachten sein. Um dies zu testen, wurden Quetschpräparate von Hoden der *orb2*-Mutante, die ein Protamin A- oder Protamin B-eGFP-Konstrukt trugen, angefertigt und dann mit einem anti-Histon Antikörper gefärbt (Abb. 46 und 47).

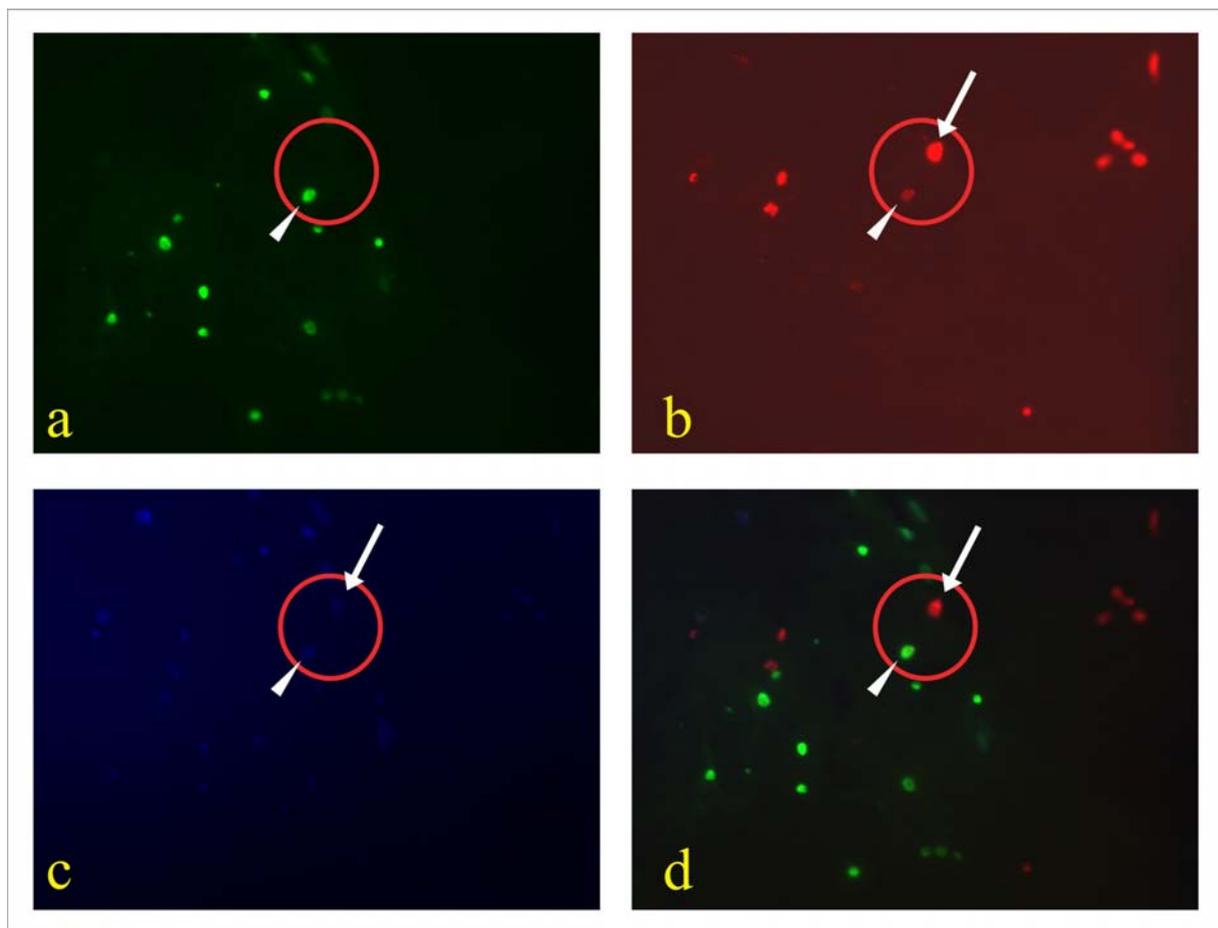


Abb. 47: Testis-Quetschpräparate der sterilen P-Element Linie BL32189 mit Protamin B-eGFP-Transgen

a) Das Protamin A-eGFP-Konstrukt ist schon in runden Kernen zu beobachten (Pfeilspitze). **b)** Nachweis der Histone mit einem anti-Histon Antikörper. In den runden Stadien finden sich Histone, kurz bevor sie im Wildtyp von Protaminen ersetzt werden (Pfeil und Pfeilspitze). **c)** Die Hoechst 33258-Färbung zeigt, dass es sich bei beiden mit Pfeil bzw. Pfeilspitze markierten Strukturen, um Kerne handelt. **d)** In der Überlagerung sieht man im Vergleich mit den Einzelbildern, dass Protamine und Histone im *Orb2* mutanten Hintergrund gleichzeitig vorliegen (Pfeilspitze) Der Pfeil markiert einen Kern, der keine Histonfärbung zeigt.

Dabei zeigte sich, dass in einigen Fällen Histone und Protamine zur gleichen Zeit vorlagen (Abb. 46 d und 47 a, b, d). Die Überlagerung war in runden Kernstadien zu beobachten, in denen das Protamin noch nicht vorliegen sollte (Rathke *et al.*, 2007). Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass beide Protamine im *orb2* mutanten Hintergrund zu früh translatiert werden. Dass diese Beobachtung nicht in allen

Kernen zu sehen war, lässt sich daraus erklären, dass die *orb2*-Mutante keine Nullmutation ist und immer noch das kleinere der beiden Proteine vorhanden ist.

2.1.32. Die *protamin*-Gene und *mst77F* enthalten CPEs in ihren 5'-UTR

Aus Untersuchungen an *Xenopus laevis* ist bekannt, dass sich im 3'-UTR von mRNAs, die durch das Protein CPEB kontrolliert werden, ein sogenanntes cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element befindet (Gebauer und Richter, 1996), an das das CPEB bindet. Dieses hat die Konsensussequenz UUUUUU. Es stellte sich uns nun die Frage, ob sich ein vergleichbares Element auch in den untranslatierten Bereichen von mRNAs bei *Drosophila melanogaster* finden lässt. Aus der *Drosophila*-Spermatogenese ist bekannt, dass sich Elemente, die die Translation kontrollieren, im 5'-UTR befinden (Schäfer *et al.*, 1990).

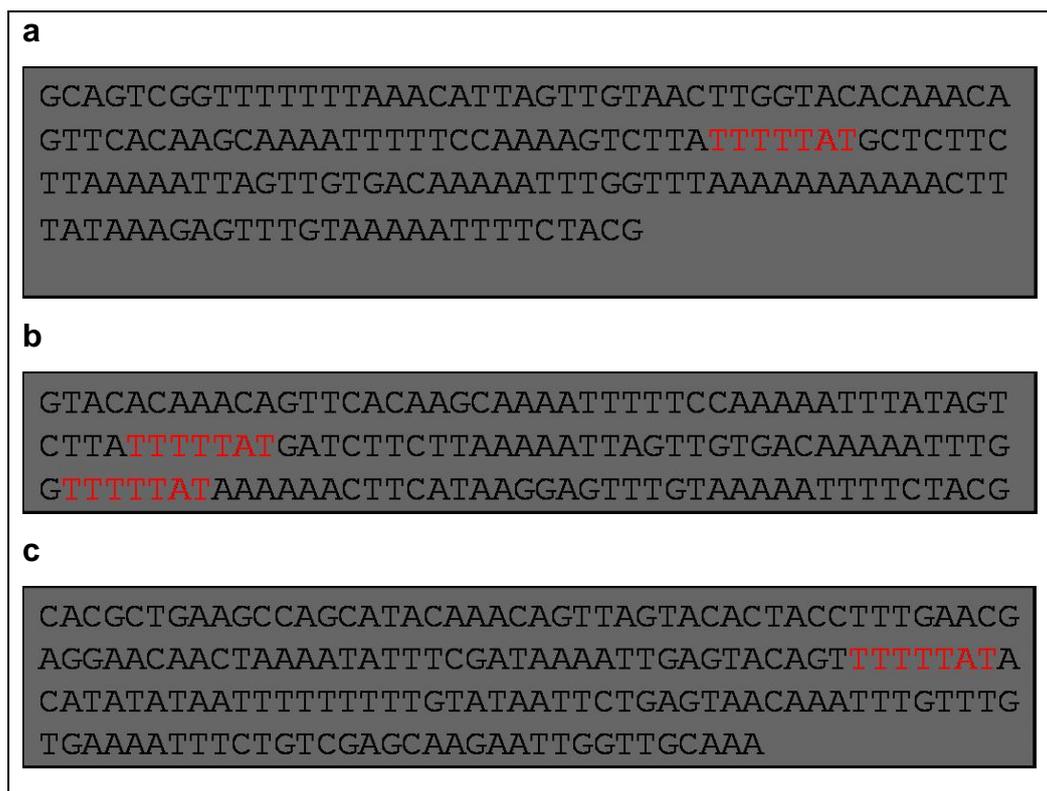


Abb. 48: 5'-UTR der beiden Protamine und von *mst77F*

a) Der 5'-UTR von Protamin A enthält ein mögliches cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element (CPE). **b)** Protamin B enthält 2 CPEs. **c)** Auch der 5'-UTR von *mst77F* enthält ein CPE. (Rot hervorgehoben sind jeweils die vermuteten CPE-Elemente).

Eine Überprüfung der Nukleotidsequenz des 5'-UTR der Protamine und von *mst77F* zeigte in allen drei Fällen ein bzw. zwei mögliche CPE-Elemente (Abb. 48), während der 3'-UTR kein solches Element zeigt. Diese Elemente finden sich in einem Bereich

von 90 nt vor dem ATG, einem Bereich, der für die Translationskontrolle der Protamine essentiell ist (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Dass das CPE in *Drosophila melanogaster* genau mit dem von *Xenopus laevis* übereinstimmt, zeigt, dass dieses Element hoch konserviert ist und lässt die Vermutung zu, dass die drei hier untersuchten mRNAs durch ein CPEB ähnliches Protein kontrolliert werden.

2.1.33. Ein CoIP-Experiment mit ganzen Fliegen führt zu sehr komplexen Ergebnissen

Da es einen großen Zeitaufwand bedeutet, ausreichende Mengen von Hoden für ein Co-Immünpräzipitationsexperiment zu präparieren, wurde zunächst versucht, dieses Experiment mit ganzen Fliegen durchzuführen. Es wurden 6700 Männchen einer Linie gesammelt, die sowohl homozygot für die *orb2*-Mutante als auch für ein *orb2*-GFP-Rettungskonstrukt ist. Diese wurden bis zum Experiment bei -80°C aufbewahrt. Die Durchführung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die Untersuchung von Co-präzipitierten Proteinen erfolgte mit Hilfe der Massenspektrometrie. Zur Auswertung der umfangreichen Daten wurden nur Proteine als richtig angenommen, deren Peptide einen Gesamtscore von über 50 und die mindestens zwei verschiedene Peptide mit einem Score von mehr als 10 aufwiesen. Dies traf bei über 20 untersuchten Proteinbanden auf insgesamt 200 Proteine zu. Da die Gesamtmenge der entstandenen Daten sehr groß ist, werden von jeder untersuchten Bande in dieser Arbeit die ersten fünf Treffer aufgeführt (siehe Anhang). Leider war es nicht möglich, das *orb2*-Fusionsprotein nachzuweisen, allerdings konnten drei verschiedene GFP-Peptide mit sehr guten score-Werten gefunden werden. Von den im two-hybrid-screen (Giot *et al.*, 2003; siehe 2.2.) vorgeschlagenen möglichen Interaktionspartnern von Orb2 konnte nur das Protein DIMM (Hewes *et al.*, 2003) gefunden werden. Aufgrund der großen Proteinmenge, die aus den Gesamttieren resultiert, könnten viele unspezifische Bindungen an der Sepharose stattgefunden haben, sodass das Orb2-GFP-Fusionsprotein nur anhand der GFP-Peptide nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse dieses Experimentes zeigten, dass es mit Sicherheit von Vorteil ist, mit Hoden anstatt mit Gesamttieren zu arbeiten, um die Komplexität der Proteinprobe zu reduzieren und damit auch die Möglichkeit von Fehlbindungen an die Sepharose einzugrenzen.

2.1.34. In der CoIP mit Hoden werden einige RNA-bindende Proteine entdeckt

Für das Co-Immunpräzitationsexperiment mit Hoden wurden insgesamt 2000 Hoden der oben beschriebenen transgenen Fliegenlinie präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die Durchführung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die Untersuchung von Co-präzipitierten Proteinen erfolgte mit Hilfe der Massenspektrometrie. Insgesamt wurden 28 Banden unterschiedlichen Molekulargewichts analysiert, die jeweils bis zu 25 Treffer mit einem score von über 50 hatten. Wie oben beschrieben wurden nur die ersten fünf Treffer in diese Arbeit aufgenommen (siehe Anhang). Leider konnte auch mit diesem Versuchsansatz das Orb2-GFP-Fusionsprotein nicht gefunden werden. Von den im two-hybrid-screen ermittelten möglichen Interaktionspartnern von Orb2 konnte keines gefunden werden. Es konnten viele ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren gefunden werden. Auffällig war, dass in fast jeder Bande unter den ersten drei Treffern das Accessory gland peptide 36DE zu finden war. Dies ist ein Protein aus den Paragonien ohne Funktion in den Hodenschläuchen. So wäre es vermutlich von Vorteil, Hodenschläuche ohne Paragonien zu präparieren, um die Komplexität der Proteinproben weiter zu reduzieren.

2.1.35. Die *protamin*-Transkripte lassen sich durch RT-PCR auf CoIP mRNA nachweisen

Die vorhergehenden Experimente haben bereits gezeigt, dass Orb2 den Zeitpunkt der Translation der Protamine zu beeinflussen scheint. Falls Orb2 wirklich an das CPE im 5'-UTR bindet, so sollte die mRNA der beiden Protaminformen bzw. von *mst77F* in einer Orb2-GFP-Immunpräzitation copräzipitieren. Für die neuerliche Immunpräzitation wurden 2000 Hoden der Fliegenlinie eingesetzt, die sowohl homozygot für die *orb2*-Mutante als auch für das *orb2*-GFP-Rettungskonstrukt ist. Die Hoden wurden homogenisiert, über Nacht mit anti-GFP Antikörper inkubiert und eine weitere Nacht mit Protein A-Sepharose inkubiert. Beide Inkubationsschritte fanden bei 4°C statt. Nach insgesamt 6 Waschschritten wurden die gebundenen Komplexe bei 70°C eluiert. Eine mRNA-Isolierung wurde mit den Waschschritten 1 und 6, sowie aus den eluierten Komplexen mittels oligo(dT)-gekoppelter Magnetbeads durchgeführt. Daran schlossen sich RT-PCR-Analysen an mit

verschiedenen genspezifischen Primern gegen mRNAs, deren Translation kontrolliert wird. Dabei zeigte sich, dass die *protamin B* mRNA im Wildtyp-Männchen im Waschschrift 1 und im gebundenen Komplex deutlich nachweisbar ist (Abb. 49). In Waschschrift 6 ist *protamin B*-mRNA hingegen nicht nachweisbar. Dies zeigte, dass in der eluierten Fraktion keine Verunreinigung durch ungebundene mRNA vorlag (Abb. 49). Im Fall der *protamin A* mRNA ist das Ergebnis nicht so eindeutig. Hier ist in allen Fraktionen mRNA nachweisbar außerdem auch in geringeren Mengen als bei der *protamin B* mRNA (Abb. 49).

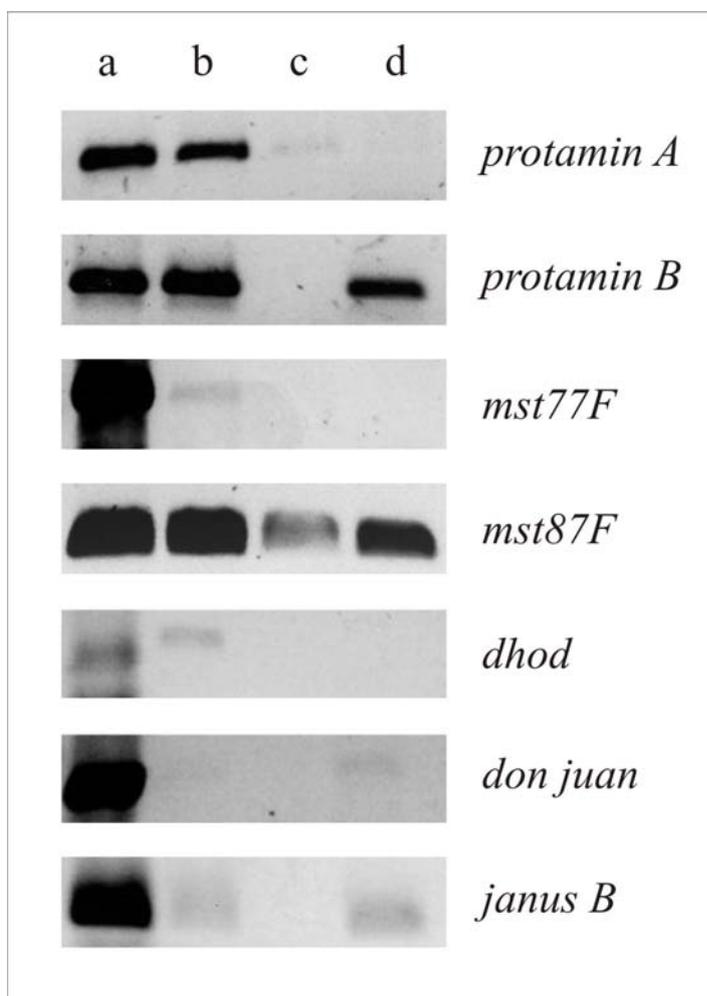


Abb. 49: RT-PCR auf translationskontrollierte mRNAs

Als Templates für die verschiedenen Kandidatenprimer dienten folgende mit oligo(dT) gereinigte mRNAs: aus OregonR-Männchen (**a**), aus den Waschschriften 1 und 6 (**b** u. **c**) und der Elution von Protein A-Sepharose (**d**).

Es ist zu erwarten, dass das Orb2 eine größere Anzahl von mRNAs kontrolliert. Daher wurden die aus der Co-Immunpräzipitation gewonnenen mRNAs auf die Präsenz von diversen weiteren translationskontrollierten Transkripten getestet (Abb. 49). Die mRNA von *mst77F* (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005) konnte trotz eines CPE-Elementes im 5'-UTR nur in der Kontrolle und im 1. Waschschrift nachgewiesen werden. Auch eine PCR mit Primern gegen *dhod* (Yang *et al.*, 1995; Löffler *et al.*,

Da die beiden aus *Drosophila* bekannten Protamine zu 94% identisch sind, ist es nicht möglich, eine spezifische Sonde für nur eines der beiden Gene zu erstellen. Mit der Sonde konnten in den Männchen des 3. Larvenstadiums zwei Banden nachgewiesen werden, die kleiner sind als die Bande in den adulten Männchen, die die erwartete Größe von etwas mehr als 0,7 kb hat (Abb. 50 A). Dies spricht dafür, dass die Protamin-mRNAs sekundär polyadenyliert werden, was normalerweise zum Zeitpunkt der Translation beobachtet wird, also erst in späten Puppen- bis frühen Adulten-Stadien. Dabei stellt sich die Frage, warum in den männlichen Larven zwei Banden zu sehen sind. Die Vermutung, dass es sich hierbei um die beiden verschiedenen Protamin-Transkripte handelt, kann nicht stimmen, da sich ihre beiden Transkripte mit den Längen von 688 nt im Fall von Protamin A und 673 nt bei Protamin B nur marginal unterscheiden. Eine mögliche Erklärung ist, dass bereits im 3. Larvenstadium die sekundäre Polyadenylierung beginnt. Dagegen spricht allerdings, dass zu diesem Zeitpunkt normalerweise nur primäre Spermatozyten vorliegen, in denen die Protamine noch nicht zu beobachten sind. Eine beginnende Polyadenylierung sollte sich auf dem Autoradiogramm auch eher als Schmier und nicht durch zwei klar begrenzte Banden zeigen. Weitere Untersuchungen sollten angeschlossen werden, um dieses Phänomen näher zu beleuchten.

2.2. Ein genomweiter two-hybrid-screen identifiziert mögliche Interaktoren von Orb2

Bei einem genomweiten two-hybrid-screen (Giot *et al.*, 2003) wurden verschiedene Proteine als mögliche Interaktionspartner des Proteins Orb2 identifiziert. Die beiden Proteine mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Interaktion, Tob und Gap, wurden daraufhin untersucht. Weitere mögliche Interaktionspartner, die im Rahmen dieser Arbeit nur am Rande berücksichtigt wurden, waren die Proteine Dimm, CG12723, CG9842, Dfd, CG1244, CycK, spn-A, lwr, CG5968, Vm26Ab, PHDP. Das hier in der Liste von möglichen Interaktionspartnern von Orb2 stehende Protein Dimm wurde, obwohl es auch im Co-Immunpräzipitationsexperiment (siehe 2.1.33.) gefunden wurde, von uns aus zwei Gründen bisher nicht untersucht. Zum einen sprechen die Daten aus Flybase nicht dafür, dass es eine mögliche Funktion in der Spermatogenese hat. So konnten keine Hoden-ESTs gefunden werden. Zum anderen wurde das Co-Immunpräzipitations-Experiment und die nachfolgende

Untersuchung mittels Massenspektrometrie zu einem Zeitpunkt durchgeführt, der genaue Analysen, wie sie mit den möglichen Interaktionspartnern Tob und Gap durchgeführt wurden, aus Zeitgründen nicht mehr möglich machte.

2.2.1. Tob, ein möglicher Interaktionspartner von Orb2

Das Protein Tob ist ein Mitglied der BTG/Tob-Antiproliferations-Protein-Familie. *Tob*-Gene werden exprimiert in Oozyten, Spermien, frühen Embryos und in verschiedenen adulten Geweben. Ihre Funktion scheint konserviert zu sein. Tob-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Spermatogenese, bei der Bildung der dorsoventralen Achse im Embryo, bei der Knochenbildung, der Aktivierung von T-Zellen und beim Lernen und Erinnern (zusammengefasst in Jia und Meng, 2007). Tob-Proteine finden sich im Genom von vielen Vertebraten und Invertebraten. Während bei Vertebraten zwei Tob-Proteine gefunden werden konnten, kodiert das Genom von *Drosophila melanogaster* nur ein Tob-Protein, welches aber eine Sequenzidentität von mehr als 57% mit den Tob-Proteinen von Vertebraten teilt (zusammengefasst in Jia und Meng, 2007). Das *Drosophila melanogaster tob* (CG9214) befindet sich auf dem X-Chromosom in der Region 14A8 und hat eine Größe von ca. 11 kb auf der genomischen Sequenz. Es besitzt zwei Transkripte mit Größen von 2,1 kb und 2,7 kb (Abb. 51), die beide für ein 564 Aminosäuren großes Protein mit einem Gewicht von ca. 60 kDa kodieren. Mehrere Hoden-ESTs lassen auf eine Funktion bei der Spermatogenese schließen.

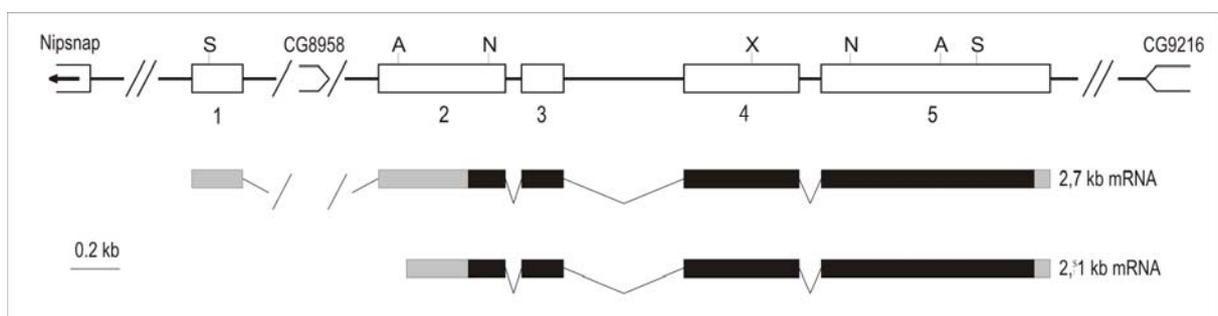


Abb. 51: Übersicht über die Genstruktur und die Transkripte von *tob*

Das Gen *Tob* besteht aus fünf Exons und vier Introns, wobei die beiden Transkripte ein unterschiedliches erstes Exon besitzen. Das kleine Transkript besteht aus vier Exons, während das größere Transkript aus fünf Exons besteht. Das offene Leseraster des Proteins dehnt sich dabei über die vier gemeinsamen Exons aus. In der Nachbarschaft von *tob* liegen die Gene *nipsnap* und *CG9216*. Zwischen dem ersten und dem zweiten Exon liegt das Gen *CG8958*. Die grauen Bereiche in den Transkripten stellen die UTR dar, in schwarz sind die offenen Leseraster dargestellt.

2.2.2. *Drosophila melanogaster* besitzt ein hodenspezifisches *tob*-Transkript

Eine Voraussetzung für eine mögliche Interaktion von Tob und Orb2 ist die Lokalisation beider Proteine in den gleichen Organen und Organkompartimenten. Dazu sollte zunächst die Frage geklärt werden, ob es von *tob* Transkripte in den Hoden gibt und in welchen anderen Organen es noch nachweisbar ist. Dafür wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. In den Hoden konnte eine prominente, spezifische Bande bei ca. 3,1 kb nachgewiesen werden (Abb. 52 A), die, wenn man das poly(A)-Ende hinzurechnet, der in der Flybase angegebenen Größe von ca. 2,7 kb entsprechen könnte. In allen untersuchten Geweben konnte zudem eine Bande in der Größe von 4,8 kb nachgewiesen werden, die besonders stark in den Weibchen ausgeprägt ist.

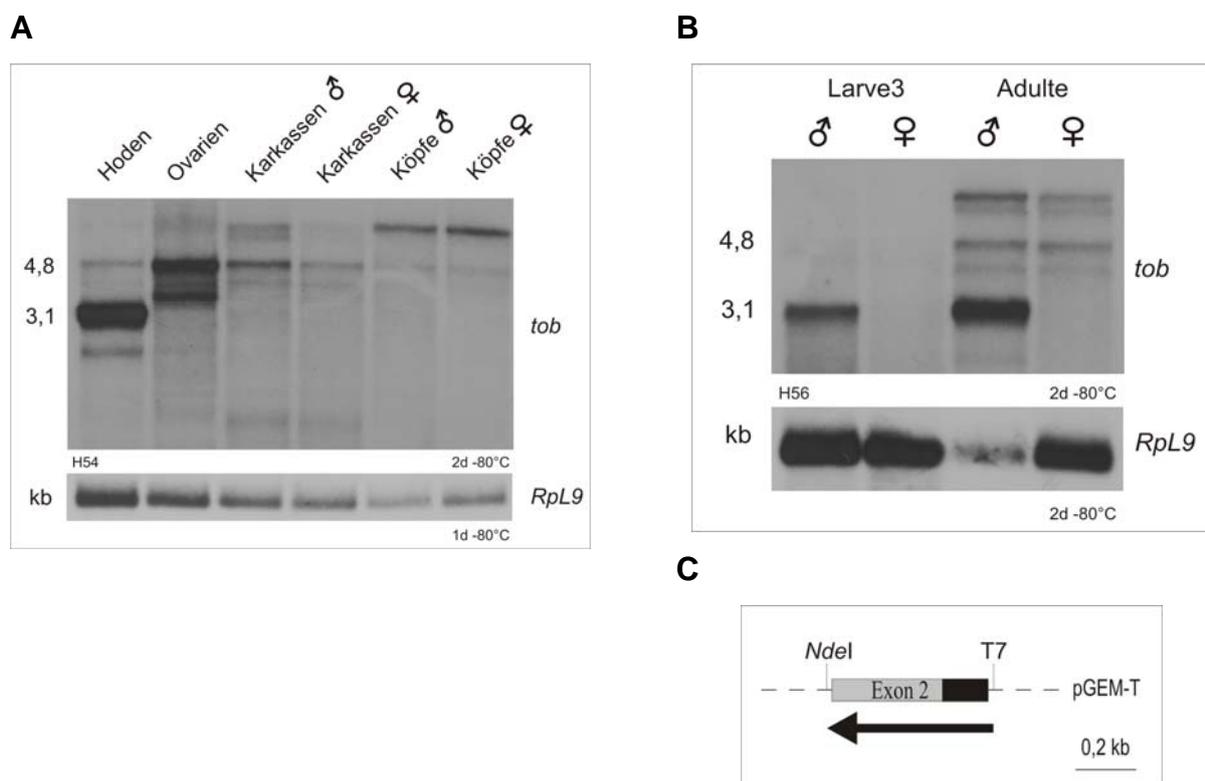


Abb. 52: Transkriptanalysen von *tob*

A) Northern-Blot-Analyse mit der Tob-Sonde auf Hoden, Ovarien, Karkassen und Köpfen von *OregonR*. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Hybridisierung auf poly(A)-RNA larvaler und adulter Männchen und Weibchen der Linie *OregonR*. **C)** Schematische Darstellung der Sonde Tob 1-5. Zum Nachweis der Tob-Transkripte wurde mit der *Taq* DNA-Polymerase ein 520 nt langes Fragment aus Exon 2 mit den Primern Tob-1 und Tob-5 auf genomischer DNA erzeugt und in den Vektor pGEM-T einligiert (Klon 730). Für die *in vitro*-Transkription wurde der Klon 730 mit der Restriktionsendonuklease *NdeI*, die in der „multiple cloning site“ des Vektors schneidet, linearisiert. Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit der T7 RNA-Polymerase. In grau dargestellt ist das 5'-UTR, in schwarz ist ein Teil des offenen Leserasters dargestellt. Die gestrichelte Linie steht für den Vektor pGEM-T.

Da diese Bande aber zu groß für die in Flybase angegebenen Transkripte von *Tob* ist und sie bei anderen Hybridisierungen nicht so ausgeprägt zu beobachten war, kann man von einer Kreuzhybridisierung ausgehen. Dies ist auch der Fall für die besonders in den Köpfen stark exprimierte Bande mit einer Größe von über 10 kb. Eine weitere Voraussetzung für eine mögliche Interaktion von Proteinen ist die zeitliche Übereinstimmung der Expression. Das *tob*-Transkript kann auch schon in den männlichen Larven von w^{1118} detektiert werden (Abb. 52 B). Es liegt aber in einer sehr viel geringeren Menge als in den adulten Tieren vor, wie der Vergleich mit der Beladungskontrolle zeigt. Dies deutet darauf hin, dass der im Hodengewebe nachgewiesene Transkriptanteil in männlichen Keimzellen vorliegt und vom Larvenstadium zum Adultstadium extrem stark ansteigt. Weibliche Larven zeigen ebenso wie die adulten Weibchen kein Signal bei 3,1 kb. Die in den adulten Weibchen nachweisbaren Banden bei ca. 4,8 kb und über 10 kb ist in den Larven trotz vergleichbarer Beladung mit mRNA nicht zu sehen und wird in den adulten Tieren auch in wesentlich geringerer Menge exprimiert, als die Ovarienspur auf der Membran H54 zeigt (Abb. 52 B). Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass es sich um eine Kreuzhybridisierung handelt. Zusammengenommen deutet alles darauf hin, dass das eine der beiden in Flybase angegebenen Transkripte von *tob* männchenspezifisch exprimiert wird und sein Transkript eine zeitliche und räumliche Übereinstimmung mit dem Transkript von *orb2* aufweist (Vergleiche Abb. 13 *orb2* Northern Larve und Adult). Das zweite Transkript konnte durch die hier verwendete Sonde nicht nachgewiesen werden. Zwar zeigten sich zum Teil andere Banden auf den Autoradiogrammen, allerdings stimmten sie in ihrer Größe nicht oder konnten in nachfolgenden Experimenten nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Frage, ob es ein zweites Transkript von *tob* gibt, das vielleicht nur zu einem durch ein Northern-Experiment nicht nachweisbaren Anteil exprimiert wird, bleibt daher unbeantwortet.

2.2.3. *tob* antisense-Linien sind männchensteril

Interagierende Proteine sollten, wenn sie ausgeschaltet oder mutiert werden, einen ähnlichen Phänotyp im betroffenen Gewebe hervorrufen. Um dies für die möglichen Interaktoren Tob und Orb2 zu testen, wurde ein antisense-Konstrukt (AS) gegen *tob* erstellt (Abb. 53).

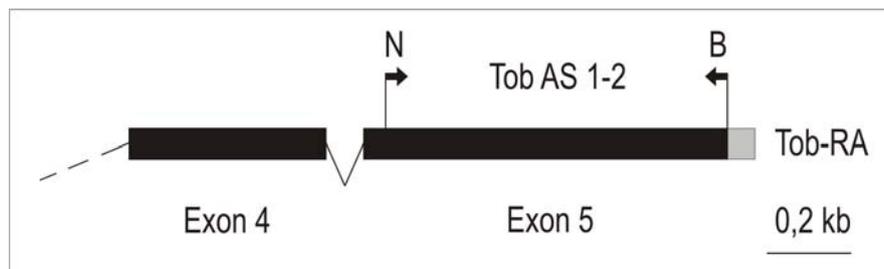


Abb. 53: Lage der Primer für das *tob* antisense-Konstrukt

Mit den Primern Tob-AS-1 und Tob-AS-2 wurde mit dem Klon 733 (Tob 6-4) als Template ein 865 nt langes Fragment erzeugt, das in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert wurde. Mit den an die Primer angehängten Schnittstellen *Bgl*II und *Not*I wurde das Fragment dann gerichtet in antisense-Orientierung in den Testis-Expression-Vektor einkloniert (TEV). Dieser enthält den für die männlichen Keimzellen spezifischen Promotor von *mst87F*. Bei der Transkription in den Hoden wird mit diesem Konstrukt eine mRNA in antisense-Orientierung zur *tob* poly(A)-RNA transkribiert. In schwarz dargestellt sind Teile des ORF, in grau der 3'-UTR des Transkriptes. Die Pfeile zeigen den Bereich, an den die Primer hybridisieren. (N= *Not*I, B= *Bgl*II)

Die DNA für dieses Konstrukt wurde mit spezifischen Primern aus einem Sequenzbereich des fünften Exons amplifiziert und in antisense-Orientierung in den Testis-Expression-Vektor (M. Hollmann, pers. Mitteilung) kloniert. Dieser enthält den *mst87F* Promotor, mit dem das antisense-Konstrukt nur in den männlichen Keimzellen transkribiert wird. Mit Hilfe der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation wurde das Konstrukt in das Genom von w^{1118} -Fliegen integriert. Insgesamt konnten fünf verschiedene Linien erzeugt werden. Alle männlichen und weiblichen Tiere dieser Linien waren homozygot vital. Die Weibchen waren homozygot fertil, wohingegen die Männchen aller Linien heterozygot steril waren. Mittels einer Northern-Blot-Analyse mit der Sonde Tob 1-5 konnte gezeigt werden, dass das *tob*-Transkript in den mutanten Linien im Vergleich zum Wildtyp in deutlich verringerter Menge vorliegt, allerdings nicht gänzlich verschwunden ist (Abb. 54). Besonders stark ist die Reduktion in Linie 30.5. Da sich aber alle Linien als männchensteril erwiesen, reicht offensichtlich bereits die geringere Transkriptreduktion in den Linien 10.1 und 22.1 für eine Störung der *tob*-Funktion aus.

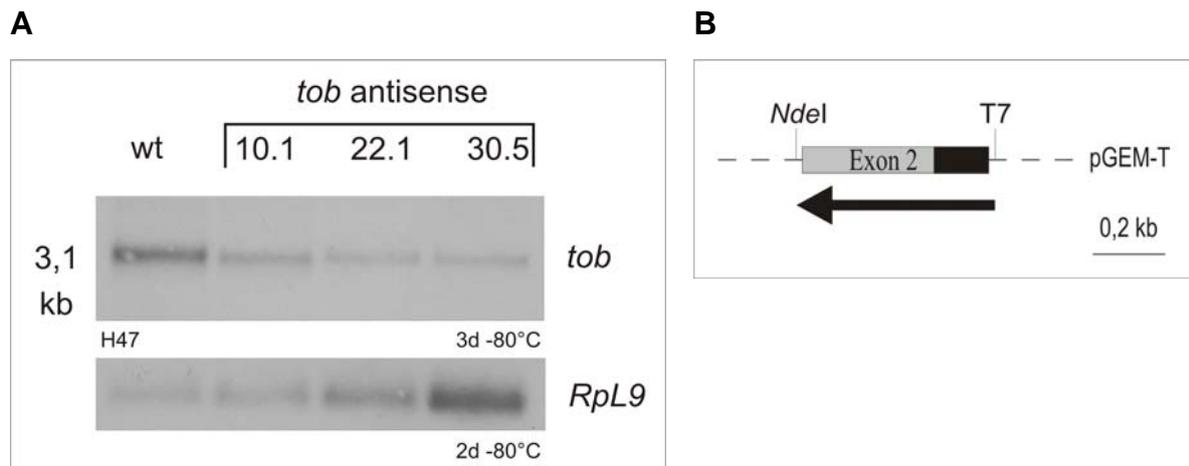


Abb. 54: *tob* antisense-Linien:

A) Aufgetragen auf die Membran sind mRNAs von Männchen des Wildtyps *OregonR* und der *Tob* antisense-Linien (*Tob AS 10.1*, *Tob AS 22.1*, *Tob AS 30.5*). Es zeigte sich, dass in den *Tob* antisense-Tieren, die *tob*-mRNA in verringerter Menge vorlag. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung der Sonde *Tob 1-5*. Für die *in vitro*-Transkription wurde der Klon *Tob 1-5* (730) mit der Restriktionsendonuklease *NdeI*, das in der „multiple cloning site“ des Vektors schneidet, linearisiert. Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit der T7 RNA-Polymerase. In grau ist die 5'-UTR, in schwarz ein Teil des offenen Leserasters von *tob* dargestellt. Die gestrichelte Linie steht für den Vektor pGEM-T.

2.2.4. Hoden der *tob* antisense-Linien zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die *orb2*-Mutanten

Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten in den *tob* antisense-Männchen eine normale Hodenmorphologie verglichen zum Wildtyp (Abb. 55). Alle Stadien der Spermatogenese von den primären Spermatozyten bis hin zu den elongierenden Spermatischen Bündeln waren vorhanden. Im Bereich des Terminalepithels zeigten sich allerdings neben aufknäulenden Spermatischen viele Degradationsprodukte gut sichtbar an der leicht bräunlichen Färbung (Abb. 55 a). Auch auf den Bündeln war diese Färbung schon feststellbar, als ob in diesen Stadien bereits Zersetzungsprozesse beginnen. Ein gewisser Anteil an Degradationsprodukten liegt im Hodenschlauch allerdings immer vor, da der Prozess der Individualisierung mit Apoptose verbunden ist (Arama *et al.*, 2003). Die Samenblasen der *tob* antisense-Tiere waren bei einigen Linien leer (Abb. 55 e u. f), bei anderen Linien waren sie gefüllt, allerdings lagen neben aufgeknäulten Stadien große Mengen an Degenerationsprodukten vor (nicht gezeigt). Motile Spermien konnten in Quetschpräparaten von frisch präparierten Hoden bei keiner *tob* antisense-Linie festgestellt werden.

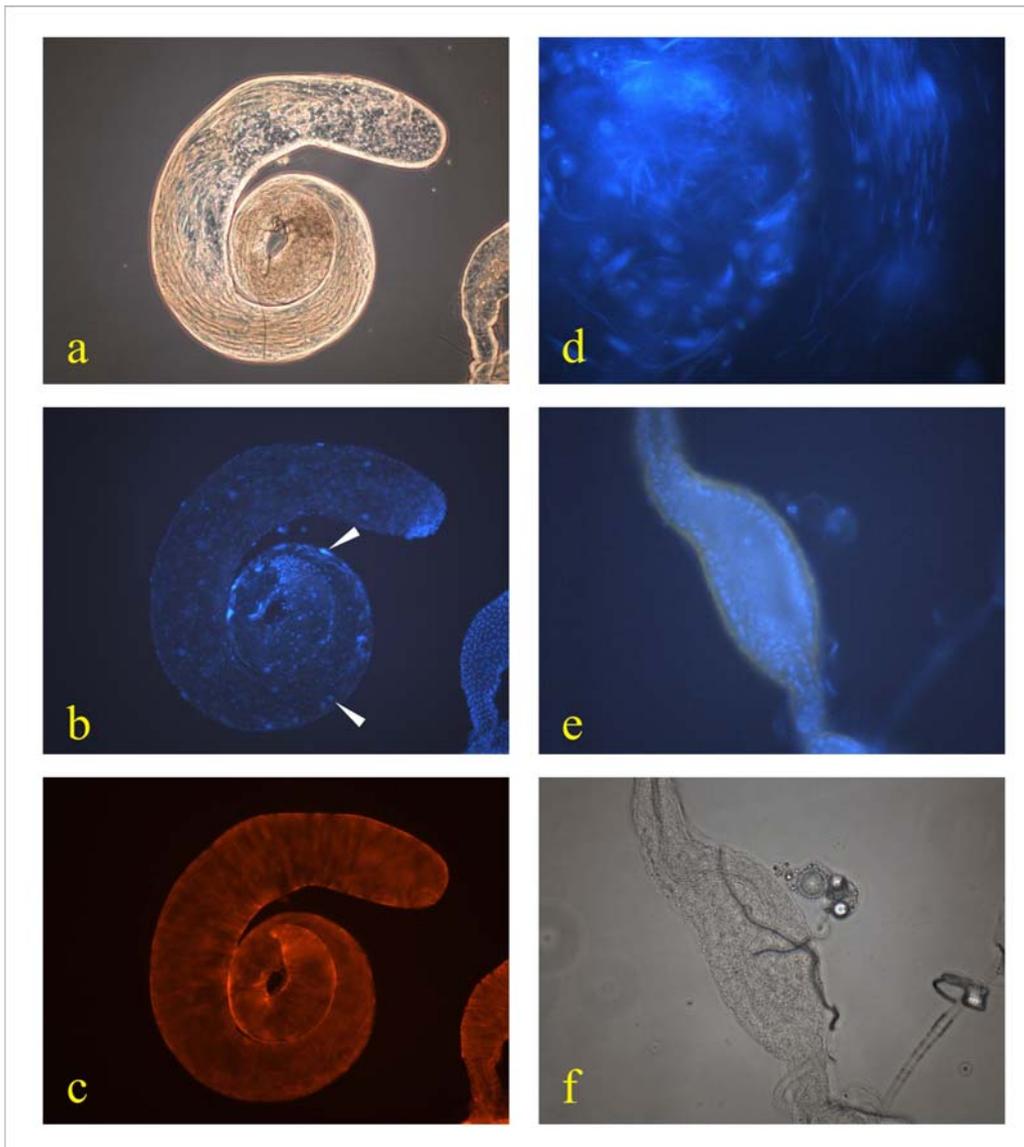


Abb. 55: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Hoden von *tob antisense* Linien

Zur Beobachtung der DNA und des F-Aktins wurden fixierte Hoden mit Hoechst 33258 und TRITC-gekoppeltem Phalloidin gefärbt. **a)** Der Hodenschlauch zeigt alle Stadien der Spermatogenese. **b)** Die Kernfärbung zeigt nur sehr wenige Bündel von nadelförmigen Kernen (Pfeilspitzen). **c)** Mit Hilfe der Färbung des F-Aktins können keine oder nur wenige Individualisierungskomplexe nachgewiesen werden. **d)** Im Bereich des Terminalepithels liegen nur einzelne nadelförmige Kerne vor. **e)** Die Färbung mit Hoechst 33258 zeigt keine Kerne in der Samenblase. **f)** In der Samenblase sind auch keine reifen Spermien zu finden.

Eine Färbung der Kern-DNA mit Hoechst 33258 zeigte einen ähnlichen Phänotyp, wie er auch für die *orb2*-Mutante beschrieben wurde (Vergleiche Abb. 17 und 18). Es sind keine, in seltenen Fällen wenige, Bündel von nadelförmigen Kernen feststellbar. Die Spermatischenbündel scheinen zwar in gleicher Menge wie im Wildtyp vorzukommen, die nadelförmigen Kerne trennen sich aber früh voneinander und liegen verstreut innerhalb der Cysten im Hodenschlauch vor (Abb. 55 b und d). Bündel dieser Kerne, von denen im Wildtyp oft mehr als 30 zu beobachten sind,

finden sich in den *tob* antisense-Männchen nur in geringer Anzahl. Allerdings ist der Phänotyp bei den verschiedenen Integrationslinien unterschiedlich ausgeprägt. Bei den stärksten Phänotypen waren keine Bündel von nadelförmigen Kernen zu beobachten, bei den schwächeren Phänotypen sind einige wenige zu finden. Dies konnte auch durch eine Färbung von F-Aktin mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin beobachtet werden, mit der die Individualisierungskomplexe gezeigt werden können. In den Linien mit dem ausgeprägtesten Phänotyp waren keine Individualisierungskomplexe zu finden (Abb. 55 c), wohingegen sie bei einer schwächeren Ausprägung vorlagen, allerdings in einer geringeren Anzahl als beim Wildtyp. Auch die räumliche Verteilung der Komplexe war in den Mutanten zum Teil verändert, so konnten sie in einigen Fällen schon in einem Bereich in der Nähe der Hodenschlauchspitze beobachtet werden, wo sie im Wildtyp nicht feststellbar sind. Diese Untersuchungen ergaben, dass die *tob*- und *orb2*-mutanten Männchen einen sehr ähnlichen Phänotyp während der Spermatogenese zeigen. Dies stützt die Vermutung einer möglichen Interaktion beider Proteine aus dem genomweiten two-hybrid-screen (Giot *et al.*, 2003).

2.2.5. Männchen mit *tob* antisense-Konstrukt im *orb2*-mutanten Hintergrund zeigen nur einen leicht verstärkten Phänotyp

Falls die beiden Proteine Tob und Orb2, wie die Ergebnisse aus dem two-hybrid-screen vermuten lassen, miteinander interagieren, könnte es bei einer Kreuzung zweier Mutanten der beiden Linien zu einer Verstärkung der einzeln zu beobachtenden Phänotypen kommen. Um dies zu überprüfen, wurden Tiere erzeugt, die das *tob* antisense-Konstrukt im *orb2*-mutanten Hintergrund enthielten. Da die Männchen mit diesem Konstrukt heterozygot steril sind, konnte die Lokalisation der Integration des antisense-Konstruktes nicht mittels sogenannter Balancerkreuzungen ermittelt werden. Für die Kreuzung in den *orb2*-mutanten Hintergrund wurden allerdings Tiere benötigt, die das antisense Konstrukt auf dem zweiten Chromosom trugen, da das Gen *orb2* auf dem dritten Chromosom liegt. Aus diesem Grund wurden verschiedene Integrationslinien für diesen Versuch verwendet, in der Hoffnung, dass zumindest eine Linie darunter ist, bei der das antisense-Konstrukt auf dem zweiten Chromosom lokalisiert ist. Bei den Kreuzungen wurde die *orb2*-Mutation mittels Balancerchromosomen verfolgt (Abb. 56), das Vorhandensein des antisense-

Konstruktes konnte anhand der roten Augen festgestellt werden. Tiere der *orb2*-Mutante Jump out 10 besitzen weiße Augen. Männliche Nachkommen dieser Kreuzung, die sowohl homozygot für die *orb2*-Mutation als auch heterozygot für das *tob* antisense-Konstrukt sein sollten, wurden zum Test ihrer Fertilität mit jungfräulichen w^{1118} -Weibchen verpaart.

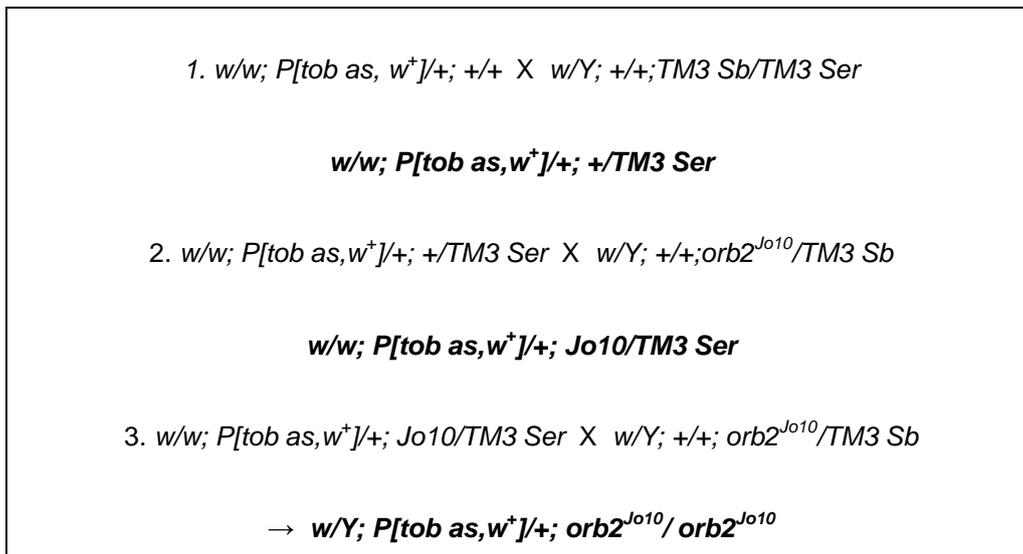


Abb. 56: Kreuzungsschema zur Erzeugung von Männchen mit *tob* antisense-Konstrukt im *orb2*-mutanten Hintergrund

Im ersten Kreuzungsschritt wurden Weibchen mit dem *tob* antisense- (*as*) Konstrukt mit Männchen gekreuzt, die den Balancer *TM3* mit den Markern *Stubble* (*Sb*) bzw. *Serrate* (*Ser*) auf dem dritten Chromosom trugen. Weibchen aus dieser Kreuzung, die das antisense-Konstrukt und den Marker *Ser* trugen, wurden im zweiten Schritt mit Männchen gekreuzt, die auf einem dritten Chromosom das Jump out 10-Allel und auf dem anderen den Marker *Sb* trugen. Töchter dieser Eltern mit dem antisense-Konstrukt und *Ser*, die nicht den Marker *Sb* trugen, wurden mit den gleichen Männchen wie in Kreuzungsschritt 2 gekreuzt. Die aus diesem Schritt hervorgehenden Männchen, die rote Augen und keinen der beiden anderen Marker trugen, wurden mit w^{1118} -Jungfrauen auf ihre Fertilität getestet.

Alle getesteten Männchen waren wie erwartet steril. Zur Überprüfung, dass das antisense-Konstrukt im homozygot mutanten Jump out 10 Hintergrund vorliegt, wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 57). Zum Nachweis der *orb2*-Transkripte wurde wie oben beschrieben der mit *Cla*I geschnittene cDNA-Klon AT07721 verwendet, mit dem beide in den Männchen vorkommenden *orb2*-Transkripte nachgewiesen werden können. Dabei zeigte sich, dass die *tob* antisense-Linie 30.1 das Konstrukt auf dem dritten Chromosom trägt, da bei dieser Kreuzung beide Transkripte von *orb2* zu detektieren sind (Abb.57). Das heißt, dass das größere Transkript vom Chromosom stammen muß, welches das antisense-Konstrukt trägt. Fliegen mit dem dritten Chromosom der Jump out Linie 10 enthalten das große Transkript nicht. Tiere, die das antisense-Konstrukt tragen, sind eindeutig an der roten Augenfarbe zu erkennen, da die Jump out Linie weiße Augen hat. Somit

kann anhand der roten Augen und durch das Fehlen des großen Transkripts eindeutig nachgewiesen werden, dass die Kreuzung wie geplant erfolgte.

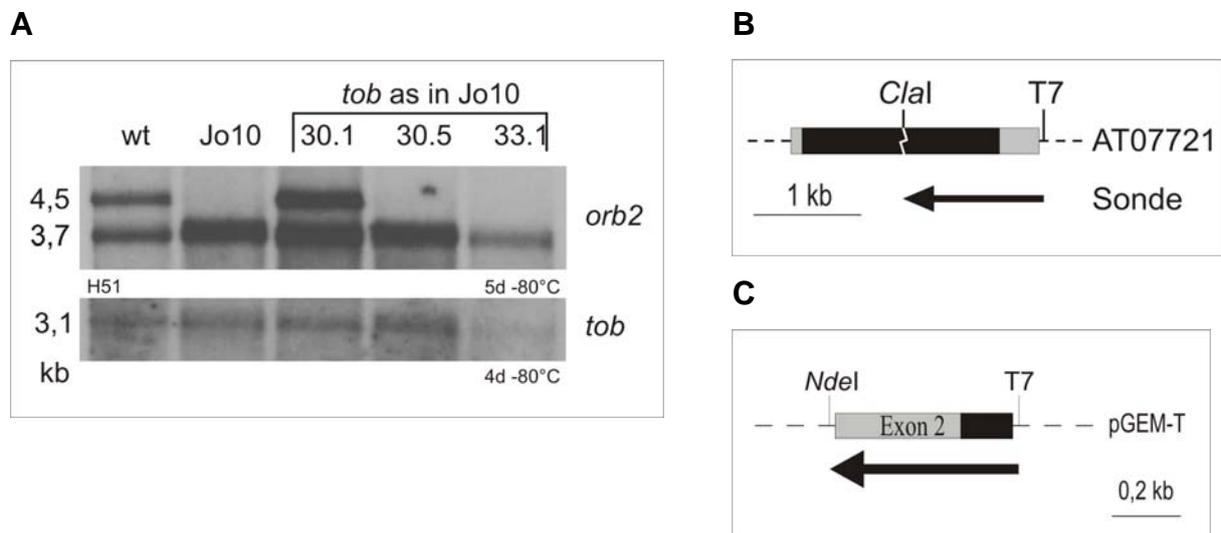


Abb. 57: Northern-Blot-Analyse der *tob* antisense-Linien im *orb2*-mutanten Hintergrund

A) Zur Überprüfung der chromosomalen Lokalisation des *tob* antisense- (as) Konstruktes wurde die poly(A)-RNA folgender Männchen isoliert: w¹¹¹⁸, *orb2* Jump out 10 (Jo10), *tob* as 30.1 in Jo10, *tob* as 30.5 in Jo10 und *tob* as 33.1 in Jo10. Eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das ribosomale Protein L9 führte leider zu keinem Ergebnis, so dass in diesem Fall auf die Beladungskontrolle verzichtet werden muss. **B)** Schematische Darstellung des Genbereichs, der für die RNA Sonde verwendet wurde. Als Sonde wurde der *Clal* geschnittene cDNA-Klon AT07721 eingesetzt. Der mit dem Pfeil markierte Bereich wurde als Template für die *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA-Polymerase eingesetzt. In grau sind die UTR und in schwarz das offene Leseraster dargestellt. **C)** Schematische Darstellung der Sonde Tob 1-5. Für die *in vitro*-Transkription wurde der Klon Tob 1-5 (730) mit der Restriktionsendonuklease *Ndel*, die in der „multiple cloning site“ des Vektors schneidet, linearisiert. Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit der T7 RNA-Polymerase. In grau ist das 5'-UTR, in schwarz ein Teil des offenen Leserasters von *tob* dargestellt. Die gestrichelte Linie steht für den Vektor pGEM-T.

Bei den Linien 30.5 und 33.1 lag das antisense-Konstrukt dagegen wie erhofft auf dem zweiten Chromosom vor (Abb. 57). Bei Fliegen, die aus Kreuzungen mit diesen Linien stammten, war nur das kleinere der beiden *orb2*-Transkripte nachzuweisen. Die Hoden der Männchen mit dem *tob*-antisense-Konstrukt auf dem zweiten Chromosom im *orb2*-mutanten Hintergrund wurden zur Überprüfung des Phänotyps mit Hoechst 33258 und Phalloidin gefärbt (Abb. 58). Eine Verstärkung des mutanten Phänotyps ist bei der *tob* antisense-Linie 33.1 im *orb2*-mutanten Hintergrund zu beobachten. Die Spermatidenspitzen liegen nie in Bündeln, sondern stets vereinzelt vor. Individualisierungskomplexe sind nicht oder nur in geringer Zahl zu beobachten. Ansonsten zeigen die Hoden den Phänotyp, wie er auch bei den beiden einzelnen Mutanten zu beobachten ist und oben bereits beschrieben wurde (siehe Abb. 17, 18 und 55).

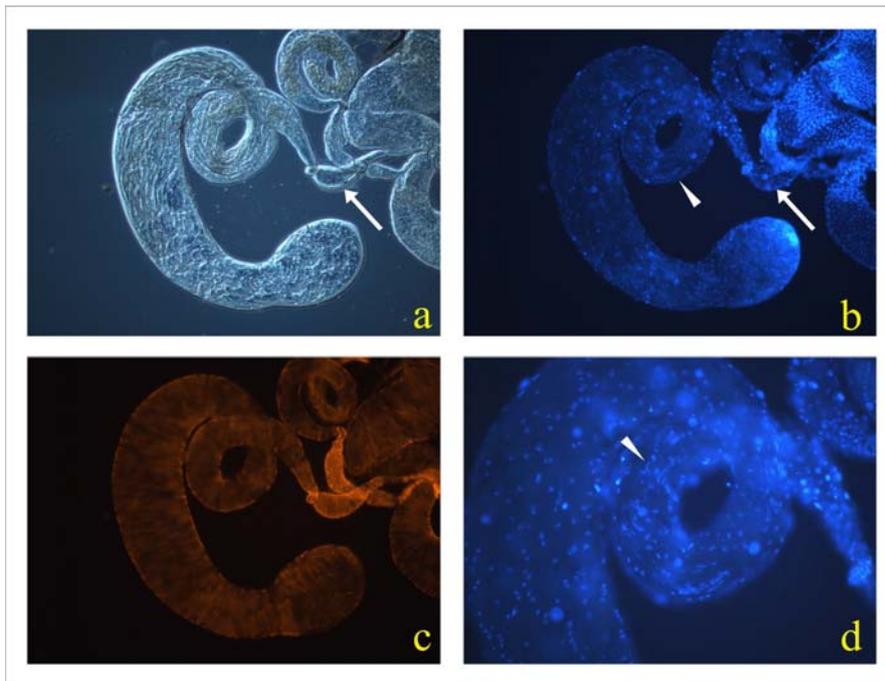


Abb. 58: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *tob* antisense-Linie 33.1 im *orb2* Jump out 10-mutanten Hintergrund

a) Die lichtmikroskopische Untersuchung zeigt alle Stadien der Spermatogenese. In der Samenblase liegen aber keine Spermien vor (Pfeil). **b)** Die Färbung der Kern-DNA zeigt nur wenige, einzelne nadelförmige Kerne (Pfeilspitze) und keine Bündel. In der Samenblase sind keine Kerne vorhanden (Pfeil) **c)** Mit der Färbung von F-Aktin konnten keine Individualisierungskomplexe nachgewiesen werden. **d)** In der Vergrößerung zeigen sich nur wenige nadelförmige Kerne im Bereich des Terminal-epithels (Pfeilspitze).

2.2.6. Das Protein Tob befindet sich in elongierenden Bündeln und reifen Spermien

Sollte Tob mit Orb2 interagieren, so sollten beide Proteine eine zeitliche und räumliche Übereinstimmung vorweisen. Zur Überprüfung der Lokalisation auf Proteinebene wurde ein Tob-GFP-Fusionsprotein erstellt. Dieses besteht aus dem geeigneten Promotorbereich und dem offenen Leseraster. An diese wird durch die im P-Element Vektor P{UAST}Green befindliche GFP-Kassette der fluoreszierende Proteinanteil aus *Aequorea victoria* angehängt (Abb. 59). Insgesamt konnten 15 verschiedene Integrationslinien erzeugt werden, deren männliche und weibliche Tiere alle homozygot vital und fertil waren. Das Fluoreszenzsignal des Tob-GFP-Fusionsproteins kann ab der Phase der elongierenden Spermatidenbündeln (Abb. 60 b) bis hin zu den reifen Spermien beobachtet werden (Abb. 60 d). Sowohl reife Spermien in der Samenblase, als auch außerhalb zeigen eine starke Fluoreszenz. Die primären Spermatozyten, die im Bereich der Hodenschlauchspitze lokalisiert sind, zeigen kein GFP-Signal (Abb. 60 e und f). Das Protein wird somit erst im Bereich der elongierenden Bündel translatiert. Eine Co-Lokalisation mit dem Protein Orb2 wäre somit im Bereich der Spermatidenbündel möglich

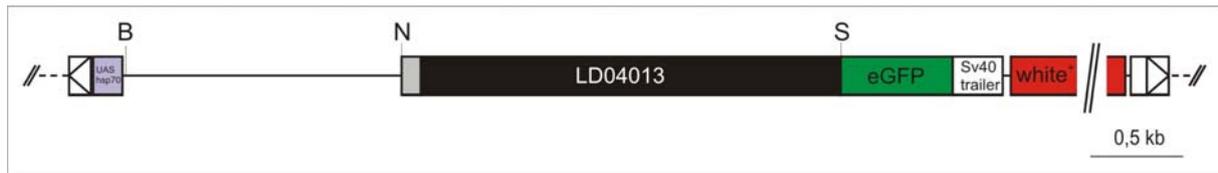


Abb. 59: Schematische Darstellung des Tob-GFP-Konstruktes

Der Promotorbereich mit einer Größe von 544 nt wurde mittels *Taq* DNA-Polymerase und den Primern Tob-Prom 4 und Tob-Prom 2 auf genomischer DNA als Template erzeugt. Der offene Leserahmen mit einer Größe von 2376 nt wurde mit *Taq* DNA-Polymerase mit den Primern Tob ORF 1 und Tob ORF 2 auf dem cDNA Klon LD04013 (in pBluescript SK-) erzeugt. Beide Teilstücke wurden in pGEM-T zwischenkloniert und über die Schnittstelle *NheI* miteinander verknüpft. Die gerichtete Einklonierung in den P-Element Vektor p{UAST}Green (siehe Material und Methoden) erfolgte über die an die Primer Tob-Prom-4 angehängte Schnittstelle *BglI* und über die an Tob ORF 2 angehängte Schnittstelle *SacI*. Die Überprüfung der Einzelteile erfolgte durch Restriktionsanalysen. Eine mögliche Rasterverschiebung zwischen der *orb2*-Sequenz und der GFP-Kassette wurde durch eine Sequenzierung dieses Bereiches ausgeschlossen. In grau ist der 5'-UTR, in schwarz das ORF und in grün die GFP-Kassette dargestellt. Der Strich stellt den Promotorbereich und die gestrichelte Linie den Vektor p{UAST} Green dar. Das in rot dargestellte *miniwhite*⁺-Gen ist verkleinert gezeichnet, seine tatsächliche Größe beträgt ca 5 kb. (B=*BglI*; N= *NheI*; S= *SacI*).

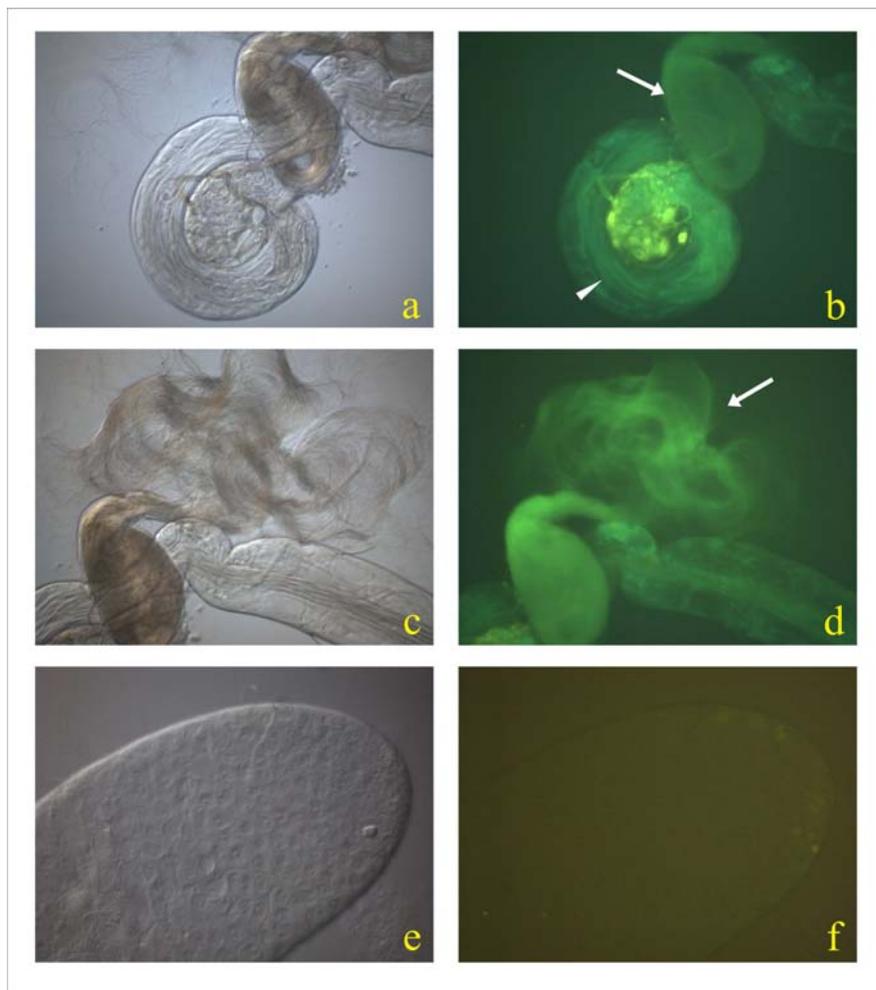


Abb. 60: Lokalisation von Tob

a) Die lichtmikroskopischen Aufnahmen des Hodenschlauches mit Samenblase zeigen alle Stadien der Spermatogenese **b)** Das GFP-Fusionsprotein ist in den Spermatidenbündeln (Pfeilspitze) und in reifen Spermien in der Samenblase (Pfeil) lokalisiert. **c)** Samenblase mit austretenden, motilen reifen Spermien. **d)** Reife motile Spermien (Pfeil) zeigen das Fusionsprotein. **e)** Hodenschlauchspitze mit primären Spermatozyten. **f)** Primäre Spermatozyten zeigen keine Fluoreszenz.

2.2.7. Whole mount *in situ*-Hybridisierungen zeigen eine postmeiotische *Tob* Transkription

Nach der Überprüfung der Lokalisation des *Tob* Proteins sollte die Lokalisation der *tob* mRNA durch eine whole mount *in situ*-Hybridisierung geklärt werden. Dazu wurde eine Digoxigenin markierte Sonde verwendet, die mit dem Klon 733 (*Tob6-4*) als Template erzeugt wurde. Mit dieser Sonde werden ca. 520 nt der *Tob* mRNA abgedeckt. Die Sonde wurde auf fixierte *w*¹¹¹⁸ Hoden hybridisiert und mittels eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Zweitantikörpers und den Farbsubstraten NBT und BCIP nachgewiesen. Interessanterweise zeigten sich bei der lichtmikroskopischen Untersuchung die stärksten Signale in einem Bereich am Ende der elongierenden Spermatidenbündel (Abb. 61 a, b, c). Schwache Färbung zeigt sich auch im Cytoplasma der Spermatozytenzysten (Abb. 61 b Pfeil). Primäre Spermatozyten zeigen aber nur eine sehr schwache Färbung.

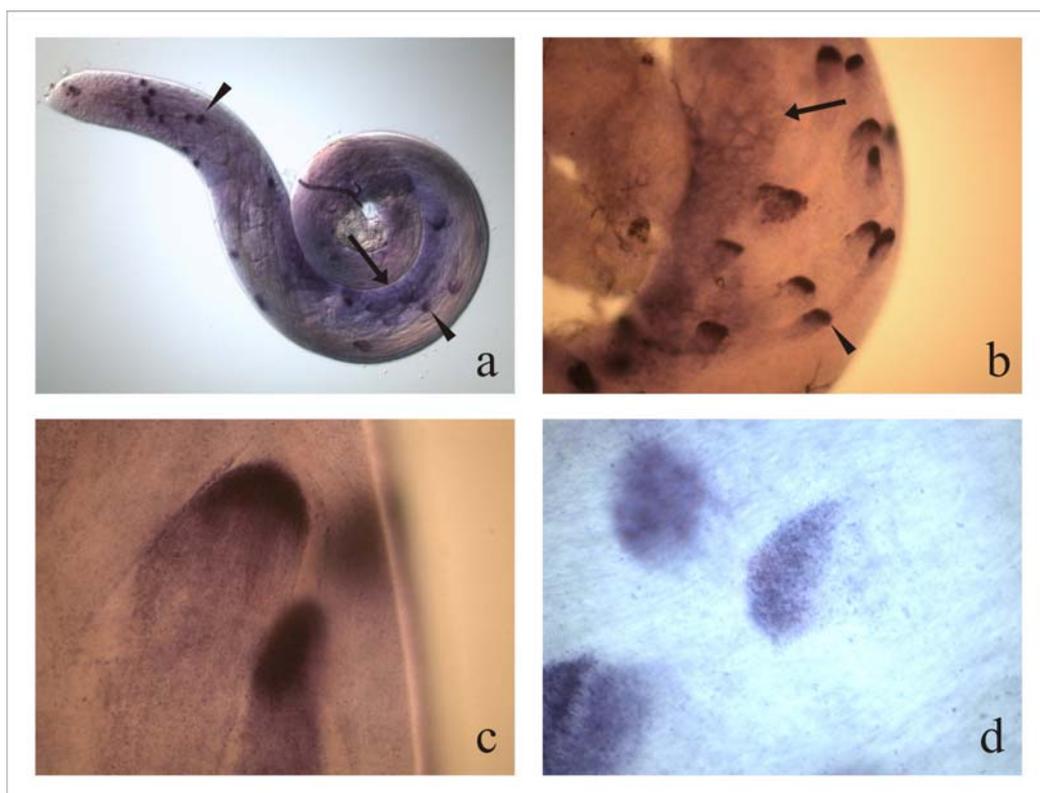


Abb. 61: *In situ*-Hybridisierung mit DIG markierter *Tob* Sonde auf Wildtyphoden

Zum Nachweis der *tob* mRNA in den Hoden wurde eine Digoxigenin markierte Sonde verwendet. Als Template diente der Klon 733 (*Tob 6-4*), mit der ca. 520 nt der *tob* mRNA abgedeckt wurden. **a)** Die *tob* mRNA ist besonders stark an den Enden der Spermatiden lokalisiert (Pfeilspitzen). In schwächerer Form finden sie sich aber auch im Bereich der Spermatozyten (Pfeil). **b)** Neben der Färbung am Ende der Spermatiden (Pfeilspitze) zeigt sich auch eine Färbung im Cytoplasma von Spermatozytenzysten (Pfeil). **c** und **d)** Eine Vergrößerung zeigt eine kometenförmige Färbung an den Enden der Spermatiden, die aber zum Teil auch schwächer ausgeprägt sein kann.

Dieses Ergebnis könnte auch die starke Zunahme der Transkriptmenge von *tob* von den Larven des 3. Stadiums zu den adulten Männchen hin erklären, die durch die Northern-Blot-Analyse beobachtet wurde (Abb.52 B). Da in den primären Spermatozyten nur wenig Transkript vorliegt, ist auch in den Larven 3 wenig zu erwarten. Das starke Signal in den Adulten (Abb. 52 b) spiegelt die große *tob* Transkriptmenge an den Enden der Spermatiden wieder (Abb. 62).

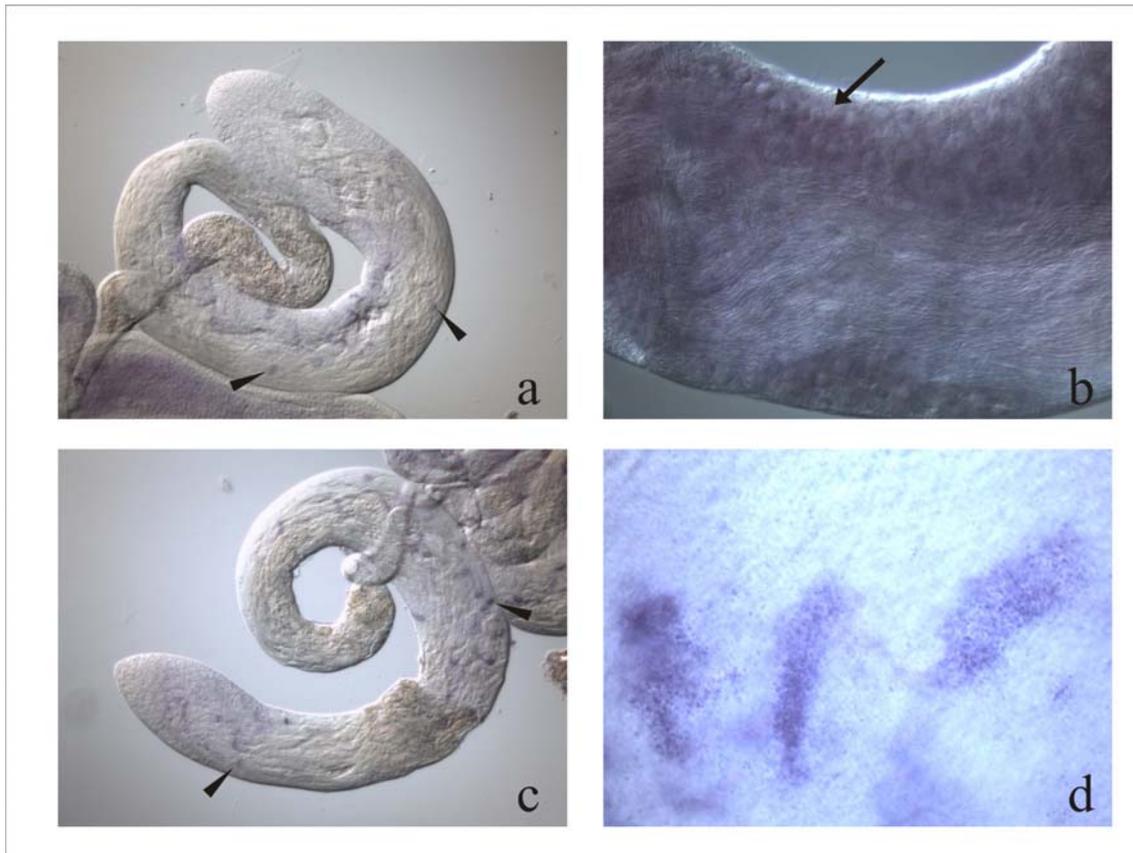


Abb. 62: *In situ*-Hybridisierung auf *tob* antisense- und *orb2* Jump out 10-Hoden mit Digoxigenin markierter *tob* Sonde

Zum Nachweis der *tob* mRNA in den Hoden wurde eine Digoxigenin markierte Sonde verwendet. Als Template diente der Klon 733 (Tob 6-4), mit der ca. 520 nt der *tob* mRNA abgedeckt wurden.

a) Übersicht des Hodenschlauches eines *tob*-antisense Männchens. Es ist nur eine sehr reduzierte Menge an *tob* mRNA nachweisbar (Pfeilspitzen). **b)** Detailaufnahme des Hodenschlauches. Im Bereich der primären Spermatozyten ist eine sehr schwache Färbung erkennbar (Pfeil). In dem hier gezeigten Bereich sollten auch gefärbte Spermatidenenden zu sehen sein. Die endogene mRNA wird durch das Antisensekonstrukt offensichtlich sehr effektiv abgebaut. **c)** Übersicht über den Hodenschlauch eines *orb2* mutanten Männchens. Die *tob* mRNA liegt im Vergleich zum Wildtyp in stark verringerter Menge vor. Sie ist am Ende der Spermatidenbündel feststellbar (Pfeilspitzen), frühe Stadien scheinen kein *tob* Transkript zu enthalten. **d)** Die Detailaufnahme zeigt, dass die *tob* mRNA im *orb2* mutanten Hintergrund auch in den Bereich am Ende der Bündel lokalisiert, allerdings liegt sie stark verringert vor und zeigt keinen ausgeprägten Kometenschweif wie in Abb. 61 beschrieben.

Die späte starke Anhäufung der *tob* mRNA ist deshalb auffällig, weil es als Dogma der Spermatogenese gilt, dass nach der Meiose keine Transkription mehr stattfindet. So ist eine große Menge an Transkript, die am Ende der Spermatidenschwänze

gebildet wird, sehr ungewöhnlich. Die Hybridisierung wurde ein zweites Mal mit einer unabhängigen Sonde wiederholt, die das gleiche Ergebnis zeigte. Um zu prüfen, ob die hier beobachtete Verteilung der *tob* mRNA nicht auf einer Kreuzhybridisierung beruht, wurden Hoden von *tob* antisense-Tieren präpariert und mit der gleichen Sonde hybridisiert. Wie zu erwarten war, konnten keine oder nur sehr geringe Färbungen unter dem Lichtmikroskop festgestellt werden (Abb. 62 a u. b). Dies zeigt, dass es sich hierbei nicht um eine Fehlhybridisierung der Sonde handelt und belegt zudem zusätzlich zu dem Ergebnis der Northern-Blot-Analyse (Abb. 54) die Funktionalität des *tob* antisense Konstruktes.

2.2.8. Im *orb2* mutanten Hintergrund liegt die *tob* mRNA verringert vor

Mittels einer *in situ*-Hybridisierung sollte die Frage geklärt werden, ob Orb2 einen Einfluß auf die Verteilung der *tob* mRNA hat. Hoden der P-Element Remobilisierungslinie Jump out 10 wurden präpariert und mit der Digoxigenin-markierten *tob* Sonde hybridisiert. Es zeigte sich, dass sich die *tob* mRNA nur am Ende der Spermatidenbündel beobachten ließ und dies in einer, verglichen mit dem Wildtyp viel geringeren Menge (Abb. 62 c und d). Gefärbte Spermatozytenzysten wie im Wildtyp waren nicht zu beobachten. Dies zeigte, dass die *tob* mRNA im *orb2* mutanten Hintergrund in stark verringerter Menge vorliegt, was auf einen direkten Einfluß von Orb2 auf die *tob* mRNA schließen läßt.

2.3. Ein möglicher Interaktionspartner von Orb2: Das Protein Gap

Der zweite mögliche Interaktionspartner von Orb2 ist das Protein Gap. Gap steht für GTPase activating protein. Proteine dieser Familie sind z.B. beteiligt an der negativen Regulation von Ras GTPasen, die sich im Cytoplasma befinden. GTPasen spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion an der intrazellulären Domäne von Transmembranrezeptoren, sind beteiligt an der Translation, der Kontrolle und Differenzierung bei der Zellteilung, der Translokation von Proteinen durch Membranen und dem Vesikeltransport innerhalb der Zelle (zusammengefasst in Bernards und Settlemen, 2004; Bustelo *et al.*, 2007). Alle regulatorischen kleinen GTPasen funktionieren nach einem gemeinsamen Mechanismus, der es ihnen ermöglicht, eine Signaltransduktionskette ein- oder auszuschalten. Beim Ausschalten wird die aktive GTP-Form durch Hydrolyse des GTP in eine inaktive GDP-Form überführt. Diese Reaktion wird durch GTPase activating proteins (GAPs) durchgeführt (Abb. 63). Das Einschalten geschieht durch Guanine nucleotide exchange factors (GEFs), die dafür sorgen, dass das GDP abdissoziiert und so neues GTP gebunden werden kann. Nur die aktive Form kann ein Signal an eine Signaltransduktionskette weiterleiten (zusammengefasst in Bernards und Settlemen, 2004). In *Drosophila* gibt es insgesamt 90 Mitglieder der kleinen GTPasen und 64 verschiedene Gap Gene (zusammengefasst in Jiang und Ramachandran, 2006).

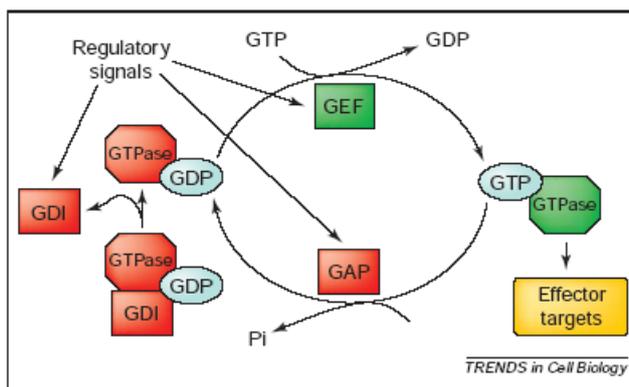


Abb. 63: Der GTPase Kreislauf

Die meisten GTPasen wechseln zwischen einem inaktiven GDP und einem aktiven GTP gebundenen Zustand. Aktive GTPasen interagieren mit sogenannten Effektoren, die zu einer biologischen Konsequenz führen. Die Regulation dieses Kreislaufs wird gesteuert durch koordinierte Interaktionen von GTPase-activating proteins (GAPs), guanine nucleotide exchange factors (GEFs) und guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs). Die Aktivität jedes einzelnen Faktors wird durch eine Vielzahl von Signalen gesteuert. Inaktive GTPasen oder GTPase-Inaktivatoren sind in rot, aktive GTPasen oder GTPase-Aktivatoren in grün dargestellt (aus Bernards und Settlemen, 2004).

Eines zu dieser großen Familie gehörenden Gene, ist das *Drosophila* Gen CG32560 (im weiteren Text als *gap* bezeichnet). Es befindet sich auf dem X-Chromosom und hat eine Größe von ca. 41 kb auf der genomischen Sequenz. Es besitzt ein

Transkript mit einer Größe von 5,4 kb, das für ein 1556 Aminosäuren großes Protein mit einem Gewicht von ca. 170 kDa codiert (Abb. 64). Ähnliche Sequenzen wurden in *Caenorhabditis elegans*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* und *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert. Das Gen enthält fünf Exons und vier Introns, wobei das Startcodon im ersten und das Stoppcodon im letzten Exon liegen. Mehrere Hoden ESTs lassen auf eine Funktion bei der Spermatogenese schließen.

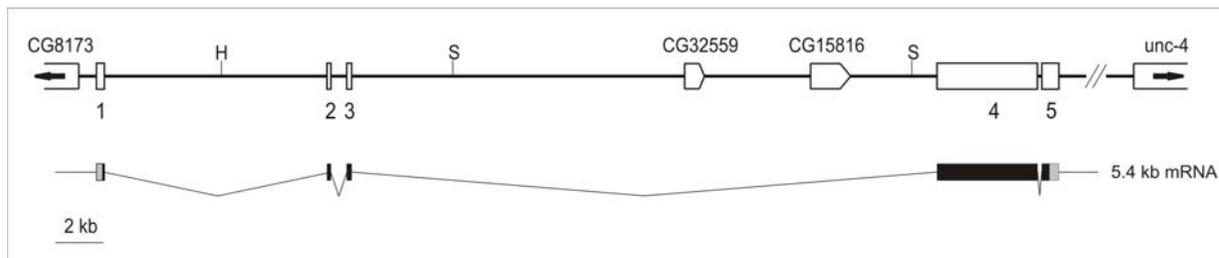


Abb. 64: Genregion und Transkript von *gap*

Das Gen *Gap* besteht aus fünf Exons und vier Introns und codiert für ein Transkript mit einer Größe von 5,4 kb. Das Transkript codiert für ein Protein, welches das Startcodon im ersten und das Stoppcodon im fünften Exon hat. In der Nachbarschaft von *Gap* liegen die Gene *CG8173* und *unc-4*. Im Intron zwischen dem dritten und dem vierten Exon liegen die beiden Gene *CG32559* und *CG15816*. Die grauen Bereiche in den Transkripten stellen die UTR dar, schwarz sind die offenen Leseraster. (H=*HindIII*, S=*SspI*)

2.3.1. Das *gap* Transkript lässt sich mittels Northern-Analysen kaum nachweisen

Für die Northern-Blot-Analysen wurden insgesamt vier verschiedene Sonden verwendet, die an unterschiedliche Bereiche des *gap* Transkriptes hybridisieren sollten. Diese Sonden wurden auf unterschiedliche Membranen mit verschiedener mRNA Beladung hybridisiert. Nur bei einem dieser Versuche mit der Sonde *Gap 3-4* (Abb. 65 A) gelang es, ein schwaches Transkript zu identifizieren, das der in der Flybase angegebenen Größe von ungefähr 5,4 kb entspricht. In den Weibchen konnte eine sehr kräftige Bande bei ca. 1,3 kb in den Ovarien, den Karkassen und den Köpfen nachgewiesen werden, die bei den Männchen nicht zu finden ist. Ab einem Bereich von 2 kb bis über 10 kb hat die Sonde unspezifisch an diverse Ovarien mRNAs gebunden, so dass nur noch ein schwarzer Schmier zu sehen war. In den Hoden sind außer der Bande bei 5,4 kb, die der erwarteten Transkriptgröße entspricht, noch vergleichbar schwache Banden bei 3,7 kb, 2,5 kb und 1,3 kb zu erkennen (Abb. 65 A). Bei einer kürzeren Expositionszeit gegen einen Röntgenfilm waren nur noch die Bande bei 1,3 kb in den Karkassen der Weibchen und die Vielzahl von Banden in den Ovarien zu finden (Daten nicht gezeigt).

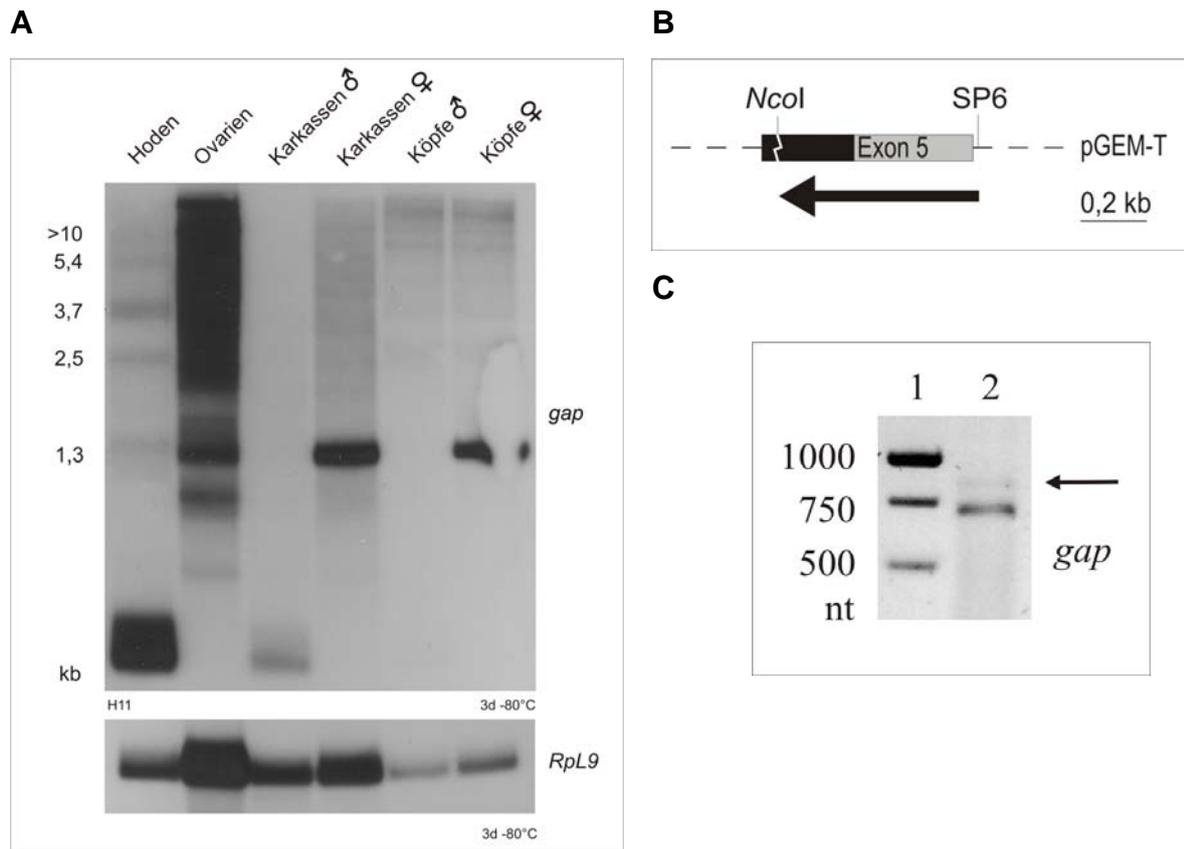


Abb. 65: Transkriptanalyse von *gap*

a) Zum Nachweis des Transkripts von *gap* wurde die Sonde Gap 3-4 (Klon 94) auf eine Northern-Membran hybridisiert, die poly(A)-RNA folgender Gewebe enthält: Hoden, Ovarien, Karkassen ♂, Karkassen ♀, Köpfe ♂ und Köpfe ♀. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **b)** Schematische Darstellung des Bereichs, der für die *gap* Sonde verwendet wurde. Vor der *in vitro*-Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase und Markierung der Sonde mit $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP wurde das Template mit *Nco*I linearisiert. **c)** RT-PCR mit den Primern Gap-7 und Gap-8. Als Template diente mRNA von *OregonR* Männchen. Das Produkt sollte eine Größe von 819 nt besitzen. Es zeigt sich in dieser Größe eine schwache Bande (Pfeil), eine stärkere Bande ist unterhalb von 750 nt nachweisbar.

Die schwache Ausprägung der Bande bei 5,4 kb und die Vielzahl von anderen Banden lässt eine verlässliche Zuordnung zum *gap* Transkript nicht zu. Aus diesem Grund wurde eine RT-PCR auf mRNA von *OregonR* Männchen durchgeführt. Mit der Primerkombination Gap-7 und Gap-8 konnte ein schwaches Produkt erzeugt werden (Abb. 65 C). Dies zeigte, dass die *gap* mRNA in den Männchen exprimiert wird. Eine Größenbestimmung des Transkriptes war auf diesem Wege natürlich nicht möglich.

2.3.2. Homozygote *gap*-antisense Männchen sind steril

Uns interessiert nun die Frage, ob eine *gap* Mutante einen ähnlichen Phänotyp wie bei *orb2* und *tob* beobachtet, auslösen kann. Zum Ausschalten des *gap* Transkriptes wurden zwei antisense- und ein RNAi-Konstrukt erzeugt (Abb. 66).

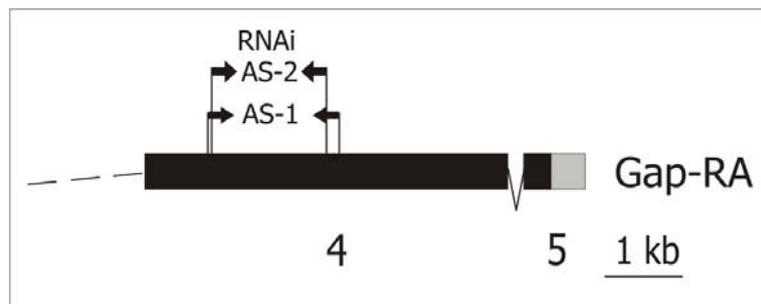


Abb. 66: Lage der Primer für *gap* antisense und RNAi Konstrukte

Als Template für alle drei Konstrukte dienten Bereiche aus dem vierten Exon. Das erste antisense-Konstrukt (AS-1) mit einer Größe von 1210 nt wurde mit den Primern Gap-AS-1 und Gap-AS-2 auf den Klon 716 (Gap 5-6) und das zweite (AS-2) mit einer Größe von 1048 nt mit den Primern Gap-AS-3 und Gap-AS-4 auf dem Klon 102 (Gap 1-2) erzeugt. Beide PCR-Produkte wurden mit der *Taq* DNA-Polymerase erzeugt, in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert und dann mit den Schnittstellen *NotI* und *BglII* so in den Testis-Expression-Vektor einligiert, dass bei der Transkription mit T7 RNA-Polymerase eine mRNA entsteht, die in antisense-Orientierung zur *gap* mRNA vorliegt. Der Sequenzbereich für das RNAi Konstrukt (1048 nt) gegen das *gap* Transkript wird mit den Primern Gap-RNAi-1 und Gap-RNAi-2 auf dem Klon 102 (Gap 1-2) amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde mit *Taq* DNA-Polymerase erzeugt und vor der weiteren Klonierung in den Vektor pGEM-T einligiert. Mit den an die Primer angehängten Schnittstellen *HindIII* und *KpnI* wurde es aus dem Vektor herausgeschnitten und zuerst mit einem *HindIII* geschnittenen 500 nt großen Bereich der GFP-Kassette ligiert, der nach erfolgter Transkription den Loopbereich für den Doppelstrang des RNAi Konstruktes bildet. Nach erfolgreicher Ligation wurde das nun aus zwei *gap*-Sequenzen mit dem Loopbereich in der Mitte bestehende Konstrukt in den *KpnI* geschnittenen Vektor pBluescriptII zwischenligiert. Das komplette RNAi-Konstrukt wurde dann mit *KpnI* ausgeschnitten und in den ebenso geschnittenen Testis-Expression-Vektor einligiert. Die Primer wurden alle aus einem Bereich gewählt, da die anderen Bereiche des Gens zu klein oder sich für die Anlagerung von Primern aufgrund der Sequenz nicht gut geeignet haben. In schwarz dargestellt sind Teile des ORFs, in grau das 3'-UTR des Transkriptes. Die Pfeile stellen die Lage der Primer dar.

Bei allen drei Injektionen wurden transgene Tiere erzeugt. So konnten mit dem ersten antisense-Konstrukt (AS-1) 3, mit dem zweiten (AS-2) 9 und mit dem RNAi-Konstrukt 14 unterschiedliche Linien erzeugt werden. Alle heterozygoten Männchen und Weibchen waren vital und fertil. Dies war auch der Fall für homozygote Männchen und Weibchen der Linie mit Gap-RNAi-1-2. Das Konstrukt wurde zwar integriert, wie an den roten Augen der Nachkommen festzustellen war, löste aber keinen Phänotyp aus. Ob das Transkript von diesem Transgen gebildet wird, konnte nicht geklärt werden, da sich auch die mRNA des Konstruktes mit einer Northern-Blot-Analyse nicht darstellen ließ (Daten nicht gezeigt). Mit dem antisense-Konstrukt (AS-1) konnte eine Linie erzeugt werden, deren Männchen zu 70% steril waren. Auch die Männchen mit dem antisense-Konstrukt (AS-2) wurden auf Vitalität und Fertilität getestet. Zwei dieser Linien waren homozygot letal, zwei weitere Linien waren homozygot steril.

2.3.3. *gap* antisense-Männchen zeigen keine motilen Spermien

Ob die Hoden der *gap* antisense Männchen einen ähnlichen Phänotyp zeigen, wie die *orb2* Mutante wurde durch Licht- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu wurden Hoden der beiden homozygot sterilen Linien mit Hoechst 33258 und Phalloidin gefärbt.

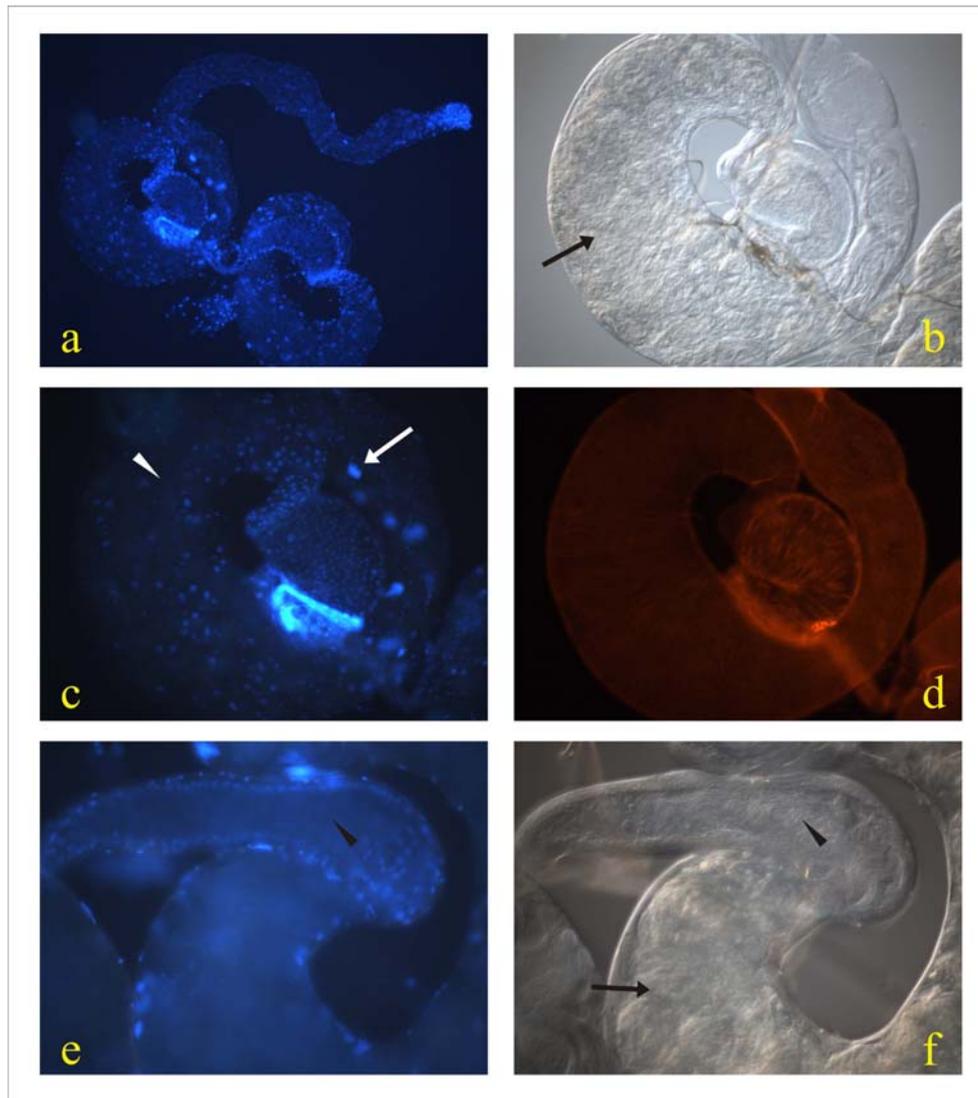


Abb. 67: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Hoden mutanter *gap* Linien
Zur Markierung der DNA und des F-Aktins wurden Hoden mit Hoechst 33258 und TRITC gekoppelten Phalloidin gefärbt. **a)** Übersicht Hoden eines *gap* antisense Männchens mit Kernfärbung. **b)** Lichtmikroskopische Aufnahme des Bereichs vor dem Terminalepithel. In diesem aufgeblähten Bereich liegen neben aufgeknäuelten Stadien viele Degenerationsprodukte (Pfeil). **c)** Kernfärbung des aufgeblähten Bereichs. Es liegen viele nadelförmige Kerne vor (Pfeilspitze). In der Mitte des Hodenschlauches finden sich mehrere Bündel von Kernen (Pfeil). **d)** Die Färbung des F-Aktins zeigt keine Individualisierungskomplexe. **e)** Die Kernfärbung zeigt keine Spermienkerne in der Samenblase (Pfeilspitze), obwohl in Bild f einzelne Spermien zu sehen sind. **f)** Direkt vor der Samenblase liegen aufgeknäulte Spermien vor (Pfeil), die Samenblase selber zeigt allerdings nur wenige Spermien (Pfeilspitze), neben Zellmaterial, das wahrscheinlich Degenerationsprodukte darstellt. Vor der Samenblase befinden sich aufgeknäulte Stadien und Degenerationsprodukte (Pfeil).

Es zeigte sich zuerst im Lichtmikroskop, dass der Hodenschlauch im Bereich des Terminalepithels stark aufgebläht ist. Es befinden sich dort neben aufgeknäuelten Spermatiden sehr viele Degenerationsprodukte (Abb. 67 b). Die Hoechstfärbung zeigte, dass an dieser Stelle viele nadelförmige Kerne vorliegen, die aber von ihrer Morphologie eher leicht gekrümmt sind und keine gerade Form haben, wie die Kerne im Wildtyp. In den Samenblasen lassen sich neben Degenerationsprodukten auch Spermenschwänze beobachten. Nadelförmige Kerne sind in der Samenblase aber nicht zu finden (Abb. 67 e und f). Bündel von nadelförmigen Kernen liegen im Hodenschlauch nur in sehr geringer Menge vor. So findet man in der Regel nur 3-6 Kernbündel, während sich im Hoden des Wildtyps z.T. über 30 zählen lassen. Auch ihre Lokalisation ist verändert. Sie befinden sich etwa in der Mitte des Hodenschlauches und tauchen damit etwas früher auf, als das im Wildtyp der Fall ist (Abb. 67 a, vergleiche Abb. 17 b). Individualisierungskomplexe lassen sich nur vereinzelt oder gar nicht nachweisen (Abb. 67 d).

2.3.4. Transheterozygote *gap* antisense-Männchen sind teilweise steril

Da von neun getesteten Linien mit *gap* antisense-Konstrukt (AS-2) nur zwei Linien homozygot sterile Männchen zeigten und Männchen mit einem *gap* RNAi-Konstrukt alle fertil waren, ist nicht auszuschließen, dass die beiden sterilen Linien, durch Integrationsdefekte entstanden sind. Um dies zu testen, wurden transheterozygote Tiere erzeugt. Dies bedeutet, dass man Tiere erzeugt, die zwei verschiedene Integrationen jeweils heterozygot tragen. Sollten diese Tiere steril sein, so ist das Konstrukt und nicht die Integration für die Sterilität verantwortlich. Dazu wurden die beiden sterilen Linien mit der Integration auf dem dritten Chromosom mit Fliegen gekreuzt, die homozygot letal waren und das Konstrukt auf dem zweiten Chromosom trugen. Deren Nachkommen, die alle vital waren, wurden auf ihre Fertilität getestet. Es zeigte sich, dass ungefähr 70% der männlichen Nachkommen steril waren. Somit ist nicht die Integration für die Sterilität verantwortlich, sondern das antisense-Konstrukt. Die sterilen Tiere wurden licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht und zeigten den gleichen Phänotyp wie die homozygot sterilen Männchen (Abb. 68).

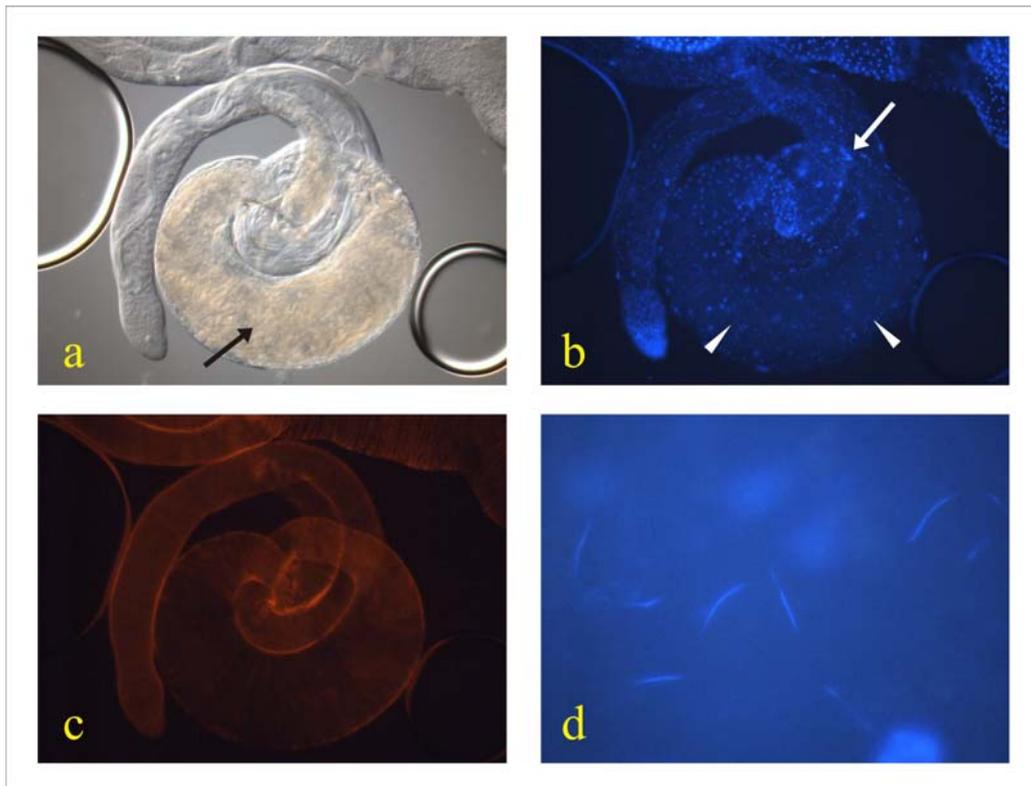


Abb. 68: Mikroskopische Untersuchungen der Hoden aus transheterozygoten Männchen

a) Der Hodenschlauch der transheterozygoten Tiere ist im Bereich vor dem Terminalepithel aufgebläht und voller aufgeknäulter Stadien und Degenerationsprodukte (Pfeil), wie es auch in den sterilen, homozygoten *gap* Männchen beobachtet werden konnte. **b)** Im aufgeblähten Bereich vor dem Terminalepithel liegen viele einzelne nadelförmige Kerne vor (Pfeilspitzen). Nur ein Bündel dieser Kerne kann eindeutig identifiziert werden (Pfeil). **c)** Individualisierungskomplexe liegen nicht vor, wie die Aktinfärbung zeigt. **d)** Eine Vergrößerung aus dem aufgeblähten Bereich zeigt nadelförmige Kerne, die eine leicht gekrümmte bis S-förmige Morphologie aufweisen, verglichen zur Wildtypsituation in Abb. 18 a.

2.3.5. Das Gap Protein findet sich auf den Spermatidenbündeln und reifen Spermien

Die Lokalisation des Gap Proteins sollte mit einem GFP-Konstrukt geklärt werden. Für dieses Konstrukt wurden der geneigene Promotorbereich und das komplette offene Leseraster verwendet und in den P-Element Vektor p{UAST}Green kloniert (Abb. 69). Insgesamt konnten 16 Gap-GFP Linien etabliert werden, deren Männchen und Weibchen sowohl homozygot vital als auch fertil waren.

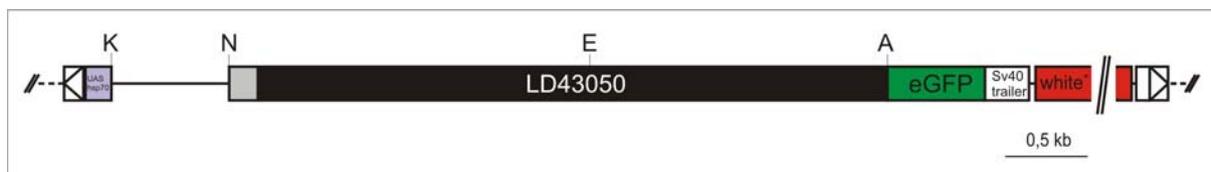


Abb. 69: Schematische Darstellung des *gap* GFP-Konstruktes

Für dieses Konstrukt wurde der geneigene Promotorbereich mit den Primern Gap-Prom 1 und Gap Prom 2 mit *Taq* DNA-Polymerase auf genomischer DNA als Template erzeugt und besaß eine Länge von 968 nt. Dieser wurde in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Da das ORF von *gap* mit 4,6 kb relativ groß ist und sich nicht als ein Stück amplifizieren ließ, wurde es aus zwei Teilen zusammengesetzt. Der 5' Bereich mit einer Größe von 2,5 kb wurde mit den Primern Gap-ORF 1 und Gap-ORF 2 amplifiziert und der 3' Bereich mit einer Länge von 2,3 nt mit den Primern Gap-ORF 3 und Gap-ORF 4. Für beide Amplifikationen wurde die *Taq* DNA Polymerase und der cDNA Klon LD 43050 (in pOT2) als Template verwendet. Beide PCR-Produkte wurden in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Durch die PCR wurden überlappende Bereiche erzeugt, so dass für die Verknüpfung der beiden Teilstücke eine in diesem Bereich liegende *EcoRI* Schnittstelle verwendet werden konnte. Beide Teilstücke wurden zusammenligiert und über die Schnittstelle *NheI* mit dem Promotorbereich verknüpft. Alle drei Teile wurden dann mit den Enzymen *KpnI* und *AgeI* in den P-Element Vektor p{UAST}Green einligiert. (Grau: 5'-UTR, schwarz: ORF, grün: GFP-Kassette, Strich: Promotorbereich, gestrichelte Linie: p{UAST}Green, K= *KpnI*, N= *NheI*, E= *EcoRI*, A= *AgeI*). Das in rot dargestellte *miniwhite*⁺-gene ist verkleinert gezeichnet, seine tatsächliche Größe beträgt ca 5 kb.

Das früheste Gap Fluoreszenzsignal läßt sich im Bereich der elongierenden Bündel feststellen. Prämeiotische Stadien zeigten keine Fluoreszenz (Abb. 70 b). Die Fluoreszenz in den Bündeln nimmt bis hin zum Terminalepithel zu und zeigt das stärkste Signal in den reifen Spermien in den Samenblasen (Abb. 70 d u. f). Die leicht gelbliche Färbung im Bereich des Terminalepithels stammt von der Eigenfluoreszenz degenerierender Stadien. Ein leichtes Quetschen von frisch präparierten Hoden zeigte, dass auch die motilen Spermien fluoreszieren (Abb. 70 d u. f). Das GFP Signal läßt sich also in Entwicklungsstadien nachweisen, in denen auch das Protein Orb2 zu finden ist.

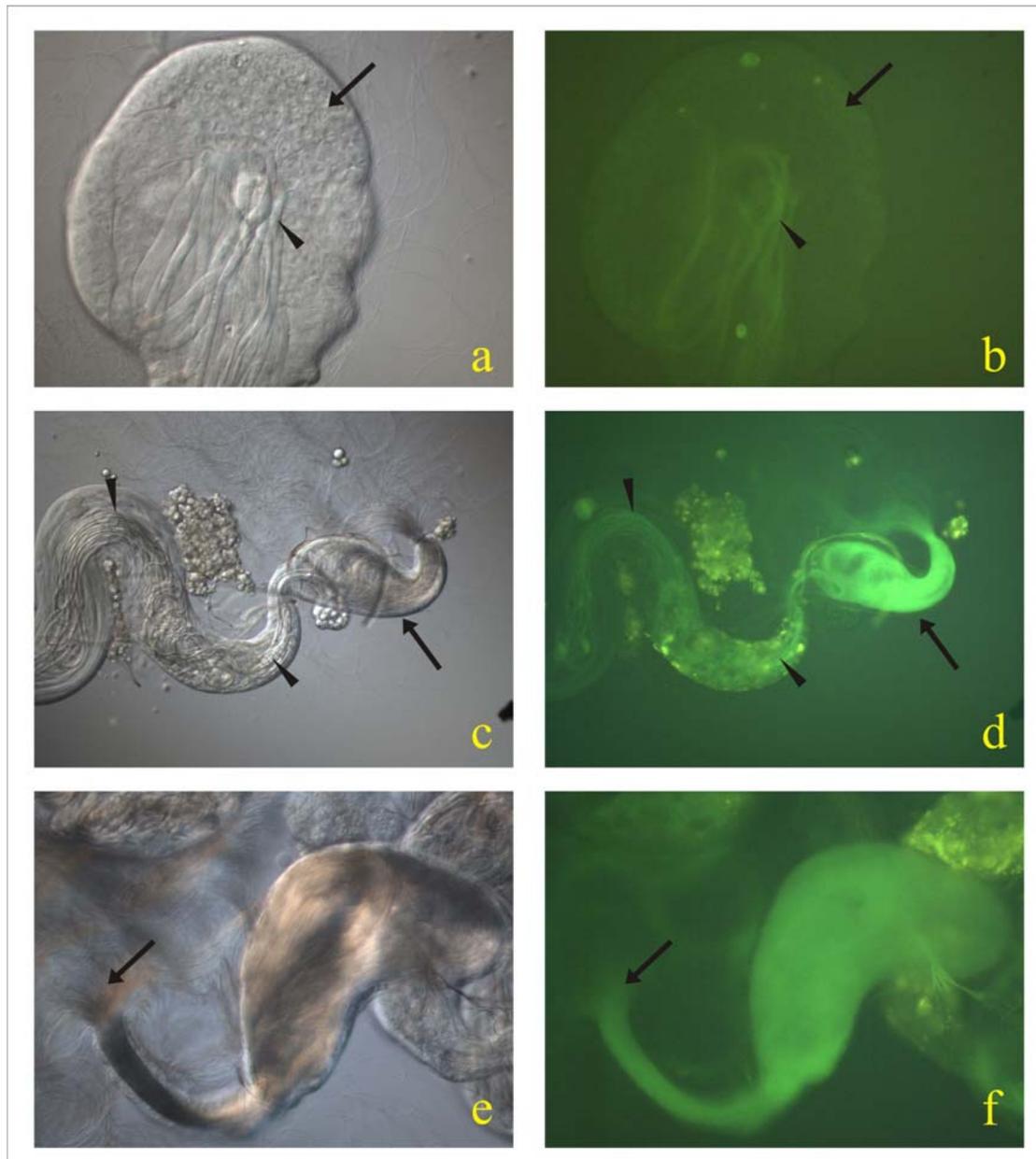


Abb. 70: Lokalisation des Gap-GFP-Fusionsproteins

a) In der Hodenschlauchspitze sind primäre Spermatozyten (Pfeil) und elongierende Bündel (Pfeilspitze) zu beobachten. **b**) Prämeiotische Stadien zeigen keine Fluoreszenz (Pfeil). Ein schwaches GFP-Signal ist auf den Spermatidenbündeln zu beobachten (Pfeilspitze). **c**) Das Ende des Hodenschlauches mit elongierenden Bündeln (Pfeilspitzen). Die Samenblase ist voller reifer Spermien (Pfeil). **d**) Die Fluoreszenz in den Bündeln scheint zuzunehmen, je näher sie der Samenblase kommen (Pfeilspitzen). Die stärkste Fluoreszenz zeigt sich in den reifen Spermien in der Samenblase (Pfeil). **e**) Samenblase und austretende motile Spermien (Pfeil) **f**) Die Spermien in der Samenblase und auch die motilen Spermien, die aus ihr austreten, zeigen ein starkes Fluoreszenzsignal (Pfeil). (a,c,e: DIC-Aufnahmen; b,d,f: Fluoreszenz)

2.4. Ein möglicher Interaktionspartner von Orb2: Das Protein Cup

Bei der Translationskontrolle in der Oogenese von *Xenopus* ist das Protein Maskin ein gut untersuchter Interaktionspartner des Proteins CPEB. Es bindet sowohl an CPEB als auch an den eukaryotischen Initiations-Faktor 4E (eIF4E). Durch die Bindung an eIF4E verhindert es dessen Bindung mit eIF4G und damit die Bildung des Translationsinitiationskomplexes. Erst nach einer Phosphorylierung des CPEB löst es seine Bindung an eIF4E und läßt somit die Translation zu (zusammengefasst in Cao und Richter, 2002). In *Drosophila* ist ein Maskin-ähnliches Protein bisher nicht beschrieben worden. Aus der Literatur ist aber bekannt, dass das *Drosophila* Orb in der Oogenese mit dem Protein Cup interagiert (Nakamura *et al.*, 2004). Cup bindet, wie Maskin, an eIF4E und ist beteiligt an der negativen Regulation von maternalen mRNAs (Piccioni *et al.*, 2005). Aufgrund seiner Funktion wird vermutet, dass Cup das Fliegenhomolog des *Xenopus* Proteins Maskin sein könnte, welches mit dem Protein CPEB interagiert (Macdonald, 2004). Es stellte sich somit für uns die Frage, ob das Protein Cup auch in der Spermatogenese von *Drosophila* eine Funktion erfüllt und ob es dort mit dem Protein Orb2 interagieren kann. Das *Drosophila melanogaster cup* mit der Flybase Bezeichnung CG11181 befindet sich auf dem linken Arm des 2. Chromosoms in der Region 26F5-6 und hat eine Größe von ca. 10 kb auf der genomischen Sequenz. Es bildet ein Transkript mit einer Größe von 4 kb, das für ein 1132 Aminosäuren großes Protein mit einem Gewicht von ca.127 kDa codiert. Das Gen enthält sechs Exons und fünf Introns, wobei das Startcodon im ersten und das Stoppcodon im letzten Exon liegen (Abb. 71). Mehrere Hoden ESTs lassen auf eine Funktion bei der Spermatogenese schließen.

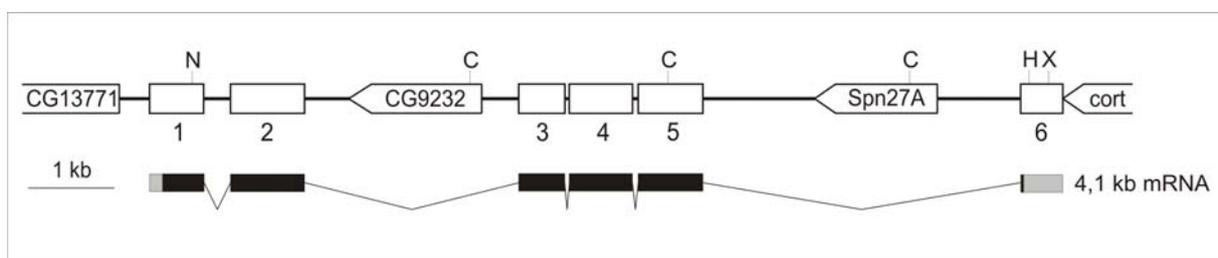


Abb. 71: Schematische Darstellung des Genbereichs und des Transkriptes des Gens cup

Das Transkript mit einer Größe von 4,1 kb setzt sich aus insgesamt sechs Exons zusammen. Benachbart zu *cup* liegen die Gene CG13771 und *cort*. Im Intron zwischen Exon 2 und Exon 3 liegt das Gen CG9232 und zwischen dem fünften und dem sechsten Exon liegt das Gen *spn27A*. Die beiden Nachbargene, sowie die zwischenliegenden Gene befinden sich auf dem Gegenstrang. Grau dargestellt sind die Bereiche, die für die 5'- und 3'-UTR codieren, in schwarz ist das offene Leseraster dargestellt. (N=*NheI*, C= *Clal*, H= *HindIII*, X= *XhoI*)

2.4.1. Eine Sonde gegen *cup* zeigt zwei Banden in Hoden- und eine in Ovarien-mRNA

Zum Nachweis des Transkriptes von *cup* wurde die Sonde Cup 1-2 verwendet (Abb 72 B). Mit dieser Sonde, die an den 3'- Bereich des *cup* Transkriptes hybridisieren sollte, konnten nach der radioaktiven Markierung zwei Banden in den Hoden bei 3,7 kb und 4,9 kb und eine starke Bande bei 4,2 kb in den Ovarien nachgewiesen werden (Abb. 72 A).

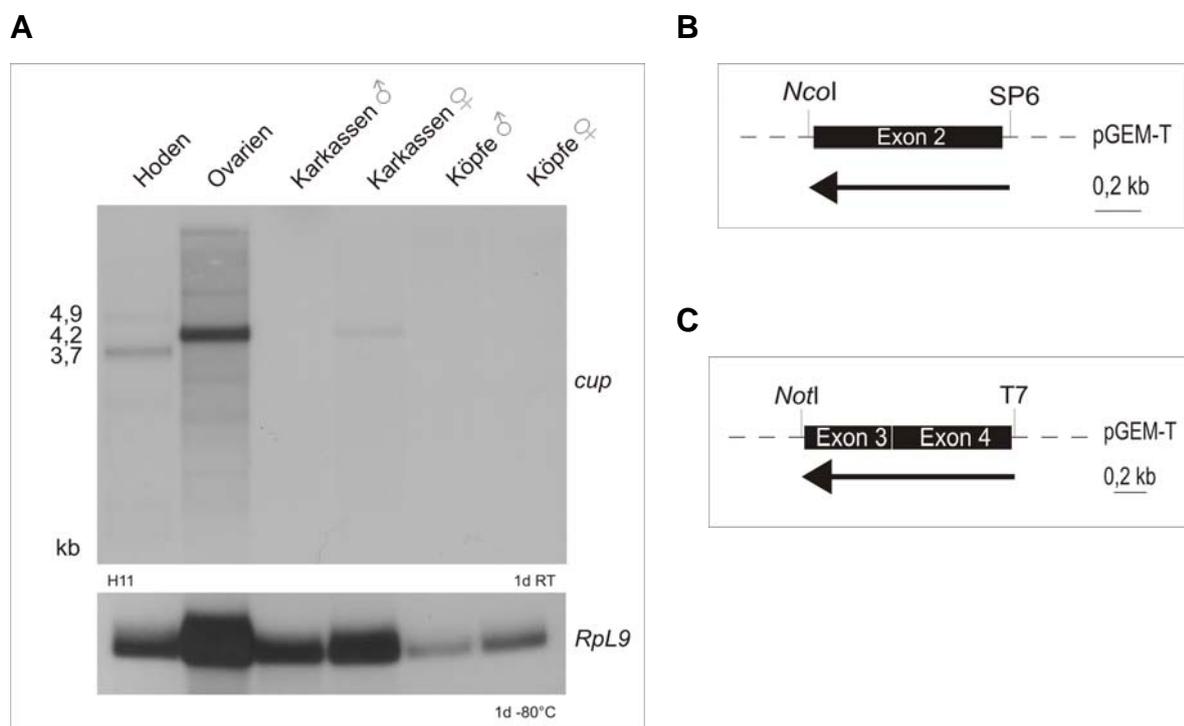


Abb. 72: Transkript-Analyse des Gens *cup*

A) Auf der Northern Membran finden sich poly(A)-RNAs aus folgenden Geweben: Hoden, Ovarien, Karkassen ♂, Karkassen ♀, Köpfe ♂ und Köpfe ♀. Mit beiden Sonden konnten in den Hoden zwei Banden mit den Größen 4,9 und 3,7 kb festgestellt werden. In den Ovarien läßt sich ein Transkript bei 4,2 kb nachweisen, die auch schwach in den Karkassen der Weibchen vorliegt. Alle anderen Spuren zeigen keine Banden. Als Beladungskontrolle wurde eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript des ribosomalen Proteins L9 durchgeführt. **B)** Schematische Darstellung der verwendeten Sonde Cup 1-2. Diese wurde durch PCR mit *Taq* DNA-Polymerase und den Primern Cup-1 und Cup-2 auf dem cDNA-Klon LD47924 als Template erzeugt. Das PCR-Produkt mit einer Größe von 809 nt wurde in den Vektor pGEM-T kloniert (Klon 809) und durch Restriktionsverdau überprüft. Das Insert ist so orientiert, dass mit der SP6-RNA-Polymerase bei der *in vitro*-Transkription ein antisense-Strang von *cup* mit einer Länge von 806 nt entsteht. Vor der *in vitro*-Transkription und Markierung mit $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP wurde das Template mit *Nco*I linearisiert. **C)** Schematische Darstellung der Sonde Cup 3-4. Diese zweite Sonde, die in der Mitte des Transkriptes hybridisieren sollte, wurde mit den Primern Cup-3 und Cup-4 wie unter B beschrieben erzeugt. Vor der *in vitro* Transkription wurde das Template (Klon 820) mit *Not*I linearisiert. Mit der T7 RNA-Polymerase wurde der antisense-Strang erzeugt, der an ein 1,3 kb großes Stück des *cup* Transkriptes hybridisieren kann.

Die Ovarienbande liegt auch in den Karkassen der Weibchen vor. Eine längere Belichtung zeigte, dass die beiden Banden in den Hoden sich in den Karkassen nicht entdecken lassen, aber in den Köpfen der Männchen zu finden sind (Daten nicht gezeigt). Dieses Bild zeigte auch, dass die kleinere der beiden Banden in den Männchen wesentlich stärker exprimiert wird, als die größere Bande (Abb. 72 A). Alle drei unterschiedlich großen Banden liegen in dem Bereich von ca. 4 kb, der als Größe für das *cup* Transkript angegeben ist. Die Bande in den Weibchen kommt dabei der erwarteten Größe von 4,1 kb am nächsten, wenn man den wahrscheinlichen poly(A)-Schwanz noch hinzurechnet. Da in der Flybase nur ein Transkript für *cup* angegeben ist, sollte mit einer zweiten Sonde geprüft werden, ob Teile der oben beschriebenen Banden von Fehlhybridisierungen herrühren (Abb.72 C). Mit dieser Sonde wurde das Ergebnis der ersten Sonde reproduziert (Daten nicht gezeigt), so dass man davon ausgehen kann, dass die Ergebnisse aus dem ersten Versuch stimmen und dass insgesamt drei Transkripte von unterschiedlicher Größe in den Fliegen vorliegen. Dieses Transkriptmuster wurde auch bei einer vorhergehenden Untersuchung der Expression von *cup* gezeigt (Keyes und Spradling, 1997).

2.4.2. Das Cup Protein findet sich in allen Stadien der Spermatogenese

Zur Überprüfung der Lokalisation des Cup Proteins wurde ein GFP-Konstrukt erstellt. Dieses besteht aus dem geneigenen Promotorbereich und dem offenen Leseraster, die zusammen in den Vektor p{UAST}Green ligiert wurden (Abb. 73).

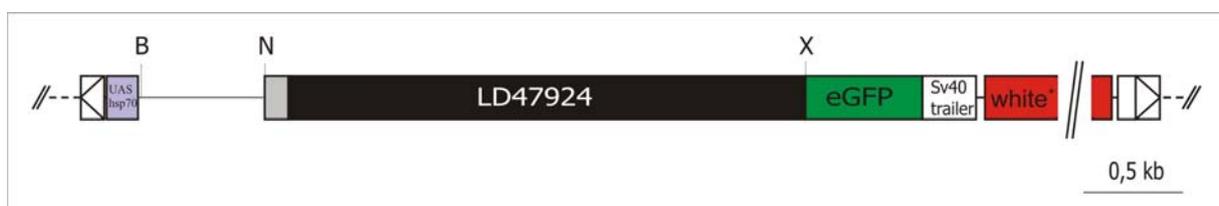


Abb. 73: *cup* GFP-Konstrukt

Das *cup* GFP-Konstrukt besteht aus dem geneigenen Promotorbereich mit einer Größe von 840 nt, der mit den Primern Cup-Prom-1 und Cup-Prom-2 auf genomischer DNA als Template erzeugt wurde. Der Bereich des offenen Leserasters mit einer Größe von 3231 nt wurde mit den Primern Cup-ORF-1 und Cup-ORF-2 auf dem cDNA Klon LD47924 erzeugt. Für beide Amplifikationen wurde die *Taq* DNA-Polymerase verwendet und die PCR-Produkte anschließend in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Die beiden Einzelteile wurden nach einer Restriktionsanalyse in pGEM-T über *NheI* miteinander verknüpft und dann unter Verwendung der Schnittstellen *BglII* und *XhoI* in den Vektor p{UAST} Green einligiert. Durch den Vektor wird eine 621 nt lange GFP-Kassette an das Konstrukt angehängt. Durch eine Sequenzierung bei der Firma Genterprise (Mainz) konnte gezeigt werden, dass es zwischen dem offenen Leseraster und der GFP-Kassette zu keiner Rasterverschiebung gekommen ist. Der Promotorbereich ist als Linie, der 5'-UTR in grau, das ORF in schwarz und die GFP-Kassette in grün dargestellt. Das in rot dargestellte *miniwhite*⁺-gene ist verkleinert gezeichnet, seine tatsächliche Größe beträgt ca 5 kb. (B= *BglII*, N= *NheI*, X= *XhoI*).

Nach Überprüfung des Konstruktes durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung des Überganges zwischen dem ORF und der GFP-Kassette wurde das Konstrukt in w^{1118} -Embryonen injiziert. Es konnten insgesamt fünf verschiedene Integrationslinien etabliert werden. Alle männlichen und weiblichen Tiere waren homozygot fertil und vital.

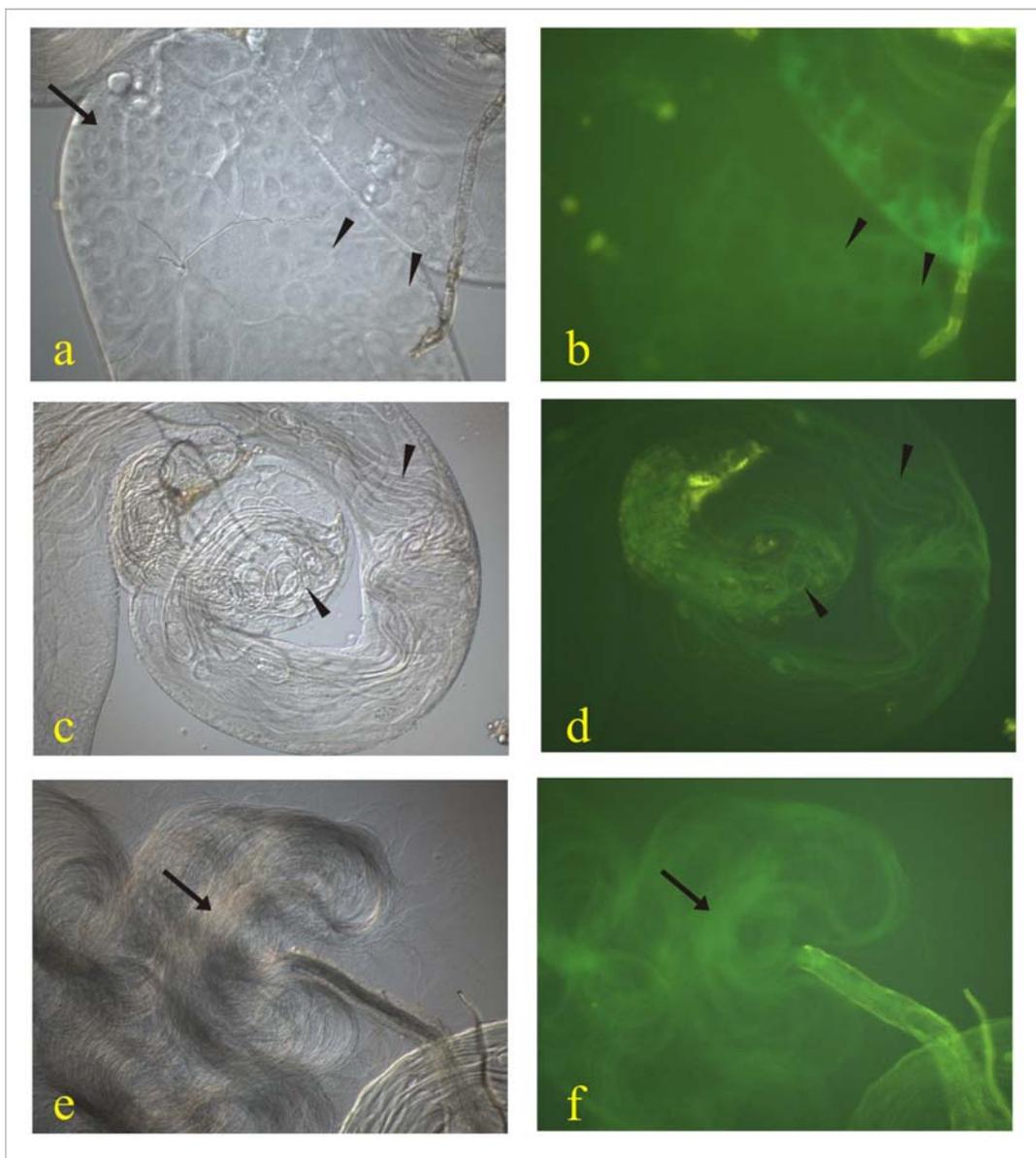


Abb. 74: Lokalisation des Cup Proteins

a und **b**) Im Bereich der Hodenschlauchspitze zeigt sich das erste Fluoreszenzsignal im Cytoplasma der sekundären Spermatozyten (Pfeilspitzen). Primäre Spermatozyten sind frei von Fluoreszenz (Pfeil). **c** und **d**) Das Cup-GFP-Fusionsprotein ist auf den Spermatidenbündeln lokalisiert (Pfeilspitzen). **e** und **f**) Auch reife Spermien zeigen ein Fluoreszenzsignal (Pfeil).

Die Fluoreszenz zeigt sich in allen Stadien der Spermatogenese. Die primären Spermatozyten zeigen dabei ein kaum erkennbares Signal (Abb. 74 b). Die Fluoreszenz nimmt dann aber schon in den prämeiotischen Stadien zu und ist dort

im Cytoplasma lokalisiert. Die Zellkerne sind frei vom Fusionsprotein und auch eine Assoziation mit Membranen und Organellen ist nicht zu beobachten (Abb. 74 a und b). Die elongierenden Spermatidenbündel und auch die reifen Spermien in den Samenblasen zeigen ein relativ starkes Signal (Abb. 74 c und d). Leichtes Quetschen von frisch präparierten Hoden zeigte, dass das Protein Cup auch an motilen Spermien zu finden ist (Abb. 74 e und f). Die Verteilung des Proteins Cup schließt somit eine mögliche Interaktion mit Orb2 nicht aus. Neben dem GFP-Konstrukt wurde zur Überprüfung möglicher Co-Lokalisationen mit den anderen Kandidaten ein RFP-Konstrukt, wie oben beschrieben kloniert und dann in den Vektor pUAST Redmars (C. Schäfer, pers. Mitteilung) kloniert. Es konnten sechs verschiedene Linien etabliert werden, die allerdings kein Fluoreszenzsignal in den Hoden zeigten. Wie sich später herausstellte, erzeugt die angehängte RFP-Kassette auch bei anderen Fusionen kein oder nur ein sehr schwaches Signal.

2.4.3. Männchen einer *cup* RNAi-Linie sind steril

Zum Ausschalten der *cup* Transkripte wurden zwei antisense-Konstrukte und zwei RNAi-Konstrukte erstellt (Abb. 75). Alle vier Konstrukte wurden in w1118 Embryonen injiziert.

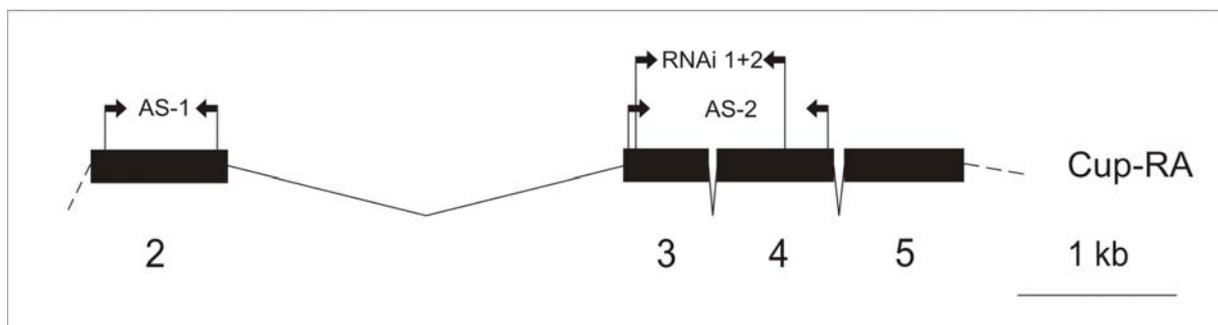


Abb. 75: *cup* antisense- und RNAi-Konstrukte

Das erste antisense-Konstrukt (AS-1) wurde mit den Primern Cup AS-1 und Cup AS-2 auf dem Klon 809 (Cup 1-2 in pGEM-T) erzeugt, das zweite (AS-2) mit den Primern Cup AS-3 und Cup AS-4 auf dem Klon 820 (Cup 3-4 in pGEM-T). Beide PCR-Produkte mit Größen von 809 nt bzw. 1345 nt wurden mit *Taq* DNA-Polymerase erzeugt, in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert und dann mit den Schnittstellen *NotI* und *BglII* gerichtet in den Testis-Expression-Vektor einligiert. Bei der Transkription wird nun in beiden Fällen der antisense-Strang von *cup* erzeugt. Das erste RNAi-Konstrukt (RNAi 1) wurde mit den Primern CP-RNAi-1 und CP-RNAi-2 auf dem cDNA Klon LD47924 erzeugt und das zweite (RNAi 2) mit den Primern CP-RNAi-3 und CP-RNAi-4 auf dem Klon 820 (Cup 3-4 in pGEM-T). Beide wurden in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *KpnI* wurden die beiden Teile wieder ausgeschnitten und dann jeweils mit einem *HindIII* geschnittenen Stück der GFP-Kassette ligiert, das im fertigen Konstrukt für die Bildung der „hairpin“ Struktur verantwortlich ist. Das fertige Konstrukt wurde in pBluescript zwischenkloniert und dann in den *KpnI* geschnittenen Testis-Expression-Vektor einligiert. In schwarz dargestellt sind Teile des ORFs. Die Pfeile stellen die Lage der Primer dar.

Mit allen vier Konstrukten gelang es, transgene Tiere zu erzeugen. So konnten je fünf verschiedene Integrationslinien mit den beiden antisense-Konstrukten (AS-1 und AS-2) erzeugt werden. Bei den RNAi-Linien waren es fünf, die das erste (RNAi 1) und zehn, die das zweite (RNAi 2) Konstrukt integriert hatten. Homozygote Männchen aller Linien wurden auf ihre Fertilität getestet. Es zeigte sich, dass von allen erzeugten Linien nur eine RNAi-Linie sterile Männchen hervorbrachte.

2.4.4. *cup* RNAi-Männchen zeigen keine reifen Spermien

Eine licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte, dass die Hoden der sterilen *cup* RNAi-Linie sich in der Größe und Morphologie nicht vom Wildtyp unterscheiden. Alle Stadien der Spermatogenese bis hin zu den elongierenden Spermatischenbündeln lassen sich nachweisen. Im hinteren Bereich des Hodenschlauches vor dem Terminalepithel sind allerdings große Mengen an degenerierenden Stadien zu beobachten. Dieser Bereich ist grau-bräunlich, leicht aufgebläht und ähnelt dem Phänotyp, wie er schon bei der *gap* Mutante festgestellt werden konnte (Abb. 76 a; siehe auch Abb. 67 b). Die Samenblasen sind leer, motile Spermien sind nicht zu entdecken. Eine Hoechstfärbung zeigte, dass noch einzelne Bündel vorlagen, die meisten nadelförmigen Kerne allerdings nicht mehr verbunden, sondern einzeln in den Zysten vorlagen. Im Bereich des Terminalepithels kann man eine Vielzahl von Kernen finden, die allerdings eher gekrümmt (Abb. 76 d) als gerade wie im Wildtyp aussehen. In der Samenblase, die einzelne Degenerationsprodukte zu enthalten scheint, sind keine Kerne feststellbar (Abb. 76 e und f). Eine Färbung des F-Aktins zeigte nur ganz wenige oder keine Individualisierungskomplexe (Daten nicht gezeigt). Da es bei den untersuchten Linien nur zu einer sterilen Linie kam, kann nicht durch transheterozygote Linien getestet werden, ob durch das RNAi-Konstrukt wirklich die *cup* mRNA abgebaut wird. Es ist somit nicht auszuschließen, dass der hier beschriebene Phänotyp auf einem Defekt beruht, der durch die Integration des Konstruktes in das Genom hervorgerufen wird.

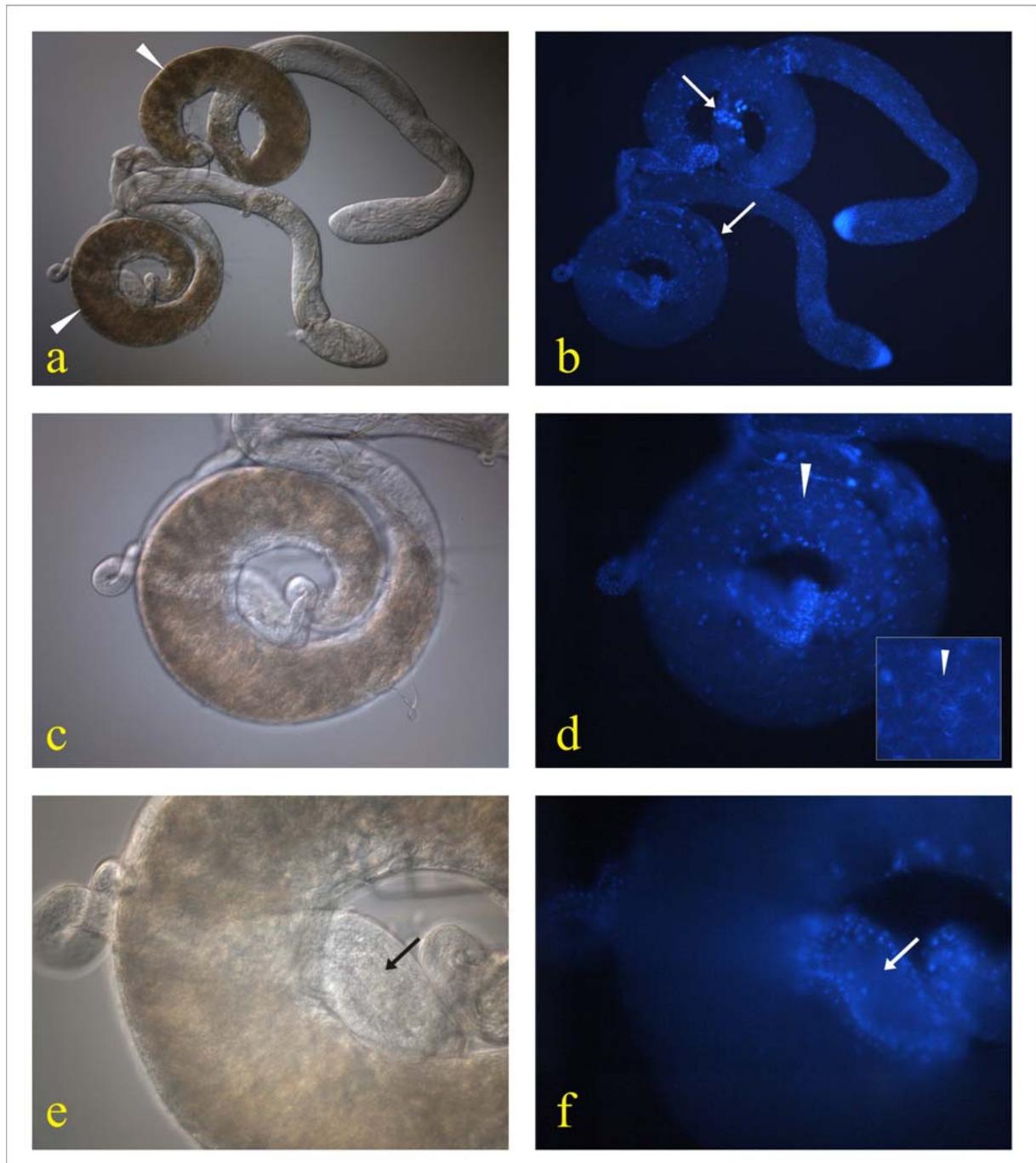


Abb. 76: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *cup* RNAi-Hoden

- a)** Übersicht des Hodens eines *cup* RNAi Männchens. Deutlich ist der aufgeblähte Bereich vor dem Terminalepithel zu erkennen, der voll mit aufgeknäulten Stadien ist (Pfeilspitzen). **b)** Die Kernfärbung mit Hoechst 33258 zeigt einige Bündel, die vor dem aufgeblähten Bereich lokalisiert sind (Pfeile). **c)** Der Bereich vor dem Terminalepithel zeigt eine grau-bräunliche Färbung. **d)** In diesem liegen eine Vielzahl von Kernen vor, die eine gekrümmte bis S-förmige Morphologie aufweisen (Pfeilspitzen in Bild und Vergrößerung), wie bei den *gap* antisense-Männchen (Abb.68). **e)** Die Samenblase enthält neben einzelnen Spermien eine Menge an Degradationsprodukten (Pfeil). **f)** In der Samenblase sind keine Kerne zu finden (Pfeil).

3. Diskussion

3.1. *Orb2* mutante Männchen zeigen Defekte in der Individualisierung der Spermatiden sowie Kerndefekte

Durch P-Element-Remobilisierung und Insertion sowie durch RNAi- und antisense-Konstrukte konnte gezeigt werden, dass das Gen *orb2* eine Funktion in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* ausübt. Die lichtmikroskopische Untersuchung der unterschiedlichen *orb2* mutanten Linien ergab dabei, dass alle Stadien der Spermatogenese vorlagen, allerdings in den Samenblasen keine reifen Spermien zu finden waren. Eine Färbung der Kern-DNA zeigte, dass die im Wildtyp-hoden parallel angeordneten Kerne der Spermatidenbündel im *orb2* mutanten Hintergrund nur sehr selten oder gar nicht anzutreffen waren. Die Kerne lagen stattdessen verstreut in den Zystenzellen vor. Zudem zeigte sich, dass nicht alle Kerne eine nadelförmige Struktur angenommen hatten, sondern zum Teil eine runde Form hatten, die sich aber in der Größe klar von runden Spermatogonien unterscheiden lassen. Dies lässt auf einen Defekt in der Formveränderung des Kerns schließen. Färbungen des F-Aktins zeigten bei den Mutanten, dass keine oder nur sehr wenige Individualisierungskomplexe vorlagen, die selten oder gar nicht parallel angeordnet waren. Dieser Defekt lässt auf einen Fehler während der Individualisierung der Spermatiden schließen.

Ein ähnlicher Phänotyp lässt sich in einer für das Myosin VI mutanten *Drosophila*-Linie beobachten (*jar, jaguar*) (Hicks *et al.*, 1999). Im Wildtyp bildet Myosin VI einen Ring an der Basis der Individualisierungskomplexe (IC), an der es während der Wanderung verbleibt (siehe Abb. 3). Es wird vermutet, dass Myosin VI die IC-Struktur durch Vernetzen von Aktinfilamenten aufrechterhält, was das stark verzweigte F-Aktin-Netzwerk im IC stabilisiert, oder dass es regulatorische Moleküle an den IC rekrutiert (Noguchi *et al.*, 2006). In der Myosin VI Mutante kommt es zu einer Anlagerung der Aktinfilamente der IC an die Spermatidenkerne, aber häufig liegen die Kerne nicht parallel wie im Wildtyp vor. Die Anzahl der Individualisierungskomplexe in diesen Mutanten ist wesentlich geringer als beim Wildtyp und ihre einzelnen investment cones liegen nicht nebeneinander sondern unorganisiert in der Zyste vor (Hicks *et al.*, 1999). In den basalen Bereich der IC lokalisieren ebenfalls der Arp (actin related protein) 2/3 Komplex und sein Aktivator cortactin. In Myosin VI

Mutanten ist ihre Lokalisation gestört (Rogat und Miller, 2002). Die erste Vermutung über die Funktion von Myosin VI war, dass es als Motorprotein für den Transport im endozytotischen Pfad dient. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Fähigkeit des Myosin VI an mit Clathrin ausgekleidete Vertiefungen und an Proteine, die mit Teilen des endozytotischen Weges assoziiert sind, zu binden. Es lokalisiert an Endosomvesikel in Säugetierzellen und an Neuronen im Mäusegehirn (zusammengefasst in Noguchi *et al.*, 2006). Für die Idee, dass Myosin VI am Transport beteiligt ist, gibt es aber bis jetzt keine Hinweise (Noguchi *et al.*, 2006). Studien der *shibire* Mutante und der Einsatz von Inhibitoren haben gezeigt, dass während der Individualisierung Endo- und Exozytose keine Rolle spielen (Noguchi und Miller, 2003).

Mutationen in *ddlc1* (*Drosophila* Dynein light chain 1) führen zu einer verminderten Zahl von Kernbündeln und Individualisierungskomplexen verglichen zum Wildtyp. Von den vorhandenen Kernbündeln und IC liegen auch hier eine große Anzahl getrennt vor (Ghosh-Roy *et al.*, 2005). DDLC1 reguliert zwei unterschiedliche zelluläre Prozesse während der Differenzierung der Spermatiden. Zum einen sorgt es für die Positionierung des Zellkerns im Kopfbereich der Spermatiden, zum anderen lokalisiert es mit Dynamin an den investment cones und reguliert dort die Anordnung von F-Aktin durch das Festhalten von Dynamin. Wie der Spermatidenkern am Kopfende festgehalten wird, ist bisher nicht beantwortet. Es lässt sich aber vermuten, dass ein Dynein-Dynactin-Komplex die Kerne durch eine direkte Interaktion von F-Aktin mit der Kernmembran in ihrer Position verankert (Ghosh-Roy *et al.*, 2005).

Auch *Chc*⁴ Mutanten (clathrin heavy chain gene) zeigen eine Vielzahl von elongierten Zysten, aber keine reifen individualisierten Spermien (Fabrizio *et al.*, 1998). Während im Wildtyp während der Individualisierung das meiste Cytoplasmamaterial zwischen den Spermatidenschwänzen entfernt wird, wird es in *Chc*⁴ Mutanten kaum entfernt und liegt sehr ungewöhnlich verteilt vor. Spermatidenbündel, deren IC gestört sind, zeigen auch eine Unorganisiertheit der Kernbündel. Dabei liegen einzelne Kerne außerhalb der Bündel oder auf den Spermatidenschwänzen verteilt in der Zyste vor. Es scheint, dass IC zwar gebildet werden, aber diese dann nicht richtig arbeiten. Dies lässt entweder auf eine Rolle für den auf Clathrin basierenden Transport in der Spermatogenese schließen oder auf eine extreme Sensitivität von manchen

Aspekten der Spermatogenese auf cytoplasmatische Disorganisation (Fabrizio *et al.*, 1998). Gestörte IC und verteilte Spermatidenkerne sind ebenfalls bei Mutanten von *crossbronx (cbx)*, *long island expressway (lie)* und *thousand points of light (tho)* zu beobachten (Fabrizio *et al.*, 1998). In Mutanten für *poe (purity of essence)* ist die Anzahl an IC deutlich verringert oder es sind gar keine zu entdecken (Fabrizio *et al.*, 1998).

Die Inhibition der DCP-1 (*Drosophila* caspase-1) führt ebenfalls zu Fehlern in der Individualisierung. Die Spermatiden trennen sich nicht voneinander, enthalten zuviel Cytoplasma und oft noch ein vergrößertes kleines Mitochondrienderivat, das normalerweise während der Individualisierung entfernt wird (siehe Einleitung). Dies zeigt, dass während der Individualisierung Caspase-Aktivität benötigt wird (Huh *et al.*, 2004).

Das *Drosophila* FXR- (fragile X-related-) Gen kodiert für ein RNA-bindendes Protein. In einer für dieses Gen mutanten Fliegenlinie scheint während der Spermiogenese die Individualisierung normal zu verlaufen. Erst am Ende der Differenzierung kann der Verlust der zentralen Mikrotubuli in den Axonemen und eine generelle Unorganisiertheit der Mitochondrien und der Parallelität der Axoneme in einer Cyste beobachtet werden (Zhang *et al.*, 2004).

Kerne, die in der Zyste verteilt vorliegen und die gleichzeitig eine höher kondensierte und runde Struktur haben, zeigt eine Mutante für *dBruce*. *dBruce* ist das *Drosophila* Homolog von Bruce/Apollon in Säugetieren. Dies sind riesige E2 Ubiquitin konjugierende Enzyme, von denen man vermutet, dass sie apoptotische Prozesse inhibieren (zusammengefasst in Arama *et al.*, 2003). Mutanten von *dBruce* zeigen hyperkondensierte degenerierte Kerne, was für eine starke Caspaseaktivität spricht. Die Mutante zeigt zusätzlich in vielen Kernen nur eine sehr schwache DNA-Färbung, was für eine Degeneration spricht. Obwohl IC entstehen, sind sie stark reduziert und liegen ebenfalls verteilt in der Zyste vor (Arama *et al.*, 2003). Die Aktivität von Caspasen scheint für eine korrekte Bewegung der IC und die Entfernung von Cytoplasma von differenzierenden Spermatiden benötigt zu werden und damit für die Fertilität der Männchen. *dBruce* wird außerdem benötigt, um den Spermienkern vor übermäßiger Caspaseaktivität und Degeneration zu schützen (Arama *et al.*, 2003).

Alle oben beschriebenen Mutanten, bis auf die von dBruce, zeigen einen wesentlich schwächeren Phänotyp, als er in der *orb2* Mutante beobachtet werden konnte. In den meisten Fällen kommt es zu einer Störung der Individualisierung mit verteilt in der Zyste liegenden, in der Anzahl oft reduzierten IC und Spermatidenkernen. Dies spricht dafür, dass in diesen Fällen nur eine spezifische Funktion während des komplexen Vorgangs der Individualisierung gestört wird ohne Auswirkungen auf andere Funktionen. Eine gleichzeitige Veränderung in der Kernmorphologie wie bei *orb2*-Mutanten kann in den oben beschriebenen Fällen nur bei dBruce beobachtet werden. Diese zwei unterschiedlichen Phänotypen sprechen für komplexere Effekte in diesen Mutanten, was bei regulatorischen Proteinen auch zu erwarten ist. Sollte Orb2 wirklich die zeitliche und räumliche Expression einer Reihe von Genen regulieren, so sollten verschiedene Prozesse bei der Individualisierung gestört werden. Dies könnte auch die beiden unterschiedlichen Phänotypen in dBruce erklären, das vermutlich an mehrere Caspasen bindet und so wie Orb2 eine regulatorische Funktion ausübt (Arama *et al.*, 2003). Wenn man davon ausgeht, dass Orb2 in *Drosophila* die Translation von spezifischen mRNAs kontrolliert wie das CPEB in *Xenopus*, so könnten mRNAs, die für strukturelle Komponenten der IC codieren, zu früh translatiert werden. Somit würden sie nicht mehr zu dem Zeitpunkt bereitstehen, wenn sie benötigt werden, wie z.B. für die Bildung eines funktionellen IC.

Proteasomen sind die Protein-Degradations-Strukturen des Ubiquitin vermittelten proteolytischen Abbauwegs, der an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen beteiligt ist. Mutationen in einer hodenspezifischen Variante führen zu einer Vielzahl von Defekten während der Individualisierung: ICs liegen getrennt vor, während die Kerne als Bündel verbleiben. Manche Spermatidenkerne liegen verstreut vor oder sind nicht vollständig kondensiert, während andere gekrümmt sind und Kreise bilden. Auch hier zeigt sich wieder ein Zusammenhang zwischen einer regulatorischen Funktion und einem variablen Phänotyp in der späten Phase der Differentierung in der Spermatogenese (Zhong and Belote, 2007).

Um die Veränderungen bei der Individualisierung in Orb2 mutanten Fliegenlinien besser beobachten zu können, sollten in einem nächsten Schritt elektronen-

mikroskopische Aufnahmen der elongierten Spermatidenbündel gemacht werden. Durch diese Aufnahmen können die Membranen zwischen den einzelnen Spermatiden eines Bündels im Querschnitt sichtbar gemacht werden (Tokuyasu *et al.*, 1972). So könnte man erkennen, ob in den *orb2* mutanten Linien überhaupt eine Individualisierung stattgefunden hat, bzw. bis zu welchem Punkt sie durchgeführt wurde. Eine weitere Möglichkeit, den Phänotyp in den mutanten Linien zu überprüfen, besteht darin, einzelne Zysten in *in vitro* Kultur zu halten (Noguchi und Miller, 2003). So könnten die Unterschiede in der Entwicklung zwischen Wildtyp und Mutanten besser beobachtet werden.

3.2. Auswirkungen des RNAi-Konstruktes von *orb2* auf *orb*

In den RNAi und antisense-Linien gegen *orb2* kam es zu einer Verstärkung des mutanten Phänotyps verglichen mit den P-Element-Tieren oder der Remobilisierungslinie. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bei diesen Linien nicht nur *orb2*, sondern auch die mRNA von *orb* abgebaut bzw. stillgelegt wurde. Sequenzvergleiche der antisense- und RNAi-Konstrukte gegen *orb2* mit der Sequenz der *orb* Transkripte zeigten, dass es keine exakte Übereinstimmung in größeren Sequenzbereichen gibt. Allerdings gibt es Bereiche von bis zu 30 nt, die nur unterbrochen von einzelnen Nukleotiden eine Übereinstimmung zeigten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass für die Stilllegung einer mRNA nicht notwendigerweise eine vollständige Übereinstimmung in der Sequenz erforderlich ist. So führt eine genaue Übereinstimmung zu einem Abbau des Transkripts, wohingegen eine unvollständige Übereinstimmung nur zu Translationskontrolle führt (zusammengefasst in Wienhold und Plasterk, 2005; Wilhelm und Smibert, 2005). So könnte es auch durch eine nicht vollständige Übereinstimmung in der Sequenz zwischen dem antisense- bzw. RNAi-Konstrukt gegen *orb2* mit der Sequenz von *orb* zu einem gleichzeitigen Ausschalten von *orb* gekommen sein. Durch das mögliche Mitausschalten des Orb Proteins könnte es so zu einem verstärkten Phänotyp in den RNAi- und antisense-Konstrukt-Linien gekommen sein. Zwei Transkripte von *orb* mit Längen von 3,2 und 2,0 kb finden sich nur in den Männchen und sind zuerst im 3. Larvenstadium zu finden (Lantz *et al.*, 1992). Beide enthalten die RNA-bindenden Domänen. Eine *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde, die beide Hodentranskripte nachweist, zeigte eine gleiche Verteilung der beiden mRNAs im Hoden. Dort sind sie

zuerst im 16 Zell-Stadium der primären Spermatozyten zu finden. Im Gegensatz zu der Verteilung in den Oozyten ist die mRNA gleichmäßig im Cytoplasma jedes Mitglieds der Zyste verteilt. Später in der Spermatogenese findet sich das Transkript an den Schwanzenden der Spermatiden in einer Struktur, die den Ausstülpungen in den Zysten entspricht (Lantz *et al.*, 1992) (siehe Einleitung, Spermatogenese). Obwohl *orb* sehr gut in der Embryogenese und der Oogenese von *Drosophila* untersucht ist, ist über seine Funktion in der Spermatogenese bisher nichts bekannt, so dass mutante Phänotypen nicht beschrieben sind. Eine redundante Funktion von *orb* zu *orb2* ist aufgrund der oben beschriebenen Verteilung der *orb* mRNA allerdings nicht zu erwarten.

3.3. Im *orb2* mutanten Hintergrund werden die Protamine und Mst77F zu früh translatiert

Während der Spermiogenese verändert sich der Zellkern der Spermatiden durch Kompaktierung der Kern-DNA von einer runden zu einer nadelförmigen Form. Dabei werden die Histone erst durch Transitionsproteine und dann durch Protamine ersetzt. Die Histone lassen sich bis zu einem Stadium finden, das als frühes Kanu bezeichnet wird (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Die Protamine sind dagegen erst im späten Kanustadium nachzuweisen. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass normalerweise Histone und Protamine in einem Kern nicht gleichzeitig auftreten (Rathke *et al.*, 2007). Im *orb2* mutanten Hintergrund gilt diese Beobachtung allerdings nicht. Hier können die Protamine schon in runden Stadien kurz vor dem frühen Kanustadium detektiert werden. Außerdem konnte bei Kreuzungen von Protamin-eGFP-Linien (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005) in den mutanten *orb2* Hintergrund das gleichzeitige Vorkommen von Histonen und Protaminen in nicht elongierten Spermatidenkernen beobachtet werden. Beide Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass im *orb2* mutanten Hintergrund die Protamine zu früh translatiert werden und so zu einem Zeitpunkt hergestellt werden, an dem die Histone noch nicht entfernt wurden. Ähnliche Veränderungen wie die Protamine zeigt ein *Mst77F*-eGFP Konstrukt. *Mst77F* ist ein entfernter Verwandter der Histon H1/H5-Familie. Dieses lokalisiert im Wildtyp zur gleichen Zeit wie die beiden Protaminen an die nadelförmigen Spermatidenkerne (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Es wird vermutet, dass es an der Mikrotubuli-Dynamik

während der Kernveränderung beteiligt ist (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Im *orb2* mutanten Hintergrund kann man *Mst77F* auch in runden Kernen finden. Dies spricht dafür, dass auch die Translation von *Mst77F* von Orb2 kontrolliert wird.

Ob Orb2 wirklich an die Protamine bindet, könnte durch Shift-Experimente geklärt werden. Dazu wird ein Expressionsprotein von *orb2* mit radioaktiven Transkripten, die die bereits identifizierte Kontrollregion der Protamin-RNA beinhalten, inkubiert und danach auf ein Gel aufgeladen. Eine mögliche Bindung sollte auf einem Autoradiogramm an einer Verschiebung des radioaktiv markierten Transkriptes im Vergleich zu einem nicht mit Fusionsprotein inkubierten Transkript sichtbar gemacht werden. Konkurrenzexperimente könnten dabei zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung unterscheiden.

3.4. Warum erfolgt die Fehlexpression der Protamine nicht schon viel früher?

Früh in der Oogenese wird *osk* (*oskar*) mRNA zuerst durch eine bisher nicht identifizierte miRNA erkannt, die den RISC Komplex rekrutiert und dadurch die Translation verhindert. Später in der Oogenese wird unlokalisierte *osk* mRNA durch einen Cup-gesteuerten Mechanismus kontrolliert. Nach der Lokalisation von *osk* an den posterioren Pol der Eizelle, stimuliert das Orb-Protein die Polyadenylierung der *osk* mRNA und damit seine Translation (zusammengefasst in Wilhelm und Smibert, 2005). Das heißt, dass bei diesem Regulationsweg drei verschiedene Komponenten an der Translationsrepression und -aktivierung von *osk* beteiligt sind. Auch in humanen Zellen konnte eine Translationsregulation durch miRNAs nachgewiesen werden (Pillai *et al.*, 2005).

Dies könnte erklären, warum Protamine im *orb2* mutanten Hintergrund nicht schon im larvalen Hoden fehltranslatiert werden, sondern erst in den Spermatozyten im adulten Hoden. Das an *osk* gezeigte Prinzip könnte auch hier vorliegen. So könnte Orb2 erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Spermatogenese die Kontrolle über die Protamine übernehmen und diese bis zu diesem Zeitpunkt von einem bisher nicht bekannten Komplex kontrolliert werden. Der Verlust der großen Proteinform von

Orb2 würde somit erst zu einem späten Zeitpunkt zu einem Defekt in der Spermiogenese führen.

Ein weiterer Faktor, der nicht zu unterschätzen ist, ist dass es von *orb2* keine Nullmutante gibt. In den zwei P-Elementlinien und der Remobilisierungslinie ist jeweils nur das große der beiden Transkripte ausgeschaltet worden. Die beiden antisense-Konstrukte und das RNAi-Konstrukt führten ebenfalls nur zu einer Reduzierung der Transkriptmenge, aber nicht zu einem vollständigen Verlust. Das gleiche gilt für ein RNAi-Konstrukt im *orb2^{Jo10}*-Hintergrund. So ist wahrscheinlich, dass in den Mutanten Orb2-Protein hergestellt wird, das eine Restfunktion erfüllt, aber nicht ausreicht, um die komplette normale Funktion aufrecht zu erhalten. So könnte die Kontrolle durch Orb2 in frühen Stadien der Spermatogenese noch funktionieren, sein verringertes Vorkommen aber dann der begrenzende Faktor für die späten Stadien sein. Dies könnte auch den heterogenen Phänotyp, der von nur leicht aufgelösten Kernbündeln bis hin zu völlig aufgelösten mit in der Zyste verstreut liegenden Kernen reicht, erklären.

Nicht auszuschließen ist auch, dass *orb2* eine unterschiedliche Affinität zu verschiedenen mRNAs hat. So könnten die Protamine durchaus am Anfang der Spermatogenese noch recht viel Orb2 rekrutieren, während dieses dann in späten Phasen der Spermatogenese nicht mehr ausreicht. Dafür spricht, dass eine Verstärkung des Phänotyps mit einer stärkeren Verringerung der *orb2* Transkriptmenge einherging.

3.5. Kontrolliert Orb2 eine Fülle von mRNAs ?

Von Untersuchungen in *Xenopus* und einer Vielzahl weiterer Organismen ist bekannt, dass Mitglieder der CPEB-Familie an das cytoplasmatische Polyadenylierungs-Element (CPE) im 3'-UTR von spezifischen Transkripten binden und dadurch ihre Translation kontrollieren (zusammengefasst in Richter, 1999). Die Sequenz des CPEs ist variabel und beinhaltet so unterschiedliche Sequenzen wie UUUUAU oder UUUUAACA. Eine generelle Konsensussequenz scheint aber UUUUUUAU zu sein. Die präzise Sequenz des CPE, die Anzahl seiner Kopien, die Entfernung zwischen dem CPE und dem Polyadenylierungssignal (AAUAAA) oder in

der Nähe liegende Sequenzen, wie z.B. das nanos response element (NRE) regulieren möglicherweise den Zeitpunkt, an dem die Polyadenylierung stattfindet (Mendez und Richter, 2001). Das CPE kann die Polyadenylierung unterstützen, wenn es mit dem Polyadenylierungssignal überlappt, wenn es direkt daneben liegt oder auch wenn es bis zu 100 Nukleotide entfernt liegt (Mendez und Richter, 2001). Da im *Xenopus*-System die Polyadenylierung von verschiedenen mRNAs während der Reifung variiert, könnte das CPE selber regulatorische Informationen enthalten. So könnte eine mRNA mit UUUUUUAU eine frühere Polyadenylierung vermitteln, als UUUUAAU oder die Entfernung zum Polyadenylierungssignal könnte den Zeitpunkt beeinflussen, wann eine mRNA polyadenyliert wird (Mendez und Richter, 2001). Die Anzahl von CPE in einem Transkript scheint einen Einfluß auf die Regulation zu haben. So wird in *Xenopus* die *c-mos* mRNA die nur ein CPE enthält früh polyadenyliert, während die spät adenylierten mRNAs von *cyclinB1*, *histone B4* und *cyclin A1* zwei Elemente besitzen (Mendez *et al.*, 2000).

	5'UTR	3'UTR	CoIP-Signal
<i>protamin A</i>	UUUUUUAU	. /.	(+)
<i>protamin B</i>	UUUUUUAU (2)	. /.	++
<i>mst77F</i>	UUUUUUAU	. /.	-
<i>mst87F</i>	UUUUUUGU	. /.	++
<i>dhod</i>	UUUUUUACA; UUUUAAU	. /.	-
<i>don juan</i>	UUUUUCU	UUUUUUUCAU	+
<i>janus B</i>	UUUUCCU	. /.	+
<i>tob</i>	. /.	. /.	n.g.
<i>gap</i>	. /.	UUUUUUGU;	n.g.
<i>cup</i>	. /.	UUUUUUAU	n.g.
<i>orb2</i>	. /.	. /.	n.g.

Tab.: 1: Mögliche regulatorische Elemente im 5'- und 3'-UTR von Transkripten, die mit Orb2 interagieren könnten und ihr Nachweis durch RT-PCR nach der Co-Immunopräzipitation.

Der 5'-UTR von *protamin B* enthält als einziger 2 CPE. (. /. = kein CPE-ähnliches Element; n.g. = nicht getestet, (+) = sehr schwaches Signal; + = Signal; ++ = sehr starkes Signal; - = kein Signal)

Von den in dem Co-Immunpräzipitations-Experiment untersuchten translationskontrollierten mRNAs enthalten einige ein CPE-Element oder Elemente, die eine Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz aufweisen (Tab. 1). Allerdings liegen diese nicht wie in *Xenopus laevis* oder *Mus musculus* nur im 3'-UTR, sondern sind auch im

5'-UTR zu finden (zusammengefasst in de Moor und Richter, 1999; Kurihara *et al.*, 2003). Es ist aber bekannt, dass regulatorische Elemente von translationskontrollierten mRNAs in der Spermatogenese von *Drosophila* häufig im 5'-UTR liegen (Schäfer *et al.*, 1993). Dort kartieren auch die translationskontrollierten Sequenzen der Protamine hin (Jayaramaiah Raja und Renkawitz-Pohl, 2005). Die Ergebnisse aus der RT-PCR nach dem Co-Immünpräzipitationsexperiment im Vergleich mit den Sequenzen der 5'- und 3'-UTR zeigen, dass nicht alle der hier untersuchten Transkripte, die ein mögliches CPE mit der Konsensussequenz enthalten, auch co-präzipitiert werden konnten. Es gelang sehr gut im Fall von *protamin B*. *Protamin A* zeigte nur ein sehr schwaches Signal, wohingegen bei *mst77F* kein Signal nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 49). In anderen Immunpräzipitationsexperimenten konnte aber auch gezeigt werden, dass einige aber nicht alle mRNAs, die CPEs enthalten, präzipitiert werden können (Groisman *et al.*, 2006). Dass *protamin B* ein wesentlich stärkeres Signal liefert im Vergleich zu *protamin A* könnte daran liegen, dass *protamin B* zwei CPE im 5'-UTR enthält und es so wesentlich fester gebunden wird. Untersuchungen an *Xenopus*-CPEB zeigten, dass Transkripte, die zwei CPE enthalten, wesentlich fester gebunden werden, als die, die nur ein CPE enthalten (Stebbins-Boaz *et al.*, 1996). Interessant ist die Tatsache, dass *mst87F* ein sehr starkes Signal bei diesem Experiment zeigte. Es besitzt nur ein CPE ähnliches Element in seinem 5'-UTR, bei dem statt eines Adenin ein Guanin vorliegt (Tab. 1). Erste Ergebnisse aus Shift-Experimenten zeigten, dass ein Fusionsprotein von *orb2* an ein *in vitro*-Transkript von *mst87F* bindet (Stinski, 2007). Ob diese Bindung spezifisch ist, muß aber durch weitere Experimente geklärt werden. Sollte sich das Ergebnis bestätigen, so wäre das erste Mal ein Bindungsprotein für ein Mitglied der *Mst(3)CGP*-Familie gefunden. Auch das Transkript von *don juan* besitzt in der Sequenz ein CPE ähnliches Element, das anstelle eines Adenin ein Cytosin enthält (Tab. 1). Der 5'-UTR von *janus B* enthält zwei Cytosine in einem möglichen CPE. Beide lassen sich durch RT-PCR nach der Co-Immünpräzipitation nachweisen (siehe Abb. 49). Ob diese Bindungen spezifisch sind, sollte auch in der Zukunft durch Shift-Experimente mit spezifischen Kompetitoren geklärt werden. Von den drei in dieser Arbeit untersuchten möglichen Interaktionspartnern von Orb2 enthält nur das Transkript von *cup* ein echtes CPE. Das Transkript von *gap* enthält ein Element, das dem in *mst87F* entspricht. In dem UTR von *Tob* ist kein Element zu finden. Es wäre in einem neuerlichen Co-Immün-

präzipitationsexperiment interessant, die Frage zu klären, ob auch die Transkripte der möglichen Interaktionspartner von Orb2 gebunden werden. Zudem sollte auch die Frage geklärt werden, ob Orb2 an seine eigene mRNA binden kann. Das in der Oogenese von *Drosophila* transkribierte *orb* enthält nämlich ein CPE und reguliert so seine eigene Translation (Tan *et al.*, 2001). Auch in anderen Organismen enthalten die Transkripte der CPEB-Homologen CPE-ähnliche Sequenzen. In *C. elegans* bindet FOG-1 an den 3'-UTR von *fog-1*, das eine CPE-ähnliche Sequenz enthält und reguliert so möglicherweise seine eigene Expression (Jin *et al.*, 2001). Die 3'-UTR von *zorba* (CPEB in *D. rerio*) und vom *Xenopus* CPEB enthalten 2 CPEs (Bally-Cuif *et al.*, 1998). Da in den UTRs von Orb2 allerdings keine CPE-ähnlichen Sequenzen gefunden werden können, ist eine vergleichbare Funktion aber eher unwahrscheinlich. Auch die UTR der hodenspezifischen Transkripte von *orb* enthalten kein CPE.

3.6. Mit massenspektrometrischen Untersuchungen konnten bisher keine Interaktionspartner von Orb2 im Hoden nachgewiesen werden

Von den in dieser Arbeit untersuchten, möglichen Interaktionspartnern von Orb2 konnte in der massenspektrometrischen Untersuchung von Proteinen aus Gesamtieren und aus Hodenproteinen keines gefunden werden. Auch das zur Co-Immunpräzipitation eingesetzte Orb2-GFP-Fusionsprotein konnte nicht entdeckt werden, allerdings konnten in den Gesamtproteinen drei verschiedene GFP-Peptide mit sehr guten score-Werten gefunden werden.

Bei der Analyse der massenspektrometrischen Daten zeigte sich, dass gewisse Gruppen von Proteinen besonders häufig auftraten. Unter diesen befinden sich unter anderem Proteine der Paragonien, die Accessory gland Proteine. So kann z.B. das Accessory gland peptide 36DE in 26 der 28 untersuchten Banden mit Proteinen aus Hodengewebe nachgewiesen werden (siehe Anhang). Dieses Protein kommt wie aus dem Namen ersichtlich, in den Paragonien vor. Daneben waren sehr häufig ejaculatory bulb Proteine zu finden, die in der Spermienpumpe exprimiert werden. Beide Familien üben keine Funktion in der Spermatogenese aus. Sie besitzen aber offenbar spezielle Eigenschaften, durch die sie besonders gut an die in diesem Versuch eingesetzte Protein-A-Sepharose binden.

Als weitere häufige Gruppe finden sich ribosomale Proteine, was durchaus funktionell sein kann, da RNA-bindende Proteine, wie z. B. das in diesem Versuch eingesetzte Orb2-GFP-Fusionsprotein, auch noch nach der Translationsaktivierung an der mRNA gebunden sein könnten. Das gilt auch für die häufig auftretende Familie der Elongationsfaktoren. Von diesen ist besonders das Protein elongationfactor 1 α 48D zu nennen, welches in vielen Banden gefunden wurde (siehe Anhang). Auch das poly(A)-Bindepotein konnte in verschiedenen Banden entdeckt werden. Auch hier könnte man sich eine indirekte Interaktion mit einem RNA-bindenden Protein vorstellen. So wurde an *mst87F* gezeigt, dass sekundäre Polyadenylierung und damit ein Neubesatz mit poly(A)-Bindepotein erfolgt (Schäfer *et al.*, 1990).

Auffallend ist, dass das Ausmaß dieser möglichen funktionellen Interaktionen steigt, wenn Hodengewebe statt Proteine aus Gesamtliegen benutzt wird. Es kommt zu einem deutlichen Anstieg an ribosomalen Proteinen, sowie Initiationsfaktoren. Dementsprechend finden sich bei der Verwendung von Hodengewebe auch mehr RNA-bindende Proteine, bzw. solche, die Defekte in der Spermatogenese auslösen. So konnte das Protein Bellwether als einziges in Hodengewebe und Gesamttieren gefunden werden, während die Proteine Exuperantia, Growl, Modulo und Boule nur in Hodengewebe gefunden wurden. Zudem konnte das Protein Purity of essence gefunden werden, dessen Funktion in der Spermatogenese bisher nicht bekannt ist.

In der massenspektrometrischen Untersuchung bei Proteinen aus Gesamttieren konnte als einziges von den im two-hybrid-screen vorgeschlagenen möglichen Interaktionspartnern von Orb2 das Protein Dimm (diminished, CG8667) gefunden werden (Giot *et al.*, 2003; Hewes *et al.*, 2003). Auffällig war auch das Auftreten eines neuronalen Proteins (Neural conserved at 73 EF), welches sehr hohe Treffer in zwei Banden des Gesamttieres zeigte. Diese Interaktionen sind durchaus vorstellbar, da man weiß, dass Orb2 Funktionen im Nervengewebe bei der synaptischen Plastizität ausübt (Keleman *et al.*, 2007).

Ein Vergleich mit Analysen aus Shift-Experimenten mit *mst87F* RNA und Hodengewebe zeigt deutliche Übereinstimmungen. In fast allen Punkten werden entsprechende Treffer verzeichnet (Stinski, 2007). So finden sich auch hier eine

Vielzahl an ribosomalen Proteinen und Initiationsfaktoren. Zudem konnte auch bei diesem Experiment das poly(A)-Bindepotein identifiziert werden. Dies erscheint glaubhaft, da in anfänglichen Bindungsstudien eine Bindung von Orb2 an *mst87F* erfolgte. Somit könnte Orb2 und seine Interaktionspartner die Translationskontrolle an dieser mRNA bewerkstelligen und es wäre also zu erwarten, dass auf diesen verschiedenen Wegen die gleichen Proteine angereichert werden. Unterschiede werden möglicherweise durch die RNA-bindenden Kandidatenproteine aufgezeigt. Im Fall der *mst87F* RNA wurden nur Exuperantia, Purity of essence und Bellwether identifiziert.

Das Auffinden von Proteinen, die an der Translation beteiligt sind, stieg im Experiment mit Hodenextrakten im Vergleich zum Experiment mit Gesamtproteinextrakt. Dies wie auch das Auffinden von GFP-Fragmenten belegt, dass der in dieser Arbeit verfolgte Versuchsansatz im Prinzip funktionieren kann. Um die Problematik zu verringern, dass sehr viele unspezifische Bindungen erfolgen, wie es durch die Proteine aus den Paragonien angedeutet wird, müssten in einem weiteren Experiment eigentlich Hodenschläuche ohne Paragonien präpariert werden. Da dies bei den für diesen Versuch benötigten Mengen von ca. 2000 Hoden aber in der Praxis nicht durchführbar ist, wird in einer nachfolgenden Arbeit versucht werden, ein Fusionsprotein mit einem anderen Aufreinigungssystem einzusetzen, das möglicherweise eine spezifischere Bindung erlaubt.

3.7. Eine Interaktion von Orb2 und Tob erscheint wahrscheinlich

Die Gene *fog-1* und *fog-3* fördern die Spermatogenese bei *C. elegans* und sind die vermutlichen Hauptregulatoren, die darüber entscheiden, ob Spermatogenese oder Oogenese abläuft. Während FOG-1 ein Homolog zum *Xenopus* CPEB ist, gehört FOG-3 zur Tob Protein-Familie (Lamont und Kimble, 2007). Obwohl beide Proteine an der Entscheidung beteiligt sind, ob eine Keimzelle zum Spermium wird, konnte bisher nicht festgestellt werden, ob sie in parallelen Wegen daran beteiligt sind, oder ob FOG-1 das Protein FOG-3 kontrolliert (Lamont und Kimble, 2007). So kann eine mögliche Interaktion der zu Tob und CPEB homologen Proteine bisher weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis kann aber als weiterer Hinweis dafür angesehen werden, dass die in dem two-hybrid-screen vorhergesagte

Interaktion von Tob mit Orb2 in *Drosophila* möglich ist (Giot *et al.*, 2003). Für diese Interaktion spricht auch die Tatsache, dass Tob eine Funktion in der Spermatogenese hat. Tob-Mutanten sind steril und zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie die *orb2*-mutanten Männchen. Die Spermatidenkerne liegen verstreut in den Cysten vor und Individualisierungskomplexe sind nicht oder nur als einzelne investment cones zu finden. Ein weiterer Punkt, der für eine mögliche Interaktion spricht, ist eine zeitweilige Übereinstimmung in der Lokalisation beider Proteine. So lassen sich beide auf den elongierten Bündeln nachweisen. Der Nachweis einer möglichen Co-Lokalisation war nicht möglich, da es nicht gelang, im Rahmen dieser Arbeit ein funktionelles RFP-Konstrukt von Orb2 oder Tob zu erzeugen. Da mittlerweile ein gut funktionierender RFP-Vektor vorliegt (C. Schäfer, pers. Mitteilung), könnte dieser Versuch in einer zukünftigen Arbeit wiederholt werden. Eine mögliche Interaktion der beiden Proteine könnte sich auch in der Verstärkung des mutanten Phänotyps zeigen, wenn beide Proteine in einer Fliege herunterreguliert werden. Dies wurde durch das Einkreuzen eines *tob* antisense-Konstruktes in die P-Element-Remobilisierungslinie *orb2*^{J010} versucht. Dabei zeigte sich, dass es nur mit einer *tob* antisense-Integrationlinie zu einer leichten Verstärkung des Phänotyps kommt. Durch die Ergebnisse aus dem whole mount *in situ*-Experiment, bei dem die *tob* mRNA im *orb2* mutanten Hintergrund verringert vorliegt, lässt sich aber eher darauf schließen, dass Orb2 die *tob* mRNA kontrolliert. Aus diesem Ergebnis lässt sich leider nicht auf eine Proteininteraktion schließen. Dass Orb2 direkt an das Transkript von *tob* bindet, ist allerdings aufgrund des fehlenden CPE eigentlich eher unwahrscheinlich. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Bindung indirekt erfolgt oder über ein bisher nicht bekanntes Element in der *tob* mRNA. Die oben beschriebenen Ergebnisse schließen eine mögliche Interaktion der beiden Proteine nicht aus. Weiterführende Experimente, wie die Wiederholung der Co-Immunpräzipitation oder Bindungsstudien könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Die *in situ*-Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Transkript von *tob* zeigte eine sehr ungewöhnliche Lokalisierung der mRNA. So ist zwar ein schwaches Signal schon in den Spermatozyten zu finden, die Hauptmenge liegt aber an den Enden der elongierten Spermatidenbündel vor. Da diese zu groß ist, um aus den Spermatozyten zu stammen, muss sie erst nach der Meiose hergestellt worden sein. Zu einem

Zeitpunkt, zu dem man bisher immer annahm, dass keine Transkription mehr erfolgt. Neben den *tob*-Transkripten konnten mittlerweile noch weitere Kandidaten gefunden werden, die auch eine postmeiotische Transkription zeigen (H. White-Cooper, Oxford UK, pers. Mitteilung). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch in postmeiotischen Stadien eine Aktivität der RNA-Polymerase II feststellbar ist. Diese endet erst mit Beginn des Einbaus der Protamine, wodurch die DNA zu stark kompaktiert wird, um noch transkribiert zu werden (Rathke *et al.*, 2007). So stimmt die bisherige Annahme, dass die Transkription mit Beginn der Meiose endet zwar noch für einen Hauptteil, aber nicht für alle Gene. Die Frage, die sich stellt, ist, warum das Transkript von *tob* an das Ende der Spermatiden lokalisiert. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass in diesem Bereich die Ringkanäle mit den Fusomen liegen (Lindsley und Tokuyasu, 1980) Durch diese findet wahrscheinlich ein aktiver Austausch von Proteinen und Transkripten im Syncytium statt. Zudem ist dies der letzte Teil, der während der Individualisierung geschlossen wird. Sollte *Tob* zu einem späten Stadium in der Spermatogenese benötigt werden, so würde es Sinn machen, die mRNA in diesen Bereich zu lokalisieren.

3.8. Eine Interaktion von Orb2 mit Gap und Cup kann nicht ausgeschlossen werden

Das hier untersuchte Gen CG32560 gehört zur Familie der Gap-Proteine (GTPase activating protein), die kleine GTPasen inaktivieren. In *Drosophila* gibt es insgesamt 64 verschiedene Gap-Gene und 90 Mitglieder der kleinen GTPasen (Bernards und Settleman, 2004; Jiang und Ramachandran, 2005). Bei dem Einsatz von zwei verschiedenen antisense-Konstrukten und einem RNAi-Konstrukt konnten nur mit einem antisense-Konstrukt (Gap-AS-1-2) mutante Linien erzeugt werden. Von diesen Linien waren zwei homozygot steril und zwei homozygot lethal. Dass die mutanten Phänotypen durch die Integrationsstellen im Genom hervorgerufen wurden, konnte durch die Erzeugung von transheterozygoten Tieren widerlegt werden. Dabei zeigte sich, dass männliche Tiere, die ein letales und ein steriles Allel trugen, vital, aber zu siebzig Prozent steril waren. Dies zeigt, dass die Letalität zwar vom Integrationsort, die Sterilität aber vom antisense-Konstrukt herrührt. Dass durch die verschiedenen Konstrukte insgesamt nur wenige mutante Linien erzeugt werden konnten, könnte an der oben beschriebenen großen Anzahl von Gap-Proteinen liegen. So ist nicht

auszuschließen, dass das Ausschalten eines Mitglieds dieser Familie durch das Vorhandensein von anderen kompensiert werden kann. Die Gene dieser Familie weisen sehr große Sequenzunterschiede auf, so dass durch das Konstrukt wohl keine anderen Gene dieser Familie betroffen werden können (zusammengefasst in Jiang und Ramachandran, 2005). Bei einem Sequenzvergleich des Gap Transkriptes finden sich allerdings insgesamt 17 Gene in Flybase, die in einem 41 nt langen Bereich zu 89 bis 98 % mit dem antisense-Konstrukt (Gap-AS-1-2) übereinstimmen. Keines dieser Gene gehört laut Flybase zur Familie der Gap-Gene. Von diesen Genen besitzen 5 ein bis mehrere Hoden ESTs, so dass durch das antisense-Konstrukt möglicherweise nicht nur Gap, sondern auch eines oder mehrere von diesen Genen ausgeschaltet wurden. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass der mutante Phänotyp durch das Fehlen von anderen Proteinen mit Funktionen in der Spermatogenese ausgelöst wird. Eine Interaktion mit dem Protein Orb2 kann durch den vorliegenden Phänotyp nicht bestätigt werden. Es zeigt sich auch hier ein später Defekt in der Spermatogenese. Individualisierungskomplexe fehlen und Spermatidenkerne liegen nicht oder nur zu einem geringen Teil als Bündel vor. Allerdings unterscheidet sich der Phänotyp eindeutig von dem der *orb2*-Mutanten. Im Bereich vor dem Terminalepithel liegen sehr viele aufgeknüllte und degenerierte Stadien vor. Die Spermatidenkerne weisen eine gekrümmte oder S-förmige Morphologie auf. In den Samenblasen liegen zwar vereinzelt Spermatidenschwänze vor, Kerne sind aber nicht nachzuweisen. Einzig die Lokalisation des Gap-GFP-Fusionsproteins entspricht in weiten Bereichen dem des Orb2-Proteins. Leider gelang es auch in diesem Fall nicht, durch ein RFP-Konstrukt eine mögliche Co-Lokalisation nachzuweisen.

In der Oogenese ist die Funktion des Gens *cup* sehr gut charakterisiert. Cup ist dort beteiligt an der Translationsrepression und Lokalisation von verschiedenen mRNAs (zusammengefasst in Wilhelm und Smibert, 2005). Es wird vermutet, dass es gleiche Funktionen hat wie das Protein Maskin in *Xenopus*, welches dort ein Bindungspartner von CPEB ist (Macdonald, 2004; Mendez und Richter, 2001). In der Spermatogenese ist seine Funktion bisher aber noch nicht untersucht worden, obwohl eine Vielzahl von Hoden-ESTs (Flybase) seine Expression während dieses Prozesses belegen. Mittels eines Cup-GFP-Fusionsproteins konnte gezeigt werden, dass es wie Orb2 in allen Stadien der Spermatogenese, einschließlich reifer motiler Spermien

vorhanden ist. Der Versuch mittels zweier antisense- und RNAi-Konstrukte einen mutanten Phänotyp zu erzeugen, gelang nur bei einer einzigen Integration. Diese führte zu einem späten Defekt in der Spermatogenese und zeigte einen ähnlichen Phänotyp, wie die Gap-Mutante, mit aufgeblähtem Hodenschlauch im Bereich vor dem Terminalepithel, in dem eine Vielzahl von degenerierten Stadien und aufgeknäulten Spermatischen mit gekrümmten oder S-förmigen Kernen vorhanden sind. Individualisierungskomplexe waren nicht zu finden. Da es nur gelang, eine einzige mutante Linie zu erzeugen, konnten keine transheterozygoten Tiere erzeugt werden. So konnte nicht geprüft werden, ob der Defekt wirklich durch das RNAi-Konstrukt oder durch die Integration in ein anderes Gen ausgelöst wurde. Die Vielzahl von unterschiedlichen verwendeten Konstrukten und die Anzahl der erzeugten Linien, die keinen Phänotyp zeigen, sprechen aber eher für einen Integrationsdefekt. Durch die hier vorliegenden Ergebnisse kann somit eine Interaktion von Cup mit Orb2 weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Da bisher sowohl von Gap, wie von Cup durch antisense- und RNAi-Linien nur sehr wenige mutante Linien erzeugt werden konnten, sollte in einer anschließenden Arbeit versucht werden, auf anderen Wegen Mutanten zu erzeugen. Für beide Gene liegen Fliegenlinien mit P-Elementen in der Sequenz vor. So könnten diese für ein erneutes Jump out Experiment verwendet werden, wie es in der vorliegenden Arbeit für *orb2* angewendet wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits Remobilisierungsexperimente mit P-Element-Linien von Cup, Gap und Tob durchgeführt, die aber zu keinem mutanten Phänotyp führten. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Gene durch homologe Rekombination auszuschalten. In einer RNAi-Fliegenbibliothek liegen Fliegenlinien mit RNAi-Konstrukten gegen Cup und Gap als UAS-Fusionen vor (Ditzl *et al.*, 2007). Diese könnten mit einer noch zu erzeugenden hodenspezifischen Teiberlinie auf einen mutanten Phänotyp getestet werden. Eine mögliche Co-Lokalisation mit dem Protein Orb2 sollte in einer nachfolgenden Arbeit durch ein neues RFP-Konstrukt nachgewiesen werden. Wie oben bereits beschrieben könnte die Wiederholung des Co-Immunpräzipitationsexperimentes mit einem neuen Aufreinigungssystem oder die Erzeugung von Fusionsproteinen mit nachfolgenden Bindungsstudien zur Klärung der Frage beitragen, ob die beiden Proteine mit Orb2 direkt oder indirekt interagieren.

4. Methoden

4.1. Fliegenzucht

4.1.1. Fliegenstämme

(Lindsley und Zimm, 1992)

Wildtypstamm: Oregon R

White Mutante: w^{1118}

Balancerchromosomen: CyO: „Curly derivative of Oster“, Chromosom 2, homozygot letal, dominantes Markergen Cy

TM3: „third multiple 3“, Chromosom 3, homozygot letal, dominante Markergene Sb oder Ser

Defizienzlinien: BL4499 (Df(3L)Scf-R11)

BL3024 (Df(3L)h-i22)

BL4500 (Df(3L)Scf-R6)

von Bloomington erhalten (BL)

P-Element Linien: BL12812 (w^{1118} ; $P\{w^{+mgt}=GT1\}orb2^{BG02373}$)

HD/H-EP32189

HD/H-EP37027

von G. Vorbrüggen (Göttingen) erhalten (HD/H)

4.1.2. Zuchtbedingungen und Herstellung des Fliegenbreis

(Hess, 1976)

Die Fliegen wurden bei 18°C bzw. 25°C in mit Nährbrei gefüllten Plastikröhrchen (Greiner) gehalten, die mit Schaumstoffstopfen verschlossen waren. Um 100 Zuchtröhrchen bzw. 50 Zuchtflaschen zu befüllen wurden folgende Bestandteile benötigt: 1,65 l dH₂O, 0,9 g Fadenagar, 18 g Bierhefe, 10 g Sojamehl, 82 g Zuckerrübensirup, 41 g Malzextrakt, 77 g Maismehl, 5 ml Propionsäure und 2 g Nipagin. Das Wasser wurde bis zum Sieden erhitzt und der Agar darin gelöst. Dann wurden Bierhefe, Sojamehl, Sirup und Malz eingerührt. Das Gemisch wurde nochmals aufgekocht und

das Maismehl hineingesiebt. Vor dem Gießen wurden als Konservierungsmittel Propionsäure und Nipagin gegen Pilzbefall hinzugefügt.

4.1.3. Präparation von Organen

Die mit CO₂ betäubten Tiere wurden in Blockschälchen in PBS präpariert. Die präparierten Organe wurden in eisgekühltem PBS in Eppendorf Reaktionsgefäßen gesammelt.

PBS: 140 mM NaCl
 10 mM NaH₂PO₄
 pH 7,4 autoklaviert

4.1.4. Fertilitätstest

Zur Überprüfung der Fertilität von *Drosophila melanogaster* wurden zu je einem Männchen 2-4 Jungfrauen bzw. zu einem Weibchen 2-4 Männchen in ein Zuchtröhrchen gesetzt. In den nächsten zwei Wochen wurde kontrolliert, ob sich Nachkommen entwickelten.

4.1.5. Überprüfung der Spermienmotilität

Die Hoden von 2-5 Tage alten Männchen wurden in PBS präpariert und auf einen Objektträger überführt. Nach dem Aufsetzen des Deckgläschens wurden die Organe durch leichtes Quetschen zum Aufplatzen gebracht. Danach erfolgte die Untersuchung der Präparate unter dem Lichtmikroskop auf das Vorhandensein von beweglichen Spermien.

4.2. DNA Klonierungstechniken

4.2.1. Verwendete Vektoren

pGEM-T, pGEM-T easy	Promega
pBluescript, pPCR-Script Amp	Stratagene
pET41a	Novagen
pZErO-1, pBAD HisA I	Invitrogen

P-Vektoren:

P{CaSpeR-4}	(Pirotta, 1989)
p{UAST} Green	(M. Hollmann, pers. Mitteilung)
p{UAST} Red	(C. Schäfer, 2003)
p{UAST} Red mars	(C. Schäfer, pers. Mitteilung)
Testis-expression-vector (+TCE)	(M. Hollmann, pers. Mitteilung)
Testis-expression-vector	(C. Schäfer, pers. Mitteilung)

4.2.2. Single-Fly-DNA Extraktion

(Jowett, 1986)

Für die Isolierung von genomischer DNA aus einer Fliege wurde diese in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in 100 µl Lösung I mit einem Pistill zermörsert. Nach der Hinzugabe von Lösung II und 1,5 µl DEPC wurde vorsichtig gemischt und 35 min im Wasserbad bei 60°C inkubiert. Durch diesen Schritt wurden die Zellkerne aufgelöst. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur durch Einstellen in Eis wurde 30 µl 8M Kaliumacetat hinzugegeben und 45 min auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden durch 5 min Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert und der Überstand mit 2 Volumen 96% Ethanol gefällt. Die Lösung wurde vorsichtig bei RT invertiert und die DNA bei 8000 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol für 5 min bei 8000 rpm gewaschen. Das Pellet wurde nach kurzem Trocknen in 25 µl TE⁻⁴ aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Lösung I:	10 mM Tris/HCl (pH7,5)	Lösung II:	1,25% SDS
	60 mM NaCl		0,3 M Tris/HCl (pH9)
	50 mM EDTA		0,1 M EDTA
	0,15 mM Spermin		5% Saccharose
	0,15 mM Spermidin		
			Lösung sterilfiltrieren

8M Kaliumacetat (KAc): 78,5g auf 100ml

DEPC-dH₂O: 0,2% Diethylpyrocarbonat in dH₂O für eine Stunde unter dem Abzug rühren und dann autoklavieren.

TE⁻⁴: 10 mM Tris/HCl pH 8
 0,1 mM EDTA
 (autoklaviert)

4.2.3. Isolierung genomischer DNA aus ganzen Fliegen

(Rasmusson *et al.*, 1994)

Zur Gewinnung größerer Mengen an genomischer DNA wurden ca. 100 Fliegen in 2 ml Lysepuffer aufgenommen und im Dounce-Homogenisator erst mit einem L-, dann mit einem S-Pistill zerrieben. Das Homogenat wurde in 15 ml Corex-Röhrchen überführt und der Homogenisator mit 1 ml Puffer nachgespült. Die Suspension wurde für 20 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert und anschließend 5 M Kaliumacetat bis zu einer Endkonzentration von 1 M hinzugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt, für 15 min auf Eis gestellt und für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein neues Corex-Zentrifugenröhrchen überführt und zur Fällung mit 0,5 Volumen Isopropanol gemischt. Die Nukleinsäuren wurden durch 15 min Zentrifugation bei 12000 rpm pelletiert, das Pellet mit 70% EtOH zentrifugierend gewaschen und nach kurzem Trocknen in TE⁻⁴ gelöst. Zum Abbau der RNA wurde RNaseA-Lösung (10mg/ml) bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml hinzugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde mit 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen 96% Ethanol für 20 min bei -80°C gefällt, durch 20 min Zentrifugation bei 12000 rpm pelletiert,

das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und die DNA nach kurzem Trocknen in 200 μ l TE⁻⁴ aufgenommen und bei -20°C eingefroren. Um die DNA auf Degradation zu überprüfen, wurde ein Aliquot auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen.

Lysepuffer: 100 mM Tris/HCl pH 9
 100 mM EDTA
 1% SDS

4.2.4. PCR Techniken

DNA Fragmente, die zur Herstellung von RNA-Sonden verwendet werden sollten, wurden durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit der *Taq*-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) erzeugt. Diese kann in kurzer Zeit lange Produkte erzeugen (ca. 1500 bp pro min), hat aber eine relativ hohe Fehlerrate. So wurde für die Erzeugung von Fragmenten, bei denen es auf eine hohe Genauigkeit des Produktes ankam, wie z.B. bei der Klonierung eines GFP-Fusionsproteins, die *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) verwendet, die langsamer ist (ca. 500 bp pro min), aber über eine zusätzliche 3`-5`-Exonuclease-Aktivität verfügt, die eine Korrekturaktivität, das sogenannte „proof reading“, erlaubt.

Standard-PCR-Protokoll

Für einen Ansatz mit 50 μ l Gesamtvolumen wurden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

1 μ l	Plasmid DNA (ca. 25 ng)
5 μ l	10x Reaktionspuffer
1 μ l	dNTP-Mix (je 25 mM)
1 μ l	Primer I (100 ng/ μ l)
1 μ l	Primer II (100 ng/ μ l)
4 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
0,5 μ l	<i>Taq</i> -Polymerase (5 u/ μ l)
36,5 μ l	dH ₂ O

Der Ansatz wurde in einem PCR-Block (Tpersonal, Biometra) folgenden Zyklen von Denaturierung, Hybridisierung der Primer und Verlängerungsreaktion durch die *Taq*-Polymerase unterworfen:

Zyklus 1:	92°C	2	min
	52-62°C	1	min
	72°C	1-5	min
Zyklus 2-24:	92°C	1	min
	52-62°C	1	min
	72°C	1-5	min
Zyklus 25:	92°C	1	min
	52-62°C	1	min
	72°C	30	min

Die Temperatur bei der sich ein Primer an das Template anlagert, ist abhängig von seiner Schmelztemperatur. Die sogenannte „annealing“-Temperatur wurde so gewählt, dass sie zwischen 2°C und 6°C unter der Schmelztemperatur des Primers lag. In der größten Differenz lag sie um 12°C niedriger. Allerdings wächst mit abnehmender Temperatur die Gefahr von unspezifischen Bindungen. Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des zu erzeugenden DNA-Fragments und wurde in der Regel etwas länger als die theoretisch benötigte Zeit gewählt. Die anfängliche Denaturierungsdauer im ersten Zyklus wurde abhängig vom eingesetzten Template gewählt. Während bei Plasmid-DNA eine Denaturierungszeit von 2 min ausreichend war, wurde genomische DNA für 5 min denaturiert. Im letzten Zyklus erfolgte eine Elongation von 30 min, um noch unfertige Produkte zu beenden.

4.2.5. RT-PCR (Abgene, Reverse iT One-Step RT-PCR Kit)

Bei der reversen Transkription dient mRNA und nicht DNA als Template für eine PCR. Die RNA wurde wie unter 5.3.1 beschrieben isoliert. Zuerst erfolgte mit einem Primer die sogenannte Erststrangsynthese, die dann nachfolgend zusammen mit einem zweiten Primer als Template für die weiteren PCR Schritte verwendet wurde.

Standard-RT-PCR-Protokoll

1	µl	mRNA
11	µl	DEPC-dH ₂ O
12	µl	Mastermix (aus Kit)
1	µl	Primer I (100 ng/µl)
1	µl	Primer II (100 ng/µl)
0,5	µl	Reverse iT Rtase Blend (50 u/µl)

Standardprogramm RT-PCR

Zyklus 1:	47°C	30	min
Zyklus 2-40:	92°C	1	min
	50 -56°C	1	min
	72°C	2-4	min
Zyklus 41	92°C	1	min
	50 -56°C	1	min
	72°C	15	min

DEPC-dH₂O: 0,2% Diethylpyrocarbonat in dH₂O für eine Stunde unter dem Abzug rühren und dann autoklavieren.

4.2.6. PCR-Produkt-Reinigung

Vor der Ligation wurden die PCR-Produkte mit dH₂O auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt. Das gleiche Volumen Phenol/Chloroform (1:1) wurde hinzugegeben, das Gemisch gevortext und für 10 min bei 12000 rpm bei RT zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit 1/20 Volumen 5 M NaCl und mit dem zweifachen Volumen an 100% EtOH gefällt für 15 min bei -80°C gefällt, das PCR-Produkt für 10 min bei 12000 rpm pelletiert und in 70% EtOH für 10 min bei 12000 rpm gewaschen. Das Pellet wurde kurz getrocknet und in 10 µl dH₂O aufgenommen.

4.2.7. Anhängen von Adenosinen an PCR-Produkte

Um PCR-Produkte ohne „sticky ends“ in einen Vektor mit „sticky ends“ zu klonieren, wurde unter Verwendung der *Taq*-DNA Polymerase ein solcher Überhang erzeugt. Zum PCR-Produkt wurden 1 µl *Taq*-Polymerase (5 u/µl), 2 µl dATP (10mM) und 1 µl *Taq*-Polymerasepuffer (10x) gegeben und der Ansatz mit dH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für 25 min bei 70°C im Heizblock.

4.2.8. „Polishing“ von PCR-Produkten

Um PCR Produkte mit „sticky ends“ in „blunt end“ geschnittene Vektoren zu ligieren, wurde der Überhang unter Verwendung der *Pfu*-DNA-Polymerase aufgefüllt. Zu 10 µl gereinigtem PCR-Produkt wurden 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1,3 µl *Pfu*-Puffer (10x) und 1 µl *Pfu*-DNA-Polymerase (2-3 u/µl) gegeben. Der Ansatz wurde für 30 min im Wasserbad bei 72°C inkubiert.

4.2.9. Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Damit mit einem Restriktionsenzym geschnittene Vektoren bei einer Ligation nicht wieder mit sich selbst ligierten, sondern mit den eingesetzten DNA-Fragmenten, wurden die 5`-Phosphatgruppen mit Hilfe des Enzyms alkalische Phosphatase (CIP, Fermentas) entfernt. Dazu wurden zu 50 µl Restriktionsverdauansatz 6 µl Reaktionspuffer (10x) und 1 µl CIP (5 u, New England BioLabs) gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde erneut Enzym (1µl CIP) hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Phenol/Chloroform (1:1)-Extraktion und eine Alkoholfällung oder eine Aufreinigung der Vektor-DNA über ein Agarosegel.

4.2.10. Ligation

Vektor und Insert wurden in äquimolaren Mengen eingesetzt. Die Konzentrationsabschätzung der eingesetzten Vektoren und DNA-Fragmente erfolgte, indem Aliquots auf einem Agarosegel aufgetragen wurden und die Intensität ihrer Banden mit denen des Markers λ /*Hind*III verglichen wurden. Zu Insert und Vektor wurde je 1

µl Ligationspuffer (10x) und T4-DNA Ligase (5u, Fermentas) gegeben und mit dH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 18°C. Im Falle einer einstündigen Ligation bei RT wurde der zweimal Rapid-Puffer (Promega) verwendet.

4.2.11. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

(Sambrook *et al.*, 1989)

Für Transformationen wurden kompetente Zellen der *Escherichia coli*-Stämme DH5 α , XL1-blue, Novablue Gigasingles und BL21DE3 verwendet. In einem sterilen Erlenmeyerkolben wurden 20 ml LB-Medium mit einer über Nacht auf Platte angezogenen Einzelkolonie angeimpft und eine weitere Nacht bei 37°C geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurden 5 ml zu 200 ml LB-Medium gegeben und die Kultur bis zu einer OD_{550nm} von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und in der Kühlzentrifuge bei 4°C im SS-34 Rotor bei 2500 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgezogen und das Bakterienpellet in einem Drittel des Ausgangsvolumens RFI-Lösung aufgenommen und für 15 min auf Eis gekühlt. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, das Pellet in 1/15 des Ausgangsvolumens RFII-Lösung resuspendiert und erneut für 15 min auf Eis gestellt. Je 200 µl Zellsuspension wurden auf vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

RFI-Lösung:

100 mM	RbCl
50 mM	MnCl ₂
30 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl ₂
15 %	Glycerin (w/v)
	pH 5,8 (Essigsäure)
	sterilfiltriert

RFII-Lösung:

10 mM	MOPS
10 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
15 %	Glycerin (w/v)
	pH 6,8 (NaOH)
	sterilfiltriert

LB-Medium (bzw.-Platten): 5 g Hefeextrakt
 10 g Pepton
 5 g NaCl
 (17 g Bactoagar)
 mit dH₂O ad 1 l autoklaviert

Die Zugabe von Antibiotika erfolgte, nachdem das Medium auf 50°C abgekühlt war. So wurde z.B. bei Bakterien, die eine Ampicillinresistenz trugen, 100 µg Benzylpenicillin pro ml verwendet. Die Platten wurden unter sterilen Bedingungen gegossen und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

4.2.12. Überprüfung von kompetenten Zellen

Um die Effizienz der kompetenten Zellen zu testen, wurden 100 µl kompetente Zellen auf 1 µl Kontrollvektor pipettiert (Stratagene competent cell control; pUC 18-Vektor; 0,1 ng/µl). Nach Inkubation für 20 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42°C im Wasserbad. Auf den Ansatz wurden 900 µl LB-Medium gegeben, vorsichtig gemischt und für 45 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Ausplattiert wurde auf drei LBamp-Platten (50 µl, 200 µl und Rest), die über Nacht bei 37°C in den Wärmeschrank gestellt wurden. Die Kolonien auf der Platte mit 50 µl Bakterienlösung wurden gezählt und mit 200000 multipliziert. Das Ergebnis gab die Kolonienzahl pro µg „supercoiled“ DNA an. Für Transformationen wurden nur Zellen verwendet, bei denen das Ergebnis zwischen 1×10^6 und 1×10^7 lag.

4.2.13. Transformation von DNA in *Escherichia coli*

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf einen Ligationsansatz gegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C im Heizblock. Nach kurzem Abkühlen in Eis wurden 800 µl LB-Medium hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 40 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank. Die Zellen wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.14. Transformation in *E. coli* Novablue GigaSingles

Pro Transformationsansatz wurden 50 µl kompetente Novablue *E. coli* GigaSingles benötigt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 µl Ligationsansatz gemischt und dann für 5 min auf Eis gestellt. Nach dem Hitzeschock für 30 s bei 42°C wurden die Ansätze für 2 min auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden

die Zellen für 45-60 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Ausplattiert wurden die Zellen je nach Resistenz der Plasmide auf mit entsprechendem Antibiotikum versehene LB-Platten. Ausplattiert wurden jeweils 200 µl und 800 µl der Ansätze.

SOC Medium (100ml):	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,058 g	NaCl
	0,019 g	KCl

Nach dem Autoklavieren wurde 1 ml 2 M Glukose (sterilfiltriert) hinzugeben.

4.2.15. Transformation in elektrokompetente *E. coli* DH5 α

Für die Transformation in elektrokompetente Zellen wurde pro Ansatz eine Küvette auf Eis vorgekühlt. In diese wurden 40 µl elektrokompetente Zellen und maximal 10 µl salzfreie DNA pipettiert. Der Ansatz wurde für 1 min auf Eis gehalten und dann in den Elektroporator (Easyject Optima, Equibio) gestellt. Es erfolgte ein Puls (2500 V) und die Küvette wurde zurück auf Eis gestellt. Nach kurzem Abkühlen wurden die Bakterien mit 1 ml SOC-Medium aus der Küvette in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Nach 45 min Schütteln bei 37°C wurden je Ansatz 50 µl und 200 µl auf LB_{Amp}-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Um salzfreie DNA zu erhalten, wurde der Ligationsansatz entweder mit Ethanol gewaschen oder mit dH₂O verdünnt.

4.2.16. Blau-Weiß-Selektion

Einige der verwendeten Vektoren enthielten das *lacZ*-Gen, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert und in der Lage ist, das Substrat X-Gal in ein farbiges Reaktionsprodukt umzusetzen. Die Expression des *lacZ*-Gens kann durch IPTG induziert werden. Durch die Insertion des zu klonierenden DNA-Fragmentes in die „multiple cloning site“ dieser Vektoren wird das *lacZ*-Gen unterbrochen. Zellen, die nach der Transformation einen Vektor ohne Insert enthalten, exprimieren nach der Induktion β -Galaktosidase und wachsen auf der Platte zu blauen Kolonien heran. Im Gegensatz dazu bilden Zellen, die ein Insert integriert haben, weiße Kolonien. Für

eine Blau-Weiß-Selektion wurden die transformierten Zellen zusammen mit 50 µl 2% X-Gal in Dimethylformamid und 20 µl 100 mM IPTG in dH₂O ausplattiert.

4.2.17. Plasmid-Minipräparation

(Birnboim und Doly, 1979)

Eine Bakterienkolonie wurde in 2ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum gegeben und über Nacht bei 37°C in einem Reagenzglas geschüttelt. 1,5 ml von dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Tag in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 4 Minuten bei 5000 rpm wurde der Überstand entfernt und das Bakterienpellet in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Lösung II wurde durch Vortexen gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von Lösung III, Vortexen und eine Inkubation für 15 min auf Eis. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm wurde der Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol (RT) versetzt und für 5 min bei RT gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 rpm wurde das Pellet nach kurzem Trocknen in 30 µl TE⁻⁴ aufgenommen.

Lsg. I:	25	mM	Tris/HCl pH 8,0
	10	mM	EDTA
	10	µg pro ml	RNaseA
Lsg. II:	0,2	M	NaOH
	1	%	SDS
Lsg. III:	3	M	Kaliumacetat pH 5,5
			autoklaviert

4.2.18. Plasmid Midipräparation mit EZNA-Kit

Zur Erzeugung größerer DNA-Mengen wurden über Nacht 20 ml Kulturen angesetzt und bei 37°C geschüttelt. Die Präparation erfolgte mit dem EZNA-Plasmid-Miniprep Kit II nach den Angaben des Herstellers (peqlab). Die DNA wurde mit 100 µl sterilem dH₂O eluiert und bei -20°C aufbewahrt.

4.2.19. Plasmid Midipräparation Quiagen-Kit

Für die Injektion von DNA-Konstrukten wurde eine große Menge besonders reiner DNA benötigt. Hierfür wurden über Nacht 25 ml Kulturen angesetzt. Die Isolierung erfolgte mit dem Plasmid-Midikit der Firma Quiagen, nach dem entsprechenden Protokoll. Die DNA wurde in 100-200 µl TE⁻⁴ aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration lag in der Regel bei 0,5 bis 1,5 µg pro µl.

4.2.20. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Es wurden Enzyme der Firmen Fermentas und New England BioLabs verwendet. Zur Überprüfung von DNA-Fragmenten wurden 10 – 100 ng Plasmid-DNA mit 10 units Restriktionsenzym mit entsprechendem Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl verdaut und nach ein- bis zweistündiger Inkubation bei 37°C auf ein 0,7% Agarosegel aufgetragen. Zur Klonierung wurden 1 bis 2 µg Plasmid DNA mit 20 units Restriktionsenzym mit entsprechendem Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 2 bis 4 Stunden verdaut und dann vor der Ligation mit anderen Fragmenten oder Vektoren mit Ethanol gefällt und in 10 µl dH₂O aufgenommen.

4.2.21. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die Auftrennung von doppelsträngigen DNA-Molekülen erfolgte in 0,7% Agarosegelen. Hierfür wurden vertikale Elektrophoresesysteme der Firma MWG-Biotech eingesetzt. Für die Herstellung eines Gels mit 13 cm Trennstrecke wurden 0,7 g Agarose in 100 ml 1x TBE bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht und mit 5 µl EtBr-Lösung (10mg/ml, Roth) gemischt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei

einer Stromstärke von 40 (kleine Gele) bis 70 mA (große Gele) in Richtung der Anode.

DNA-Probenpuffer: 0,1 % Bromphenolblau (w/v), 50% Glycerin in 4x TBE

10x TBE:	890 mM	Tris
	890 mM	Borsäure
	20 mM	EDTA
	pH 8,3	autoklaviert

4.2.22. DNA-Fragment-Isolierung aus Agarosegelen

(Weichenhan, 1991)

Die auf einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden auf dem UV-Tisch sichtbar gemacht und die gewünschten Fragmente mit Hilfe einer Rasierklinge ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben, das ein Filterpapiertütchen enthielt und an der Unterseite mit einer feinen Öffnung versehen war. Dieses Gefäß wurde in ein zweites Gefäß gestellt und die Konstruktion für 1 min bei 12000 rpm (RT) zentrifugiert. Das obere Gefäß, mit Filterpapier und Gelresten, wurde verworfen. Auf die DNA Lösung im unteren Gefäß wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform (1:1) gegeben und für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde wie oben beschrieben gefällt und die DNA in 10 µl dH₂O gelöst.

4.2.23. DNA-Sequenzierung

(Sanger *et al.*, 1977)

Um die Basenabfolge in klonierten DNA-Fragmenten zu analysieren, wurde die Kettenabbruchmethode angewendet. Die elektrophoretische Auftrennung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente erfolgte im denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel.

Gießen des Sequenzgels

Vor dem Zusammenbau der Gelapparatur mussten beide verwendeten Glasplatten vorbehandelt werden. Die Platten wurden gründlich mit Wasser und Seife gewaschen. Eine Platte wurde so behandelt, dass sich die Glasplatte leicht vom Gel lösen lässt (Repel silane), die andere so, dass das Gel an der Glasplatte haften blieb (Bind silane).

Repel silane: 10 ml Trichlorethan (Trichlormethan/Chloroform)
200 µl Dichlormethylsilan
10 Minuten trocknen, kurz wässern

Bind silane: 12,5 ml 96% EtOH
37,5 µl 10% Essigsäure
37,5 µl Bindsilane (Methacryloxypropyltrimethoxysilane)
3 Minuten trocknen, 10 Minuten wässern

Beim Zusammenbau der Gelapparatur lagen die Spacer in einem Abstand von 16,5 cm. Beim Gießen wurden die Glasplatten leicht schräg gehalten, um das Einfließen der Gellösung zwischen die Glasplatten zu erleichtern. Eventuell auftretende Luftblasen wurden mit einer Gelangel entfernt. Das fertige Gel wurde bis zur Sequenzierung im Höchstfall für eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt.

Acrylamidstammlösung: 38 g Acrylamid
2 g Bisacrylamid
306 g Harnstoff

Die Chemikalien für die Acrylamidstammlösung wurden in 600 ml dH₂O und 100 ml 10 X TBE gelöst, für 30 Minuten mit 5 g pro 100 ml Resin (Ionenaustauscherharz) gerührt, durch einen Faltenfilter gegossen und durch Vor- und Feinfilter filtriert und entgast.

Sequenzgel:	30 ml	Acrylamidstammlösung
	30 µl	TEMED
	165 µl	10% APS

Beim Zusammenbau der Gelapparatur wurde zur besseren Wärmeverteilung im Gel eine Metallplatte mit eingespannt. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Vor dem eigentlichen Gellauf erfolgte ein Vorlauf für 30 Minuten bei 25 mA und 40 Watt, um unpolymerisierte Reste aus der Gelmatrix zu entfernen.

Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung erfolgte mit dem T7-DNA-Sequenzierungskit der Firma USB. Für die Sequenzierungsreaktion wurden 1-2 µg DNA mit dH₂O auf 18 µl aufgefüllt und nach Zugabe von 2 µl 2M NaOH, 2 mM EDTA für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 6 µl 3 M NaAC und 52 µl 96% EtOH wurde die Probe gevortext und für mindestens 10 min bei -80°C gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C wurde das Pellet für weitere 10 min bei 12000 rpm mit 70% EtOH gewaschen und nach kurzer Trocknung bei 42°C in 10 µl dH₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 2 µl Annealing Puffer und 2 µl spezifischem Primer (10ng/µl) erfolgten nachfolgende Inkubationsschritte: 5 min bei 65°C, 10 min 37°C und 5 min RT.

Markierungsreaktion

Die nachfolgenden Schritte fanden im Isotopenlabor statt. Zum Ansatz wurden 3 µl Labeling Mix, 2 µl α³²P-dATP und 2 µl verdünnte T7-DNA-Polymerase (Angaben des Herstellers) gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Je 4,5 µl dieses Ansatzes wurden in frische, vorgewärmte Reaktionsgefäße mit je 2,5 µl A, C, G, T-Nukleotiden pipettiert und 5 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 µl Probenpuffer abgestoppt, die DNA für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und dann auf Eis gestellt. Von jedem Ansatz wurden 1,5 µl auf das Sequenzgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 25 mA und 40 Watt für 1-2 h. Vor dem Auftrag der Proben wurden die Geltaschen gründlich mit Laufpuffer gespült. Nach dem Gellauf wurde die mit Repel silane behandelte Platte vorsichtig entfernt und das Gel

für 10 Minuten mit 10% Essigsäure fixiert. Es folgte ein Wässern für 10 min, wobei das Wasser mehrmals gewechselt wurde. Nach dem Trocknen des Gels bei 90°C für ca. eine Stunde wurde ein Röntgenfilm direkt auf das Gel aufgelegt. Die Exposition erfolgte in der Regel über Nacht.

4.3. RNA-Techniken

4.3.1. Isolierung von poly(A)-RNA

Zur Isolierung von mRNA aus Geweben nutzt man die Tatsache, dass fast alle mRNAs an ihrem 3`Ende einen poly(A)-Schwanz tragen, mit denen man sie von anderen RNAs in den Zellen trennen kann. Für die Isolierung wurden kovalent an magnetische Beads gebundene oligo d(T)-Partikel (Novagen) verwendet. Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden bei der gesamten Durchführung Handschuhe getragen und nur autoklavierte, bzw. mit DEPC-dH₂O angesetzte Lösungen verwendet. Alle Lösungen waren auf 4°C temperiert. Für die Isolierung von poly(A)-RNA wurden je nach Experiment 25 bis 30 Gesamttiere, 50 Hoden, 25 Ovarien oder 100 Köpfe verwendet. Das Ausgangsmaterial wurde in 200 µl Lysepuffer gemörsert, dann auf 400 µl mit Lysepuffer aufgefüllt und für 1 min bei 12000 rpm pelletiert. Vor dem Binden der mRNA wurden 200 µl Magnetbeads im magnetischen Halter konzentriert, der Überstand abgezogen und die Beads einmal mit Lyse-/ Bindungspuffer gewaschen. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation auf die vorbereiteten Magnetbeads gegeben und für 5 min auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Bindung der mRNAs an die Magnetbeads. Nach fünfminütiger Inkubation auf dem Magnethalter wurden die gebundenen mRNAs zweimal mit 200 µl Waschpuffer mit LiDS und einmal mit Waschpuffer ohne LiDS gewaschen. Die Elution der gebundenen mRNAs von den Magnetbeads erfolgte mit 20 µl 2 mM EDTA (pH8.0) bei 65°C im Heizblock. Die Magnetpartikel wurden erneut an den Magnethalter konzentriert und die im Überstand vorliegenden mRNAs in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die isolierte mRNA wurde nun entweder auf ein denaturierendes Formaldehydgel aufgetragen und für eine Northern-Membran verwendet oder diente als Template für eine RT-PCR. Der Auftrag auf die Membran erfolgte immer direkt im Anschluss an die Präparation. Bis

zur Verwendung als Template für RT-PCR-Versuche wurde die isolierte poly(A)-RNA bei -20°C aufbewahrt.

Lyse-Bindungspuffer:

100 mM	Tris/HCl pH 8,0
500 mM	LiCl
10 mM	EDTA
1 %	LiDS
5 mM	DTT

Waschpuffer mit LIDS

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
150 mM	LiCl
1 mM	EDTA
0,1 %	LiDS

4.3.2. Isolierung von poly(A)-RNA aus Larve 3

Da Larve 3 eine große Menge an endogenen RNasen enthält, wurde sie vor der eigentlichen poly(A)-RNA-Isolierung vorbehandelt. Die Larven wurden aus einem Fliegenröhrchen mit Brei in ein Siebchen gelöffelt und mit 1 x PBS gespült. Nach der Überführung in ein Reaktionsgefäß wurde mit DEPC-dH₂O gespült. Das DEPC-dH₂O wurde vollständig entfernt und 200 µl Lyse-/Bindungspuffer + 1 µl RNasin (40 u) hinzugegeben. Fortgefahren wurde mit der poly(A)-RNA-Isolierung wie oben beschrieben.

4.3.3. Auftrennung von RNA Fragmenten in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen

Vor der Auftrennung der mRNAs auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel wurde der RNA-Standard (RNA-Sizer 0.2 –10 kb, Novagen) mit dH₂O auf das gleiche Volumen wie die isolierten mRNAs gebracht. Zu allen Proben wurden dann folgende Lösungen hinzugegeben: 20 µl deionisiertes Formamid, 8 µl Formaldehydlösung (37%), 6µl MOPS (10x) 2 µl EtBr.-Lösung (500 µg/ml dH₂O).

Nach 5 min im Heizblock bei 65°C wurden die Proben sofort in Eis gekühlt und 6 µl RNA-Load (0,1% Bromphenolblau; 0,1 % Xylencyanol; 70% Glycerin) hinzugegeben. Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und dann auf das Formaldehydgel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der mRNAs erfolgte in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen. Dazu wurde eine vertikale Elektrophorese-Kammer (MWG-Biotech) verwendet, die über eine Pufferumwälzung verfügt. Das Gel bestand aus 1,5 g Agarose, 85 ml dH₂O und 10 ml 10x MOPS. Das Gel wurde durch

Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Verdampftes Wasser wurde ersetzt, die Gellösung auf 70°C abgekühlt, 5 ml Formaldehydlösung (37%) hinzugegeben und die Lösung luftblasenfrei in die Gelapparatur gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Probestaschen mit Puffer gespült und die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 2 h 40 min bei 120 V.

10x MOPS:	200	mM	3-Morpholinopropansulfonsäure
	50	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA
			pH 7 autoklaviert

4.3.4. Transfer von RNA auf Nylonmembranen

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel mit einem Maßstab fotografiert, die Markerbande abgeschnitten und der Transfer aufgebaut. Für den Transfer wurden 2 Filterpapierstreifen zurechtgeschnitten, im Puffer (20 x SSPE) aus dem Pufferreservoir angefeuchtet und über eine Glasplatte, die über dem Puffergefäß lag, gelegt. Mit diesen Filterpapieren wurde der Puffer durch Kapillarkraft zum Gel befördert. Auf die Filterpapiere wurde nun das Formaldehydgel luftblasenfrei aufgelegt. Auf das Gel wurde die Membran (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech) gelegt. Auf diese Membran kamen zwei weitere Filterpapiere in Gelgröße. Die Teile der Filterpapierbrücke, die auf der Glasplatte lagen und nicht vom Gel bedeckt waren, wurden mit Parafilm abgedeckt. Auf die beiden oberen Filterpapiere wurden nun Papierhandtücher aufgelegt und dann mit einem Gewicht von etwa 1 kg beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran mitsamt dem Gel umgedreht und die Lage der Geltaschen mit einem Bleistift auf der Membran markiert. Die mRNA wurde dann bei 254 nm mit 1200 J im Stratalinker (Stratagene) kovalent auf die Membran gebunden. Bis zur Verwendung der Filter wurden diese in Frischhaltefolie eingepackt und bei 4°C gelagert.

20x SSPE:	3,6	M	NaCl
	0,2	M	NaH ₂ PO ₄
	0,02	M	EDTA
			pH 7,4 (NaOH), autoklaviert

4.3.5. *In vitro*-Transkription

(Melton *et al.*, 1984)

Bei der *in vitro*-Transkription wurde von einem DNA-Template mit Hilfe von RNA-Polymerasen eine einzelsträngige Kopie erstellt. Dazu wurde die RNA-Polymerase so gewählt, dass die Kopie den antisense-Strang darstellt und dieser somit an den Sensestrang der gesuchten mRNAs binden konnte. Vor der Transkription wurde das Template, das in der Regel eine Plasmid-DNA war, mit einem Restriktionsenzym so linearisiert, dass bei der Transkription keine Vektorsequenz erzeugt werden konnte. Für die *in vitro*-Transkription wurde folgender Mix angesetzt: 0,5-1 µg linearisiertes Plasmid, 2 µl Transkriptionspuffer (10x), 1 µl DTE (0,2 M), 1 µl RNase-Inhibitor (25 u/µl), 3 µl ACG-Mix (je 3,3 mM), 1 µl UTP (200 µM), 1 µl RNA-Polymerase (20 u/µl), 2 µl α -³²P-UTP (10 µCi/µl, Hartmann Analytic), ad 20 µl dH₂O Gesamtvolumen. Je nach eingesetzten Vektoren und nach der Orientierung des Inserts wurde T7-, T3- oder SP6-RNA-Polymerase (Fermentas) verwendet. Der Ansatz wurde bei 37°C für 1,5 bis 3 h inkubiert. Anschließend wurden 170 µl dH₂O und als Fällhilfe 20 µl HefetRNA (1µg/µl) hinzugefügt und eine Phenol/Chloroform-Behandlung (1:1) durchgeführt. Danach wurde das Transkript mit 80 µl Ammoniumacetat und 600 µl 96% EtOH gemischt und für 30 min bei -20°C gefällt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 30 min. Das Pellet wurde für 15 min mit 170 µl 70% EtOH bei 12000 rpm gewaschen. Das Pellet wurde dann in 100 µl dH₂O aufgenommen und die Stärke der radioaktiven Markierung des Transkriptes mittels der Cerenkov-Strahlung im Szintillationsmessgerät überprüft. Die Werte lagen nach Abhängigkeit von dem Kalibrierungsdatum des α ³²P-UTP und der Reaktionseffizienz bei 1 bis 10 x 10⁶ cpm.

4.3.6. Hybridisierung an Northern-Transfers

Vor der Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonde wurde die Membran für 2-4 h vorhybridisiert, um die Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Dazu wurde die Rückseite der Membran auf die Wand des Hybridisierungsröhrchens aufgelegt, 20 ml Vorhybridisierungslösung hinzugegeben und die Luftblasen zwischen Membran und Röhrchen mit Hilfe einer Glaspipette vorsichtig entfernt. Nach erfolgter Vorhybridisierung wurde die Lösung entfernt und 5 ml Hybridisierungslösung hinzugegeben. In diese wurde dann vorsichtig die radioaktive Probe pipettiert. Die Inkubation

erfolgte in der Regel über Nacht bei 62°C. Diese Temperatur stellt ideale Bedingungen für die Bildung von RNA/RNA-Hybriden in 50 % Formamid dar. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde für eine mögliche nachfolgende Hybridisierung bei -20°C aufbewahrt. Die Membran wurde einmal für 30 min mit 2x SSPE, 0,1% SDS und zweimal 15 min mit 0,1 x SSPE, 0,1% SDS gewaschen. Nach den Waschschrinen wurde die Strahlungsintensität mit Hilfe eines Handmessgerätes ermittelt und bei zu starker und/ oder gleichverteilter Strahlungsintensität der Membran wurden weitere Waschschrine durchgeführt. Die Waschschrine wurden solange wiederholt, bis die Radioaktivität nicht mehr gleichmäßig über die Membran verteilt war. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie gewickelt, in eine Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie gelegt und für mehrere Stunden bis Wochen gegen einen Röntgenfilm bei RT oder bei -80°C exponiert.

Vorhybridisierungsgg.:	10	ml	1 M NaPO ₄	pH 6,5
	7	ml	20% SDS	
	3	ml	DEPC-dH ₂ O	
Hybridisierungsgg.:	2,5	ml	Formamid	
	1,25	ml	20 x SSPE	
	250	µl	1 M NaPO ₄	pH 6,5
	100	µl	radioaktive Probe	
	900	µl	DEPC-dH ₂ O	

4.3.7. Entfernung von Signalen auf Northern-Membranen

Um hybridisierte RNA-Sonden von einem Filter zu waschen, entweder um diesen für eine neue Sonde zu verwenden oder um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, wurde der Filter für 1 bis 2 h bei 65°C im Hybridisierungsofen mit 5 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM Na₂-EDTA und 0,1x Denhardt's gewaschen.

100 x Denhardt's-Lösung: je 2% Ficoll

Polyvinylpyrrolidon (PVP)
Rinderserumalbumin (BSA)
in dH₂O

4.3.8. RNaseH Northern

Das Enzym RNaseH schneidet nur den RNA-Strang von RNA-DNA-Duplexen. Damit ist es möglich, nach Hybridisierung von oligo(dT)-Primern an einen poly(A)-Schwanz diesen vom restlichen Transkript abzuschneiden und somit die Länge des Transkriptes ohne poly(A)-Schwanz auf einer Northern-Membran zu messen. Neben der RNaseH-Reaktion müssen als Kontrolle immer unbehandelte identische RNA-Proben parallel behandelt werden, denen statt RNaseH und oligo(dT) entsprechende Mengen an DEPC-dH₂O zugegeben werden. Die poly(A)-RNA-Isolierung erfolgte wie unter 5.3.1 beschrieben. Zu 20 µl poly(A)-RNA wurden folgende Reagenzien zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert: 4 µl 5x RnaseH-Puffer, 5 µl oligo(dT) (1µg/µl), 2 µl RNaseH (2 u/µl) und 9 µl DEPC-dH₂O. Die Reaktion wurde in Eiswasser abgestoppt und mit Phenol/Chloroform (1:1) für 5 min bei 12000 rpm extrahiert. Zum wässrigen Überstand kamen 80 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 600 µl 100% EtOH hinzu und es folgte eine 30 minütige Fällung bei -20°C. Die RNAs wurden durch 15 minütige Zentrifugation pelletiert und das Pellet wurde in 50 µl 0.3 M Natriumacetat +125 µl 100% EtOH gelöst und dann wie vorher gefällt. Das Pellet wurde in 20 µl DEPC-dH₂O aufgenommen und nach entsprechender Vorbereitung (siehe 5.3.3) auf ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen.

4.4. Proteinchemische Methoden

4.4.1. Fällung mit Trichloressigsäure

Zum Ausfällen von Proteinen aus Lösungen wurde Trichloressigsäure verwendet. Diese Fällung von Proteinen ist irreversibel, so dass sie nur zum Ankonzentrieren vor einer elektrophoretischen Auftrennung verwendet wurde. Trichloressigsäure wurde bis zu einer Endkonzentration von 10% zur Proteinlösung gegeben und diese für mindestens 30 min auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm und 4°C wurde der Überstand vollständig entfernt. Die gefällten Proteine wurden in Proteinauftragspuffer aufgenommen und die Lösung mit ein paar Krümeln Tris-Pulver neutralisiert.

4.4.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde in einem Gelelektrophoresesystem der Firma Hofer durchgeführt. Diese erlaubt eine Trennstrecke von ca. 13 cm, bei einer Geldicke von 1 mm. Vor dem Zusammenbau des Systems wurden die Glasplatten gründlich mit Seife gewaschen und mit Methanol behandelt, was ein späteres Ablösen des Gels von den Glasplatten erleichterte. Es wurde ein Gelsystem mit 5% Sammelgel und 8% oder 10% Trenngel verwendet. Das Trenngel bestand je nach Konzentration aus unterschiedlichen Zusammensetzungen von dH₂O, Acrylamid, SDS, Trenngelpuffer, TEMED und APS. Die Lösungen wurden zusammenpipettiert und zum Schluss APS und TEMED hinzugegeben. Das TEMED sorgte für die Quervernetzung der Gelmatrix, durch APS wurde die Polymerisation gestartet. Nach dem Gießen des Gels wurde die Oberfläche mit Isopropanol überschichtet, was zum einen für eine glatte Geloberfläche, zum anderen für den für die Polymerisation notwendigen Ausschluss von Sauerstoff sorgte. Nach der Polymerisation, die zwischen 30 und 60 min dauerte, wurde das Isopropanol vorsichtig entfernt und das Sammelgel gegossen. Das Sammelgel bestand aus 1,6 ml 40% Acrylamidlösung, 5 ml Sammelgelpuffer und 3,4 ml dH₂O, 5 µl TEMED und 33 µl APS (10%). Sofort nach dem Gießen wurde der Kamm so eingesetzt, dass zwischen Taschenboden und Trenngeloberfläche ein ca. 1 cm langes Sammelgel entstand. Die Polymerisation des Sammelgels dauerte ca. 30 min. Nach dem Entfernen des Kamms wurden die Taschen gründlich mit dH₂O gewaschen, um unpolymerisierte Gelreste zu entfernen. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer versetzt, dem pro 100 µl Puffer 5 µl β-Mercaptoethanol zugefügt wurde. Vor dem Auftrag wurden die Proben für 5 min im Wasserbad gekocht und dann in Eiswasser abgekühlt. Das Einlaufen der Proben ins Sammelgel erfolgte bei 25 mA, die Auftrennung im Trenngel bei 50 mA. Die Auftrennung erfolgte für 3 bis 4 Stunden bei 4°C.

Lösung:	8 % Trenngel	10 % Trenngel
Acrylamid (39:1)	6,6 ml	8,3 ml
Puffer	6,25 ml	6,25 ml
dH ₂ O	12,15 ml	10,45 ml
TEMED	12,5 µl	12,5 µl
APS-Lösung (10 %)	82,5 µl	82,5 µl

Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	0,25 M Tris pH 6,8
0,8% SDS	0,4% SDS

Laufpuffer:	Probenpuffer
0,025 M Tris pH 8,3	2 ml Sammelgelpuffer
0,192 M Glycin	1 ml Glycerin 50 %
0,1 % SDS	0,12 g SDS
	0,2% Bromphenolblau

4.4.3. Comassiefärbung

Nach dem Lauf wurde das Gel für 1 h bis ü.N. in Coomassie Brilliant blue G-250 Färbelösung (0,05% Coomassie, 50% Methanol, 10% Essigsäure) langsam geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte in Entfärbelösung (30% Methanol, 7% Essigsäure) für mehrere Stunden, unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung.

4.4.4. Silberfärbung

(Shevchenko *et al.*, 1996)

Diese Färbemethode stellt eine wesentlich empfindlichere Nachweismethode für Proteine dar. Da die Silberfärbung sehr sensitiv ist und auch das Keratin der Hautpartikel angefärbt wird, müssen bei diesem Versuch Handschuhe getragen werden. Mit Ausnahme der Färbung erfolgten alle Schritte auf dem Schüttler bei RT. Proteingele wurden zunächst in 50% Methanol und 5% Essigsäure für 20 min fixiert. Nach 10 min waschen mit 50% Methanol wurde für weitere 10 min mit dH₂O gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 0,02% Natrium-Thiosulfat für 1 min, das mit

zweimaligem Waschen für 1 min mit dH₂O entfernt wurde. Die Färbung erfolgte für 60 min bei 4°C mit 0,1% Silbernitrat. Überschüssiges Silbernitrat wurde durch 2 maliges Waschen mit dH₂O entfernt. Die Entwicklung erfolgte mit 0,04% Formaldehyd, 2% Natriumcarbonat. Bei diesem Schritt musste das Gel sehr intensiv geschüttelt werden und die Entwicklerlösung durch neue ersetzt werden, sobald sie sich verfärbte. Die Entwicklung wurde durch 5% Essigsäure abgestoppt. Die gefärbten Gele wurden in 1% Essigsäure im Kühlschrank gelagert.

4.4.5. "Semidry"- Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran

Die auf einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels eines "Semidry"-Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran (Optitran BA-S85, Schleicher & Schuell) übertragen. Dazu wurden 10 Whatman Filterpapierstücke zurechtgeschnitten, die etwa 1 cm größer als das Proteingel waren. Die Graphitplatten der Blot-Apparatur (Fast Blot, Biometra) wurden mit dH₂O befeuchtet. Auf die untere Platte kamen 5 mit Anodenpuffer angefeuchtete Filterpapierstücke. Das Gel wurde mit der Nitrozellulose-Membran von der Glasplatte der Gelapparatur abgenommen und mit der Membran nach unten auf die mit Anodenpuffer angefeuchteten Filterpapiere gelegt. Auf das Gel wurden nun 5 mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere gegeben. Der angefeuchtete Deckel der Apparatur wurde aufgesetzt und der Blot erfolgte für 1 bis 2 h bei 10 W und 0,8 mA pro cm² Gel.

Anodenp.:	200 mM	Tris/HCl	Kathodenp.:	25 mM	Tris/HCl
		pH 10,4			pH 9,4
	20%	Methanol		40 mM	ε-Aminocaprinsäure
				20%	Methanol

4.4.6. Ponceau S-Färbung

Mit dieser reversiblen Färbung kann die Effektivität des Transfers und das Auftreten möglicher Transferstörungen überprüft werden. Die Membran wurde für 2 min mit Ponceau Lösung (5% (w/v) Ponceau-S in 1% Essigsäure) geschwenkt und dann mehrmals mit dH₂O gewaschen, um den Hintergrund zu entfernen. Die Entfärbung erfolgte für mehrere Minuten mit 0,1 M NaOH.

4.4.7. Antikörpernachweis mittels Chemilumineszenz

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran für 1 h in Blockierlösung gewaschen und dann mit dem 1. Antikörper (1:5) in 10 ml Blockierlösung in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Antikörper wurde durch Waschen für eine Stunde bei dreimaligem Wechseln des Waschpuffers entfernt. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei RT mit dem 2. Antikörper (1:5000) in 10 ml Blockierlösung. Die Membran wurde für 4 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen und danach mit Filterpapier trockengetupft. Zum Nachweis des Antikörpers wurde die Membran für eine Minute mit 9,2 ml H₂O + 0,4 ml LUMIGLO + 0,4 ml H₂O₂ in Plastikfolie eingeschweißt und unter schütteln inkubiert. Die Membran wurde kurz mit Filterpapier trockengetupft und dann für 10 s bis 1 h gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Blockierlsg.:

1 x TBS
pH 7,5
5 % Magermilchpulver
0,1 % Tween 20

Waschpuffer:

1 x TBS
pH 7,5
0,1 % Tween 20

10 X TBS: 1,4 M NaCl, 0,2 M Tris pH 7,6

4.4.8. Expression von rekombinanten Proteinen

Zur Erzeugung eines Orb2-Antikörpers und für Shift-Experimente sollte ein rekombinantes Orb2-Protein erzeugt werden. Dabei wurden zwei verschiedene Expressionssysteme verwendet, das pET-System (Novagen) und das pBAD-System (Invitrogen). Für die Proteinexpression von Orb2 im pET41a-Vektor wurde das komplette offene Leseraster ohne Rasterverschiebung inkloniert. Der pET41a-Vektor erzeugt an dem Fusionsprotein mehrere Anhänge (sog. Tags), durch die eine Aufreinigung und Detektion ermöglicht wird. Die Expression erfolgte im Expressionsstamm *E.coli* BL21DE3, bzw. in *E.coli* BL21DE3pLys-S. Für die Expression wurden frische Kolonien von Bakterien mit Vektor und offenem Leseraster von *orb2* und als Kontrolle Bakterien mit leerem Vektor gepickt und über Nacht in 2

ml LB_{Kan} bei 37°C geschüttelt. Die über Nacht gewachsenen Bakterien wurden, um Stoffwechselabbauprodukte zu entfernen, für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, in 1 ml frischem LB_{Kan}-Medium gelöst und dann in 24 ml LB-Medium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Dabei wurden pro Ansatz zwei Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden solange bei 37°C und 130 rpm geschüttelt, bis sie eine OD₅₅₀ von ca. 0,6 aufwiesen. Je eine Kultur mit leerem Vektor und eine mit Vektor und offenem Leseraster von *orb2* wurden mit 1 mM IPTG induziert, die restlichen Kulturen dienten als Kontrolle für die Effizienz der Expression. Die Kulturen wurden für weitere 4 h bei 37°C geschüttelt und dann auf Eis auf 4°C abgekühlt. Die Zellen wurden in SS34-Zentrifugenröhren überführt und für 10 min bei 12000 rpm pelletiert. Die Bakterienpellets wurden getrocknet und dann bei -80°C ü.N. tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Pellets in 2 ml kaltem Lysepuffer aufgenommen. Das Lysat wurde für 60 min auf einem Schüttler inkubiert und nachfolgend 4 x 10 s mit Ultraschall behandelt, wobei sie zwischen den einzelnen Ultraschallbehandlungen auf Eis gekühlt wurden. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 12000 rpm befand sich im Überstand die lösliche und im Pellet die unlösliche Proteinfraction. Ein Aliquot der löslichen Fraction wurde direkt auf ein SDS-PAGE aufgetragen; die unlösliche Fraction wurde in 500 µl Lysepuffer mit 8 M Harnstoff durch abwechselnde Ultraschallbehandlungen und extensives Vortexen solange behandelt, bis sie gelöst vorlag und danach für 90 min bei 60°C inkubiert. Ein Aliquot wurde auf eine SDS PAGE aufgetragen.

Lysepuffer:	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
	100 mM	NaCl
	10 mg/ml	Lysozym
Lysepuffer mit Harnstoff:	100 mM	Na ₂ HPO ₄
	10 mM	Tris/HCl pH 8.0
	8 M	Harnstoff

Für die Expression im pBAD-Vektorsystem in *E.coli* LMB194 wurden von folgenden Transformationen Übernachtkulturen angesetzt: Komplettes offenes Leseraster von *orb2* in pBADHisA, pBADHisA leerer Vektor und als Kontrolle pBADLacZ. Für diese Kulturen wurden je 2 ml LB_{amp} mit eine Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C und

130 rpm inkubiert. 7 Reagenzgläser (RG) wurden mit 10 ml LB_{amp} befüllt und fünf mit je 100 µl mit orb2 in pBADHisA angeimpft. Die anderen beiden RG wurden mit je 100 µl *E.coli* LMG194 mit leerem Vektor und mit pBADLacZ angeimpft. Bei einer OD₅₅₀ von 0,6 wurde von jedem Ansatz je ein Aliquot entnommen (1 ml) und die Expression induziert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgt beim pBAD-Vektor-System mit Arabinose. Zu den fünf Ansätzen mit dem offenen Leserahmen von orb2 wurden unterschiedliche Konzentrationen von Arabinose gegeben (0,002%, 0,02%, 0,2%, 2% und 20%). Die Bakterien mit leerem Vektor und mit der *lacZ*-Kontrolle wurden mit 2% Arabinose induziert. Die Expression wurde nach 4 h bis 20 h beendet und die Bakterien pelletiert. Der Aufschluss und der Auftrag erfolgte wie oben beschrieben.

4.4.9. Enterokinasebehandlung des Fusionsproteins

Das unlösliche Fusionsprotein in 100 µl Lysepuffer mit 8 M Harnstoff wird mit 300 µl Wasch/Bind-Puffer auf eine Harnstoffkonzentration von 2 M verdünnt. Zu 200 µl verdünnte Proteinlösung werden 5 µl rekombinante Enterokinase (rEK; 1,7 u/µl), 25 µl 10 x rEK-Puffer und 20 µl dH₂O gegeben. Die Inkubation erfolgt für 16 h bei RT auf einem Laborshaker. Nach der Behandlung erfolgt eine Aufreinigung des geschnittenen Fusionsproteins mit Histidin-Magnetpartikeln.

4.4.10. Bindung von Fusionsprotein an S-Tag Agarose

S-Tag-Agarose wurde durch Invertieren resuspendiert und mit 4 M Harnstoff auf 2 M Harnstoff eingestellt. Das in 2 M Harnstoff gelöste Fusionsprotein wurde auf die Agarose gegeben und für 30 min bei RT auf dem Orbital Shaker inkubiert. Die Agarose wurde mit einer Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand abgenommen. Es folgten drei Waschschrte mit 1x Wasch-/Bind-Puffer. Die Elution des Fusionsproteins von der Agarose erfolgte durch Schneiden mit rekombinanter Enterokinase. Dazu wurde zu der S-tag-Agarose in 2 ml 1x Wasch-/Bind-Puffer 10 units rekombinante Enterokinase gegeben und 16 h bei RT auf Orbital Shaker inkubiert. Zum Entfernen der rekombinanten Enterokinase wurde EKapture Agarose hinzugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Agarose pelletiert und der Überstand abgenommen.

4.4.11. Aufreinigung des Fusionsproteins an Magne His Magnetpartikel

Die geladenen Nickelpartikel des Magne His Protein Purification Systems (Promega) ermöglichen die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen, die einen Polyhistidinanteil enthalten. Die Magnetpartikel wurden gründlich gemischt und pro Ansatz wurden je 30 µl in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach 30 s Inkubation auf einem Magnetständer wurde der Überstand entfernt und 250 µl Proteinlösung (nativ oder denaturiert) mit Fusionsprotein durch 10 maliges Auf und Ab pipettieren mit den Magnetpartikeln gemischt. Nach einer 2 minütigen Inkubation bei RT wurden die Magnetpartikel für 30s an den Magnetständer gebunden. Der Überstand wurde abgezogen und die Magnetpartikel mit gebundenem rekombinanten Protein mit 150 µl Wasch-/Bind-Puffer gewaschen. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt und gebundene Proteine wurden durch zweimalige Elution mit 50 µl Elutionspuffer gelöst.

Wasch-/Bind-Puffer: 100 mM HEPES
 10 mM Imidazol
 (8 M Urea, nur bei denaturierenden
 Bedingungen)

Elutionspuffer: 100 mM HEPES
 500 mM Imidazol
 (8 M Urea, nur bei denaturierenden
 Bedingungen)

4.4.12. Proteinexpression im Retikulozythenlysat

Für die Expression kleinerer Mengen an Fusionsprotein wurde ein gekoppeltes Transkriptions- und Translations-System im Retikulozytenlysat (TNT Quick Master Mix, Promega) verwendet. Der Ansatz: 35 µl Mastermix, 1 µl Methionin (kalt oder heiß), 2 µl DNA-Template, 7 µl dH₂O wurde für 60 bis 90 min bei 30°C im Wärmeschrank inkubiert. Ein Aliquot wurde zur Überprüfung auf ein 8 % SDS-PAGE aufgetragen.

4.4.13. Formaldehyd-Crosslink

Zur Gewinnung von RNA-Protein-Komplexen aus Geweben wurden diese vor der Präparation mit Formaldehyd reversibel quervernetzt. Formaldehyd kann sowohl RNA-Protein und DNA-Protein als auch Protein-Protein-Komplexe vernetzen. Die Organe werden in PBS präpariert und für 20 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS auf einem Drehrad fixiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS werden die Organe bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

4.4.14. Proteinextraktion aus *Drosophila*-Gewebe

Für die Gewinnung von Proteinen aus *Drosophila*-Hodengewebe werden Hoden in PBS präpariert und in Proteinextraktionspuffer I auf Eis überführt. Je 200 Hoden wurden in 50 µl Proteinextraktionspuffer gesammelt und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Proteinextraktionspuffer I:	100 mM	HEPES pH 7,9
	50 mM	KCl
	1 mM	EDTA
	20 %	Glycerin (v/v)
	1 %	NP-40

Vor der Verwendung werden Protease Inhibitoren aus Stocklösungen hinzugegeben.

1 mM	PMSF (in Isopropanol)
0,5 µg/ml	Leupeptin (in dH ₂ O)
1 µg/ml	Pepstatin (in Methanol)

4.4.15. Co-Immunpräzipitation (Co-IP) mit ganzen Tieren zur Isolierung gebundener Proteine

Um mögliche Interaktionspartner von Orb2 zu finden, wurde ein Co-Immunpräzipitations-Experiment durchgeführt, bei dem unter Verwendung eines GFP-Antikörpers, das *orb2*-GFP-Fusionsprotein mit interagierenden Proteinen und gebundenen mRNAs präzipitiert werden sollte. Für dieses Experiment wurden Fliegen verwendet, die sowohl homozygot für das *orb2*-Jump out Allel (*orb2*^{Jo10}), als

auch homozygot für das 4,5 kb lange *orb2*-GFP-Rettungskonstrukt sind. Da diese Fliegen fertil waren, muß das GFP-Fusionsprotein funktionell sein. Männchen die das Jump out-Allel tragen, sind nämlich normalerweise steril. Für dieses Experiment wurden ca. 6700 Männchen der Linie 18.2/18.2; *orb2*^{Jo10}/*orb2*^{Jo10} verwendet. Die Fliegen dieser Linie wurden in Flaschen angezogen, 5-10 Tage alte Männchen gesammelt und zu je 200 Tieren für mehrere Tage in Röhrchen mit Hefe angefüttert. Die Tiere wurden mit CO₂ betäubt, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die gesammelten Fliegen wurden zu je 1000 Tieren in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben und mit 2-4 ml flüssigem Stickstoff so lange kräftig geschüttelt, bis der Stickstoff komplett verdampft war. Durch das Schütteln wurden Köpfe, Flügel, Halteren und Beine von Thorax / Abdomen abgetrennt. Beine und Flügel blieben an den Seiten des Falconröhrchens hängen, Thorax/Abdomen wurden von den Köpfen durch Sieben durch ein Haushaltssieb getrennt. Die Thorakal- und die Abdominalbereiche der Fliegen wurden zu je 2000 in einem MikroDismembrator (Braun Melsungen) mit kleinen Stahlkugeln für ca. 15 s zerkleinert und mit ca. 5 ml Proteinextraktionspuffer II in ein 20 ml Falconröhrchen überführt. Die gesamten zerkleinerten Thorakal- und Abdominalbereiche der 6700 Fliegen wurden in 8 ml Puffer aufgenommen und für je 3 x 15 min bei 4000 rpm in einem schwenkbaren Rotor zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Dabei wurde der Überstand jeweils in ein frisches Falconröhrchen pipettiert und die Pellets bei -20°C eingefroren. Zum Überstand wurden 100 µl ProteinA-Sepharose (Slurry; 0,25 g/ ml) gegeben und 2 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert, um unspezifisch bindende Proteine aus der Lösung zu entfernen. Die Sepharose wurde für 15 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und verworfen. Zum Überstand wurden 5 µl GFP-Antikörper (0,5mg/ml, Abcam, Cambridge UK) gegeben und alles über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Zum Protein-Antikörpermischung wurden 150 µl ProteinA-Sepharose gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die ProteinA-Sepharose wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm vom Überstand getrennt, der Überstand verworfen und die Sepharose mit 1 ml Proteinextraktionspuffer II in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml Proteinextraktionspuffer II wurden 50 µl Protein-auftragspuffer auf die Sepharose gegeben und gebundene Proteine bei 70°C eluiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und bis zum Auf-

trag bei -20°C eingefroren. Die eluierten Proteine wurden auf einem vorgefertigten Polyacrylamidgel (Gradientengel: NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen) aufgetrennt, prominente Banden ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut. Die Proben wurden mittels Massenspektrometrie (nano ESI-MS/MS, ULTIMATE nanoLC, 4000QTRAP, Applied Biosystems/MDS SCIEX) untersucht.

Proteinextraktionspuffer II:	100 mM	HEPES pH 7,9
	50 mM	KCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	20 %	Glycerin
	0,5 mM	DTT
	1 mM	PMSF
	0,5 µg/µl	Leupeptin
	1 µg/µl	Pepstatin

4.4.16. Co-Immunpräzipitation mit Hoden zur Isolierung mit Orb2 gebundener Proteine

Für dieses Experiment wurde als Ausgangsmaterial die gleiche Fliegenlinie verwendet, wie bei dem CoIP-Experiment mit ganzen Fliegen. 2000 Hoden wurden mit Hilfe einer abgeschnittenen blauen Spitze in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in 400 µl Proteinextraktionspuffer II vereinigt. Die Hoden wurden mit einem Pistill zermörsert und dann für 2x 20 s mit Ultraschall behandelt. Nach der Zugabe von 500 µl Proteinextraktionspuffer II wurde das Lysat für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert, um so unlösliche Zellbestandteile zu entfernen. Um Proteine zu beseitigen, die unspezifisch an ProteinA-Sepharose binden, wurde das Lysat vor der Zugabe von GFP-Antikörper auf 100 µl ProteinA-Sepharose (Slurry) gegeben und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde in 5 min bei 5000 rpm pelletiert. Zum Überstand wurden 5 µl GFP-Antikörper (Abcam, Cambridge UK) gegeben und das Gemisch wurde über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl ProteinA-Sepharose (Slurry) wurde die Lösung eine weitere Nacht bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Der GFP-Protein-Sepharosekomplex wurde 6 x mit Proteinextraktionspuffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Nach

dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig abgezogen und gebundene Proteine wurden mit 40 µl Proteinauftragspuffer für 10 min bei 70°C eluiert. Die eluierten Proteine wurden auf einem vorgefertigten SDS-PAGE (Gradientengel: NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, Invitrogen) aufgetrennt, prominente Banden ausgeschnitten und mit massenspektrometrischen Methoden (nano ESI-MS/MS, ULTIMATE nanoLC, 4000QTRAP, Applied Biosystems/MDS SCIEX) untersucht.

4.4.17. Co-Immunpräzipitation zur Isolierung von Orb2 gebundenen mRNAs

Für die Isolierung von mRNAs aus RNA-Proteinkomplexen des *Drosophila*-Hodengewebes wurden ca. 2000 Hoden in PBS präpariert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Co-Immunpräzipitation erfolgte bis zum 6. Waschschrift, wie oben beschrieben. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Proteinextraktionspuffer vollständig entfernt und die Sepharose in 150 µl Lyse-Bindungspuffer (s. 5.3.1) gelöst. Nach 10 min bei 70°C auf dem Heizblock wurde die Sepharose für 4 min bei 4000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde auf 200 µl oligo d(T) gekoppelte Magnetbeads gegeben und zur Bindung der mRNAs für 5 min auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Nach Konzentration der Magnetpartikel im Magnethalter wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Der Überstand sollte das CPEB-GFP-Fusionsprotein sowie interagierende Proteine enthalten. Die Beads wurden 2 x mit Waschpuffer mit LiDS und 1 x mit Waschpuffer ohne LiDS gewaschen. Die Elution der gebundenen mRNAs erfolgte mit 20 µl 2mM EDTA bei 65°C im Heizblock. Die eluierte mRNA wurde bis zur weiteren Verwendung ebenfalls bei -20°C gelagert.

4.5. P-Element-vermittelte Keimbahntransformation

(Spradling & Rubin, 1982)

Für die Keimbahntransformation wurde ein DNA-Gemisch aus P-Konstrukt und Helferplasmid in den Hinterpol von jungen Embryonen, die noch keine Polzellen abgeschnürt haben, injiziert. Das Gemisch wird nach der Injektion zufällig in die entstehenden Urkeimzellen eingeschlossen und das P-Konstrukt kann durch die Transposase, die vom Helferplasmid geliefert wird, in die Chromosomen integrieren.

Diese Integration erfolgt zufällig und die Lokalisation auf den Chromosomen wurde durch anschließende Kreuzungen bestimmt. Das Helferplasmid ist nicht in der Lage, in die Chromosomen zu integrieren und dünnt im Laufe der Zellteilungen aus.

4.5.1. Ernte von Embryonen

Für die Keimbahninjektion wurden Fliegen der Linie w^{1118} zwei bis vier Tage vor der Injektion auf mit Hefe bestreute frische Flaschen gegeben. Am Tag der Injektion wurden die Fliegen in leere, mit Luftlöchern versehene Zuchtflaschen geschüttelt und auf frisch hergestellte Apfelsaftagarplatten mit Hefe aufgesetzt. Da die Eiablage bevorzugt im Dunkeln stattfindet, wurden die Gefäße abgedeckt. Die Apfelsaftagarplatten wurden alle 15 min erneuert. Die ersten drei Ernten wurden verworfen, weil sie mit älteren Embryonalstadien kontaminiert waren. Die Embryonen wurden mit Hilfe eines Skalpell von den Platten abgenommen und in 50% Klorix in dH_2O für ca. 2-3 min bei Binokularkontrolle vom Chorion befreit. Nach mehrmaligem Spülen mit dH_2O wurden die Embryonen mit Hilfe einer Präpariernadel auf einem Agarblock mit dem Hinterpol in jeweils dieselbe Richtung parallel ausgerichtet. Die Embryonen wurden auf ein mit Klebstoff versehenes Deckgläschen überführt (Klebstoff mit Heptan aus Paketklebeband von Tesa gelöst), für ca. 2-3 min unter der Lampe eines Mikroskops getrocknet und anschließend mit Voltalef 10S-Öl (elf atochem) überschichtet.

Apfelsaftagar für ca. 20 Platten (Durchmesser 6 cm): 200 ml dH_2O , 7,3 g Agar-Agar, 67 ml Apfelsaft und 3,2 g Zucker. Agar-Agar wurde in Wasser in der Mikrowelle gelöst, Apfelsaft und Zucker hinzugeben und dann in Petrischalen gegossen.

4.5.2. Vorbereitung der DNA und Injektion

Vor der Injektion wurde die DNA durch eine Plasmidpräparation (Quiagen) gereinigt. 25 μg der Konstrukt-DNA wurden mit 5 μg Helferplasmid gemischt und zur Entfernung von Verunreinigungen mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und dann einer Ethanol-fällung unterzogen. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 μl dH_2O aufgenommen. Bis zur Verwendung wurde die Probe bei $-20^\circ C$ gelagert. Vor der Injektion wurde die Lösung für 30 min bei 12000 rpm

zentrifugiert, um eventuelle Verunreinigungen zu pelletieren. Von der Oberfläche der Lösung wurden 5 μ l abgenommen und in eine vorher vorbereitete Glasnadel (Glaskapillare mit Wärme und Zugkraft zur Nadel ausgezogen) übertragen. Die Mikroinjektion erfolgte mit einem Transjektor (Femto Jet, Eppendorf), dessen Pumpe mit einem Nadelhalter verbunden ist. Das Deckgläschen mit den Embryonen wurde auf einen Objektträger gelegt und dieser im Mikroskop eingespannt. Die DNA wurde in den Hinterpol des Embryos injiziert. Nach der Injektion wurden die Embryonen mit den Deckgläschen in ein Wägeschälchen gelegt und mit 3S-Voltaleföl (elf atochem) soweit überschichtet, dass die Embryonen bedeckt waren. Die Wägeschälchen wurden in Feuchtkammern gestellt und nach zwei Tagen bei 18°C konnten die frisch geschlüpften Larven abgesammelt und in Nährbrei überführt werden.

4.5.3. Etablierung transgener Linien

Von den geschlüpften Tieren aus der Injektion wurden Einzelpaarzuchten angesetzt. Dazu wurden sie je nach Geschlecht einzeln mit w^{1118} -Männchen oder -Jungfrauen verpaart. Die transgenen Tiere unter deren Nachkommen konnten anhand ihrer rötlichen Augenfarbe erkannt werden. Die Augenfarbe transgener Tiere reichte von hellgelb bis dunkelrot. Transgene Tiere wurden einzeln mit w^{1118} -Männchen oder – Jungfrauen verpaart. Nachkommen dieser Tiere wurden mit Geschwistern gekreuzt, um einen Stamm zu etablieren. Zur chromosomalen Lokalisation der Integration wurden die Tiere mit sogenannten Balancerlinien gekreuzt. Diese enthalten chromosomale Inversionen, wodurch lebensfähige Rekombinationen verhindert werden. Zudem tragen diese Chromosomen rezessiv (homozygot) letale, phänotypisch dominante Markergene.

4.6. Histochemische Nachweismethoden

4.6.1. *In situ*-Hybridisierung

Für die Markierung einer RNA-Sonde wurde ein auf Digoxigenin beruhendes Nachweissystem verwendet. Digoxigenin ist ein Cardenolid-Steroid, welches nur im Fingerhut vorkommt und sich aufgrund geringer Hintergrundreaktionen besonders gut für die *in situ*-Hybridisierung eignet. Um Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurden als Template für die Sonden DNA-Fragmente ohne Vektorsequenzen eingesetzt. Das Klenow-Fragment baut während der Neusynthese eines DNA-Stranges DIG-gekoppelte Nukleotide ein, die nach der Hybridisierung mit Nukleinsäuren im Gewebe, unter Verwendung eines Alkalische-Phosphatase-konjugierten anti-Digoxigenin-Antikörpers nachgewiesen werden können.

Die Synthese der DIG-markierten Sonde erfolgt mit einem DIG DNA-Labeling und Detection Kit (Roche) nach den Angaben des Herstellers.

4.6.2. Whole mount *in situ*-Hybridisierung von Organen

(Tautz und Pfeiffle, 1989)

Mit dieser Methode ist es möglich, die Lokalisation von mRNAs direkt im Gewebe nachzuweisen. Organe wurden in PBS präpariert und auf Eis in PBS gesammelt. Durch eine 20 min Behandlung mit 4% Paraformaldehyd in PBS wurden die Organe fixiert. Dieser Schritt und die nachfolgenden Waschschriffe erfolgten falls nicht anders beschrieben, in einem Volumen von 500 µl auf einem Drehrad bei RT. Das Formaldehyd wurde durch zweimaliges Spülen, Waschen für 5 min und nochmaligem Spülen mit PBT entfernt. Damit die Gewebe durchlässiger werden für die Digoxigenin markierte Sonde, wurden sie für 1-4 min mit 2,5 µl Proteinase K (20 mg/ml PBT; Roche) behandelt. Die Behandlung wurde durch 2 mal 1 min Waschen mit Glycin/PBT (2mg/ml) beendet. Nach zweimaligem Spülen mit PBT wurden die Organe für weitere 20 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS nachfixiert. Die nachfolgenden Waschschriffe mit PBT erfolgten wie nach der Fixierung beschrieben. Durch 5 min Waschen mit HS/PBT (250µl; 1:1) und zweimaliges Spülen mit 250 µl HS wurden die Organe aufgepuffert. Es folgte eine einstündige Vorhybridisierung in 500 µl HS für 1 h bei 49°C im Wasserbad. Die Digoxigenin markierte Sonde wurde

15 min in 20-30 µl HS gekocht und danach sofort in Eiswasser abgekühlt. Die Lösung HS wurde über den Organen entfernt, die denaturierte Sonde hinzugegeben und über Nacht bei 49°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde vorsichtig entfernt und für eine mögliche weitere Hybridisierung bei -20°C eingefroren. Die Organe wurden für 5 min und dann für 15 min mit 500 µl vorgewärmter HS bei 49°C im Wasserbad gewaschen und dann durch eine Verdünnungsreihe mit 70%, 50%, 30% HB in PBT für jeweils 5 min Inkubation auf dem Drehrad bei RT umgepuffert. Nach zweimaligem Spülen und dreimaligem Waschen für 5, 10 und 15 min mit 1 ml PBT wurden die Präparate für den DIG-Nachweis für 2 h bei RT mit in PBT, verdünnten mit alkalischer Phosphatase gekoppelten α -Digoxigenin-Fab-Fragmenten (1:2000 in PBT) auf dem Drehrad inkubiert. Der Antikörper wurde zuvor für 2 h bei RT auf 50 fixierten Organen in 1:1000 Verdünnung präabsorbiert. Der Antikörper wurde entfernt und die vorhergehenden Waschschrte mit PBT wurden wiederholt. Nach Spülen und einmal Waschen mit Färbelösung wurde zum letzten Spülschritt 20 µl NBT/BCIP-Stocklösung in 1 ml Färbelösung gegeben und die Organe wurden damit und mit einer abgeschnittenen blauen Spitze (1ml) in eine 16 Well-Zellkulturschale überführt. Die Färbung erfolgte für 30 min bis über Nacht bei 37°C im Dunkeln und wurde durch mehrmaliges Spülen mit PBT abgestoppt. Mikroskopiert wurde in PBS oder 50% Glycerin in PBS.

PBT: PBS + 0,1% Tween 20 , pH 7, 4
 Glycin: 100 mg/ml in PB T
 Heparin: 5 mg/ml

HS:	50 %	Formamid	HB:	50 %	Formamid
	5 x	SSC		5 x	SSC
	100 µg/ml	tRNA			
	50 µg/ml	Heparin			
	0,1 %	Tween 20			

Färbelsg.:	100 mM	Tris, pH 9,5
	50 mM	MgCl ₂
	100 mM	NaCl
	0,1 %	Tween 20

4.6.3. X-Gal-Färbung von Organen

(Glaser *et al.*, 1986)

Die Organe wurden in pBS präpariert, in 20 Well-Zellkulturschalen überführt und 15 min bei RT in Lösung I fixiert. Nach kurzem spülen mit Lösung II wurden die Organe bei 37°C im Dunkeln in Lösung III gefärbt. Die Färbung wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS abgestoppt. Die gefärbten Organe wurden in PBS mikroskopiert.

PBS:	10 mM	Na-Phosphat pH 7.0
	150 mM	NaCl
	1 mM	MgCl ₂
Lösung I:	0,25 %	Glutaraldehyd in PBS
Lösung II:	3,3 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆]
	3,3 mM	K ₄ [Fe(CN) ₆] in PBS
Lösung III:	3,3 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆]
	3,3 mM	K ₄ [Fe(CN) ₆]x 3H ₂ O
	0,2 %	X-Gal in Dimethylformamid
	0,1 %	Triton X-100 in PBS

4.6.4. Hoechst / Phalloidin-Färbung von Hodengewebe

Um einige Vorgänge der Spermatogenese besser beobachten zu können, wurden *Drosophila melanogaster*-Hoden mit Reagenzien gefärbt, mit denen man DNA und F-Aktin nachweisen kann. Dazu wurden die Hoden in PBS präpariert und für 20 min mit 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Das Formaldehyd wurde durch dreimaliges Waschen für 10 min mit PBT entfernt. Die Färbung erfolgte mit 1 µg/ml Hoechst 33258 und 0,25 µg/ml TRITC-gekoppeltem Phalloidin. Überschüssige Reagenzien wurden durch zweimaliges Waschen für jeweils 10 min mit PBT aus dem Gewebe

entfernt. Der letzte Waschschrift erfolgte dann für 10 min mit PBS. Die Hoden wurden in PBS mikroskopiert. Eine Aufbewahrung von gefärbten Organen erfolgte bei 4°C unter Ausschluss von Licht und kann über mehrere Tage erfolgen.

4.6.5. Antikörperfärbung an Hoden Quetschpräparaten

(Hime *et al.*, 1996)

Um einzelne Spermatogenesestadien besser dokumentieren zu können, wurden Quetschpräparate angefertigt, die mit einem Antikörper gegen Histone und Hoechst 33258 gefärbt werden. Dazu wurden Hodenschläuche adulter Fliegen in PBS präpariert und auf Vectabond-behandelte Objektträger überführt. Nach dem Auflegen des Deckgläschens wurde der Puffer unter dem Mikroskop mit Hilfe eines Filterpapiere vorsichtig entfernt, bis die Hodenschläuche aufplatzten und ihr Inhalt herausfloss. Der Objektträger wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und das Deckglas anschließend mit einer Rasierklinge abgesprengt. Die Präparate wurden nun für mindestens 10 min in gekühltem Ethanol (95%) entwässert und anschließend für höchstens 10 min in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Es folgten mehrere Waschschriffe: 2 x 15 min in PBSTD, mindestens 10 min in PBT und 30 min in PBT / 3% BSA. Der 1. Antikörper wurde in PBT / 3% BSA 1:1200 verdünnt (60µl) auf den Objektträger gegeben und ein Deckglas darüber gelegt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C. Für die Präabsorption des zweiten Antikörpers wurden 30 Hoden präpariert, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, 5 min in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und 3 x 5 min mit PBT gewaschen. Der 2. Antikörper wurde 1:200 verdünnt in PBT / 3% BSA hinzugegeben und für 1 h im Dunkeln bei RT auf einem Drehrad inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Deckgläschen von den Präparaten vorsichtig entfernt und die Präparate 4 x 15 min in PBS / 3% BSA in Färbetrögen gewaschen. 60 µl des präabsorbierten Antikörpers wurden auf die Objekte gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C im Dunkeln in einer feuchten Kammer. Das Deckglas wurde vorsichtig entfernt und die Präparate 3 x 15 min mit PBS / 3% BSA in Färbetrögen gewaschen. Zur Färbung der Kern-DNA wird 60 µl Hoechst 33258 (1µg/ml) auf die Objekte gegeben und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS / 3% BSA wurden die Objekte für 5 min im Dunkeln getrocknet und mit Permount blasenfrei eingedeckelt.

PBSTD:	0,9	ml	Triton X-100	
	0,9	g	Natriumdeoxycholat	
	ad	300	ml	dH ₂ O
PBT / 3% BSA:	4,5	g	BSA	ad 150 ml PBT
PBT:	0,5	ml	Tween 20	
	ad	500	ml	PBS

4.7. Verwendete Marker

1 kb DNA Leiter (Fermentas)

λ / Hind III (Fermentas)

peqGold IV (prestained Peqlab)

RNA-Sizer (0.2 – 10 kb Novagen)

5. Literatur

- Arama E., Agapite J. and Steller H. (2003): Caspase activity and a specific Cytochrome c are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell* 4: 687-697.
- Ayyar S., Jiang J., Collu A., White-Cooper H. and White R.A.H. (2003): *Drosophila* TGIF is essential for developmentally regulated transcription in spermatogenesis. *Development* 130: 2841-52.
- Bally-Cuif L., Schatz W.J. and Ho R.K. (1998): Characterization of the zebrafish ORB/CPEB-related RNA-binding protein and localisation of maternal components in the zebrafish oocyte. *Mech. Dev.* 77: 31-47.
- Barnard D.C., Cao Q. and Richter J.D. (2005): Differential phosphorylation controls Maskin association with eukaryotic translation initiation factor 4E and localisation on the mitotic apparatus. *Mol. Cell Biol.* 25: 7605-7615.
- Barnard D.C., Ryan K., Manley J.L. and Richter J.D. (2004): Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell* 119: 641-651.
- Bayaa M., Booth R.A., Sheng Y. and Liu X.J. (2000): The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8-10.
- Behura S.K. (2007): Insect microRNAs: Structure, function and evolution. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 3-9.
- Bernards A. and Settleman J. (2004): GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol.* 14: 377-385.
- Birnboim H.C. and Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.

- Braun R.E. (2001): Packaging paternal chromosomes with *protamine*.
Nature Genet. 28: 10-12.
- Bustelo X.R., Sauzeau V. and Berenjano I.M. (2007): GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo.
BioEssays 29: 356-370.
- Caldwell K.A and Handel M.A. (1991): *Protamine* transcript sharing among postmeiotic spermatids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2407-2411.
- Cao Q. and Richter J.D. (2002): Dissolution of the Maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation. EMBO J. 21: 3852-3862.
- Carrió M.M. and Villaverde A. (2001): Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. FEBS Letters 489: 29-33.
- Castagnetti S. and Ephrussi A. (2003): Orb and a long poly(A) tail are required for efficient *oskar* translation at the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. Development 130: 835-843.
- Chang, J.S., Tan L. and Schedl P. (1999): The *drosophila* CPEB homolog, Orb is required for Oskar protein expression in oocytes. Dev. Biol. 215: 91-106.
- Costa A., Wang Y., Dockendorff T.C., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Schedl P. and Jongens T.A. (2005): The *Drosophila* fragile X protein functions as a negative regulator in the *orb* autoregulatory pathway. Dev. Cell 8: 331-342.
- Dean K.A., Aggarwal A.K. and Wharton R. (2002): Translational repressors in *Drosophila*. Trends Genet. 18: 572-576.
- de Moor C.H. and Richter J.D. (1999): Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of *cyclin B1* mRNA. EMBO J. 18: 2294-2303.

- Dietzl G., Chen D., Schnorrer F., Su K.C., Barinova Y., Fellner M., Gasser B., Kinsey K., Oettel S., Scheiblauer S., Couto A., Marra V., Keleman K., Dickson B.J. (2007): A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* 448: 151-156.
- Du L. and Richer J.D. (2007): Activity-dependent polyadenylation in neurons. *RNA* 11: 1340-1347.
- Elbashir S.M., Lendeckel W. and Tuschl T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15: 188-200.
- Fabrizio J.J., Hime G., Lemmon S.K. and Bazinet C. (1998): Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125: 1833-1843.
- Fuller M.T. (1993): Spermatogenesis. In: Bate M., Martinez-Arias A. (Eds.), *The Development of Drosophila melanogaster*, Vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 71-147.
- Fuller M.T. (1998): Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9: 433-444.
- Gebauer F. and Richter J.D. (1996): Mouse cytoplasmic polyadenylation binding protein: An evolutionary conserved protein that interacts with the cytoplasmic polyadenylation elements of *c-mos* mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14602-14607.
- Ghosh-Roy A., Desai B.S. and Ray K. (2005): Dynein light chain 1 regulates dynamin-mediated F-actin assembly during sperm individualization in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell.* 16: 3107-3116.

- Giot L., Bader J.S., Brouwer C., Chaudhuri A., Kuang B., Li Y., Hao Y.L., Ooi C.E., Godwin B., Vitols E., Vijayadamodar G., Pochart P., Machineni H., Welsh M., Kong Y., Zerhusen B., Malcolm R., Varrone Z., Collis A., Minto M., Burgess S., McDaniel L., Stimpson E., Spriggs F., Williams J., Neurath K., Ioime N., Agee M., Voss E., Furtak K., Renzulli R., Aanensen N., Carrola S., Bickelhaupt E., Lazovatsky Y., DaSilva A., Zhong J., Stanyon C.A., Finley R.L. Jr, White K.P., Braverman M., Jarvie T., Gold S., Leach M., Knight J., Shimkets R.A., McKenna M.P., Chant J., Rothberg J.M. (2003): A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302: 1727-1736.
- Glaser R.L., Wolfner M.F. and Lis J.T. (1986): Spatial and temporal pattern of *hsp26* expression during normal development. *EMBO J.* 5: 747-754.
- Gould-Somero M. and Holland L. (1974): The timing of RNA synthesis for spermatogenesis in organ cultures of *Drosophila melanogaster* testes. *Wilhelm Roux` Arch.* 174: 133-148.
- Gray N.K. and Wickens M. (1998): Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 399-458.
- Groisman I., Huang Y.S., Mendez R., Cao Q. and Richter J.D. (2001): Translational control of embryonic cell division by CPEB and maskin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 66:345-51.
- Groisman I., Ivshina M., Marin V., Kennedy N.J., Davies R.J. and Richter J.D. (2006): Control of cellular senescence by CPEB. *Genes Dev.* 20: 2701-2712.
- Hackstein J.H. and Hochstenbach R. (1995): The elusive fertility genes of *Drosophila*: the ultimate haven for selfish genetic elements. *Trends Genet.* 11: 195-200.
- Hake L.E. and Richter J.D. (1994): CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* 79: 617-627.

- Hake L.E., Mendez R. and Richter J.D. (1998): Specificity of RNA binding by CPEB: requirement for RNA recognition motifs and a novel zinc finger. *Mol. Cell Biol.* 18: 685-693.
- Hardy R.W., Tokuyasu K.T., Lindsley D.L. and Garavito M.(1979): The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.* 69: 180-190.
- Hempel L.H., Rathke C., Jayaramaiah-Raja S. and 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_{II}80 cannonball while translational repression is achieved by distinct elements. *Dev. Dyn.* 235: 1053-1064.
- Hess O. (1976): Genetics of *Drosophila hydei Sturtevant*. In Novitsky E. and Ashburner M. (Hrsg.): The genetics and biology of *Drosophila*. Band 1c, S. 1342-1363. Academic Press, New York.
- Hewes R.S., Park D., Gauthier S.A., Schaefer A.M., Taghert P.H. (2003): The bHLH protein dimmed controls neuroendocrine cell differentiation in *Drosophila*. *Development* 130: 1771-1781.
- Hicks J.L., Deng W.-M., Rogat A.D. and Miller K.G. (1999): Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell* 10: 4341-4353.
- Hime G.R., Brill J.A., and Fuller M.T. (1996): Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. *J. Cell Sci.* 109: 2779-2788.
- Hinnebusch A.G. (2006): eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem. Sci.* 31: 553-562.

- Hackstein J.H. and Hochstenbach R. (1995): The elusive fertility genes of *Drosophila*: the ultimate haven for selfish genetic elements. Trends Genet. 11: 195-200.
- Huang Y.S., Jung M.Y., Sarkissian M. and Richter J.D. (2002): N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and α CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. EMBO J. 21: 2139-2148.
- Huang Y.S., Carson J.H., Bararese E, and Richter J.D. (2003): Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. Genes Dev. 17: 638-653.
- Huang Y.S., Kan M.C., Lin C.L. and Richter J.D. (2006): CPEB3 and CPEB4 in neurons: analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. EMBO J. 25: 4865-4876.
- Huh J.R., Vernooy S.Y., Ju H., Yan N., Shi Y., Guo M. and Hay B.A. (2004): Multiple apoptotic caspase cascades are required in nonapoptotic roles for *Drosophila* spermatid individualization. Plos Biology 2: 0043-0053.
- Izquierdo M. and Bishop J.O. (1979): An analysis of cytoplasmic RNA populations in *Drosophila melanogaster*. Biochem. Genet. 17: 473-497.
- Jayaramaiah Raja S. and Renkawitz-Pohl R. (2005): Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. Mol. Cell Biol. 25: 6165-6177.
- Jia S. and Meng A. (2007): Tob Genes in Development and Homeostasis. Dev. Dyn. 236: 913-921.
- Jiang S.Y. And Ramachandran S. (2006): Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their activating proteins in eukaryotic genomes. Physiol. Genomics. 24: 235-251.

- Jiang J. and White-Cooper H. (2003): Transcriptional activation in *Drosophila* spermatogenesis involves the mutually dependent function of *aly* and a novel meiotic arrest gene *cookie monster*. *Development* 130: 563-573.
- Jowett T. (1986): Preparation of nucleic acids. In: Roberts D.B. (ed) *Drosophila. A practical approach*. IRL Press, Oxford, pp 275-286.
- Juge F., Zaessinger S., Temme C., Wahle E. and Simonelig M. (2002): Control of poly(A) polymerase level is essential to cytoplasmic polyadenylation and early development in *Drosophila*. *EMBO J.* 21: 6603-6613.
- Jung A. (1998): Molekulargenetische Untersuchungen einer Enhancer-Trap Linie von *Drosophila*, die Expression in Cystenzellen aufweist. Dissertation Georg-August Universität Göttingen.
- Jung A., Hollmann M. and Schäfer M.A. (2007): The fatty acid elongase NOA is necessary for viability and has a somatic role in *Drosophila* sperm development. *J. Cell Sci.* 120: 2924-2934.
- Kashiwabara S., Noguchi J, Zhuang T., Ohmura K., Honda A., Sugiura S, Miyamoto, Takahashi S., Inoue K., Ogura A., Baba T. (2002): Regulation of spermatogenesis by testis-Specific, cytoplasmic poly(A) polymerase TPAP. *Science* 298:1999-2002.
- Kavi H.H., Fernandez H.R., Xie W. and Birchler J.A. (2005): RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Letters* 579: 5940-5949.
- Keady B.T., Kuo P., Martínez S.E., Yuan L. and Hake L.E. (2007): MAPK interacts with Xgef and is required for CPEB activation during meiosis in *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* 120: 1093-1103.
- Keleman K., Krüttner S., Alenius M and Dickson B.J. (2007): Function in the drosophila CPEB Orb2 in long-term courtship memory. *Nat Neurosci.* Oct 28; [Epub ahead of print].

- Kempe E., Muhs B. and Schäfer M. (1993): Gene regulation in *Drosophila* spermatogenesis: analysis of protein binding at the translational control element TCE. *Devel. Genet.* 14: 449-459.
- Keyes L.N. and Spradling A. (1997): The *drosophila* gene *fs(2)cup* interacts with *out* to define a cytoplasmic pathway required for the structure and function of germ-line chromosomes. *Development* 124: 1419-1431.
- Kiger A.A., Jones D.L. Schulz C., Rogers M.B. and Fuller M.T. (2001): Stem cell self-renewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue. *Science* 294: 2542-2545.
- Kierszenbaum A. (1994): Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocrin. Rev.* 15: 116-134.
- Kim J.H. and Richter J.D. (2006): Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol. Cell* 24: 173-183.
- Kuhn R., Schäfer U. and Schäfer M. (1988): Cis acting regions sufficient for Spermatocyte specific transcriptional and spermatid-specific translational control of the *Drosophila melanogaster* gene *mst(3)gl-9*. *EMBO J.* 7: 447-454.
- Kuhn R., Kuhn C., Börsch G., Glätzer K.H., Schäfer U. and Schäfer M. (1991): A cluster of four genes selectively expressed in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* 35: 143-151.
- Kurihara Y., Tokurik M., Myojin R., Hori T., Kuroiwa A., Matsuda Y., Sakura T., Kimura M., Hecht N.B. and Uesug S. (2003): CPEB2, A novel putative translational regulator in mouse haploid germ cells. *Biol. Reprod.* 69: 261-268.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

-
- Loveland K.L. and Hime G. (2005): TGF β superfamily members in spermatogenesis: setting the stage for fertility in mouse and *Drosophila*.
Cell Tissue Res. 322: 141-146.
- Lamont L.B. and Kimble J. (2007): Developmental expression of FOG-1/CPEB protein and its control in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germ line. Dev. Dyn. 236: 871-879.
- Lantz V., Ambrosio L. and Schedl P. (1992): The *Drosophila orb* gene is predicted to encode sex-specific germline RNA-binding proteins and has localized transcripts in ovaries and early embryos. Development 115: 75-88.
- Lantz V., Chang J.S., Horabin J.I., Bopp D. and Schedl P. (1994): The *Drosophila orb* RNA-binding protein is required for the formation of the egg chamber and establishment of polarity. Genes Dev. 8: 598-613.
- Lindsley D.L. and Tokuyasu, K.T. (1980): Spermatogenesis. In: Ashburner, M., Wright T.R.F. (Eds.), Genetics and Biology of *Drosophila*, vol 2d. Academic Press, New York, 225-294.
- Lindsley D.L. and Zimm G.G. (1992): Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Liu J. and Schwartz J.H. (2003): The cytoplasmic polyadenylation element binding protein and polyadenylation of messenger RNA in *Aplysia* neurons. Brain Res. 959: 68-76.
- Liu J., Hu J.-Y., Wu F., Schwartz J.H. and Schacher S. (2006): Two mRNA-binding proteins regulate the distribution of syntaxin mRNA in *Aplysia* sensory neurons. J. Neurosci. 10: 5204-5214.
- Luitjens C., Gallegos M., Kraemer B., Kimble J. and Wickens M. (2000): CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. Genes Dev. 14: 2596-2609.

- Löffler M., Knecht W., Rawls J., Ullrich A. and Dietz C. (2002): *Drosophila melanogaster* dihydroorotate dehydrogenase: the N-terminus is important for biological function *in vivo* but not for catalytic properties *in vitro*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1159-1169.
- Macdonald P.M. (2004): Translational control: A cup half full. *Curr. Biol.* 14: 282-283.
- McGrew L.L. and Richter J.D. (1990): Translational control by cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation: characterization of *cis* and *trans* elements and regulation by cyclin/MPF. *EMBO J.* 9: 3743-3751.
- Martínez A.E., Yuan L., Lacza C., Ransom H., Mahon G.M., Whitehead I.P. and Hake L.E. (2005): Xgef mediates early CPEB phosphorylation during *Xenopus* oocyte meiotic maturation. *Mol. Cell Biol.* 16: 1152-1164.
- Meijer H.A., Radford H.E., Wilson L.S., Lissenden S. and de Moor C. (2007): Translational control of *maskin* mRNA by its 3' untranslated region. *Biol. Cell* 99: 239-250.
- Meistrich M.L., Mohapatra B., Shirley C.R. and Zhao M. (2003): Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111: 483-488.
- Melton D.A., Krieg P.A., Rebagliati M.R., Maniatis T., Zinn K. and Green M.R. (1984): Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* 12: 7035-7055.
- Mendez R., Murthy K.G.K., Ryan K., Manley J.L. and Richter J.D. (2000): Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol. Cell* 6: 1253-1259.
- Mendez R. and Richter J.D. (2001): Translational control by CPEB: A means to the end. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 521-529.

- Misawa S. and Kumagai I. (1999): Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biopolymers* 51: 297-307.
- Minshall N. and Standart N. (2004): The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. *Nucl. Acids Res.* 32: 1325-1334.
- Minshall N., Thom G. and Standart N. (2001): A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *RNA* 7: 1728-1742.
- Morales J., Hiesinger P.R., Schroeder A.J., Kume K., Verstreken P., Jackson F.R., Nelson D.L. and Hassan B.A. (2002): *Drosophila* fragile X protein, DFXR, regulates neuronal morphology and function in the brain. *Neuron* 34: 961-972.
- Nakamura A., Amikura R., Hanyu K. and Kobayashi S. (2001): Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis *Development* 128: 3233-3242.
- Nakamura A., Sato K. and Hanyu-Nakamura K. (2004): *Drosophila* Cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates *oskar* mRNA translation in oogenesis. *Dev. Cell* 6: 69-78.
- Noguchi T. and Miller K.G. (2003): A role for actin dynamics in individualization during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 130: 1805-1816.
- O'Hare K. and Rubin G.M. (1983): Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* 34: 25-35.
- Olivieri G. and Olivieri A. (1965): Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 2: 366-380.

- Parker J.S. and Barford D. (2006): Argonaute: a scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends Biochem. Sci.* 31: 622-630.
- Pearson W.R., Wood, T., Zhang, Z. and Miller, W. (1997): Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* 46: 24-36.
- Penalva L.O. and Sanchez L. (2003): RNA-binding protein sex-lethal (Sxl) and control of *Drosophila* sex determination and dosage compensation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 343-359.
- Piccioni F., Zappavigna V., Verrotti A.C. (2005): A cup full of functions. *RNA Biol.* 2: 125-128.
- Pillai R.S., Bhattacharyya S.N., Artus C.G., Zoller T., Cougot N., Basyuk E., Bertrand E. and Filipowicz W. (2005): Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. *Science* 309: 1573-1576.
- Pirotta V. (1989): Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. In Rodriguez R.L. and Denhardt D.L. (Hrsg.): *Vectors, a survey of molecular cloning vectors and their uses*. S. 437-456. Butterworths, Boston.
- Proudfoot N.J. and Brownlee G.G. (1976): 3' non coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263: 211-214.
- Racki W.J. and Richter J.D. (2006): CPEB controls oocyte growth and follicle development in the mouse. *Development* 133: 4527-4537.
- Rasmusson K., Serr M., Gepner J., Gibbon I. and Hays T.S. (1994): A family of dynein genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* 5: 45-55.

- Rathke C., Baarends W.M., Raja S.J., Bartkuhn M., Renkawitz R. and Renkawitz-Pohl R. (2007): Transition from a nucleosome based to a protamine-based chromatin configuration during spermatogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 120: 1689-1700.
- Renkawitz-Pohl R., Hempel L., Hollmann M. and Schäfer M.A. (2005): Spermatogenesis. In L.I. Gilbert, K. Iatrou and S.S. Gill (Hrsg.): *Comprehensive Molecular Insect Science Band 1*, p 157-178. Elsevier BV.
- Richter J.D. (1999): Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 446-456.
- Richter J.D. (2007): CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* 32: 279-285.
- Robertson H.M., Preston C.R., Phillis R.W., Johnson-Schiltz D.M., Benz W.K. and Engels W.R. (1988): A stable genomic source of P-element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118: 461-470.
- Rogat A.D. and Miller K.G. (2002): A role for myosin VI in actin dynamics at sites of membrane remodeling during *Drosophila* spermatogenesis. *J. Cell. Sci.* 115: 4855-4865.
- Rouhana L. and Wickens M. (2007): Autoregulation of GLD-2 cytoplasmic poly(A) polymerase. *RNA* 13: 188-199.
- Rudolph R. and Lilie H. (1996): *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10: 49-56.
- Sambrook J., Fritsch E.E. and Maniatis T. (1989): *Molecular cloning; a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Press, New York.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

- Santel A., Winhauer T., Blümer N. and Renkawitz-Pohl R. (1997): The *Drosophila don juan (dj)* gene encodes a novel sperm specific protein component characterized by an unusual domain of repetitive amino acids. *Mech. Dev.* 64: 19-30.
- Schäfer C. (2003): Charakterisierung eines Gens, das einen potentiellen Interaktionspartner für FAN in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* kodiert. Diplomarbeit Universität Kassel.
- Schäfer M., Kuhn R., Bosse F. and Schäfer U. (1990): A conserved element in the leader mediates post-meiotic translation as well as cytoplasmic polyadenylation of a *Drosophila* spermatocyte mRNA. *EMBO J.* 9: 4519-4525.
- Schäfer M., Börsch D., Hülster A. and Schäfer U. (1993): Expression of a gene duplication encoding conserved sperm tail proteins is translationally regulated in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1708-1718.
- Schmidt A., Hollmann M., Schäfer U. (1996): A newly identified *Minute* locus, M(2)32D encodes the ribosomal protein L9 in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 251: 381-387.
- Schwarz D.S. and Zamore P.D. (2002): Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev.* 16: 1025-1031.
- Shevchenko A., Wilm M, Vorm O. and Mann M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.
- Spradling A.C. and Rubin G.M. (1982): Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218: 341-347.
- Stebbins-Boaz B., Hake L. and Richter J.D. (1996): CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of *cyclin*, *cdk2* and *c-mos* mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *EMBO J.* 15: 2582-2592.

- Stinski K. (2007): RNA-bindende Proteine in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit Universität Kassel.
- Tan L., Chang., Costa A. and Schedl P. (2001): An autoregulatory feedback loop directs the localized expression of the *Drosophila* CPEB protein Orb in the developing oocyte. *Development* 128: 1159-1169.
- Tates A.D. (1971): Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. An electron microscope study. Dissertation Rijksuniversiteit, Leiden.
- Tautz D. and Pfeiffle C. (1989): A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98: 81-85.
- Tay J. and Richter J.D. (2001): Germ cell differentiation and synaptonemal complex formation are disrupted in CPEB knockout mice. *Dev. Cell* 1: 201-213.
- Theis M., Si K. and Kandel E.R. (2003): Two previously undescribed members of the mouse CPEB family of genes and their inducible expression in the principal cell layers of the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9602-9607.
- Tian J., Kim S., Heilig E. and Ruderman J.V. (2000): Identification of XPR-1 a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 14358-14363.
- Tokuyasu, K.T. (1974): Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*, III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. *Exp. Cell Res.* 84: 239- 250.
- Tokuyasu, K.T., Peacock, W.J. and Hardy R.W. (1972): Dynamics in spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process. *Z. Zellforsch.* 124: 479-506.

- Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I. and Arakawa T. (2003): Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 28: 1-8.
- Tulina N., and Matunis E. (2001): Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling. *Science* 294: 2546-2549.
- Tuschl T. and Borkhardt A. (2002): Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv.* 2: 158-167.
- Weichenhan D. (1991): Fast recovery of DNA from agarose gels by centrifugation through blotting paper. *Trends Genet.* 7: 109.
- White-Cooper H., Schäfer M.A., Alphey L.S. and Fuller M.T. (1998): Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*. *Development* 125: 125-134.
- Wilczynska A., Aigueperse C., Kress M., Dautry F. and Weil D. (2005): The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J. Cell Sci.* 118: 981-992.
- Wienholds E. and Plasterk R.H.A. (2005): MicroRNA function in animal development. *FEBS Letters* 579: 5911-5922.
- Wilhelm J.E. and Smibert C.A. (2005): Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol. Cell* 97: 235-252.
- Wilusz J., Shenk T., Takagaki Y. and Manley J.L. (1990): A multicomponent complex is required for the AAUAAA-dependent cross-linking of a 64-kilodalton protein to polyadenylation substrates. *Mol. Cell Biol.* 10: 1244-1248.
- Wolfner M.F. (1997): Tokens of love: function and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 172-192.

- Yang J., Porter L. and Rawls J. (1995): Expression of the dihydroorotate dehydrogenase gene, *dhod*, during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* 246: 334-341.
- Yanicostas C. and 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. *Mol. Gen. Genet.* 224: 450-458.
- Zhang Y.Q., Matthies H.J., Mancuso J. & Andrews H.K., Woodruff E. 3rd, Friedmann D. and Broadie K. (2004): The *drosophila* fragile X-related gene regulates axoneme differentiation during spermatogenesis. *Dev. Biol.* 270: 290-307
- Zhong L. & Belote J.M. (2007): The testis-specific proteasome subunit Pro α 6T of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development* 134, 3517-3525.

6. Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-Phosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy DNA
Ci	Curie
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoIP	Co Immunpräzipitation
cpm	counts per minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxinukleotidtriphosphate
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N-,N-,N`-,N`-tetraessigsäure
ESI	Electrospray Injection
EST	expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
F-Aktin	filamentöses Aktin
g	Gramm

GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kac	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB _{amp}	Luria Bertani-Medium (mit Ampicillin)
LC	Liquid Chromatography
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinpropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NaAC	Natriumacetat
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschlorid
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pers.	persönliche Mitteilung
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rEK	rekombinante Enterokinase
RG	Reagenzgläser
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N-N-N`-N`-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u	units
u.a.	unter anderem
UAS	upstream activating sequence
ü.N.	über Nacht
usw.	und so weiter
UTP	Uridin-Triphosphat
UV	Ultraviolett(es Licht)
v/v	Volumen/Volumen
Vol.	Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

7. Anhang

7.1. Proteine aus den CoIP-Experimenten, die vermutlich an Regulationsmechanismen in der Spermatogenese beteiligt sind

Ergebnisse CoIP Hoden

Protein	MW (kDa)	Funktion	Bande	Score	Peptide
Growl (CG14648)	60, 59	RNA-binding	4	165	10
			10	169	7
			13	241	9
			19	334	12
Exuperantia (CG8994)	58	RNA-binding	8	119	3
			9	158	7
			14	391	14
			15	261	9
			16	337	12
Boule (CG4760)	20, 24	RNA binding	9	247	8
Modulo (CG2050)	60	DNA-RNA-binding	14	242	11
			15	247	7
			16	537	22
			19	102	4
Bellwether (CG3612)	59	spermatid development	15	805	36
			16	490	20
Purity of essence (CG14472)	590	spermatid development	28	99	5
Stretchin Mlck (CG18255)	85-1037	calmodulin-dependent protein kinase activity	2	68	16
			3	59	2
Rhinoceros (CG7036)		DNA binding	2	52	10
			5	66	10

Protein	MW (kDa)	Funktion	Bande	Score	Peptide
Elongation factor 1 α 48D(CG8280)	50	translation elongation factor activity	8	120	6
			9	197	12
			10	102	5
			11	120	8
			12	229	16
			13	218	19
			15	248	9
			16	119	5
Protein	MW (kDa)	Funktion	Bande	Score	Peptide
polyA-binding protein (CG5119)	70	poly(A) binding	13	171	8
			14	524	26
			15	296	10
			16	123	3

Ergebnisse CoIP Gesamttiere

Protein	MW (kDa)	Funktion	Bande	Score	Peptide
Bellwether (CG3612)	59	spermatid development	18	1641	104
			19	535	22
Futsch (CG34387)	592		2.5	51	9
			2.15	55	15
			2.16	52	18
			12	79	16
			15	39	13
			20	51	15
Stretchin Mlck (CG18255)	85-1037	calmodulin-dependent protein kinase activity	2.1	53	21
			2.15	49	3
			12	76	14
			13	66	12
			17	55	12
			19	89	17
			20	51	16
Rhinoceros (CG7036)	343, 347	DNA binding	2.5	60	13
			15	70	11
Bent (CG32019)	970-1000	protein serine/threonine kinase activity	2.7	52	14
			2.10	63	24
			13	48	20
			18	53	12
			20	58	15
Bruce (CG6303)	540	small protein conjugating enzyme activity	2.1	61	10
			13	51	9
Elongation factor 1 α 48D(CG8280)	50	translation elongation factor activity	2.8	73	3
			19	85	4
			20	673	39
Neural conserved at 73EF (CG11661)	87-113	oxoglutarate dehydrogenase	13	2157	146
			13	2068	140
			14	870	44

7.2. Ergebnisse des Co-Immünpräzipitationsexperimentes mit ganzen Tieren

Aufgeführt sind wegen der großen Datenmenge nur die jeweils 5 höchsten Treffer jeder analysierten Bande. Aus Platzgründen wurde die Schriftart Times New Roman verwendet.

Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
2.16	<i>Protein ejaculatory bulb II</i>	CG2665	-	Kein AT	159
	<i>oxen</i>	CG8765	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	Zwei bs	115
	<i>Neuropeptide-like precursor 2</i>	CG11051	neuropeptide hormone activity;	Kein AT	114
	-	CG14482	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity;	Kein AT	106
	-	CG14235	cytochrome-c oxidase activity;	Zwei ATs	105
2.15	-	CG11267	ATP binding	Kein AT	355
	<i>ATPase coupling factor 6</i>	CG4412	hydrogen-transporting ATP synthase activity, rotational mechanism	Kein AT	276
	-	CG9920	ATP binding	Mehrere AT	228
	-	CG7580	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity;	Zwei ATs	225
	-	CG32230	NADH dehydrogenase activity;	Kein AT	198
2.14	-	CG4692	hydrogen-exporting ATPase activity	AT und bs	249
	Ribosomal protein S15Aa	CG2033	structural constituent of ribosome	Ein AT	207
	-	CG10664	cytochrome-c oxidase activity;	Mehrere ATs	185
	<i>Ribosomal protein L23</i>	CG3661	nucleic acid binding	Mehrere ATs	181
	-	CG11151	estradiol 17-beta-dehydrogenase activity	Kein AT	130
2.13	<i>lethal (1) G0230</i>	CG2968	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism;	Kein AT	351
	Ribosomal protein S16	CG4046	structural constituent of ribosome	Kein AT	245
	<i>Ribosomal protein S14a</i>	CG1524	nucleic acid binding	Kein AT	213
	Ribosomal protein S15Aa	CG2033	structural constituent of ribosome	Ein AT	207
	-	CG17472	-	Kein AT	172
2.12	<i>Ribosomal protein S19a</i>	CG4464	nucleic acid binding	Kein AT	286
Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
	<i>ADP ribosylation factor 102F</i>	CG11027	GTP binding	Kein AT	197
	<i>Glycogenin</i>	CG9480	glycogenin glucosyltransferase activity;	Kein AT	194
	Ribosomal protein L12	CG3195	structural constituent of ribosome	Kein AT	1662

Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
2.7	<i>stress-sensitive B</i>	CG16944	ATP:ADP antiporter activity	Mehrere ATs	748
	<i>porin</i>	CG6647	voltage-gated ion channel activity	Mehrere ATs	624
	<i>ATP synthase-γ chain</i>	CG7610	hydrogen-transporting ATPase activity, rotational mechanism	Ein AT	604
	-	CG9090	phosphate transmembrane transporter activity	Kein AT	346
	-	CG7834	electron carrier activity;	Kein AT	333
2.6	acidic ribosomal protein P0	-	-	-	385
	ribosomal protein S3.e, cytosolic	-	-	-	364
	<i>Ribosomal protein S3A</i>	CG2168	nucleic acid binding	Kein AT	265
	<i>walrus</i>	CG8996	electron carrier activity	Ein AT	224
	<i>Ribosomal protein S3A</i>	CG2168	nucleic acid binding	Kein AT	221
2.5	<i>Protein ejaculatory bulb</i>	CG2668	structural molecule activity	Kein AT	362
	Ribosomal protein LP0	CG7490	structural constituent of ribosome	Zwei AT	272
	-	CG11876	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity	Mehrere ATs	263
	-	CG9914	structural molecule activity;	Kein AT	192
	-	CG7998	L-malate dehydrogenase activity	Ein AT	189
2.4	-	CG11876	transcription factor activity	Mehrere ATs	597
	<i>lethal (1) G0156</i>	CG12233	isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺) activity	AT und bs	475
	-	CG6439	isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺) activity;	Mehrere ATs	363
	<i>Protein ejaculatory bulb</i>	CG2668	structural molecule activity	Kein AT	309
	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 2	CG8893	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Ein AT	261
2.3	<i>lethal (1) G0334</i>	CG7010	pyruvate dehydrogenase (acetyl-transferring) activity	Kein AT	362
	<i>squid</i>	CG16901	mRNA binding	Zwei ATs	288
	<i>Protein ejaculatory bulb</i>	CG2668	structural molecule activity	Kein AT	152
	<i>Arginine kinase</i>	CG32031	arginine kinase activity	Mehrere ATs	140
	<i>Serine protease inhibitor 3</i>	CG9334	serine-type endopeptidase inhibitor activity	Mehrere ATs	138
2.2	-	CG4169	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	Mehrere ATs	568
	<i>Actin 42A</i>	CG1251	motor activity	ATs und bs	388
	<i>Aldolase</i>	CG6058	fructose-bisphosphate aldolase activity	Mehrere ATs	242
	-	CG5028	isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺) activity	Kein AT	212
	-	CG5214	acetyltransferase activity	Mehrere ATs	115

Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
2.1	-	CG11963	succinate-CoA ligase (ADP-forming) activity	Viele ATs	433
	<i>Thiolase</i>	CG4581	acetyl-CoA C-acyltransferase activity	Mehrere ATs	361
	Eukaryotic initiation factor 4a (eIF4a)	CG9075	mRNA binding	Viele ATs	350
	-	CG5214	acetyltransferase activity	Mehrere ATs	332
	-	CG6663	serine-type endopeptidase inhibitor activity	Ein AT	235
20	-	CG5214	acetyltransferase activity	Mehrere ATs	1092
Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
	<i>Elongation factor 1a48D</i>	CG8280	Regulation of translation	Kein AT	673
	-	CG3731	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	Viele ATs	476
	<i>Elongation factor 1a100E</i>	CG1873	GTPase activity translation elongation factor activity	Kein AT	439
	-	CG5261	protein binding	Mehrere ATs	230
19	<i>ATPsyn-β</i>	CG11154	nucleotide binding	Zwei ATs	1585
	-	CG7430	dihydropoyl dehydrogenase activity	Mehrere ATs	724
	-	CG7920	4-hydroxybutyrate CoA-transferase activity;	Viele ATs	599
	<i>bellwether</i>	CG3612	spermatid development	Mehrere ATs	535
	-	CG5261	dihydropoyllysine-residue acetyltransferase activity	Mehrere ATs	448
Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score	
18	<i>bellwether</i>	CG3612	spermatid development	Mehrere ATs	1641
	<i>Cytochrome P450-4g1</i>	CG3972	electron transporter activity	Keine ATs	646
	-	CG5261	dihydropoyllysine-residue acetyltransferase activity, protein binding	Mehrere ATs	584
	-	CG7430	<u>dihydropoyl dehydrogenase activity</u>	Mehrere ATs	362
	-	CG7910	fatty acid amide hydrolase activity	Mehrere ATs	75
17	Heat shock protein cognate 4	CG4264	ATPase activity	Mehrere ATs	800
	<i>lethal (2) k05713</i>	CG8256	glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity	Zwei ATs	430
	<i>Heat shock protein cognate 3</i>	CG4147	ATP binding	Mehrere ATs	403
	<i>Heat shock protein cognate 1</i>	CG8937	ATP binding	Viele ATs	270
	Tropomyosin 1	CG4898	actin binding	Kein AT	243

Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
16	lipophorin	-	lipid transporter activity	-	867
	<i>Cytochrome P450 reductase (Cpr)</i>	CG11567	NADPH-hemoprotein reductase activity	Ein AT	177
	-	CG6904	glycogen biosynthesis	Mehrere ATs	143
	-	CG6455	mitochondrial inner membrane F. nicht bekannt	Viele ATs	90
	<i>Tropomyosin 1(Tm1)</i>	CG4898	<u>actin binding</u>	Mehrere ATs	84
15	<i>Microtubule-associated protein 205</i>	CG1483	microtubule binding	Kein AT	824
	<i>Aconitase(Acon)</i>	CG9244	aconitate hydratase activity	Kein AT	683
	-	CG7470	delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase activity	Zwei AT	506
	-	CG4389	long-chain-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity	Zwei AT	399
	<i>Phosphofruktokinase(pfk)</i>	CG4001	6-phosphofruktokinase activity	Viele ATs	240
14	<i>Calcium ATPase at 60A</i>	CG3725	ATP binding;	Mehrere ATs	2074
	<i>Neural conserved at 73EF</i>	CG11661	oxoglutarate dehydrogenase	Mehrere ATs	870
	<i>Na pump alpha subunit (Atpa)</i>	CG5670	ATP binding;	Kein AT	323
	<i>Elongation factor 2b</i>	CG2238	GTP binding translation elongation factor activity	Mehrere ATs	266
	<i>alpha actinin</i>	CG4376	actin binding		225
13	<i>Neural conserved at 73EF</i>	CG11661	oxoglutarate dehydrogenase	3 ATs	2157
	-	CG11661	-		2068
	<i>Calcium ATPase at 60A</i>	CG3725	ATPase, E1-E2 type	Mehrere ATs	1073
	<i>Paramyosin 74kDa</i>	CG5939	cytoskeletal protein binding	Ein AT	150
	<i>Stretchin-Mlck</i>	CG18255	calcium- and calmodulin-dependent protein kinase activity	Ein AT	66
12	<i>Myosin heavy chain</i>	CG17927	cytoskeletal protein binding	Keine ATs	3269
	-	CG3523	fatty-acid synthase activity	Ein AT	451
	<i>futsch</i>	CG3064	nervous system development	Keine ATs	79
	<i>Stretchin-Mlck</i>	CG18255	ATP binding	Ein AT	76
	-	CG8929	-	Keine ATs	76
11	-	CG3523	fatty-acid synthase activity, cofactor binding	ein AT	2672
	Retinoid- and fatty-acid binding protein	CG11064	Wnt receptor signaling pathway; lipid transport;	kein AT	1566
	<i>Mhc</i>	CG17927	myosin heavy-chain	Kein AT	636
	<i>v(2)k05816</i>	CG3524	S-acetyltransferase activity	Ein AT	288
	-	CG11198	ATP binding; acetyl-CoA carboxylase activity	Drei AT	184
10	Lipophorin	-	Lipid Transport	-	2840
	-	CG3523	fatty-acid synthase activity,	ein AT	495

Bande	Name	CG	cofactor binding Funktion	Hoden ESTs	Score
	Su(var)2-HP2	CG12864	DNA binding	Keine AT	61
	<i>mRpL39</i>	-	mitochondrial large ribosomal subunit; threonine-tRNA ligase activity	Keine AT	59
	<i>trr</i>	CG3848	histone methylation; transcription coactivator activity	Keine AT	56

7.3. Ergebnisse des Co-Immunopräzipitationsexperimentes mit Hoden

Aufgeführt sind wegen der großen Datenmenge nur die jeweils 5 höchsten Treffer jeder analysierten Bande. Aus Platzgründen wurde die Schriftart Times New Roman verwendet.

Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
1	Cytochrome c oxidase subunit Va	CG14724	cytochrome-c oxidase activity	Zwei AT	320
	-	CG4847	cysteine-type peptidase activity; cathepsin K activity. proteolysis	ein AT	248
	Ribosomal protein LP2	CG4918	structural constituent of ribosome	ein AT	245
	Protein ejaculatory bulb II	CG2665	-	Kein AT	181
	Protein ejaculatory bulb	CG2668	structural molecule activity	Kein AT	170
2	-	CG31680	-	ein AT	405
	-	CG34051	-	-	353
	-	CG15394	-	-	280
	ocnus	CG7929	-	viele bs	275
	Ribosomal protein S15Aa	CG2033	structural constituent of ribosome; nucleic acid binding	ein AT	266
3	-	CG17472	-	-	537
	-	CG34051	-	-	346
	lethal (1) G0230	CG2968	hydrogen ion transporting ATP synthase activity	kein AT	327
	-	CG31680	-	ein AT	275
	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	sperm storage	mehrere AT	254
4	ADP ribosylation factor 79F	CG8385	GTP binding; GTPase activity	bs	540
	ADP ribosylation factor 102F	CG11027	NAD(P)+-protein-arginine ADP-ribosyltransferase activity; GTP binding	kein AT	508
	-	CG11037	trypsin activity	ein AT	300
	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	sperm storage; sperm displacement; mating plug formation	massig AT	275
	Pdsw	CG8844	NADH dehydrogenase	bs	202
5	Acp36DE	CG7157	hormone activity	viele AT	710
	Ribosomal protein L14	CG6253	translation; negative regulation of neuron apoptosis	kein AT	368
	ADP-ribosylation factor 102F	CG11027	NAD(P)+-protein-arginine ADP-ribosyltransferase activity; GTP binding	kein AT	348
	-	CG6888	thioredoxin peroxidase activity	ein AT	269
	spaghetti squash	CG3595	ATPase activity	kein AT	217
6	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	hormone activity	viele AT	739
	Oligomycin sensitivity-conferring protein	CG4307	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism	ein AT	633
	Glutathione S transferase D1	CG10045	glutathione transferase activity	bs	335

Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
6	Ribosomal protein S7	CG1883	structural constituent of ribosome; nucleic acid binding	zwei AT	309
	δ -coatomer protein	CG14813	-	mehrere AT	243
7	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	hormone activity; negative regulation of female receptivity	massig AT	636
	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	hormone activity; negative regulation of female receptivity	massig AT	598
	Ribosomal protein S9	CG3395	structural constituent of ribosome	mehrere AT	390
	ATP synthase, subunit d	CG6030	hydrogen-exporting ATPase activity	kein AT	354
	Rab-protein 1	CG3320	GTPase activity; ATP binding	kein AT	338
8	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	hormone activity; negative regulation of female receptivity	massig AT	836
	-	CG17242	serine-type endopeptidase activity	kein AT	500
	Accessory gland-specific peptide 26Aa	CG8982	sperm competition	bs	361
	Adenylate kinase-3	CG6612	adenylate kinase activity;	bs	291
	-	CG18067	-	kein AT	214
9	Vacuolar H ⁺ -ATPase 26kD E subunit	CG1088	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism	zwei AT	711
	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	sperm competition	massig AT	520
	lectin-29Ca	CG17799	galactose binding	-	393
	Accessory gland-specific peptide 26Aa	CG8982	sperm competition	bs	339
	-	CG17242	serine-type endopeptidase activity	kein AT	308
10	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	hormone activity; negative regulation of female receptivity	massig AT	872
	porin	CG6647	voltage-gated ion-selective channel acti	mehrere AT	808
	Adenine nucleotide translocase 2	CG1683	ATP:ADP antiporter activity; carrier activity	mehrere AT	745
	ATP synthase- γ chain	CG7610	hydrogen-exporting ATPase activity	mehrere AT	559
	lethal (2) 37Cc	CG10691	regulation of progression through cell cycle	mehrere AT	514
11	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	hormone activity; negative regulation of female receptivity	massig AT	1516
	Protein ejaculatory bulb	CG2668	structural molecule activity	kein AT	685
	lethal (1) G0156	CG12233	isocitrate dehydrogenase (NAD ⁺) activity	AT und bs	549
	Accessory gland-specific peptide 26Aa	CG8982	hormone activity; sperm competition	bs	441
	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 2	CG8893	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ein AT	386
12	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	hormone activity; negative regulation of female receptivity	massig AT	996
	Serine protease inhibitor 2	CG8137	hormone binding; serine-type endopeptidase	mehrere AT	915

Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
12	Actin-related protein 53D	CG5409	structural constituent of cytoskeleton	ein AT	717
	Actin 42A	CG12051	structural constituent of cytoskeleton; ATP binding	AT und bs	716
	-	CG12262	acyl-CoA dehydrogenase activity	kein AT	601
Nr	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
13	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1435
	Accessory gland-specific peptide 76A	CG3801	serine-type endopeptidase inhibitor activity	Kein AT	976
	-	CG6663	serine-type endopeptidase inhibitor activity	Ein AT	700
	-	CG17097	lipase activity; triacylglycerol lipase activity	AT und bs	472
	Protein ejaculatory bulb	CG2668	post-mating behavior	Kein AT	425
14	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1145
	β -Tubulin at 56D	CG9277	GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Ein AT	1103
	α -Tubulin at 84D	CG2512	structural constituent of cytoskeleton; GTP binding	Viele AT	917
	ATP synthase- β	CG11154	hydrogen-exporting ATPase activity,	zwei AT	819
	-	CG13340	leucyl aminopeptidase activity;	Massig AT	657
15	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1139
	-	CG4546	arginine kinase activity	Massig AT	935
	β -Tubulin at 56D	CG9277	GTP binding; structural constituent of cytoskeleton	Ein AT	
	bellwether	CG3612	hydrogen-exporting ATPase activity; spermatid development	Mehrere AT	805
	α -Tubulin at 85E	CG9476	GTP binding; tubulin binding	Mehrere AT	762
16	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1151
	Hsp60C	CG7235	ATPase activity,	Massig AT	952
	Putative Achaete Scute Target 1	CG6148	calcium ion binding	Mehrere AT	862
	-	CG17097	lipase activity; triacylglycerol lipase activity	AT und bs	844
	-	CG4434	dehydrogenase [NAD(P)+] activity	Massig AT	615
17	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1546
	hephaestus	CG31000	poly-pyrimidine tract binding	Ein AT	674
	Succinyl coenzyme A synthetase flavoprotein subunit	CG17246	succinate dehydrogenase (ubiquinone) activity	Mehrere AT	455

Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
17					
	-	CG17097	lipase activity	AT und bs	444
		CG5389	hydrogen-exporting ATPase activity	Ein AT	380
18	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1600
	-	G8036	transketolase activity	Mehrere AT	962
	-	CG5389	hydrogen-exporting ATPase activity	Kein AT	722
	Heat shock protein cognate 4	CG4264	ATPase activity	Mehrere AT	662
	Heat shock protein 68	CG5436	unfolded protein binding	Mehrere AT	497
19	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1870
	Heat shock protein cognate 4	CG4264	ATPase activity; unfolded protein binding	Massig AT	1181
	Heat shock protein cognate 3	CG4147	ATPase activity	Mehrere AT	770
	Trap1	CG3152	ATP binding;	Mehrere AT	634
	hephaestus	CG31000	poly-pyrimidine tract binding	Zwei AT	599
20	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	2051
	Heat shock protein 83	CG1242	ATPase activity	Mehrere AT	1713
	-	CG31872	triacylglycerol lipase activity	AT und bs	604
	Dynamamin related protein 1	CG3210	GTPase activity	Mehrere AT	485
	-	CG4389	long-chain-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity	Zwei AT	435
21	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1969
	Na pump α subunit	CG5670	sodium:potassium-exchanging ATPase activity	Kein AT	866
	Calcium ATPase at 60A	CG3725	calcium-transporting ATPase	Mehrere AT	807
	β -coatomer protein	CG6223	retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER	Mehrere AT	618
	Elongation factor 2b	CG2238	translation elongation factor activity	Mehrere AT	385
22	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	2219
	eIF3-S10	CG9805	translation initiation factor activity.	Mehrere AT	756
	midline fasciclin	CG3359	cell-cell adhesion	Mehrere AT	657
	-	CG32165	protein transporter activity	AT und bs	397
	-	CG17097	lipase activity; triacylglycerol lipase activity.	AT und bs	329

Bande	Name	CG	Funktion	Hoden ESTs	Score
23	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1650
	-	CG31872	triacylglycerol lipase activity	AT und bs	1083
	-	CG5366	transcription factor binding	Zwei AT	1010
	-	CG6071	membrane alanyl aminopeptidase activity	Kein AT	923
	-	CG17097	lipase activity; triacylglycerol lipase activity	AT und bs	690
24	Dodeca-satellite-binding protein 1	CG5170	single-stranded DNA binding	Kein AT	1530
	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	sperm displacement sperm storage	Nur ATs	1490
	Myosin heavy chain	CG17927	cytoskeletal protein binding	Kein AT	1228
	Neuroglian	CG1634	calcium ion binding	Ein AT	388
	Neurexin IV	CG6827	transmembrane receptor activity	Kein AT	328
25	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1567
	Clathrin heavy chain	CG9012	sperm individualization	Zwei AT	1564
	-	CG8683	binding	Zwei AT	570
	UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase	CG6850	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase activity	Kein AT	490
	Dodeca-satellite-binding protein 1	CG5170	single-stranded DNA binding	Kein AT	363
26	Myosin heavy chain	CG17927	structural constituent of muscle; ATPase activity	Kein AT	3493
	zipper	CG15792	ATPase activity,	mehrere AT	1994
	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1204
	-	CG32436	-	mehrere AT	333
	Protein ejaculatory bulb	CG2668	post-mating behavior	Kein AT	326
27	α Spectrin	CG1977	cytoskeletal protein binding; actin binding	Mehrere AT	2198
	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	1211
	β Spectrin	CG5870	cytoskeletal protein binding; actin binding;	Mehrere AT	1136
	Myosin heavy chain	CG17927	structural constituent of muscle; ATPase activity	Kein AT	821
	-	CG11198	acetyl-CoA carboxylase activity	Mehrere AT	811
28	Dynein heavy chain at 93AB	CG3723	ATPase activity	-	1122
	Accessory gland peptide 36DE	CG7157	negative regulation of female receptivity, post-mating; sperm storage	Massig AT	954
	Dynein heavy chain 64C	CG7507	ATPase activity	Mehrere AT	350
	Dynein heavy chain at 36C	CG5526	ATPase activity	Ein AT	316
	Dynein heavy chain at 62B	CG15804	motor activity; ATPase activity	Mehrere AT	225

7.4. Sequenzvergleich Orb2 Jo10 mit Wildtyp (Oregon R) Sequenz

```

          10      20      30      40      50      60
wt      ATTAAGCCTACAGTGCATCGCACGAAAGCAAAACAAGCGAGAATGATTGATTTTTTCGTCG
       .....
Jo10   ATTAAGCCTACAGTGCATCGCACGAAAGCAAAACAAGCGAGAATGATTGGTTTTTCGTCG
          10      20      30      40      50      60

          70      80      90      100
wt      TCGTCTTCGGGCGAGTGGCAGCTTCGTGGAAAAGCGGGCAGCA-----
       .....
Jo10   TCGTCTTCGGGCGAGTGGCAGCTTCGTGGAAAAGCGGGCAGCACATGATGAAATAACAT
          70      80      90      100      110      120

          110      120      130      140
wt      -----GTGAAAACCTTTTGGCATCACAGTCGTTGCTGACGAGCG
       .....
Jo1    GTTATTTTCATCATGGGGCAGCAGTGAAAACCTTTTGGCATCACAGTCGTTGCTGACGAGCG
          130      140      150      160      170      180

          150      160      170      180      190      200
wt      GAAGGGACCGCAGCTCGGGAAAATCAGGAAAGAAAACAACCGCTCAGGGCGCTCTCTTA
       .....
Jo10   GAAGGTACCGCAGCTCGGGAAAATCAGGAAAGAAAACAACCGCTCAGGGCGCTCTCTTA
          190      200      210      220      230      240
          Primer CP Jo-3

          210      220      230      240      250      260
wt      AATTTGAAAATTAATGCAACTAAATAGCGTAAATTAGTCAAAAGTGAAAATAGTTAAAA
       .....
Jo10   AATTTGAAAATTAATGCAACTAAATAGCGTAAATTAGTCAAAAGTGAAAATAGTTAAAA
          250      260      270      280      290

          270      280      290      300      310      320
wt      TCGTTTTATAACCAAAAATTACCAGTGAAAATCGCTTATTAGTGCTGTGTTAAATAAGT
       .....
Jo10   TCGTTTTATAACCAAAAATTACCAGTGAAAATCGCTTATTAGTGCTGTGTTAAATAAGT
          300      310      320      330      340      350

          330      340      350      360      370      380
wt      TACCGTTGTACGGAAGAGAGAATCGAGTGCAAAGGAATTTTCCTACGTCACAGGCTGTG
       .....
Jo10   TACCGTTGTACGGAAGAGAGAATCGAGTGCAAAGGAATTTTCCTACGTCACAGGCTGTG
          360      370      380      390      400      410

          390      400      410      420      430      440
wt      CGTTTTGTGTGAGTGTGCACCCCGGAAATGTAACACGCACACTGGCGCAGGAAAACTTG
       .....
Jo10   CGTTTTGTGTGAGTGTGCACCCCGGAAATGTAACACGCACACTGGCGCAGGAAAACTTG
          420      430      440      450      460      470

          450      460      470      480      490      500
wt      CACCTGAAAGTTTTTCGTGCTGTTTTCCATCTTCGTGCGCTCTCGGCATTCGACATAACAC
       .....
Jo10   CACCTGAAAGTTTTTCGTGCTGTTTTCCATCTTCGTGCGCTCTCGGCATTCGACATAACAC
          480      490      500      510      520      530

          510      520      530      540      550      560
wt      AAAAAAAAAATAAATTGAATAACGCAGCAAAGGTTAGTTATCCGCTATTTCAGTGCACCTG
       .....
Jo10   AAAAAAAAAATAAATTGAATAACGCAGCAAAGGTTAGTTATCCGCTATTTCAGTGCACCTG
          540      550      560      570      580      590

```


TTCCCCGTACGATTTATTTATTTTTAAACGCAATTACGTGCGGCTCTAGT
 GCTGCGATGGCAAATGAGAAAGGGGGGGGGGGGGTGTGTGCGGCGAA
 AAGTGGGCGTGTGGAGGAGGTGGAGGGGCTCGTTTTCCCCCTAACAAACACA
 CGCATGACGTTGACATTTTCGAAAACAGCAAGTGTTCAGGCCAAAAATATGA
 TCAACATATCGCCTGTCTACCTACCTACCTATATACCCGCTAACGTTTC
 GTCTTTCTACTTCACTATCTTTTCATGTGCCGCTGATTGATGTTTGGGAC
 ACTCGGATTCGATTGCGCGGCTCCACAACGATTCCGATTTCCACGTGCT
 CCAATTTTCACATTTTCCCATTTCCCCATTTCCCATGAAGGGCATCTAG
 GGCAGCAGCGAACTGAGGCGCAGCGGAGCCGCCAAGTGCAGCTGTAGA
 AAGTGTGGTGGCGGCCACTGGACTCGCTCAAGTTACCAAAGGGTAAGT
 GTCCACACCCGGAGATCTCGGCGGAATTTAACCTGCTCAAGTGGAAATCC
 CTTGGTGTACACAGTTAACTTAATGTGAAGATAAAATAAATCAATGCCCG
 GTTTGATTTCTCACGTTTGCAAATTGAACTTTTTCAAATGTCAACTAATC
 ATTTGTTACTTATTATATTGTCTAATCGTATCTTTGATTATATGTATTGT
 ATTATTTTCGCTTTTTGATCAAACCTGATTAAGTAATTGAATTTTTTTTT
 ATAACAAAATGGCACTCAAATGATTTTAAATGAGCAAGTTATCCAATTC
 CAAGACACGACCCCTTCTGTGAATTGCTTTTCGATTGCTGACAACCTAAC
 CCGTATTTTCCATTCAACAGCCAACAGTGCCACCAGCAGTGCCAGCGGCA
 GCAACAGCAACCTGTCCGTTTCGACTTCCGCGTCCGCATCCGCAGCCACA
 TCGCCTACATCGTCAGGAACTGCAGTGGGTGGCATTCTATCCGGTGCCCC
 AAAATCGCCACCTGGCCTGGGCAGCAGCACCCCGATCTCGGTGCGATTCA
 ATGCCAACGAGGAGTCCCTGGACGACATCCTACAGTCTTCCATCACAGC
 AAGCATAGTCCCAGTGGAGGAGCGAGTGGCGGGCGGAGATGCCTCGCCCAC
 ATCGAATCTGCTCGGGATGAAGAACAACGGGCTGGGATTGGTCGTGGGCA
 ACTGTGACTCCCTCTCCAGCAGTCCATCGCAGCCCCAGATGCATGCCGGA
 TCCGCATCCCTCTTCGGCGTAAGTAAAAAGTGCAGCAATAGTGAAATGCT
 GTCCAAGAAATAGGAAACGCCTATCTAAGTTATAGATATTATCTTTAAT
 TAACGCAGCATGGCAATTATTATTAGTTTCGTTGGGAGTCCGCTTTAATA
 GGTTACACGTGTTGGTATAGTCACAATAAACATATCTATCCAGCTATCA
 AATATGCTTATTTTGCAAATTATTTACGGCTAGCAGTTTCAAACATGCTT
 AAATAGCCATGACTATAGAAATTTTATTAAAGTACTTAAATACAAAATGAT
 TTTAGGTTTATAGAAATTTAATGAGGGAAAGAATTCTAGGTGATTCTTT
 GGACACTTCAAAGCCCATTTATGTGCTGTATAAAATCCAACCTGGAATGG
 ATAGGAAATTGTCTAATCTAGAGCCGTTGGCAGTGAACCTCAATACTTTGT
 TTATTTTCCGCACCGTTTCGCCCTCCCTGGGCCCCCTTATCATTTATCGA
 AACAGGCCGCCACAAATTATGATTTCATATTCATTGTCGCGAGTCCAAGT
 TTGTCGCAATTAACATAAATTGTACAGAACGCGCCGCTTTGTTCACTG
 ATCGTTGTCGGTTCGCCAATTAGCATTTCGCTGGCCAAATTAGTGGAACAC
 TTATCTTTTGATTTCTGTGTACGGCCACAAATAGTTTCACTTTTTGGCTG
 TCCGATTTTCGGATTTCGTATTCAGATTTCGATTTCAGATACAACGG
 GTACGGATGCGTTGGCTTCGCAGCGAACGTGCGGTGTGGCTATTTCCGGTG
 GTTTCCGGGGCGACATAAGTATGTGACTTTTGTGCAAGCGCAGAACATTT
 GCCAAAATTTGCAACAGATGTGCCGCTGGCGATTGCAAAATTCATTTGGC
 ATTATTACTCACTAATTGCAAAATGTTCTTTTTCGTTTCATCTCTGCCAATG
 ACGATGCCCCCCCCCAACAACCTGCAATGATGACGATGTGGATGCTTGA
 TATGAACACAGAACGACGAAGTTAGTCTGCGCAATAATTTTCATGCAAGCC
 GGTGTTTTCTTCAATCGAAAAAGGTGAGTGCCGAAATGTATAAACAATTT
 CCTGGGCGGATGATGTGTGTCCAAGTGTGTAGAGTTAAACAAGGAACCATC
 GTAACACTAATGTTGTTGTTGTTGTCATGCGAGCTAATACATATCCACACA
 CAAGATATATCCATAGTTCCATCCACACAAAACACCGGAAATACATGCAT
 TCGACACATTTGCTTAGTGACTCACAGAGCTTAGTGATCGCCTCGAAAGC
 CAATCCTACGAGTTAGTTGTATCTATCTATAGGGATGTTTTAATTTTAAA
 TCTCCTTGAATGAAATCTTTGCTCGTATGGAACTTTAAATTTGCGCGC
 AAAAATCTTTGTTCTGTGATATGATTTTATTTTCTAGAGTTGCCGCTTTG
 AAAACTGCAAGTTATCTGGAATATAGACGTAAGATTTTAGATTGCTAC
 ACATTTAAAAGCCTTATTTTGTGCAACCCACTTTCTTTGAAGTTTTTTTT
 TTGGCCCCAAGTTTCGTTGACCGTTGACAACAACAAATTAATTTGGCTGCAG
 TTTTGTGACTTTGATTTTGTTTATGCGCGCATATACACACATGAACATAC
 ATACATACATATGTATGTATGTATATCCTGCACCATTTCGTGCATTTTAA
 TGCACCTCCGGCTGCAGCCGGCGTGTGCCAATGGCCGTAAACTTGCCCGTC
 CGTCGGTCTACGCTTTTGTGCTTTTGTCACTGCACAACCTGCATTTGTTG
 TTGCTACTGCTGTTGTTGTTCTTGTGTTGGAGCATCTGTGGAGTGCACACTAG

CP-Prom-3 ↓

CTAAAGGATCTGAATCAGCAGCGGTGGTGGGTGCGCTTTGTTTATGCTGC
 CTTGCAATATGCAACATATATATACGTGTGTACCTTTTTCTTTCTTTTTT
 TTTATTTTGTATCCTCTGCCCGTCTGCAACTTTTCAAGTCAAGTGCCGCC
 CGTCTGGCCCAGTGGGCGGTGGTTTTGTTGTGGGTGGGTTTTGTCTGCAACG
 GGACATCAACGTACCAACGTTCCGCTCAAGTTCTGTTTCTGTCTGCTCT
 CCATTTCCATTTGCTTTTTTACCATTTCCCTCGCTCGCTTTTTAAATATTG
 AAAAAGGCAAGTCTAGCTGGGATTTTGTACCTGAGAAGAAGCTATTGCC
 ACCTTCAACCGTTTGACGTCAATTGCGCTTGCCTGATTGCTTTATTGATT
 TCCGTGAGCTGATATCGTATGCAAACACGTCTATAGCGTCTATTGGCGGT
 CTTGAAGAGCATTGGCTGTCCGATTTTCAATTTGGCCATCAATCAGAGT
 TGAATTTTTGTGTCGCTCGCTTTTCGACGACACTGTATTCATTCATTT
 CCGTTGCCTTTTTAATTAAGTTTCCGGGGGCTAATTGCATTTTATAATTG
 CATTTTTCAGCACTGCCTGGTGCCGTTATTATCGTATCCAAACCTCTCGT
 TTCGATGATGGTGTACTGACTAGTTGTGCTTGTCTTTTTGCTTTCCGTT
 GCTCTTGTACGCGTGCCCTTATCATTAGCTTACACACCACCACATCCA
 ACCATCCATCCAGTTAGCCACCCACGCAACCACCCACCGCTTTCCATGT
 TGTTGCCGCTTTTTTATCTATTTACACTTGTACACGTTTCTACATGTTTG CP-Prom-4 ↑
 TTATACACACATTTTCATCATCGTCATCAGCACCCGAGCATCATCATCAT CP-GFP-5 ↓
 CTGCAACAGCAGCAGCAACATCGGGCTGTGGATGCCACCTTAAGCCACCC
 ACTTACCAGCCCCCCCCCTACATTTTTCGCTATCGCCCCACCCCATCCAC
 CAGAGACACCCGAGGCCCCAGCAACGCAAGTTGTCTCGTCCGGCAGCGTT
 TTAATAAAAAATTTCCATGCAATTTTCATGTCTCGGTGGCCTTACAGTTG
 GGCATGCACTGCACTTGGCCCAATCAATTAGCATGAACGTGTCAAAGCAT
 CAACACTCACACACTTAAACACACACCCCAAGTATTGGCCAACAGTATGCG
 ACGGCAGCAGCAGCAGCAACAACAACAACAATAAAACGTAACGAA
 TTGATACACATTTGAACTATACACATAGTTTGTATTTTCTATTAGCGGACA
 TGTGTACTCGTTACCTCGTATTAACCCCTTGGCGCCACTGTGCCGCGCG
 ACTATTTTTGGTTGGCTTTTCAGTTGTTACTTTTTTCTAGACCAATGATTG
 TCTTTTTTTCGGTTTTTCGTTTTGTTTTCTCTGGGCAAATTTTTTGACTGCCT
 CGAAACGTTTTGTTGGTGTGCTAAGTGTGGATATTTTTCCCTTTTGTATTG
 AAAATCATCAAAATCAAAAAGGATACATACATATGTATATAAAGCA
 ATCGATCGTTTCGCGGGCACAGTGCTAAAACCGAACTAACAAATCCAAAA
 TATACTCAACTGCTGTGCCGATATAACTGCGCCTCTTTCAAAAAGATAAT
 ATGCTAAACCTTCGCCAAAAACAACAATAAAACCAAAAGCGCCAGC
 GTAACCTGAAATTTTCATTTTGTATTGGATGTGTGCCAAAGCCAAAGCCA
 CCAAGCCACCACAAAAGAAAAGAAAAAAGAAAACCACCAAGACAA
 AACTCGTTCCACCACCACCACCACCACCAATGCCACCCACACTATTTAC
 CACAGCAACAGTAATCCTACACCACAACCGCCAACAACAACAACAATAAT
 CGGAAAATTATATATATAACAATAATACCAAGCAACGTCGAGCATAA
 AGTTAAATTAAGGAGCAATTTAGGATATGAGAAGATAAGTTAGGATA
 GTTCGGATGGTTTAGGAATTTAAACAAATAAATAAATTTTACAATATTTT
 ATTGCGTTTTCTGTTAAACTGACATCATAGCAGTAGGCTTTAAGAATAAT
 GTAGTATATTATAGTAGCTTGTCTCATATTCGCATAAAGTCATTTCTAGTT CP-AS-1 ↓ CP-Exon-1d1 ↑
 AATGTTTCGACAAAACAATACCCAAAATTTTGTGTGTGATTGTGAGTGTC
 CGTAAAAATGTACAACAATTTGTTAATTTTCATGTAAGTTCCGCCACGAT CP-Exon-1d2 ↓
 TACTTTTCAGTTTTTCACTGTTTTGTTTTACAATACTTTTAAATTTTCGAAC
 GCCGGGCGGCAATGGGTTAAGCCTACACCTACACCTACACTAAACCGAAC
 CGAAACAATCCGAATCCGAAGCAAATCCTTGAACAATTTGCTCCTTTTTT
 CATAATGCAACAACACTATACAGACCTGAATCAATCAGAATCACAATATCA
 GTCCAAAATTAATAAATCATCCACTAAAATTTGCCAATGTTGTAAAAGCC
 TCTTCATCTTGTGTCCCTTCTTCTGAGTTGCGGTGGCCTGCCGAATC
 TCAATCTCAACAAGCCGCCCGAGCTCCACCAGCAACAGCATCAACAACAG
 CATCAGCAGCACCAGCAACATCAACAGCAGCAACAGCTCCATCAGCACCA CP-RNAi-1 ↓
 ACAGCAACTGTGCGCGAATCTGAGTGCCCTGCACCATCATCACCAGCAGC
 AGCAGCAGCTTCCGGAAAGCGGAGGATCACATAGCCCCCTCGTCCGCCGGT
 GGAGGAGGCGGAGGATCGCCGTACAACGGCTCTCAGGCGGGCTGCAGCAG
 CGGCGGCATCTCGCCATTCTCCCCAGATGGGCGTGTGCCCCAAATACC
 GTCGCAGCATATCTTTCCCATCAAGGGCAACTCGCCACAGCTATCTAT
 GGCAATATGCACATGGACGGCATGGGTAGTGGGCACATGAATATACCGAC
 ACTTTTCGATTGAAACGGTGGTGGTGGCGGATCTACTGGCATGGTCTCAG
 CCGGAGCAACTGGTGGCGGAGATGCGCCCTATTTGGGCAACAGCTATGGC
 AACATGATGACGTCCAATGGACAAATGCACCACGGTGGCGGCTTGGATAA

CTCACTGTGCGATTATATGCGCAACATGTCGCTGGGTGGAAATGGTGGTG
 GCGATGGCAGCAACAGCATGTCTTTAATGCAGGACAGGATGCGTGTGATG
 GGCGGTCCGAAGCATCTGAGCGAGGCCGATGCTATGGCCATAGCAGCCAG
 TGGAAATGATCCATCCGTCTACTTAAATGCCCTCAAAAATGGGTTCGCCAT CP-AS-2↑
 CGAGGCTCTCTCCACACTCGCCGCACTCACCCATCCAGGGCGGAAATGGA
 GGAAACGTGCGCGATGGCACGGCTCGCTTCTCCCGGAAGGTATTCGTTGG
 CGGTCTGCCACCGGACATCGATGAGGATGAGATTACCACTTCGTTTCGGC
 GCTTCGGGCCATTGGTCGTCGATTGGCCACACAAGGCGGAATCCAAGTCG
 TATTTTCCGCCCAAGGGATATGCCTTCTGCTGTTCCAGGACGAGAGCAG CP-RNAi-2↑
 TGTGCAGCAGCTAATTGACTCGTGCATCACGGATGAGGACAAGCTGTATC
 TATGCGTTTCTTCGCCGACGATCAAGGATAAAGCAGTGCAGATTTCGTCCT
 TGGCGCCTGGCCGATGCGGACTATGTGCTTGATGCTACCATGTCCTGGA
 CCCACGCAAAACGGTGTGTTGTTGGGCGGCGTGCACGTCCTCTGAAGGCCT CP-AS-3 ↓
 TCGAACTGGCAATGATCATGGATAGATTGTACGGTGGAGTATGCTATGCT
 GGAATTGACACCGATCCGGAATTAAGTATCCAAAGGGCGCTGGACGTGT
 GGCCTTCTCGAATCAGCAGAGCTACATAGCGGCCATCTCAGCCAGATTTG
 TGCAGCTGCAGCATGGCGATATAGACAAGCGGGTGGAGGTCAAGCCCTAT
 GTCCTGGACGATCAGATGTGCGACGAGTGCAGGGTGCAGCGTTGTGGTGG
 CAAGTTTGCGCCCTTCTTTTGCGCCAATGTCACCTGTCTGCAGTACTATT
 GCGAACACTGTTGGGCCGTATCCATTTCGCGACCTGGACGCGAATATCAC
 AAGCCGCTGGTCAAGGAGGGAGCCGACCGGCCGCGTGCAGTCCCCTTTTCG CP-GFP-4 ↑
 CTGGTGTAAACGGCGGCGCTGGTAGGCCGCGCTGCACGACGAGAGACGCC
 AACAGAGGGAGCAACGACACCGGTTGTTAAACGCAGCGCTGGCAGTGGCC
 AGAATCATAACAGAATCATCAGGATCGGGAGGAGTGCAGAAAGGAGCGGG
 AGTGGCAGCACTAGATGCCGCTGGCGGAGATGCGGATCGAAGGCGAAGAA
 TCTAGTAGATAACCATTAGAGACAACACACGCACCACCAACCCCACTCA
 CACACAACAGTCCGATACTATTCTCATAAGCAAAAAGACAATTGCCCGGGG
 GAATCACCCATTCCGAAGGGCAAGGTGCAAATACAACGGGAGCTGGACAA CP-AS-4 ↑
 AGGTGTCCCTTTGAATAGCCACCAGAGTCTACAGTTTTAGAGGCGAGAAA
 CGAAAGCAACATAGTTTTTTAGTTCTTATTTATTTCGGCAATCAGTTTTTTTT
 TTTTTGTTTCGCGCTTGCTAGTTTTACATTTGCTTAACCGAAATTTTAGT
 TTTGATTTTGCCTTCGATGCCTGCACAGTATTTTTTGTACTTTATATTTT
 TAGCAACATTTATGTTTGCTAATATGTTATTTAATCTCACAAAAGAAAAA
 AAAAAGGAA

Unterstrichen sind die Bereich an die die Primer hybridisieren. In rot und unterstrichen ist der Bereich, in dem in der P-Element-Linie BL12812 das P-Element integriert ist. In schwarz sind die Intronbereiche und in blau das Exon 1b dargestellt. Die Zahlen in den Klammern geben den Bereich der genomischen Sequenz an.

7.6. Lage der Primer, die für die Untersuchung des Proteins Tob verwendet wurden

TTTTTATTTCTGTATGTGTATATAGACACCTATGTAGGTAGGTGACTTGG Tob Prom-1 ↓
 GTTGGGGAATTGTGTGTTTTGTTTTTACACACAGTCTTTATGTTTAAAGTT
 GCACAAAACCTCAATAAATAAAGTACAATGCACTTTGAAAACCTGAAACATT
 GCTTTCATTGGGGCAGTAAACAGCGCTATATTGTTCTATATTGTTTCAAT Tob Prom-3 ↓
 TTTAATTAACCATCTATTTTACATCCATCTTTCAGGAGTTGACAGACATT
 TGGTTAAAGTGCAAGCCCAAACATTTCCCTGATTAATGGAAATGTTTTAA
 AAAAAAAGCGTGCTCGGGTTGCCAAATCAAAGAGAATCGACAGATGCAC
 CACCAAATAATACGAAAAACAACCAAAAACCGTGGCCAAATAAAAAGTCGA
 CAAGGAATAAAGACACATAAATAACACAAAATGTACATAATTTAATATTT
 GGATATGCCTTGTAATAACGACATAAATATTTAGAATCTAGGCAACTACG Tob Prom-4 ↓
 CTTAATACGACAGCTAGACAGGCAGGAGAAAACACATCTTTTCGAATAAC

AAACAAACACGACTCTCACTCCACTCGGTTAACTTCCACAAATACAGATA
ATCACAACACAGTGGAACTACTAAAACCTAACCACAAACAGAAACAACCTCCC
CCCACCAAAAACCTTAAACCACGTAAAACAATTTATACATAAATGTAACA Tob-1 ↓
GAAGGAAGCTAAACCACAAAAACAAGAAAAAACCAAAAAAAAAATAATA
ATAATATATATATATACTAAACAAAACCTAAACGAACGCATAAAGGGCA
CAAAGCCCACTTTTCCAAATTGCCGTCAATGTGTTGATGATCTACAGAA
ACCGTCTTTGAACGCTCTTAATCAGTAGGATATCGCCATAAACTGCACTC Exon 1
CCCAACGACAGGCAGCGATCCGGAACAGATCGGCTAACATAACCGGATT
CCGAGCCGGAGTCCGTGAAGCGAAAGTGATAAGGGTAAAGAACGAATACC
GAAAGTTTCGGCCGAGGATCAAGATGCATATTGAAATCCAGGTCGCCTT Tob Prom-2↑ *ORF-1*↓
GAACTTTGTATATCTATCTCTACAACAAGTTGCCGCGCAGACGTGTAA
ATATATTCCGGCAGGAGCTAGAGAAGGCCCTACGCGACAAGTTCCAGGAT
CCTGGTACCCAGAAAACCTTCAAGGTAAATGATCATCCCTGCAATGT Tob-5 ↑
ATGATACATATTCTAAAATACATTTTTTTTTCATATTTCATTTCTTATAGGG
ATCTGCCTATCGCTGCTTAAAGACCCGGGATCCCATTGATTTCGGTTTTGG
AAAGGGCGGCTAGAGAAAGTGGGGTCCCAATCGGCGATATCTAGAAAAC Exon 2
TTACCAATGAACTTTCCGTGTGGATAGATCCTGGGGAGGTCTCTTTTCG
CATTGGTGAAAAGGAGCGGTAAAGGTAACATTTATAGTATTTACCCCA Tob-2 ↑
ACAAAATCTGCATACATTTAAAGATTCCGCACTCTGTTAAACAATTTTAA
ACTCATATAATCTTAAAGTTTGGTCATCTTCTTCTATAACAATAATAAAA
CTTTCCATATTCAAGAAAATATCTTAATAGAATAGAATTAGAAATATTCT
ACCACTGGGTGTAATTTTTCAACGTTATATTGAAGTTTCTGAATTTGTTA
ATGGCATTAGCTTTAAAATGAGCGAGAACATCGCCATGCTGTATCAACCT
GTCTGAATAGACCGAAATAGCAATACTTGTGTTTGTGCAATGTCCGATT
GTCTTTGTATACAATGCTTATCAAATGCCGCTTTAGTCAGCGTTAAGG
TACACACACACACATTATTGATTATAATATTATATAAATTAATAAATTAT
ATTATATTATTTGATGTATCACACGTCCTGTGAATGTGATGTAATGTGAT
GTAATACCCCTTCTTTTCTAATCATCAGATTCTTTACACGGAAAAACAATG
AAAATCATGAGGACAGTCATTCTGCAGATCGCGAAGTCACCAAAATGTTT Tob-3 ↓
AACCCGGAGGCGCAATGCTTCCGACCCATCGACGCCGTTAATACCACCAT
GAACAATATGAGCCTGAGTCCCAAGGGGCATACCAATCAGGATCATCGC
CGCACTCGGCCGCGTCCAGTTCCGCCACCTACAAGGGCAGTCCGAACCGT Exon 3
ACGATCTCTGGCAGCTGCAGTTCCGTTTTCCGGAGCGGGATCTGGAACGGG
CTCTGGTTCTAGATCAGGATCCAATCATGCACCCGGTCCAGGTACCGCTC
CAGGTCCCCTTCCCGAAACGGTGCCACCGCCAATGCAGCTGCAGCGGCA
TTCATGCAACGCGGCCCGCCAGGCGCCATTAACATTACCCACGGCCACCTT
TGCGCAGACTAAATTTGGCAGCACCAAGCTGAAGACTAGCTCCAAGCGCA
CAAACAGGTAAATACTCTCACAACGATATCATAATCTTAGAAGAAAAAAA
ATTCAAATAAATGCAATAATAATAACATATTTCTGTCTCCTTTCTGTAC
TTCAGCAGCAGCGCCTATCGCATGTGCGCCACTGAGTTCTCCAACACTACAT
CAAACAGCGTGCAATGCAACAGCAGATGCATCATGGCCATGCAGTTGTCC Tob-6↓ AS-1↓
CGTCCGAGGATCATCGGTATCGGCAGCATATGGCGCATGGACGCCGTA
TCGCCTGCCCGTTCCCTATCGCCGAATCCCCTATCGCTGGCCGAAATCA
AAATCAGTCCGTATCGGGATCGTCCGCCGATTCTTACTATCCAAATA
TGCCGATCAATATGTATCCACAATATGGCAATCCACGCTGCCTCTTTGAG
TCGCACTTCTCTGCGGATGTTAGCAGCATGGGTCTGTATGTGAGCGGAAC
AGCTGGTGTGTCAGTACCCGCTGTCCGAAAGTGTGGCGCAATAAGTATA
GTACTTATCTGGAGCCGTGCTACTATGGCAATGGCCATGCCAATACCCAA
CAGCATTTCGAGCAACAGACTCGCGTCCGGAATGGATCGTCCAATAGTAG Exon 4
CGAAAGCTGCTTTGGTCTCAATGTGGACTGCGGTAGTGTGTTGCTCGAGG
ATTTCATCATCTCGTCATCTGCAGCAGCTGCTGCTGTGGCCGTTACCATT
GCCGGGACTCATCGGCAGAAAACAGTCTCTAAGTACACCCACCTTGGC
AGCCGTAAACGTAGGAAAAGCCACTAGTCCTCCTACCAACTCCACCAACA
ACAGTAGTAGCCATCCAATTAACAACAGGAACAACCGTCTCTCATCG
GGAAACGGAAACGGAAATGCAAACGCCAATGCGAACGGAAACAACGGTAA
CAATTCTAACAGCAATACTAAACTGATCGATGGCATAAGCTCCTTCTATG
GCACCGGATCATCGTATCAGCAACTATTGGTTGCCAACTAGAGTTTCTCTC
GAAGTCAATCACCGCAAAGAGAATCCACCATAGTTATGTAGATATAAAAA Tob-4↑ *ORF 2*↑
TATCAACCAAAAAAAAAAAGGAATATTATATTTCGTGGCATGGTTATGTAT
GAAATGCATTTACAGGCTTACTGGTCAAAACTCAATGAGCAATACGAATTG
TTATGCAGTTTTTCAGATTTTCGTGTATGTTTCCCGATAGGAACCGAAACAA
AGTGAATGGAGCTACTTTGGTGGAGTGGTTGATGTAGATATCATCGTTAC

CATTATAGGCAAGTTTTAATGAGGAAAGATAACATTAATAAATCAAGGACA
AACATTATTTGCCGCTTGGAAAGTTATGTAATAATGTTCTTGCGGATGT
GAGCAATTAAGTTGGATGCATATCTGCGCGGAGAATTGATTTCGATACGAT
GTTGACACGCTCACGATCAGACACACAAGGAAGGCACATAACCAGATGTA
CATGCATATGTGTTAAAAGCTGTATGCAGATGTATATACAGACATATATA
TATGTGTATGGATAGGGCCAATAAGTGCCATATGTGTGAGGCCCATTAAT
GTAGATATGTACGAGTTGTATATACATATATATATCAGCCACTAATAATA
TTTTATTTTGTAAACAAATTTTCGTGTAATCGCAAAGTGAAGTTTCCTTCT
GGTATCAAGCGCATGCATAGAAAAATTAACCTCAAAATATTGAGTGTAGCC
ATAGGCATGTACGAATGATACACTCTAATCAAAAACACACAAGCAAATAA
TGAAGATTTACCGAAGCAAACCAATAAGCAACAATAAATAATACCGCAA
AAATAAATATATGCAAAGAGAACAATATA

Unterstrichen sind die Bereiche, an die die Primer hybridisieren. Bei Überschneidungen von zwei Primern wurde die Sequenz des zweiten Primers und seine Bezeichnung zusätzlich kursiv dargestellt. Aus Darstellungsgründen wurde für die Sequenz und die Beschriftung die Schriftart Courier New gewählt.

7.7. Lage der Primer, die für die Untersuchung des Proteins Gap verwendet wurden

CCGACACAGAAGTACCGCATTTTCGTTGGTATTATTTTCACACCAACAATT
GGCGCGAAAGCCGTGCCAAAGCAGAGATGCGATAAAGAAGAGGAGTGCAG *Gap-Prom-1*
AGAGGCGGCAGTCTGTGGAGAAAACACCAGTGAATCGCACACAAGCGCGG
CGATTTCGAAAGCGGACGTGTGTGAAAATCCAGACCGCGGGTTTTTTAAAA
TTTTTTGTTTTATTTTTTCGCGTGCGGTGTGGGAGGGTGTACATCCAAA
AAACACAAAGCGACAGCAACAACAACCTCCGTTAATATTCTGGATCGGGCA
CACACGCACACAAACATAAAAAAACCGAAATATACACATGCTTGGCGGAG
TTCGTGATTTAAAAATAATACAAAACACCAGAATTAATATACGCGCACG
CACACACACACGCGTATGTAAGGTGCAAAATAAAGTTTTCTTTACTGGTTT
CTGGTGTAAACAACAACAAAAACATGAATAACTAAAGAAGAAAACCGAAA
ATATAAACGAAAAGAGGAGCCGCAAAAATGCCACTCAGCTGTTACGGCGA
AAAAACAGCGAAAACGCCAAAAACATCGAAAATCAGGTGTAGCGAGAGA
GGAAATATGGTGATTAAAACAAAGAGTGAATTTGAAACGAAATCGTTAA
AAATCAAATAATAACAATAACTACAACAAAGGCGGCGCAACCTGCTCTT
GAAATTGCCACAAATCTGTCTTTAATCTTTTGTTTTACAATAACCCCCAA
AATCGCCATAAGGCACAAGTGCAATAAAAAACCATAACAACAACAACA
GCAAGAACAACAACAATCAATATTCAAATTAAGCAGCAGCACCAACAACA *Gap-7*
ACAACCTCAACGAGCCGAGTCGATAAGCTAAACGATAAGTGCGAGAGCCAA
AAAGGGGAGAAGAGCGCTCGACAGAGAGCGCGGAGAGAAAAGCCGAGAG
AGTGAGAACACAGCATCCACCCAAACCAATCCACAAAATTACCACCCCC *Gap-Prom-2*
ACAAAATGGGACGTGGAACGTATTTAAGCCGGTCTCAACGATTTCTCTAC *Gap-ORF-1*
CCCAGCAGAATCGAAGGATGGCTGGATGTCTGCGAAACCGAGGGAGAACT
AACTCGCCTGATCAAGACGCTTCCCTGGGGTCTTTATACTGCGTGCTGC
AACAGGACGATCAGACATTCACCGCCTACTGCAGCGAGGAGATTTTCGCTA
GGCGATGTTTGTACGAGGACATTCGAAGGGTTTCGGTTGGACCGAGTTTCG
TCGTCTGCGAAGGCTTTGTGGGACGGACCGCCGACGTTGGTTCGAGGAAA
ACGAGGATTCAGATTCGTGTGTTGGGGGCGAGCGGCGGCATGAGTGGCATC
AACGACATCGTCTGAATACGACGCTCTACAGTGAAGTAGATACGTCCTA
TGAGAAGGCGTGCCGCGTGGATCAGCGCCACCACGCCCATTTTGGGCA
GCAAACAGCACCAGACGGAGCAATGCCACCTCGCGTTTCACCAACTTC
TTTTCCAAGAAATCCAATCTTTGAAGCGGACCAAGTCGGTGACCAAGCT
GGAGCGGACCAAGCGCGGATCCGGCGGACTGAGGGGCTCCCGCTCGCACG
AGAGTCTGCTGTCCAGTCACGCCGTATGTCACCATAGATCTCTCGTGC *Gap-8*
ACTGGGGCGGTGGGCGTGGCGCCCGTGCATCAGTCGGTTCTGGGACGTCG

TCACTGTTTTCCAGGTACGGGGCGGGCCTCGTGGCGAGCGGTACTIONACTCAT
 GCGGATCGCGCCAGGAGCGCGACCTTTGGATCTACTCGCTGCGCAAGTCG
 ATCGCTCCGAATGCAGAGCACACGCGTGCACGGACAACCTCGCTGAAGAT
 GTGGGTGTACGAGGCGAAAAATCTGCCGCCAAGAAGCGTTACTTTTTGCG
 AACTGCAATTGGACAAGACGCTGTACGGCCGGACTTCGGTGAAGCTGCAG
 ACGGATCTGCTGTTTTGGGGGGAGCACTTCGATTTCCCGACATAACCCGA
 GATTAATGTGATCACTGTTAACGTTTTCCGTGAGGTGGACAAGAAGAAGA
 AGCGGGACAATAACCAATTTGTGGGATCGGTGAAGATAACCCGTGCACGAT
 GTCACCTCCAGATTGCCCTGCGAACAATGGTATCCATACTGAGCGACAA
 GCGGGCGCAGTCTGGGCAGGACATCGGGCGGGCGGCAGTGGGTCCA
 AGGACAAGGAGCAATTGCCACGCTGAGGATCAAGTGTGTTTTCCAGAGC
 ACCGACATCCTGCCATCAATGTGTACGGCAACTTTTTGACGTACCTCAA
 GGAGAACTATAAGCGCGTGTGCGAGACCCTGGAGCCGGTATCGGAGTCA
 AGGCCAAGGAGGACATTGGACAGGCACTGGTGTCTGTATGCACGCACAG Gap-1 u. Gap-AS-1
 GGATTGGCGGGCGCCTTCCCTCACCGATGTGGTGGCCCTCGATCTGCTGCG Gap-RNAi-1 u. Gap-AS-3
 AGTTGGCGATCAGAGGCTTACGTTTCAAGGGCAACTCCTTGCCACCAAGA
 GCATGGAGGCATTCTCAAGCTGACGGGCGAACAGTATCTGCAGGACACA
 CTATCCGCACCAATAAACGAGCTAATTCAGTCGGAGAGGGACTGCGAGGT
 GGATCCCACCAAGACGAGCGGTTTCGTGCGCGGGTTTCGCTGCAGCGACAGC
 AGGCCGCTTGCCTGGCGCGGTCCGAGGGGCGTGGCAGTGCATCTTCGAA
 TCGCACAAAGCATTTCGCCGCCAGTTACGAAATTGCTTTGCGACGTTCCG
 GGAGCGCTTGACGAGCTGGGCCGTGAGGATATGGCCGACAACCTGATCT
 CGGCGAGCATTTCCTGCGCTTCCCTGTGCCCGCCATCCTGTGCGCGTGC
 CTCTTCAATATCACCGCAACTGCCGTCCGCACGGGCCACCCGCAATCT
 CACACTGGTGGCCAAGACCCTGCAAACTTTGGCCAATTTACCCGCTTCC
 AGGGCAAAGAGAATTTTATGGAGTTTCTCAACGATTTCTCGAGCAGGAG
 GCCGCTCGCATCAACAGTTTCTGGAGATTATATCCACGCGGCCGGAGCA
 CCCAGCTCCAGACTCGATCCTCGATTGGGCCGGGTACATCGACCAGGGCA
 AACAGTTGTCCATACTACACAGTTTGTCTCAGCGAAAGCCTGGCCAAGCTG
 CCGGAGGCCAGGCAGCACGAGCTGGATCCGTTGCAGCATATTCTCGATGA
 AATCAGCCGAGCCAAAGAGCATGGCATGGGCACAGCACTGCCGGGTGGAT
 ATTTGCCGGCCACCTCGTCTACGCACTCGATAGCCAGCGAGAATCAGGAG
 AATCGCAATCCGGGATCCTCGGGCTCGCACGCTGGCTCCAACCTCGGAGCA Gap-ORF-3
 GTTACTGCCACAACAAGCCAGTTGGCCAGCCGAGCATGCGATTGTTA
 GTAAACCATTATCTGCGGAGCGCGGCATCATGCGAGGAGTACTTACGCCG Gap-RNAi-2 u. Gap-AS-4
 AATTCTCTGGAGAAGAATATCTTTAGATAACAATGATCCACGGTTAATGG
 CTTACTGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAGCAAC Gap-2 u. Gap-AS-2
 AGCAACATCAGCAGCTGCAACAGCATGGCCATCAGCAACAGCCGACCCAC Gap-ORF-2
 CAGCATCCACTCCAGATGCTCTCCAATTCACAAACCTCCATTGCCGGCAA
 CCAATATATGAGTTCCGCCAGGAGGCTGCAGCATGCCCAATCGCAGACCT
 CGATGGCGTCTCATCGCTTAATGGGAGCAGCAGCAATTTGCTGCACGGC
 CACCAGCAGCATGCCCATCACCCGAGCAACTGCATCCACATCACTGCCC
 GCCGGCGCCACAGACCATGCTCCAGCACTATGGAGCGCATGGATCGCA
 TGAACATCCGATATAGTGCACAATGGCAATGACTACGAGACCAGCAGC
 CCTTCGAGCACTCGCTCCAGGACACTGCCACGGAATGGAAATCCCAATGC
 CAATGGCAACGTGGGCAGCAGCAACAATAACCAGAGCGGCAGCTACGATG
 ACATGCACGGGGAGTTCCAAATCCAGATCTCTGGGTTTCGATACGAGCAGT
 GCTTTTGTCTGCAAGTCGCCACACCCATGATGAAATCCAGTTTGGGACC
 AGCGGGGGCCGGACGAAGTCATCACAACCTGAATTTGGGAATACCCGATC
 ACTCAGGTGGCTATGTGCGGGGTAATAATTTGAATCCCAACTCGAATATG
 CCCAAGAACTTGGAGGATCTGGACGATCTGTTCAAGTACGCCGAGGAGCA Gap-5
 TGACGTGGCGGAACCAGCGAACCATCACAATCACAACCAGGGTCAGCAGA
 ACCACCAGGGACATCTGAAGCCGGCCGCGTTCCCGGCAAGGAGCAGCTG
 TCGGCGAAAAGCAGTCACTGCAGTTCTGGCTACCAGAGCATCTCCACAAA
 TCCCTCGCCCTCGCAGTCCCTCCAGTCCCCTGGAGAGCCAGCTGAAGGCCG
 CGATGGGCAGTCACAATGCGCCGCTGGCCTTCAAGAATCCCTCCTATCAG
 CTTACGCCCCAAACTGGCTCGTCCAGATCATCGGCACAGAGTAATACACA
 CCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAACAGTTTGGCAGCCGCTTGA AAC
 CAATTGGCGGGCGGACTGGTGGCCGCGAGGGCGGCTTTCTCAACAGTGGC
 GGAGCCTTGGAGGCGGCCACTTTGACGCCAGCTCCTCGGACGAACAGCT
 CTCGGCGGATAATTACTTTCAGTTATGCAGCGGCTGCAGCTGCTGGAGCGG
 GTATTGCCACCAAAATTGGAGGCTCAACGCTCGCTCAGCGGCGGCAGTAGC
 TCCTCCACCTCAGCATCTGCGTCCACCTCGAATCTTGGCAAGAGCGGGCG

CCCCCTCCACCGCCACCAACTCCAGTCCAGGCTCCGCTAGCCACCAAGGC
CACCGCTCTGAATGCCAGTCAAGAGCATGACGACGACGAGGCCAACTCCG Cup-Prom-2
 AGAAGTGGGAGGATCCGTGCGCTCCGCCCCCGCTCCTCCGCTGCCGACT
 AGCGTTTTCTGGCCACCGGACTGGGCTACCTCAAGCTGCCCCGCTTCAA
 GCTGAAGGACGCACTGGAGAAGGCCATCACCAAGTTGGAGGCCAACAAGC
 GGACGCTAAAGGCCAGCCCTGAGTCTTCTCGTTCCATCAAAAACAAGAAT
 GTGGTGGCCCTGGAGATGTTACCCAGGCGCTCAAACCCAGAAACGATCGG Cup-1
 CGATGGATCCATGTTGGCATCCACATCCACGGCTGTTATGCTGCAGACCA
 AAAAGCCCCCGTTATTGTGGAGATGGAGAGGCGTTGTAAGATCATCAAT
 TTACTGGCCAAACAGAATCAAATCCTCGAATCCATTTGGGGGAGGCCAT
 TCCGATGCATGGACCCTCGAAGCATCTGCACGAGGACGAGGGTCTGACCC
 TGCAAGTTCTCTCGGCCCGAGCATCCACACCGTACACACAGCCCTCCAGC
 ATGTTGTCTGACGGCCGTTAGTTGTGACCTGGAGCACGATTTCGCCGCG
 GAAGCAAGTGGCCAGCAAGGAGGCGTGCCGGAGCAGCAGTCTAGTCAGG
 TGCAGCAAAAGCGTCCACCCAGCACAGGCATTACAAGCCAGGAAGTCTG
 CGAGCACCAAGGCTGTTCTGCTACTACTGCTCCGGTGGTTCAGCAGCAA
 GCCGGTCAAGAGCTATACCCGCTCCCGCCTGATGGACATTCGCAACGGGA
 TGTTCAATGCCCTGATGCACAGGTCCAAGGAGAGCTTTGTGATGCCTCGC
 ATCGCCACCTGCGACGACATTGAGTTGGAGGGAAGGCTTCGCCGATGAA
 TATTTGGCGCACCTCGGACGGCACAAGATTCCGGACCCGCTCCACCACAG
 CTAACTTAAACATGAACAACAACAACAACAATGAGTGCATGCCTGCCTTC
 TTCAAAAACAAAATAAGCCGAACCTAATCAGTGACGAGTCCATCATCCA Cup-2
GAGCCAACCGCCCCAGCCGCAAACGGAGTTCCAAGATCCGGCCATTGTTA Cup-3 u. Cup-AS-3
ACCAAAGACGCATTGGCAGCGGTGCGTTAAACCATTCCAAGTGGGGTTAC
AACGACGAAGACTACCACTCGTACCACAATGGCAAGTTCGACGATATGGA Cup-RNAi-1, Cup-RNAi-3
GGAGGTCAACTCGAAGACGCAAAAACATGACGGTGTGCAGTTCTTCG
 ACAACGGCGAGATCAGACAGTCAAGCCTCAAAGACGGCCGAACACTCCTGTG
 ATGGGGATGTCTATCAATCGATCCGAGAACGACACCCCTGCACTCGAACGA
 GTCCAGTGAAGATTTGAGTTCGCGCCAACGAGAATATGTAAAGCGCGTAA
 TGTCTGGATTCTGTTGTATCGAAGCCCAAGTCACGAGATGTTCGAGGAT
 AGACATCACCGGCGGTACAGGAACCAGAACGAGGAGCCTGAGTGGTTTTAG
 CTGTGGACCCACGTCTAGACTGGACACTATAGAGTTGTGTGGTTTCGATG
 AGGACGAGGAGAAAATGCTAAAGGAGGGCAACAAAACCACGGATTAGGC
 GAAACAGAGCGAGAAACGTCAAACAAAAGATGGACCATAAGTACAAATG
 GACGCATGCGGAGCCGATGGGTGGAAGCAAATACATGCCCAAACACGACA
 CTAACAATAATCATAACGTGGAGAACATGAATAATGTTATGGCTACCGAG
 CATCAGCAACAAAAGGAAGAGAAACGCCAGGCAGTGGCCGTTTCGTTTCA
 GTTTTGATAAGTTCAATCAAAGCCAACAGAATTACGAGAGTAGCAGTTATG
 TTAATCACCAACAGCCGCCGCAAACGCAGCCTCAGCAAATGCAGCAGCAG
 TCGAACACAAACACGAACAACCTCTAAATTCATGTCAATCTTTGCCAATGA
 GGGAACTCCTCGTCTTCTTCGCTGAACGAGTTTTTCAAGCAGGCCATTA
 ACCAGGGTCATGGCAACAATCCGGAGCAGCCCAAATCGTTGGGCCACATC Cup-RNAi-4
 GGACAGATGCCTTCGGTGGACTCAGCTGGAGGCCAAATGGCGTCGAAACTC Cup-RNAi-2
 ACTGAAACAATGTTGGCGGAGACTGCCAACAAGCAGACTGATAACTTCCAGA
 AGCTAATTGGGTCTCTTTCTTCGGCTAAGCCACAGTCACAGGCGGTTGGC
 TATGATGCCATCTCCAACCTTTATAATGCAGCAACAGCAGTACCAGCAGCA
 GCAACAGAAGCAGCACCTCATCATAACAGCAGCAGCAGCAACATAACCGCCT
 TTTTGGCGAGCCTGCAGCTGAAGGCGATCCTCGGCCGGCCGACACCCAA Cup-4 Cup-AS-4
TTGCTACTGCTCCGTCTGACTAAAGGGGAAATATCCAAGCACGGATTGCT
GGTGCAGTTGGCCAACCCACGCTTGACGGACATGGATCGCGAGGCCATCA
 CTGCTGTATTGCAGTTCACCAACACCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCACAAG
 CAGCAGCTGGACATGCTCTCAAGCACGGTCATCGCCAGCCAGTTGCAGAA
 TCTCCACAACCTTGGCCATTGTCCAGCAGACTCTTGCAGCCAGGCAGCAGC
 CGCAGCATAATCCACAGACGCAGGCGCCGACCAACTGTTCGAGGAGGAC
 TTGCAAGCGCATGCCAATGTGATAATGCGAAACGCCGTAATGAAGCGAAA
 AATTGAGGAGCAGACCTCGAAGCTTATCAATGGCGGTGCCAAGCATCAGG
 CACAGCAGCAATATCTAAACCGTGGCCAGCAACGCCAGGCTCGACCAGAT
 GCCAACTCGAATGCCTTGCTCCATGCCTTGATCTCTGGCGGTGGCAATAA
 CCACGCCTCTGGTTATCTATGAATGGACAGCCGAGAAGCATCATTCCA
 ATTTGAGATTCCGTTGATAACCAAACTTCCAATCTTTTGTGATCCAACCAG
 CCGCACTTCGCCACGCAGTACAAGCAGCAATAACCAACAGTCTCAGCAGCA
 ACATCCCCATCAGCAGCCCAACAGCTGAATTCGCTTCATCAGAACAACG
 CTGGAGCTGTCAATAGCTTCAATAAGGCCCAAATGCAAGCTCAATCAGCT

```

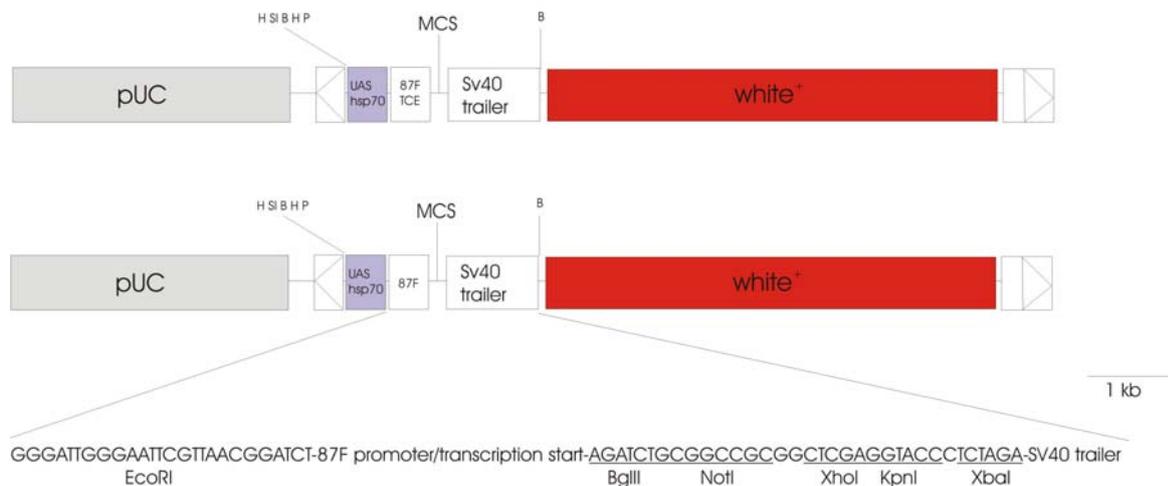
ATTTCCATGCTGCCCAACAGCGGGGATGAGTTTCATTAACGGCTTCAAAA Cup-ORF-2
GATTCGCCACAACGACGGTTGGTCTGATGGCCATCGGTATTGGATCGACT
GTTATATTCTACACCACCCATCGCCTTGTTCATCAAACCCTATCTTCTCGA
GAAACGACGCCTGGAAGCCGAGGCCAGTGCGGAGTACCTCTTCCAGCAGG
AGGTTCACTCCCAGATTGGCGAGTCAAGACCCAAACGGAGCGAATATTGA
GCCAAGGCTGCCAGTGCCGTATAGACATCTTTACATACTTATAGCCTAG
TGATTAGTTACCAAATTTCAACGCTGTAACATGGTGAACAATGAATGGAC
TTTTACTTTCTTACCTTCACTTTGGGTGGAGAGGCCCATCTTCTTGTGTT
CATTTTAGAGTTAAACAGAATGGATTTTTTATGAAAGTAATATGAATTGA
ATAAATAATGAAAAGCACAATGGTTTGAATAAAAAGACTAGAAACATAAAA
CAATTAATAACTACT

```

Dargestellt ist die Sequenz des Cup-Transkriptes (CG11181-RA, Flybase). Unterstrichen sind die Bereiche, an die die Primer hybridisieren. Bei Überschneidungen von zwei Primern wurde die Sequenz des zweiten Primers und seine Bezeichnung zusätzlich kursiv dargestellt. Aus Darstellungsgründen wurde für die Sequenz und die Beschriftung die Schriftart Courier New gewählt.

7.9. Schematische Darstellung des Testis expression Vektors (Hollmann, M. und Schäfer, C., pers. Mitteilung)

Testis expression vector 87F and 87F^{TCE}



Danksagung

An allererster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Mireille Schäfer für eine tolle Promotionszeit, ein interessantes Thema, hartnäckiges Nachfragen, immerwährende Hilfsbereitschaft, fruchtbare Diskussionen und viel Geduld bedanken. Nicht unterschlagen möchte ich an dieser Stelle die stetige, liebevolle Versorgung mit Nervennahrung.

Wolfgang Nellen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Der gesamten Arbeitsgruppe Entwicklungsbiologie, Carolin Schäfer, Franziska Gustke, Katrin Stinski, Ilka Pfurr, Nicole Schleinschok, Christine Otto, Tanja Wilhelm, Anke Eberhardt, Lydia Sand, Birgit Simon und ehemaligen Mitarbeitern möchte ich für viele kleine und große tägliche Hilfen, die fröhliche Stimmung und die vielen schönen Stunden im Labor und darüber hinaus danken.

Für die Hilfe bei der Einarbeitung in ein für mich neues Arbeitsgebiet und für viele interessante, oft heiße Diskussionen danke ich Martin Hollmann.

Für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die Arbeit mit *Drosophila*, für viele Kreuzungen und die Pflege meiner Fliegenstämme danke ich besonders Nicole Schleinschok, Christine Otto und Tanja Wilhelm.

Der Abteilung Biochemie und ganz besonders Oliver Bertinetti danke ich für die Durchführung der Massenspektrometrie. Gerd Vorbrüggen vom MPI in Göttingen danke ich für Fliegenlinien. Markus Maniak danke ich für Antikörper. Ulrich Schäfer danke ich für viele hilfreiche Literaturbeschaffung. Christina Rathke und Bridlin Barckmann von der Uni Marburg danke ich für Hilfe am Apotom und für hilfreiche Diskussionen.

Vielen Dank an die jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter der Abteilung Zellbiologie für viele vergnügliche gemeinsame Mittagessen und sonstige Unternehmungen.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner neuen Chefin Renate Renkawitz-Pohl, für ihre Geduld und die Möglichkeit, der Spermatogenese noch ein wenig treu zu bleiben.

Ein ganz lieber Dank gilt meiner Mutter für ihre stetige Unterstützung.