

**Kurze Promotoren und Translationskontrollelemente steuern die
Expression von Don Juan, Don Juan-Like und Min, wobei Don
Juan und Don Juan-Like vermutlich funktionell redundant in der
Spermiogenese von *Drosophila melanogaster* sind**

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

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Leonie Hempel

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 24.06.2004 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
Zweitgutachter: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Die Spermatogenese von <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellsystem für Untersuchungen genereller biologischer Fragestellungen	3
2.2. Die Spermatogenese in <i>Drosophila melanogaster</i>	3
2.3. Regulation der Genaktivität während der Spermatogenese	8
2.3.1. Transkriptionale Kontrollmechanismen	8
2.3.2. Translationskontrolle ist ein notwendiger Regulationsmechanismus der Poteinexpression während der Spermatogenese	11
2.4. Mechanismen der Translationsregulation	12
2.5. Das testisspezifische Protein Don Juan wird translationskontrolliert exprimiert	16
2.6. Don Juan zeigt eine duale Lokalisation während der Spermiogenese	19
2.7. Problemstellung	21
3. Material	22
3.1. Geräte	22
3.2. Chemikalien	22
3.3. Antikörper und Seren	24
3.4. Fertige Reagenziensätze	25
3.5. Enzyme	25
3.6. Sonstiges Material	25
3.7. Synthetische Oligonukleotide	26
3.8. Plasmide	28
3.9. Fliegenstämme	29
3.10. Bakterienstämme	31
3.11. DNA-Sequenzierung	31
3.12. Computer-Software	31
4. Methoden	32
I. Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i>	32

4.1	Zucht und Stammhaltung von <i>Drosophila melanogaster</i>	32
4.2	<i>Drosophila</i>-Kreuzung	32
4.3	Mutagenese adulter Fliegen mit Ethylmethansulfonat	33
	4.3.1. Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit EMS	33
	4.3.2 Vorbereiten der Fliegen für die Mutagenese	33
	4.3.3 Mutagenese	34
4.4	Sammeln von Fliegenembryonen und deren Entchorionisierung	34
4.5	Herstellung transgener <i>Drosophila</i> Linien	35
II.	Präparation und Analyse von Nukleinsäuren	37
4.6	Präparation genomischer DNA aus <i>Drosophila</i>	37
4.7	Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien	37
4.8	Herstellung kompetenter Zellen	38
4.9	Transformation kompetenter Bakterien	39
4.10	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
	4.10.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (alkalische Lyse)	39
	4.10.2. Midi-Präparation von Plasmid-DNA	40
4.11	Elektrophoretische Auftrennung von DNA / RNA in Agarosegelen	41
4.12	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	42
4.13	Photometrische Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	42
4.14	RNA-Präparation aus ganzen <i>Drosophilae</i> und <i>Drosophilae</i> Testes	43
4.15	Isolierung von PolyA⁺-mRNA aus Gesamt-RNA-Proben	43
III.	Enzymatische Nukleinsäuremanipulation	44
4.16	Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	44
4.17	Dephosphorylierung freier 5'-Enden	45
4.18	Ligation von DNA-Fragmenten	45
4.19	Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
IV.	Histologische Methoden	
4.20	<i>in situ</i> Hybridisierung an mRNA in adulten Testes	46
	4.20.1 Markierung der Sonden-DNA	46
	4.20.2 Testen der Sonden-DNA	47
	4.20.3 Fixierung von adulten Testes	48
	4.20.4 Vorbehandlung der Testes für die Hybridisierung	48
	4.20.5 Hybridisierung und Detektion	49
4.21	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	50
	4.21.1 Hybridisierung	50

4.21.2	Detektion (Fluoreszenz)	50
4.22	<i>in situ</i> Hybridisierung an Polytänchromosomen aus larvalen Speicheldrüsen von <i>Drosophila</i>	51
4.22.1.	Vorbereitung der Präparate zur Hybridisierung	52
4.22.2.	Hybridisierung	52
4.22.3.	Signal Detektion	53
4.23.	Fluoreszenzfärbungen	54
4.23.1.	Immunofluoreszenz an Testes-Quetschpräparaten	54
4.23.2.	Whole mount Antikörper-Immunofluoreszenzfärbung	55
4.23.2.1.	Whole mount Antikörperfärbung an Testes	55
4.23.2.2.	Whole mount Antikörperfärbung an Speicheldrüsen	55
4.24.	β-Galaktosidase-Färbung an larvalen und adulten Testes	56

5. Ergebnisse

I.	Regulation der <i>don juan</i> Expression	58
5.1	Die kurze Promotorregion -23 bis +10 ist alleine nicht ausreichend für eine zelltypspezifische Transkription	59
5.2	60 bp im 3'-Bereich der <i>don juan</i> 5'UTR sind für ein hohes mRNA-Level notwendig	60
5.3	Die Region -69 bis -24 ist für ein hohes Transkriptlevel notwendig	62
5.4	Das TRE _{dj} (<u>T</u> ranslations <u>R</u> epressions <u>E</u> lement des <i>don juan</i> Gens) umfasst 35 bp in der 5' UTR und ist von dem Translationskontrollelement der <i>Mst(3)CGP</i> -Gene klar zu unterscheiden	62
II.	Spezifische Expression und Regulation des <i>don juan-like</i> Gens während der Spermatogenese von <i>Drosophila melanogaster</i>	69
5.5	Das <i>don juan</i> Gen bildet mit drei weiteren Transkriptionseinheiten ein Cluster testisexprimierter Gene, die basische Proteine kodieren	69
5.6	Computerunterstützte Analyse des testisspezifischen DJ-Like (1984) Genprodukts	70
5.7	<i>dj-like</i> -Transkripte sind in männlichen Keimzellen ab dem primären Spermatozytenstadium nachweisbar	73
5.8	Charakterisierung regulatorisch aktiver Sequenzen des <i>dj-like</i> -Gens <i>in vivo</i>	73
5.8.1	Konstruktion eines <i>dj-like</i> Promotor- <i>lacZ</i> Fusionsgens	74
5.8.2	Die Translation der <i>dj-like</i> Transkripte ist bis zum Stadium elongierter Spermatischen repräsentiert	74
5.9	Das Fusionsprotein Myc-DJ-Like ist in den Flagellen und den	

	Köpfen elongierter Spermatiden nachweisbar.	76
III.	Expressionsregulation des basischen testisspezifischen Proteins Min	80
5.10	Computerunterstützte Analyse des Proteins Min	80
5.11	<i>min</i> wird in <i>Drosophila melanogaster</i> testisspezifisch exprimiert	81
5.12	Die Regulation des testisspezifisch exprimierten Gens <i>min</i>	83
5.12.1	<i>min</i> -Transkripte sind im Testis ab dem Stadium primärer Spermatozyten detektierbar	83
5.12.2	Analyse genregulatorischer Sequenzen des <i>min</i> -Gens <i>in vivo</i>	83
5.12.3	Die <i>min</i> -mRNA ist bis zum Stadium elongierter Spermatiden translational reprimiert	84
5.12.4	Etablierung verkürzter <i>min</i> -Promotor- <i>lacZ</i> -Reportergenkonstrukte zur Identifizierung essentieller genregulatorischer Sequenzbereiche	85
5.12.5	200bp stromaufwärts des <i>min</i> Translationsstarts sind ausreichend zur Steuerung der testisspezifischen und postmeiotischen <i>min</i> -Expression	87
5.12.6	Die <i>min</i> -Transkriptmenge ist in homozygoten <i>cannonball</i> -Mutanten stark reduziert	88
5.12.7	30 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts von <i>min</i> sind notwendig für die Translationsrepression der mRNA	89
5.12.8	In homozygot <i>boule</i> -mutantem Hintergrund wird die <i>min-lacZ</i> -Reporter mRNA verfrüht translatiert	92
IV.	Funktionsanalyse der Gene <i>don juan</i>, <i>don juan-like</i> und <i>min</i>	93
5.13	Verfrühte Expression als experimenteller Ansatz zur Funktionsanalyse von Don Juan und Don Juan-Like	93
5.13.1	Expression des Don Juan Proteins in prämeiotischen Keimzellstadien	94
5.13.2	Verfrühte Expression des Fusionsproteins Myc-DJ-Like in prämeiotischen Keimzellen	95
5.13.3	Das verfrüht exprimierte Fusionsprotein Myc-DJ-Like ist in Nebenkernen und Flagellen elongierender Spermatiden lokalisiert	96
5.13.4	Die verfrühte Expression des Fusionsproteins Myc-DJ-Like hat keine Differenzierungsstörungen während der Spermatogenese zur Folge	100
5.14	Ektopische Expression der Fusionsproteine Myc-DJ-Like und Myc-DJ in Speicheldrüsen unter Verwendung des GAL4-UAS-Systems	100
5.15	Die Ektopische Expression von <i>myc-don juan</i> und <i>myc-dj-like</i>	

	in der Augenimaginalscheibe hat einen partiellen Verlust der Ommatidien zur Folge	105
5.16	Vom Genotyp zum Phänotyp über Mutagenese und „Gene silencing“	106
5.16.1.	EMS-Mutagenese als funktionsanalytischer Ansatz der Gene <i>don juan</i> , <i>dj-like</i> und <i>min</i>	107
5.16.1.1	Die Fliegenlinien 2009 und 1833 sind defizient für die Gene <i>don juan</i> , <i>dj-like</i> und <i>min</i>	108
5.16.1.2.	Zur Selektion zu Sterilität führender Mutationen, die potentiell die Gene <i>don juan don juan-like</i> oder <i>min</i> betreffen, wird die <i>dj</i> -defiziente Linie 1833 eingesetzt	112
5.16.1.3	EMS-Mutagenese zur Erzeugung steriler <i>don juan</i> , <i>don juan-like</i> und <i>min</i> Mutanten	113
5.16.1.4	Die mit EMS mutagenisierten Fliegenlinien I 54 und B 99 sind keine <i>don juan</i> bzw. <i>min</i> Mutanten	116
5.16.2	RNA Interferenz als Mittel zur experimentellen Manipulation der Genexpression	117
6.	Diskussion	
6.1	Regulation der Gene <i>don juan</i>, <i>don juan-like</i> und <i>min</i> in der Spermatogenese bei <i>Drosophila melanogaster</i>	121
6.1.1	Kurze Promotoren charakterisieren <i>dj</i> , <i>dj-like</i> und <i>min</i>	122
6.1.2	Cannonball/TAF _{II} 80 kontrolliert die Transkription von <i>dj</i> und <i>min</i>	124
6.1.3	Der Promotorbereich und die 5' UTR können sich funktionell in der Genaktivierung von <i>don juan</i> ersetzen	125
6.1.4	Die 5'UTR reguliert die Transkriptmenge von <i>don juan</i> und <i>dj-like</i>	126
6.1.5	Die Translationsrepression der Transkripte von <i>dj</i> , <i>dj-like</i> und <i>min</i> wird vom Leader vermittelt	128
6.1.6	Das Boule Protein ist in die Translationsrepression der <i>min</i> -mRNA involviert	129
6.1.7	Vermitteln regulative Proteine über Bindung an das 35 bp umfassende TCE _{dj} die Translationsrepression der <i>dj</i> -mRNA?	133
6.2	Vergleich der subzellulären Lokalisation von Myc-DJ-Like mit der von Don Juan	136
6.3	Funktionsanalyse der Proteine DJ, DJ-Like und Min	137
6.3.1	Prämeiotische Expression von DJ und DJ-Like in Keimzellen	137
6.3.2	Sind die ektopisch in Speicheldrüsen exprimierten Proteine Myc-DJ und Myc-DJ-Like mit dem Chromatin assoziiert?	140
6.3.3	Sind die ektopisch in Augenimaginalscheiben exprimierten	

Proteine Myc-DJ-like und Myc-DJ in den Kernen lokalisiert?	141
6.3.4 Reverse Genetik in <i>Drosophila</i>	141
6.3.4.1 Die durchgeführte EMS-Mutagenese war nicht sättigend	142
6.3.4.2 Sind Don Juan und Don Juan-Like funktionell redundant?	143
6.3.5 Potentielle Funktionen von Don Juan, Don Juan-Like und Ausblick	145
7. Literaturverzeichnis	149
Abkürzungen	164

1. Zusammenfassung

Das testisspezifisch exprimierte Gen *don juan*, sowie die in dieser Arbeit neu charakterisierten Gene *dj-like* und *min* sind als Cluster auf dem 3. Chromosom organisiert. Ihre Expression erfolgt translationskontrolliert, d.h. die Transkripte der Gene sind bereits in prämeiotischen Stadien vorhanden, aber das Protein wird erst in postmeiotischen Zellstadien translatiert. Das Don Juan-Protein kolokalisiert mit dem Chromatin während der Kern-Transformation und ist entlang der Flagellen elongierter Spermatiden detektierbar. Subzellulär ist das DJ-Protein in den mitochondriellen Derivaten und im Kern lokalisiert. Das benachbarte Gen *dj-like* zeigt Identität zu *don juan*, 70 % auf Nukleotidebene und 42 % auf Proteinebene. Da eine Beteiligung der drei Genprodukte an dem postmeiotischen Differenzierungsprozess der Spermatogenese wahrscheinlich ist, erscheint neben einer Analyse der *don juan*-, *dj-like*- und *min*-Genregulation eine Funktionsanalyse der kodierten Proteine sinnvoll. Die transgene Expression eines Myc-DJ-Like-Fusionsproteins in der männlichen Keimbahn unter genregulatorischer Kontrolle des *dj-like* Promotors ermöglichte die spezifische Lokalisierung des Fusionsproteins in den Flagellen elongierter Spermatiden sowie in den Spermatidkernen während der Chromatinkondensationsphase. Unter Verwendung von Promotor-Reportergenkonstrukten konnte im transgenen Organismus gezeigt werden, dass die Expression von *dj-like* und *min* ebenso wie von *don juan* von kurzen genvorgelagerten Sequenzen gesteuert wird. Während 200 bp stromaufwärts des Translationsstarts von *min* zur Expressionsregulation des *min*-Gens ausreichen, sind für die Regulation der Expression von *dj-like* 650 bp stromaufwärts des Translationsstarts ausreichend. Zudem konnte die für die Repression der *dj*-mRNA verantwortliche Region auf 35 bp direkt stromaufwärts des ATG in der 5' UTR des Gens eingegrenzt werden. In dem Leaderbereich des *min*-Gens wurde ebenfalls direkt stromaufwärts des ATG eine 30 bp umfassende Region identifiziert, welche die Translationskontrolle der *min*-mRNA vermittelt. Sequenzidentitäten beider Regionen von *dj* und *min* sind nicht vorhanden. Mit Hilfe eines kreuzungsgenetischen Experimentationsansatzes wurde festgestellt, dass das Boule Protein in die Translationskontrolle von *min* involviert ist und Einfluss auf die Expressionshöhe des Proteins hat.

Eine transkriptionsreprimierende Funktion der Proteine DJ und DJ-Like wurde durch ektopische Expression der Fusionsproteine Myc-DJ und Myc-DJ-Like in Augenimaginalscheiben und daraus resultierenden Entwicklungsdefekten nahegelegt.

Zur Klärung der Funktion von DJ, DJ-Like und Min sollte eine Ethylmethansulfonat (EMS)-Mutagenese dienen. Als Selektionskriterium wurde hierbei ein bei Mutation männlich steriler *dj*-, *dj-like*- und *min*-Phänotyp postuliert. Zwei mit EMS-mutagenisierte Fliegenlinien zeigten gegenüber einer *dj*-, *dj-like*- und *min*-defizienten Fliegenlinie einen männlich sterilen, bzw semisterilen Phänotyp. Nach einer molekularbiologischen Analyse der beiden potentiell *dj*-, *dj-like*- und *min*-mutanten Fliegenlinien konnte eine Mutation in allen drei Genen ausgeschlossen werden. Alternativ wurde mit Hilfe der RNAi-Technik das *don juan*-Gen posttranskriptional ausgeschaltet. Das „Gene-Silencing“ von *don juan* hatte keinen Phänotyp zur Folge. Eine funktionelle Redundanz der Proteine DJ und DJ-Like ist daher wahrscheinlich.

2. Einleitung

2.1 Die Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* als Modellsystem für Untersuchungen genereller biologischer Fragestellungen

Die Spermatogenese ist ein hochkonservierter zellulärer Differenzierungsprozess. Viele Details dieses Entwicklungsprozesses sind in Säugern und *Drosophila* ähnlich und somit vergleichbar (zur Übersicht: Hecht, 1988, 1998). Dadurch wird die Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* zu einem geeigneten Modellsystem für die Untersuchung genereller biologischer Aspekte. So können beispielsweise Stammzell determinierung und -erneuerung, subzelluläre Differenzierungsprozesse, wie Kern- und Mitochondrienmorphogenese, sowie Transkriptions- und Translationskontrollmechanismen, welche die gewebespezifische Expression steuern, anhand des Modellsystems Spermatogenese in *Drosophila melanogaster* untersucht werden.

2.2 Die Spermatogenese in *Drosophila melanogaster*

Die zelluläre Entwicklung einer Stammzelle zu einem Spermium ist ein hoch spezialisierter Differenzierungsprozess, der in *Drosophila melanogaster* ca. 10 Tage dauert (zur Übersicht: Fuller 1993, 1998).

Die Spermatogenese kann in drei distinkte Phasen eingeteilt werden. In der ersten Phase wird durch mitotische Teilungszyklen eine große Anzahl von Keimzellen generiert. Darauf folgt eine meiotische Phase, in welcher die Spermatozyten eine Reduktionsteilung durchlaufen. Es schließt sich eine Differenzierungsphase an, genannt Spermio-genese, in der die haploiden runden Spermatozyten komplexe morphologische Modifikationen erfahren. Diese Veränderungen resultieren in der Bildung reifer Spermien (zur Übersicht Abb. 2.1).

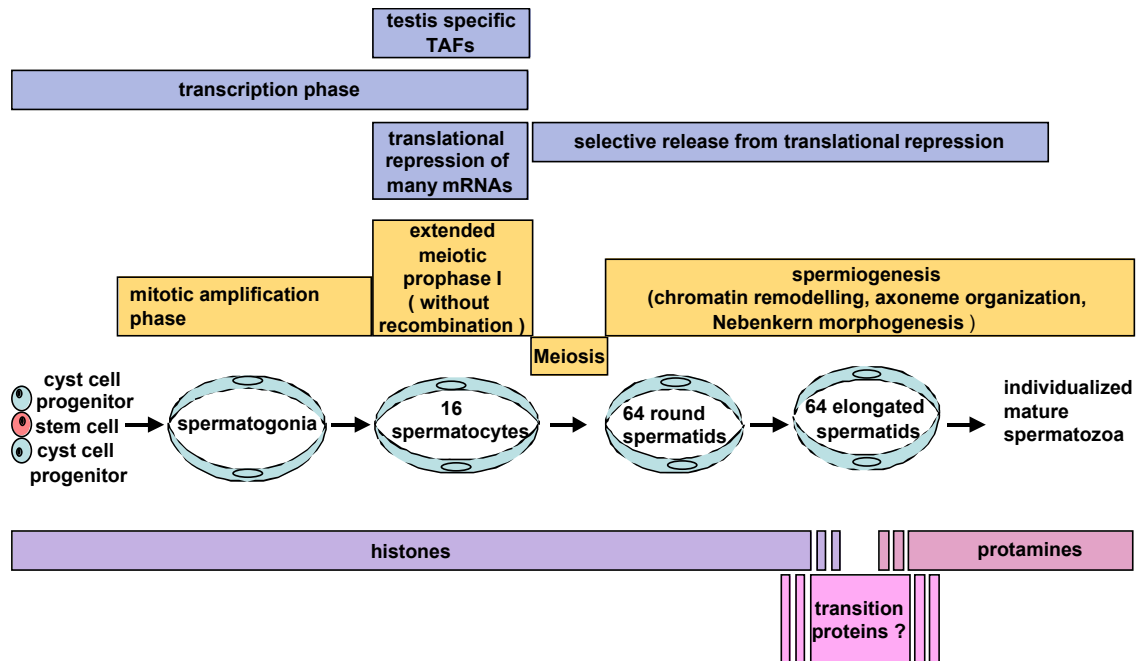


Abb. 2.1. Schematische Darstellung der Spermatogenese mit ihren wesentlichen regulatorischen Merkmalen (aus Renkawitz-Pohl et al., 2004)

Durch asymmetrische Teilung einer Stammzelle entsteht eine neue Stammzelle und eine primäre Spermatogonienzelle. Das Spermatogonium durchläuft vier mitotische Teilungen. Hieraus resultiert ein Satz von 16 primären Spermatozyten, welcher nach einer mehrtägig andauernden meiotischen Prophase ohne Rekombination in die beiden meiotischen Teilungen eintritt. In primären Spermatozyten ist die Transkriptionsaktivität sehr hoch. Viele Transkripte unterliegen einer Translationsrepression, die zu einem spezifischen Zeitpunkt während der Spermienmorphogenese aufgehoben wird. Aus den meiotischen Teilungen resultieren 64 runde Spermatiden, die bis zu ihrer Individualisierung mit den beiden sie umgebenden Zystzellen (Kopf- und Schwanzzystzelle) assoziiert bleiben. Während das Chromatin vor der Meiose nukleosomal vorliegt, sind die Histone nach der Meiose nicht mehr nachweisbar. Die Histone werden durch basische Proteine, ähnlich den Protaminen bei Säugern, ersetzt, welche das Chromatin dicht verpacken (Jayaramaiah-Raja and Renkawitz-Pohl, eingereicht). Ob Transitionsproteine an der Chromatinkondensation beteiligt sind, ist nicht klar.

Da die Spermatogenese kontinuierlich abläuft, sind im Testes einer adulten *Drosophila* alle Stadien von den Stammzellen bis zu den reifen Spermien enthalten (Abb 2.2. A). Die Spermatogenese wird im Keim-Proliferationszentrum initiiert. Diese Region ist dem weiblichen Germarium analog. Das Proliferationszentrum ist an der Spitze des Testis lokalisiert und besteht aus einer Gruppe kleiner somatischer Zellen, genannt "Hub", die von fünf bis neun Keimbahnstammzellen, sowie somatischen Zyststammzellen, umgeben ist.

Jede Keimbahnstammzelle ist von einem Paar somatischen Zyststammzellen umgeben. Die Keimbahnstammzellen teilen sich synchron mit den Zyststammzellen. Aus der asymmetrischen Teilung der Stammzellen resultiert eine neue Stammzelle und eine Spermatogonie bzw. Zystzelle. Die apikale Gruppe somatischer Zellen exprimiert den JAK-Liganden Unpaired (Upd). Dieser aktiviert den JAK-STAT (Januskinase signal transducers and activators of transcription) Signalweg in der

angrenzenden Tochterstammzelle, indem er an den Upd Rezeptor Domeless bindet, der wiederum die Janus-Kinase Hopscotch und den Transkriptionsfaktor Stat92E aktiviert (Kiger *et al.*, 2001; Tulina and Matunis, 2001). Die angrenzenden Tochterstammzellen werden durch die Aktivierung des JAK-STAT Pfadweges zu neuen Stammzellen (Kiger *et al.*, 2001; Tulina and Matunis, 2001). Bei der asymmetrischen Stammzellteilung ist die mitotische Spindel senkrecht zur Berührungsfläche zwischen apikalen Zellen und Keimbahnstammzellen orientiert (Yamashita *et al.*, 2003), sodass ein Spindelpol immer an der Berührungsfläche lokalisiert ist. Die Orientierung der Stammzellen zu den "Hub"-Zellen spielt sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der asymmetrischen Stammzellteilung und stellt dabei möglicherweise sicher, dass eine Tochterzelle Kontakt zu den somatischen "Hub"-Zellen behält und so Signale empfangen kann, während die andere Tochterzelle von dort verdrängt wird (Yamashita *et al.*, 2003). Die Orientierung der Keimbahnstammzellen zu den somatischen "Hub"-Zellen hat ihre Ursache wahrscheinlich in Zell-Zell Adhäsionen, wie Adherens junctions (Yamashita *et al.*, 2003). Durch diese zellulären Adhäsionen zwischen Keimbahnstammzellen und somatischen "Hub"-Zellen wird den Stammzellen möglicherweise eine Polarität vermittelt, nach welcher sich Mikrotubuli ausrichten und die Spindel orientiert wird (Yamashita *et al.*, 2003). Die Aufrechterhaltung beider Stammzellpopulationen ist abhängig von Signalen der apikalen somatischen "Hub"-Zellen (Castelli-Gair Hombria and Brown, 2002; Lin, 2002). Nach der asymmetrischen Teilung einer Keimbahnstammzelle wird die resultierende Spermatogonie von zwei Zystzellen umgeben. Alle weiteren Differenzierungsschritte der Keimzelle laufen innerhalb dieses Zystverbandes ab. Das Spermatogonium durchläuft nun vier mitotische Teilungen mit unvollständiger Zytokinese (Abb. 2.2. B, Pfeil), sodass die aus den mitotischen Teilungen resultierenden sechzehn primären Spermatozyten (Abb. 2.2. B, Pfeilkopf) durch Ringkanäle interzellulär verbunden sind. Die primären Spermatozyten treten in die meiotische Prophase ein, welche durch eine extensive Transkription charakterisiert wird. Hiermit verbunden ist eine 25-fache Volumenzunahme der Nuklei, sowie die Bildung von Lampenbürsten-Schleifen des Y-Chromosoms (Hackstein and Hochstenbach, 1995). Hierbei handelt es sich um Chromatinschleifen, die mit neu transkribierter RNA verpackt sind. Die RNA ist wiederum in dichte RNA-Proteinkomplexe eingeschlossen. Die Lampenbürsten-Schleifen sind notwendig für die männliche Fertilität (Hackstein and Hochstenbach, 1995). Mit dem Eintritt in die Meiose (Abb. 2.2. C) endet nahezu die gesamte Transkriptionsaktivität (Olivieri and Olivieri, 1965; Gould Somero und Holland, 1974). Als besonderes Merkmal der männlichen Meiose wird kein synaptonemaler Komplex gebildet, sodass keine Rekombination stattfindet (Morgan, 1912; Morgan, 1914). Das Resultat der beiden meiotischen Teilungen ist ein Zystverband, der aus 64 haploiden syncytial verbundenen Spermatischen besteht. Während der anschließenden

Spermiogenese erfahren die Spermatiden starke morphologische Veränderungen. Zu Beginn der Spermiogenese aggregieren die Mitochondrien und fusionieren zu zwei riesigen Derivaten, die sich ineinanderfügen (Lindsley and Tokuyasu, 1980). Diese spährische mitochondriale Stuktur ist neben dem Kern lokalisiert und wird deshalb auch als Nebenkern bezeichnet (Abb. 2.2. D) (Fuller, 1993). Da der Nebenkern im Schnitt einer Zwiebel gleicht, wird dieses Zellstadium auch als „onion-Stadium“ bezeichnet (Fuller, 1993). Ausgehend von einem Zentriol wird der axonemale Vorläufer gebildet. Die spährischen mitochondrialen Derivate entfalten sich und bilden zwei unabhängige Strukturen („minor und major mitochondrial derivatives“). Beide mitochondrialen Strukturen elongieren entlang des wachsenden Axonems zu einer Flagellenlänge von 1,8 mm. Die entlang des Axonems lokalisierten mitochondrialen Derivate stellen diesem ATP zur Verfügung, das für die Motilität notwendig ist. Der nach der Meiose noch runde Nukleus erfährt während der Spermiogenese u.a. durch Chromatinkondensation eine Formveränderung und ist schließlich in reifen Spermien nadelähnlich gestreckt.

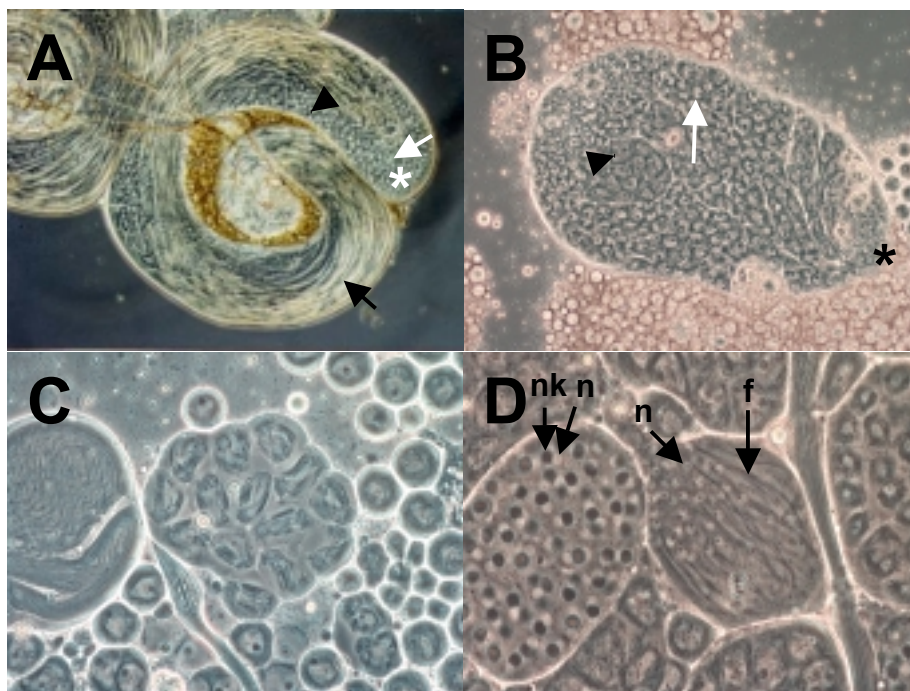


Abb. 2.2. Zellstadien der Spermatogenese

(A) Testis einer adulten *Drosophila*. Die apikale Spitze, an welcher sich die somatischen „Hub“-Zellen sowie die Stammzellen befinden, ist mit einem Stern markiert. Neben Spermatogonien (weißer Pfeil) sind im Testisschlauch Spermatozyten (Pfeilkopf) und elongierte Spermatiden (schwarzer Pfeil) zu sehen. (B) An der apikalen Spitze des larvalen Testis (Stern) befinden sich „Hub“- und Stammzellen. Neben einer Zyste mit Spermatogonien (weißer Pfeil) ist eine Zyste mit primären Spermatozyten (Pfeilkopf) zu erkennen. (C) Die Zyste enthält sich meiotisch synchron teilende Keimzellen. (D) Die linke Zyste enthält Nebenkernstadien kurz nach der zweiten meiotischen Teilung. In Phasen-Kontrast-Optik erscheint der Nukleus (n) weiß und der Nebenkern (nk) schwarz. In der rechten Zyste befinden sich junge Spermatiden mit einem runden Nukleus (n) und elongierendem Flagellum (f).

In Säugetieren vermitteln Transitionsproteine und Protamine die Chromatinkondensation. Die Histone werden nach der Meiose durch Transitionsproteine ersetzt, welche schließlich selbst durch hoch basische Protamine ersetzt werden (Sassone-Corsi, 2002). Im Gegensatz zur Chromatinkondensation in Säugetieren ist wenig bekannt über die molekularen Prozesse, die in *Drosophila* zur Kondensation des Chromatins führen.

Während der finalen Schritte der Spermiogenese wird der Zystverband aufgelöst und jedes Spermium separat von einer Plasmamembran umgeben (Kierszenbaum, 1994). Dieser Prozess wird Individualisierung genannt. Während der Individualisierung wird ein Zytoskelett-Membran Komplex (Individualisierungskomplex) am nuklearen Ende der Zyste aufgebaut. Die wichtigste Zytoskelett-Komponente des Komplexes ist Aktin (Fabrizio *et al.*, 1998). Eine weitere Komponente ist das 95F Myosin (Hicks *et al.*, 1999). Der Individualisierungskomplex besteht aus Aktinstrukturen, die sich um jeden Spermatiden-Nukleus kegelförmig bilden und „investment cones“ genannt werden (Tokuyasu *et al.*, 1972). Die Aktinstrukturen bewegen sich synchron entlang der Zyste, wobei jedes Spermium von einem einzelnen „investment cone“ individualisiert wird. Es wird vermutet, dass die Kraft, mit der sich der Individualisierungskomplex bewegt, durch Aktin-Polymerisation bereitgestellt wird (Hicks *et al.*, 1999). Die Funktion von 95F Myosin ist vermutlich notwendig, um Komponenten, die für die Individualisierung benötigt werden, an die Stelle des Membranaufbaus zu transportieren (Hicks *et al.*, 1999). Da während der Progression des Individualisierungskomplexes, von der Kopfreion des Spermatidiums zum caudalen Ende, überschüssiges Zytoplasma gesammelt wird, ist während der Bewegung des Komplexes eine Ausdehnung der Zyste zu beobachten. Der Individualisierungsprozess ist in Abb. 2.3 schematisch dargestellt. Wenn der Individualisierungskomplex das distale Ende der Zyste erreicht hat, wird er als „waste bag“ bezeichnet (Tokuyasu *et al.*, 1972). Am Ende des Individualisierungsprozesses wird die „waste bag“-Struktur, die das überschüssige Zytoplasma und entfernte Membranen enthält, von der Zyste getrennt. Die individualisierten Spermien werden von dem somatischen Zystverband befreit. Bevor sie den Testis verlassen, um schließlich in die Samenblase zu gelangen, nehmen sie eine spiralisierte Form an.

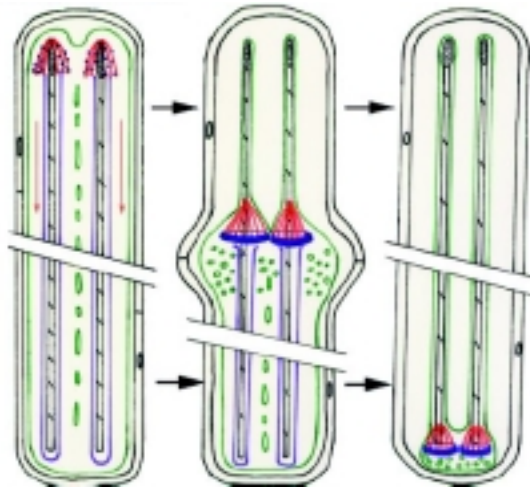


Abb. 2.3. Schematisches Diagramm der Individualisierung (Hicks *et al.*, 1999)

Der Prozess der Individualisierung ist chronologisch von links nach rechts dargestellt. Eine einzelne Zyste (Die Zellmembran ist schwarz eingezeichnet) mit zwei stellvertretenden Spermatiden ist zu drei verschiedenen Zeitpunkten abgebildet. In der ersten Zyste wird gezeigt, wie sich das Aktin (rot) um die Nuklei (schwarz gepunktet) aufbaut. Die 95F Myosin-Proteine sind als punktierte Strukturen (blau) entlang der Aktin Filamente lokalisiert. Die Aktin-Kegel bewegen sich von der Kernregion zum caudalen Ende der Spermatiden in Richtung der roten Pfeile. Die Spermatid-Membranen sind unterbrochen von zytoplasmatischen Brücken. In der zweiten Zyste sind Aktin-Kegel, Spermatid-

Membranen und 95F Myosin nach Fortbewegung des Individualisierungskomplexes dargestellt. 95F Myosin bildet einen Ring an der Basis der Aktin Filamente. Während sich der Aktin-95F Myosin-Komplex vorwärts bewegt, befinden sich viele Vesikel und Organellen (grüne Kreise) vor dem Komplex. Hinter dem Komplex wird jedes Spermium von einer eigenen Membran umgeben (grün). Die axonemale Scheide (lila) wird von dem Individualisierungskomplex entfernt. In der dritten Zyste hat der Individualisierungskomplex das Ende des Axonems (quergestreifte Struktur) erreicht. Es bildet sich nun die „waste bag“-Struktur, die schließlich von der Basis der Zyste abgetrennt wird.

2.3 Regulation der Genaktivität während der Spermatogenese

2.3.1. Transkriptionale Kontrollmechanismen

Die Transkriptionsinitiation ist ein wichtiger Kontrollschritt der Genexpression. Essentiell für die Transkriptionsinitiation ist die Rekrutierung des generellen Transkriptionsfaktors TFIID zum Promoter Protein kodierender Gene (zur Übersicht: Orphanides *et al.*, 1996). Zusammen mit TFIID oder im Anschluß werden weitere generelle Transkriptionsfaktoren, sowie RNA Polymerase II für die Bildung des Präinitiationskomplexes zum Promoter rekrutiert. TFIID besteht aus dem TATA-Binde-Protein (TBP), sowie den Koaktivator-Untereinheiten, genannt TBP-assoziierte Faktoren (TAF_{II}s) (zur Übersicht: Burley and Roeder, 1996; Green, 2000; Albright and Tjian, 2000). TAF_{II}s funktionieren nicht nur als „konventionelle“ Koaktivatoren, indem sie eine physikalische Verbindung zwischen dem DNA-bindenden Aktivator-Protein und dem Präinitiationskomplex darstellen (Goodrich *et al.*, 1996), sondern besitzen außerdem eine Enzymatische- oder Promotorerkennungs-Aktivität, die möglicherweise die Effizienz der Bildung des Präinitiationskomplexes fördert (Burke und Kadonaga, 1996; Chalkley und Verrijzer, 1999). TBP-Homologe sowie gewebespezifische TAF_{II}s wurden in verschiedenen Organismen beschrieben, darunter auch im Menschen und in *Drosophila*. Beispielsweise werden in *Drosophila* die Isoformen von TAF_{II}110 und TAF_{II}80 (No hitter und Cannonball) ausschließlich im

Testis exprimiert, wo sie für Expression von Genen notwendig sind, die für die Spermiogenese benötigt werden. Neben *cannonball (can)* kontrollieren die Gene *always early (aly)*, *meiotic arrest (mia)*, *spermatocyte arrest (sa)* und *cookie monster (comr)* die Transkription von Genen, die für die postmeiotische Spermatid-Differenzierung benötigt werden. Die Gene *can*, *aly*, *mia*, *sa* und *comr* sind notwendig für den Übergang in den meiotischen Zell-Zyklus und in die Spermien-Differenzierung. In Mutanten kommt es zum Stopp der Spermatogenese vor der Meiose. Im Gegensatz zur Wildtypsituation werden translationskontrollierte mRNAs, wie z.B. *don juan*, *Mst87F*, *Mst84Da-d*, *Mst98Ca/b* und *janus B*, deren kodierte Proteine erst postmeiotisch translatiert werden, nicht transkribiert (White-Cooper *et al.*, 1998; Hiller *et al.*, 2001). Somit scheinen Gene, deren Produkte erst während der Spermiogenese benötigt werden, und deren kodierte mRNAs somit unter translationaler Repression stehen, differentiell transkriptional kontrolliert zu werden, in Abhängigkeit von Aly, Can, Mia, Sa und Comr (Fuller, 1998; Jiang and White-Cooper, 2003). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Identifizierung von Cannonball als Spermatozyten-spezifischem TAF_{II}80 (Hiller *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass sich die Transkriptionsmaschinerie in Spermatozyten von der generellen Transkriptionsmaschinerie in anderen Zelltypen unterscheidet (Hiller *et al.*, 2000). Der Einsatz testisspezifischer Formen von TFIID oder anderer testisspezifischer Komponenten der generellen Transkriptionsmaschinerie könnte eine Erklärung dafür sein, warum viele Gene, die auch im Soma exprimiert werden, für die Expression während der Spermatogenese in *Drosophila* und in Säugetieren testisspezifische Promotoren besitzen (Hiller *et al.*, 2001; Fuller 1993; Hecht 1993), wie z.B. das *dihydroorotate dehydrogenase (dhod)* Gen aus *Drosophila* (Yang *et al.*, 1995). Diese zusätzlichen testis-spezifischen Promotoren sind in der Regel sowohl in *Drosophila* als auch in Säugern kurz. Eine kurze Transkriptionskontrollregion zeichnet somit Gene, die spezifisch während der Spermatogenese exprimiert werden als gemeinsames Merkmal aus (Renkawitz-Pohl *et al.*, 2004). So sind beispielsweise für die testisspezifische Transkription der Gene *don juan* und *β2 tubulin* extrem kurze Kontrollregionen (-23 bis +117 bzw. -53 bis +156, relativ zum Transkriptionsstart) ausreichend (Blümer *et al.*, 2002; Michiels *et al.*, 1989). Auch in Mäusen konnte mit der Kontrollregion des *Protamin 1* Gens, die weniger als 200 bp umfasst, ein sehr kurzer testisspezifischer Promotor beschrieben werden (Zambrowicz *et al.*, 1993). Eine testisspezifische Isoform existiert auch von TFIIA. Im Menschen wurde das testisspezifische TFIIA Homolog ALF identifiziert (Upadhyaya *et al.*, 1999; Ozer *et al.*, 2000). Dieser RNA-Polymerase II assoziierte Faktor stimuliert die Transkription durch Stabilisierung der Assoziation von TBP mit der Promotor-DNA sowie durch Förderung Aktivator-abhängiger Konformationsänderungen im Präinitiationskomplex. Ebenso wird das zu TBP homologe humane Protein hTRF2 vorwiegend im Testis

exprimiert (Teichmann *et al.*, 1999).

Neben der Regulation der Transkription auf Gen individueller Ebene durch die Transkriptionsinitiationsmaschinerie wird vermutet, dass die Transkription auch auf Chromatin-Ebene, d.h. epistatisch, reguliert wird (White-Cooper *et al.*, 2000). Always early und Cookie Monster könnten als Chromatin assoziierte Proteine in Spermatozyten eine Funktion bei der Repression verschiedener Gene ausüben und gleichzeitig die Aktivierung anderer Gene, welche für die Meiose und Spermiogenese essentiell sind, erlauben (White-Cooper *et al.*, 2000; Jiang and White-Cooper, 2003). Dabei könnten sie durch Veränderung des Chromatins bestimmte Gene für den Transkriptionskomplex zugänglich machen. Es wird vermutet, dass Aly und Comr entweder einen Histon-Deacetylase-Komplex in primären Spermatozyten aktivieren, oder dass beide Proteine testisspezifische Komponenten eines solchen Komplexes sind. Sowohl Always early als auch Cookie Monster werden mit Eintritt in die meiotischen Teilungen und somit gleichzeitig mit dem Transkriptionsstop abgebaut (Jiang and White-Cooper, 2003).

Für die Aktivierung der Transkription in Spermatozyten ist der Transkriptionsfaktor TGIF essentiell, der von den Genen *achintya* und *vismay* kodiert wird (Ayyar *et al.*, 2003; Wang and Mann, 2003). Es wird vermutet, dass TGIF mit Aly und Comr einen Komplex bildet (Wang and Mann, 2003).

Neben gewebespezifischen TAF_{II}s wurde in *Drosophila* ein dem TATA-Binde-Protein verwandtes Protein isoliert, TRF1 (TBP-related factor 1) (Crowley *et al.*, 1993). TRF1 wird im Nervensystem und in den Gonaden extensiv transkribiert (Crowley *et al.*, 1993). Ebenso wie TBP kann TRF1 mit TFIIA und TFIIB interagieren, an das TATA-Box-DNA-Element binden und RNA-Polymerase II abhängige Transkription *in vitro* lenken (Hansen *et al.*, 1997). Somit ist TRF1 möglicherweise ein funktionelles Homolog des prototypischen Transkriptionsfaktors TBP, welcher gewebespezifische oder Gen-selektive Transkription in *Drosophila* steuert. Als drittes Mitglied der TBP-Familie wurde TRF2 in *Drosophila* identifiziert (Rabenstein *et al.*, 1999). TRF2 konnte auch in *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus*, Maus und im Menschen identifiziert werden. Ebenso wie TBP und TRF1 kann TRF2 mit TFIIA und TFIIB interagieren, was eine Rolle von TRF2 bei der RNA Polymerase II abhängigen Transkription vermuten lässt. Das humane TRF2 wird am stärksten im Testis exprimiert (Rabenstein *et al.*, 1999). TRF2^{-/-}-Knockout-Mäuse sind lebensfähig, aber steril aufgrund eines späten Stopps der Spermienentwicklung. TRF2 defiziente Mäuse weisen ein verändertes Expressionsmuster testisspezifischer Gene auf, deren Proteine funktionell in die Spermiogenese involviert sind (Martianov *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Dieses veränderte Expressionsprofil ist übereinstimmend mit der Vermutung, dass TRF2 spezifisch die Transkription während der Spermatogenese von Mäusen und Menschen reguliert (Martianov *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). In *Drosophila*, *C. elegans* und *Xenopus* dagegen kommt TRF2 keine spezifische

Funktion während der Spermatogenese zu. Verschiedene Spezies scheinen spezialisierte TRFs entwickelt zu haben, die spezifische biologische Funktionen übernehmen.

2.3.2. Translationskontrolle ist ein notwendiger Regulationsmechanismus der Proteinexpression während der Spermatogenese

Genexpression wird nicht nur durch transkriptionale, sondern auch durch posttranskriptionale Vorgänge kontrolliert. Posttranskriptionale Regulationsvorgänge können durch RNA-RNA- und RNA-Protein-Interaktionen vermittelt werden. Besonders wenn die Transkription stoppt, oder die Transkriptionsaktivität niedrig ist, ist die Regulation der mRNA-Stabilität und der Translation ein effektiver Mechanismus zur Kontrolle der Proteinexpression. Solche Bedingungen sind während der Gametogenese in vielen Organismen gegeben.

In Säugern werden Transitionsproteine exprimiert, welche in runden Spermatiden die Histone ersetzen (Hecht 1989 a,b, 1990 a, b, Oliva and Dixon 1991, Dadoune 1995, Wouters-Tyrou *et al.*, 1998). Gleichzeitig mit der Expression der Transitionsproteine kommt es einige Tage vor Beendigung der Spermiogenese zum Stillstand der Transkription (Kierszenbaum and Tres 1975, Meistrich *et al.*, 1977; Balhorn *et al.*, 1984; Heidaran *et al.*, 1988). In *Drosophila* findet während der gesamten haploiden Phase der Spermatogenese keine Transkription statt (Gould-Somero *et al.*, 1974; Olivieri and Olivieri, 1965), sodass dem Translationskontrollmechanismus eine wichtige Rolle während der Spermiogenese zukommt. Transkripte von Genen, deren Proteine für die extensiven morphologischen Umformungen während der Spermiogenese benötigt werden, müssen im Laufe der transkriptionsaktiven Phase präsynthetisiert und anschließend stabil gelagert werden, um schließlich später zu einem spezifischen Zeitpunkt translatiert zu werden. Die Lagerung translational reprimierter mRNA ist ein verbreitetes Phänomen in haploiden Spermatiden (Kleene 1993, 1996, 2001; Penttilä *et al.*, 1995; Cataldo *et al.*, 1999; Steger 2001). Durch diese zeitliche Entkopplung sind Transkript und entsprechendes Protein spezifisch in verschiedenen Stadien vorzufinden (Braun 2000).

Die Transkription kann einige Tage vor der Translation erfolgen. So werden z.B die mRNAs von Transitionsproteinen und Protaminen in Säugetieren früh in postmeiotischen runden Spermatiden transkribiert, aber nicht translatiert. Diese Transkripte werden 7 Tage in einer translational inaktiven Form gelagert, bevor sie mit Polysomen assoziieren und eine Verkürzung des Poly(A)Schwanzes stattfindet (Kleene, 1989).

Auch für *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass mRNAs in der männlichen Keimbahn einer Translationskontrolle unterliegen. Beispielsweise werden die Gene der *Mst(3)CGP*-Familie, sowie die Gene *jan B* und *dhod* in prämeiotischen Spermatozyten transkribiert, aber erst nach der Meiose translatiert (Schäfer *et al.*, 1995). Für einige dieser mRNAs wird die Translation bis zu den späten Spermatidstadien reprimiert. Somit kann die Repression einen Zeitraum von 3 Tagen einnehmen. Die RNA-Sequenzelemente, die für die translationale Repression erforderlich sind, sind für einige dieser Gene bekannt. An sie binden testisspezifische Proteine (Kempe *et al.*, 1993). Aber bisher gibt es keine Beweise dafür, dass diese Proteine die Translationsregulation vermitteln.

Während in der *Drosophila*-Spermatogenese die Translationskontrollregion im 5' untranslatierten Bereich der mRNA lokalisiert ist, kann bei Säugern sowohl der 5' untranslatierte Bereich (z. B. *acrosin*-mRNA) als auch der 3' untranslatierte Bereich (z.B. *protamin*- mRNA) für die Translationskontrolle verantwortlich sein (Nayernia *et al.*, 1992; Hecht, 1998; Venables und Eperon, 1999). Die Spermienmorphogenese dauert bei *Drosophila* drei Tage, was darauf schließen lässt, dass die Aufhebung der Translationsrepression innerhalb dieses Zeitraumes selektiv für verschiedene mRNAs erfolgt. Beispielsweise wird die *don juan*-mRNA früher als die *Mst(3)CGP*-mRNAs translatiert (Blümer *et al.*, 2002). Der Mechanismus dieser zeitlich geregelten Zugänglichkeit der Transkripte für die Translation ist bisher nicht geklärt.

2.4 Mechanismen der Translationsregulation

Neben der Transkriptionskontrolle ist die Regulation der Translation ein bedeutender Kontrollschritt auf dem Weg von der DNA zum Protein.

Die Translation kann durch verschiedene Mechanismen reguliert werden, welche nicht nur die Initiationsschritte betreffen, sondern auch die Elongation und Termination.

In den meisten Fällen wird Translationskontrolle durch Interaktionen von RNA-bindenden-Proteinen mit 5' oder 3' untranslatierten Regionen der mRNAs vermittelt. Ein zelluläres RNA-bindendes-Protein, das an ein cis-Element in der 5' UTR des Transkriptes bindet, kann dadurch die Translationsinitiationsvorgänge verhindern. Ein Beispiel aus somatischen Zellen für diesen Translationsrepressionsmechanismus ist die Bindung des Iron-response-element (IRE)-bindenden-Proteins an eine „stem-loop“-Struktur, das IRE, in der *ferritin* 5'UTR (Goossen *et al.*, 1990; Klausner *et al.*, 1993). Die Bindung erfolgt in Abhängigkeit einer geringen Eisenkonzentration und verhindert die Translation der *ferritin*-mRNA (Gray *et al.*, 1993). Durch das IRE-

bindende-Protein wird die Interaktion des 43S prä-Initiationskomplexes mit dem Cap-bindenden-Komplex eIF4F blockiert (Muckenthaler *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zur Translationsinitiationsregulation durch 5'UTR-bindende-Proteine ist nicht klar wie die Initiationsregulation durch 3'UTR-bindende-Proteine funktionieren könnte. Eine zirkuläre Struktur der mRNA, durch die 5' Terminus und 3' Terminus des Transkripts in räumliche Nähe gebracht werden, lässt eine Initiationsregulation durch 3'UTR-bindende-Proteine verständlicher werden. Dieses Modell einer zirkulären mRNA wird unterstützt durch die Entdeckung, dass das Poly(A)-bindende-Protein (PABP) in Hefe mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G interagiert, welcher wiederum mit dem Cap-bindenden-Protein eIF4E interagiert. Durch diese Komplex-Bildung, die die beiden Enden der mRNA verbindet, wird das Transkript effektiv zirkularisiert (Tarun und Sachs, 1996; Wells *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass der eIF4G-PABP Komplex die Rekrutierung von Ribosomen fördert, indem die 40S Ribosomenuntereinheit direkt von der 3'UTR zum 5' Terminus geleitet wird (Gingras *et al.*, 1999). In diesem Modell würde eine Verhinderung der 5'-3' Interaktion das Ribosomen "Recycling" blockieren, dadurch die Verfügbarkeit der Ribosomen reduzieren und somit die Translationsinitiation hemmen (Mazumder *et al.*, 2003). Die Interaktion des 5' Endes mit dem 3' Terminus könnte durch Translationsinhibitor-Proteine, die an die 3'UTR binden und die Bindung von PABP mit dem Poly(A) Schwanz oder mit eIF4G unterbrechen, verhindert werden (Mazumder *et al.*, 2003). Spezifische Beispiele, die diesen Inhibitionsmechanismus mit Sicherheit bestätigen, konnten bisher noch nicht gezeigt werden; aber verschiedene Experimente lassen darauf schließen, dass dieser oder ähnliche Mechanismen tatsächlich wirksam sind. Das Kupfer enthaltende Protein Ceruloplasmin, das eine wichtige Funktion bei Entzündungsprozessen und im Eisen-Metabolismus übernimmt, steht beispielsweise unter Translationskontrolle. Die Translationsrepression ist abhängig von Interferon- γ , das einen Inhibitor aktiviert, welcher an eine 100 bp Sequenz in der 3'UTR der *ceruloplasmin*-mRNA bindet (Mazumder *et al.*, 2001). Der Inhibitor verhindert nicht die Interaktion von PABP mit dem Poly(A) Schwanz, sodass die Zirkularisation des Transkripts nicht beeinträchtigt ist. Wird die Interaktion von PABP mit dem Poly(A) Schwanz oder mit eIF4G gestört, so verliert der Inhibitor seine Aktivität, und die Translation der *ceruloplasmin*-mRNA findet wieder statt (Mazumder *et al.*, 2001). Somit ist in diesem Fall die Interaktion zwischen dem 3' Ende und dem 5' Terminus des Transkriptes und die damit verbundene Zirkularisation der mRNA eine Voraussetzung für die Aktivität des Translationsrepressors (Mazumder und Fox, 2003). Es wird vermutet, dass das inhibierende Protein durch die Zirkularisation der mRNA in die Nähe des Initiationskomplexes gebracht wird und diesen inaktiviert, möglicherweise indem es kompetitiv mit spezifischen Interaktionsfaktoren interagiert, oder indem es alternativ

den Zusammenbau der 60S und 40S ribosomalen Untereinheiten zum translationskompetenten 80S Ribosom verhindert (Mazumder *et al.*, 2001).

Eine neue Klasse posttranskriptionaler Genregulatoren sind kleine, ca. 20 bis 24 Nukleotid-lange, nicht kodierende RNAs, genannt microRNAs (miRNAs) (zur Übersicht: Bartel *et al.*, 2004; Moss und Poethig, 2002). Diese miRNAs werden nicht ubiquitär exprimiert, sondern sind nur in spezifischen Geweben oder zu bestimmten Zeitpunkten abundant. MiRNAs entstehen über zwei miRNA-Vorläufer. Zunächst werden lange Vorläufer-miRNAs (primary-miRNAs, pri-miRNAs) von nicht-protein-codierenden Genen transkribiert. Diese werden noch im Nukleus zu kürzeren prä-miRNAs von ca. 70 Nukleotiden prozessiert, die ausgedehnte „stem-loop“-Strukturen bilden können. Die Prozessierung der prä-miRNAs zu einzelsträngigen miRNAs von 20 bis 24 Nukleotiden durch das RNase III Enzym Dicer findet schließlich im Zytoplasma statt (Lee *et al.*, 2002, Hutvagner *et al.*, 2001). Einige der bekannten miRNAs sind evolutionär konserviert, was darauf schließen lässt, dass sie wichtige, möglicherweise konservierte, Funktionen ausüben (Lau *et al.*, 2001, Lee und Ambros, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2001, 2002). Obwohl inzwischen viele miRNAs identifiziert wurden, ist die Funktion von nur wenigen *in vivo* bekannt. Allerdings wird angenommen, dass die Mehrheit der miRNAs an posttranskriptionaler Genregulation komplementärer „target“-mRNAs beteiligt ist. Generell können miRNAs in zwei Gruppen eingeteilt werden (Baulcombe *et al.*, 2002). Während die erste Gruppe an vollständig komplementäre mRNAs bindet und somit deren Degradation durch den Multikomponenten Komplex RISC (RNA induced silencing complex) einleitet (Llave *et al.*, 2002; Hutvagner und Zamore 2002; Tang *et al.*, 2003), führt eine Bindung der zweiten Gruppe der miRNAs an nicht vollständig komplementäre mRNA Sequenzen zur Repression der Translation der „target“-mRNA (Olsen und Ambros, 1999; Doench *et al.*, 2003).

Am Besten untersucht sind die miRNAs *lin-4* und *let-7* aus *C. elegans*, deren Expression zeitlich kontrolliert ist. Sie reprimieren die Expression von Lin-14 und Lin-28 bzw. Lin-41 durch Bindung an teilweise komplementäre Sequenzen in der 3'UTR der mRNAs (Lee *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 1999; Reinhart *et al.*, 2000; Seggerson *et al.*, 2002; Slack *et al.*, 2000).

Das *Drosophila* Gen *bantam* codiert eine miRNA, die Zellproliferation und Apoptose kontrolliert, indem sie die Translation der *hid*-mRNA reprimiert (Brennecke *et al.*, 2003). Hid ist ein Aktivator des programmierten Zelltodes. Somit reprimiert *bantam*-miRNA Apoptose und fördert die Zellproliferation. Das *bantam* Gen ist verwandt mit den Genen *mir-80-82* von *C. elegans*, was vermuten lässt, dass die *mir-80* Familie Zelltod und -proliferation im Wurm kontrolliert (Brennecke *et al.*, 2003).

Ein anderer Mechanismus der Translationsregulation wird durch offene Leserahmen vermittelt, genannt uORFs (upstream open reading frames). Diese sind in der 5'UTR von mRNAs lokalisiert und können als translationsregulatorische cis-Elemente

fungieren (Morris und Gaballe, 2000). Eine Beeinträchtigung der Translation des Haupt ORF durch den uORF ist möglich, da nach Translationstermination des uORFs die Reinitiationeffizienz des Ribosoms aufgrund der Nähe des uORFs zum Haupt ORF gering ist. So hemmen uORFs, die sehr nahe am Haupt ORF lokalisiert sind, dessen Translation stärker als weiter entfernt gelegene uORFs. Ein Grund hierfür könnte sein, dass für den Aufbau des kompletten Initiations-Komplexes nicht genügend Zeit zur Verfügung steht (Kozak, 1987b). In anderen Fällen bewirkt das von dem uORF kodierte Peptid die Hemmung der Translation des stromabwärts gelegenen ORF, indem es cis-agierend translatierende Ribosomen stoppt. Hierdurch werden die nachfolgenden Ribosomen blockiert, welche andernfalls den stromabwärts gelegenen ORF erreicht hätten. Durch diese Blockade kann die Translationstermination des uORF entweder verhindert oder verzögert werden (Hill und Morris 1993; Gaballe und Morris 1994). Das Stoppen der Ribosomen während der Translation wird durch eine Interaktion des vom uORF kodierten Peptids mit distinkten Komponenten der Translationsmaschinerie erreicht (Morris und Gaballe, 2000).

Kontrollierte Veränderungen der Poly(A) Länge können sich regulatorisch auf die Translation auswirken. Im Nukleus von Vertebraten erhalten mRNAs anfänglich einen Poly(A)Schwanz von ungefähr 250 Nukleotiden. Im Zytoplasma wird der Poly(A)Schwanz vieler mRNAs, welche vorerst nicht translatiert werden sollen, verkürzt und somit eine Repression bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass eine zytoplasmatische, sekundäre Polyadenylierung für die translationale Aktivierung dieser Transkripte notwendig ist (Salles *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1996; Barkoff *et al.*, 1998; Gebauer *et al.*, 1994). Beispielsweise geht in *Drosophila* mit der Translationsrepression der *hunchback*-mRNA durch Nanos und Pumilio eine schnelle Deadenylierung einher (Wreden *et al.*, 1997). Diese wird durch regulatorische Elemente vermittelt, die in der 3'UTR des *hunchback* Transkriptes lokalisiert sind (Wreden *et al.*, 1997).

Ein in der 3'UTR lokalisiertes Signal, das die Poly(A) Länge während der Oocyten-Reifung und nach der Fertilisation in Mäusen und Fröschen reguliert, ist das zytoplasmatische Polyadenylierungs Element (CPE). In Mäusen, die eine Mutation im CPE der *tPA* (*tissue-type plasminogen activator*)-mRNA tragen, findet keine Poly(A)Schwanz Verkürzung der *tPA*-mRNA statt, wenn die mRNA den Kern verlassen hat (Huarte *et al.*, 1992). Hierdurch wird eine Translationshemmung der *tPA* mRNA vor der Meiose verhindert (Huarte *et al.*, 1992). Eine Überexpression des Poly(A)bindenden-Proteins in *Xenopus* verhindert die Deadenylierung und Repression verschiedener mRNAs (Wormington *et al.*, 1996). Somit ist eine Verkürzung des Poly(A)Schwanzes erforderlich für die Translationsrepression dieser Transkripte (Wormington *et al.*, 1996).

Veränderungen der Polyadenylierung können auch eine Rolle spielen bei der

Regulation von Genen, deren Translation durch die 5'UTR kontrolliert wird. Beispielsweise findet bei Aktivierung der mRNAs der *Mst87F* Gen-Familie während der Spermatogenese von *Drosophila* eine sekundäre Poly(A)Schwanz Verlängerung statt (Schäfer *et al.*, 1990; Kuhn *et al.*, 1991).

Untersuchungen ergaben allerdings, dass Deadenylierung ebenso eine Konsequenz der Translationskontrolle wie ihre Ursache sein kann. So kann Deadenylierung durch Translationsinhibitoren verursacht werden, welche die Lösung der mRNA von den Ribosomen fördern (Gray und Hentze 1994).

2.5 Das testisspezifische Protein Don Juan (DJ) wird translationskontrolliert exprimiert

Die kurze regulativ aktive Region von *don juan* reguliert nicht nur die spezifische Expression des Gens im Testis, sondern enthält auch Kontrollsequenzen, welche eine Translationsrepression der mRNA vermitteln. Das *don juan* (*dj*)-Gen ist daher ein Paradigma für die Untersuchung genregulatorischer Fragestellungen in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*.

Das *dj*-Gen wurde durch ein "DNA-binding site-screen"-Experiment (Vinson *et al.*, 1988), bei welchem regulatorische Promotor-Elemente des testisspezifisch exprimierten $\beta 2$ *tubulin*-Gens eingesetzt wurden, isoliert (Dissertation T. Winhauer 1995). Bei diesem Versuchsansatz sollten mit den Promotorelementen interagierende Regulatoren des $\beta 2$ *tubulin*-Gens unter Verwendung einer testisspezifischen cDNA Expressionsbibliothek (Hazzelrig und Tu, 1994) identifiziert werden. Durch Interaktion des Don Juan Proteins mit dem $\beta 2$ UE2-Element konnte die entsprechende 922 bp umfassende *dj*-cDNA isoliert werden. Das $\beta 2$ UE2-Element liegt zwischen -32 und -23 und ist für volle Expressionshöhe des $\beta 2$ *tubulin*-Gens notwendig (Michiels *et al.*, 1989).

Abb. 2.4. A zeigt die genomische Region des *don juan*-Gens. Der offene Leserahmen ("open reading frame" ORF) der *don juan* cDNA umfasst 744 bp. Das einzige Intron des Gens ist 58 bp lang. Das Don Juan Protein hat eine kalkulierte Masse von 29,2 kDa und einen isoelektrischen Punkt von $pI=9,8$ (Santel *et al.*, 1997). Die 248 Aminosäuren umfassende Primärsequenz des Proteins weist einen basischen Charakter mit einem Lysin-reichen, sechs Aminosäuren umfassenden, repetitiven Element (DPCKKK) im C-terminalen Bereich (Abb. 2.4. B, rot unterlegt) auf (Santel *et al.*, 1997). Mit Hilfe des PSORT-Computerprogramms (Nakai und Kanehisa, 1992) wurde eine Lokalisation des Proteins mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit für die Zellkompartimente Kern und Mitochondrium vorausgesagt. Das Don Juan Protein besitzt ein potentiell N-terminales

Mitochondrienlokalisierungssignal (Abb. 2.4. B, grün unterlegt) sowie eine präsumtive Schnittstelle für die mitochondriale Peptidase. C-terminal konnten putative Kernlokalisierungssignale identifiziert werden. Gegen zwei Peptide aus dem N-terminalen sowie C-terminalen Bereich des Don Juan Proteins wurden Antikörper generiert.

Die Transkripte des *don juan*-Gens sind ab der meiotischen Prophase bis zu den elongierenden Spermatiden kurz vor der Individualisierung detektierbar. Im Gegensatz dazu beschränkt sich die Translation auf Spermatid-Stadien. Das bedeutet, dass die *dj*-mRNA einige Tage lang translational reprimiert wird (Santel *et al.*, 1997). Zur Bestimmung der Größe des *don juan* Promotors und der Identifizierung transkriptionsregulatorischer Sequenzen wurde eine Promotoranalyse durchgeführt. Durch die von Lis *et al.* (1983) etablierte Methode Promotor-*lacZ*-Reportergenkonstrukte über P-Element vermittelte Transposition stabil in die Keimbahn von *Drosophila* zu integrieren, wurde die Durchführung von Promotorstudien *in vivo* möglich. Zur Generierung transgener Fliegenstämme wurde die Konstrukt-DNA in *Drosophila melanogaster*-Embryonen des Blastodermstadiums injiziert. Das Reporterprotein β -Galaktosidase aus *E. coli* wurde in tierischen Zellen natürlicherweise nicht exprimiert. Die Expression des Reportergens *lacZ* konnte im transgenen Organismus durch histochemische Nachweisverfahren verfolgt werden und spiegelte die endogene Expression des Gens wider, dessen Promotor mit dem offenen Leserahmen des *lacZ*-Reportergens fusioniert wurde. Um den Promotorbereich des *don juan* Gens zu analysieren, wurde eine Serie von Promotor-*lacZ*-Konstrukten etabliert, wobei der *don juan* Promotorbereich systematisch verkürzt wurde (Blümer, 2000). Die in den Reportergenkonstrukten inserierten Promotorregionen nahmen somit graduell an Länge ab. Auf diesem Weg konnte gezeigt werden, dass nur 23 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes in Kombination mit der 5' untranslatierten Region für eine zelltypspezifische Expression ausreichend sind, wenn auch die mit Hilfe der CPRG-Methode ermittelte Expressionsstärke im Vergleich zu den Reportergenkonstrukten mit längerem Promotoranteil schwächer war (Blümer, 2000). Beispielsweise führte im Vergleich das Konstrukt *dj-lacZ* 3, das 69 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes enthielt, zu vollem Expressionslevel. Mit einem weiteren Promotor-*lacZ* Konstrukt (*dj-lacZ* Δ +11/+114) konnte durch Deletion der Basenpaare +11 bis +114 des 117 Nukleotide langen Leaders gezeigt werden, dass die ersten 10 bp und die letzten 3 bp der 5' UTR in Kombination mit 294 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes zelltypspezifische Expression erlauben. Allerdings wurde auch hier unter Anwendung der CPRG-Methode eine verminderte β -Galaktosidase-Enzymaktivität gemessen (Blümer, 2000). Aus der ermittelten Expressionshöhe beider Konstrukte lässt sich schließen, dass sowohl ein in der Promotorregion -69 bis -23 lokalisiertes Element

als auch ein in der Leaderregion +10 bis +114 lokalisiertes Element quantitativen Einfluß auf die Expression nehmen. Desweiteren ergibt sich die Möglichkeit, dass die Promotorregion -23 bis +10 ausreichend für die zelltypspezifische Expression sein könnte, wenn auch aufgrund des Fehlens der erwähnten Promotorelemente eine mengenmäßig verminderte Reporteraktivität erwartet werden würde. Die Beteiligung der *don juan*-Leadersequenz am Translationskontrollmechanismus wurde durch histochemische Enzymaktivitätstests an Testes der transgenen Fliegenlinie *dj-lacZΔ +11/+114* bewiesen (Blümer, 2000). Eine Deletion der Promotoregion +11 bis +114 relativ zum Transkriptionsstart hatte eine prämeiotische Reporterexpression zur Folge (Blümer, 2000). Durch Etablierung von zwei weiteren Konstrukten konnte der Translationskontrollbereich auf einen kürzeren Sequenzbereich begrenzt werden. Während die Deletion der Region +10 bis +53 relativ zum Transkriptionsstart keine verfrühte Translation zur Folge hatte, zeigten Testes transgener Fliegen, die ein Reportergenkonstrukt trugen, in dem der *don juan* Promotorbereich +54 bis +114 deletiert war, bereits in Spermatozyten-Stadien β -Galaktosidase Expression (Blümer, 2000).

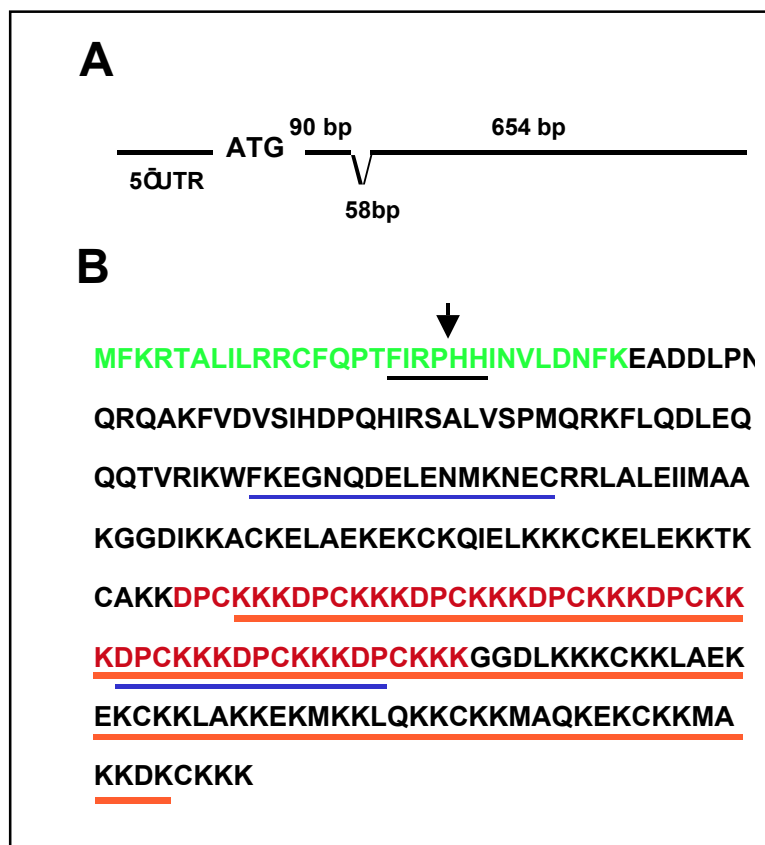


Abb. 2.4. Genomische Organisation des *dj*-Gens und Primärstruktur des *dj*-Genprodukts

(A) Der 744 bp umfassende Leserahmen des *dj*-Gens wird durch ein Intron von 58 bp unterbrochen. (B) Das charakteristische Hexapeptidmotiv (DPCKKK) ist in rot dargestellt. Die von PSORT identifizierte Erkennungssequenz der mitochondrialen Peptidase ist schwarz unterstrichen; die Schnittstelle ist mit einem Pfeil markiert. Das N-terminale Mitochondrienimportsignal ist grün unterlegt. Im basischen Bereich des Proteins nach PSORT lokalisierte putative Kernlokalisierungssignale sind orange unterstrichen. Antikörper wurden sowohl gegen ein N-terminales (blau unterstrichen), als auch gegen ein C-terminales (blau unterstrichen) Peptid hergestellt.

2.6 Don Juan zeigt eine duale Lokalisierung während der Spermio-genese

Wichtige Hinweise auf die Funktion des *dj*-Genproduktes konnten durch die Klärung der subzellulären Lokalisation im Testis erhalten werden. Mit Hilfe von Antikörpern, die gegen ein C-terminales und ein N-terminales Peptid von Don Juan gerichtet waren, konnte gezeigt werden, dass das DJ-Protein postmeiotisch sowohl im Spermienkopf als auch im Flagellum elongierter Spermatischen lokalisiert war. Das Protein ist zu Beginn der Chromatinkondensation im Spermienkopf detektierbar. Der Nukleus hat zunächst eine ovale Form, wobei das Chromatin an der konvexen Seite des Kerns konzentrierter vorliegt. Mit Hilfe einer Doppelfärbung, bei welcher neben dem anti-DJ-Antikörper ein Chromatin-markierender Farbstoff eingesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Verteilung des Don Juan Proteins zu diesem Zeitpunkt mit dem Chromatin überlappt (Abb. 2.5.) (Santel *et al.*, 1998). Während der weiteren Chromatinkondensation elongiert der Kern und durchläuft ein Stadium, in welchem er in mit DAPI gefärbten Testis-Quetschpräparaten eine Bananen- oder Kanu-ähnliche Form zeigt (Fuller, 1993). Auch zu diesem Zeitpunkt liegt eine Co-Lokalisation von DJ mit dem Chromatin vor (Santel *et al.*, 1998). Allerdings ist ab diesem Stadium das DJ-Protein zusätzlich im Spermienflagellum detektierbar. Wenn die Nuklei der Spermatischen nadelförmig sind, und somit die Kernkondensation abgeschlossen ist, kann das DJ-Protein nicht mehr im Kern detektiert werden. Die Proteinverteilung entlang des Flagellums ist allerdings weiterhin auch in reifen Spermien zu beobachten (Santel *et al.*, 1998).

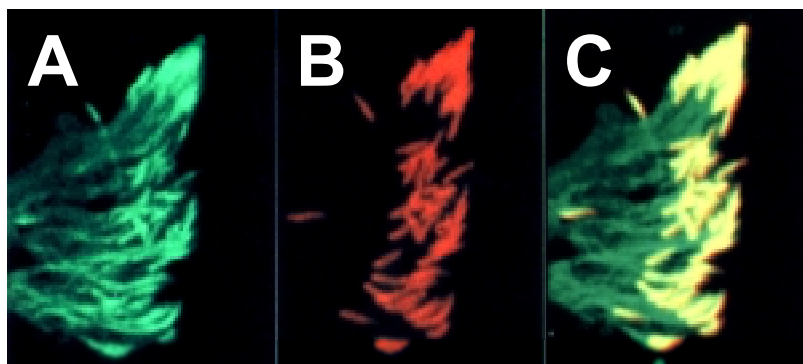


Abb. 2.5. Das Don Juan-Protein ist während der Spermatischenmorphogenese sowohl im Kern als auch im Flagellum lokalisiert (aus Santel *et al.*, 1998).

Die in der Abbildung dargestellten Spermatischenzellen befinden sich in der abschließenden Phase der Chromatinkondensation. (A) Die Anti-DJ-Antikörperfärbung

demonstriert die duale Lokalisation von DJ im Kern und im Flagellum. (B) Zum Vergleich ist die Aufnahme einer Gegenfärbung mit dem chromatinmarkierenden Farbstoff Propidiumiodid dargestellt. (C) Die Abbildung zeigt durch Überlagerung der beiden getrennten photographischen Bildaufnahmen A und B die Kolokalisation des DJ-Proteins mit dem Chromatin. Regionen, in welchen eine Kolokalisation vorliegt, erscheinen gelb.

Nach ektopischer Expression eines DJ-GFP-Fusionsproteins in prämeiotischen Zellstadien konnte das Protein in den Mitochondrien dieser Zellen nachgewiesen werden (Santel *et al.*, 1998). Nachdem ein das P[w+; *dj-GFP*] tragendes Chromosom in den genetischen Hintergrund verschiedener männlich steriler Mutanten mit Entwicklungsstörungen der Mitochondrien oder des Axonems kreuzungsgenetisch eingebracht werden konnte, wurde nur in Mutanten, die eine gestörte Mitochondrienmorphogenese zeigten, ein verändertes DJ-GFP-Expressionsmuster beobachtet (Santel *et al.*, 1998). Sowohl aufgrund der Assoziation des DJ-GFP-Fusionsproteins in prämeiotischen Zellen mit den Mitochondrien als auch aufgrund der Fehlexpression des Fusionsproteins in Mutanten mit Störungen der Mitochondrienmorphogenese kann eine Lokalisierung des DJ-Proteins in den Mitochondrien postuliert werden. Aufgrund der zusätzlichen Lokalisierung des Proteins im Spermatidenkern ist eine duale Funktion des Don Juan Proteins denkbar. Während die DJ-Proteinverteilung entlang des Flagellums in Spermatidenstadien eine Funktion von DJ in der Mitochondrienmorphogenese nahe legt, lässt die transiente, chromatinüberlappende Lokalisierung des Proteins während der Kernkondensation im Spermienkopf eine Beteiligung des Proteins am Entwicklungsprozess des Kerns vermuten, z.B. als Transitionsprotein. Über die molekularen Mechanismen, welche die Chromatinkondensation in der Spermio-genese von *Drosophila melanogaster* vermitteln, ist wenig bekannt. Histochemische Färbungen gaben erste Hinweise darauf, dass auch in der Spermio-genese von *Drosophila* Histone durch basischere Proteine ersetzt werden (Das *et al.*, 1964). Es wird angenommen, dass im Nukleus lokalisierte Proteasomen den Abbau der Histone übernehmen (Ma *et al.*, 2002). Proteine in *Drosophila melanogaster*, die eine Sequenzhomologie zu Transitionsproteinen von Säugern zeigen, konnten mit Hilfe von Genom-Sequenzanalysen nicht identifiziert werden. Das könnte bedeuten, dass Histone direkt durch Protamine ersetzt werden, oder dass andere basische Proteine die Funktion der Transitionsproteine übernehmen. Aufgrund des basischen Charakters und der transienten Lokalisierung im Spermatidenkern während der Chromatinkondensation stellt Don Juan ein Kandidatenprotein für eine Komponente mit funktioneller Analogie zu Transitionsproteinen dar.

2.7 Problemstellung

Das Modellsystem Spermatogenese ist nicht nur geeignet zur Untersuchung von Zelldifferenzierungsprozessen, sondern auch zur Analyse der Genexpression. In der Spermatogenese von *Drosophila* ist die Transkription auf prämeiotische Zellstadien beschränkt. Da die Translationskontrolle deshalb einen relevanten Mechanismus in der Spermatogenese von *Drosophila* darstellt, kann die Regulation des testisspezifisch exprimierten Gens *don juan*-Gens, sowie die Regulation der in dieser Arbeit neu charakterisierten testisspezifischen Gene *dj-like* und *min* optimal anhand des Modellsystems Spermatogenese untersucht werden.

Bisher sind nur wenige Proteine bekannt, die in die Differenzierungsprozesse der Spermatogenese involviert sind. Durch die Kenntnis weiterer Proteine und ihrer Funktion können die morphogenetischen Vorgänge während der Spermiementwicklung besser verstanden werden. Die funktionelle Analyse der Proteine Don Juan, DJ-Like und Min war daher ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

3. Material

3.1 Geräte

3D-Schüttler	WT-12, Biometra
Digitalkamera	DMC 1e Low Light Polaroid, Offenbach
Elektrophoreseapparaturen	Werkstatt MPI Martinsried und Werkstatt Universität Marburg, Biometra
Elektrophorese-Spannungsquellen	PowerPack3000 BioRad, München
Fotomikroskop	Axiophot, Zeiss, Jena
Kryobad	KH-3, Biometra
Konfokales Laserscan-Mikroskop	TCSSP2 Leica, Heidelberg
Kühlzentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R
Magnetrührer	Variomag, H+P Labortechnik
PCR Maschine	Personal Cyclor, Biometra, Göttingen
pH-Meter	Ultrospec 3000, Pharmacia, Freiburg
Photometer	Ultrospec 3000, Pharmacia, Freiburg
Reaktionsgefäßschüttler	Reax 2000, Heidolph, Schwabach
Stereomikroskop	Stemi SV, Zeiss, Jena
Tischzentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415 C Biofuge 13 Heraeus
Thermoblock	Driblock DB.2A, Techne
UV-Crosslinker	UV Stratalinker™ 2400, Stratagene, La Jolla USA
UV-Transilluminator	Spektroline TS-302
Vakuumzentrifuge	Savant SVC 199 H
Vortex-Gerät	MAGV, Rabenau, Londorf
Wärme-Wasserbad	Julabo U3

3.2 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
Agarose	GibcoBRL, Eggenstein
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Eggenstein
Bacto-Trypton	Difco, Eggenstein
Borsäure	Fluka, Neu-Ulm
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat (BCIP, X-Phosphat)	Boehringer, Mannheim
5-Bromo-4 chloro-3-indoxyl-β-D-	Roth, Karlsruhe

thiogalactosid (X-Gal)	
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Sigma, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Digoxygenin	Roche, Mannheim
1,4-Dithio-L-threitol (DTT)	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylmethansulfonat (EMS)	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Fluka, Neu-Ulm
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Heparin	Sigma, Deisenhofen
Heptan	Fluka, Neu-Ulm
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm
Levamisol	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Fluka, Neu-Ulm
4-Nitrotetrazoliumchlorid (NBT)	Roche, Mannheim
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Octylphenolpolyethylenglycolether (Triton X-100)	Serva, Heidelberg
Piperazin-N,N'-bis [2-ethanolsulfonsäure] (PIPES)	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma, Deisenhofen
Propionsäure	Sigma, Deisenhofen
Ribonukleotide	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Thioglycolsäure	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

Weitere, hier nicht aufgeführte, Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Taufkirchen) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

3.3 Antikörper und Seren

Anti- β -Galaktosidase Polyklonal aus Kaninchen 1:2500	Biotrend, Köln
Anti-Digoxygenin-Fab-Fragment	Roche, Mannheim
Anti-GFP Polyklonal aus Kaninchen 1:300	Abcam, Cambridge
Anti-Myc Monoklonal aus Maus 1:100	Roche, Mannheim
Anti-Kaninchen IgG, Cyanine3-gekoppelt aus Ziege 1:100	Dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG, Cyanine3-gekoppelt aus Ziege 1:100	Dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG, biotinyliert aus Pferd 1:100	Vector Laboratories, Burlinghame
Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlinghame
Pferdeserum	Vector Laboratories, Burlinghame

3.4 Fertige Reagenziensätze

DIG-DNA-Labeling-Kit	Roche, Mannheim
Elutip-D	Schleicher & Schüll,
Dassel	
GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit	Pharmacia, Freiburg
Mass Ruler DNA-Ladder, Mix	MBI Fermentas, St.
	Leon-Roth
Mass Ruler DNA-Ladder, Low Range	MBI Fermentas, St.
	Leon-Roth
Oligotex® mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy RNA Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning-Kit	Invitrogen, Groningen
Tyramid Amplification Signal (TSA)	New England Nuclear
	Life
System Fluorescein	Science Products
Vektastain Elite ABC Standard Kit	Vector Laboratories,
	Burlingame, USA
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

3.5 Enzyme

Desoxyribonuklease I	Roche, Mannheim
Klenow Polymerase	Amersham,
	Braunschweig
Lysozym	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Amersham,
	Braunschweig
RNaseA	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
	Qiagen, Hilden,
	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

3.6 Sonstiges Material

Dan Klorix	Colgate	Palmolive
	GmbH, Hamburg	
Hybond N-Membran	Schleicher & Schüll,	
	Dassel	

Whatmanpapier (Blotting-Papier GB 2000)

Schleicher und Schüll,
Dassel

3.7 Synthetische Oligonukleotide

Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind innerhalb der Primer fett unterlegt.

Zur Etablierung des *don juan*-Promotor-*lacZ*-Konstruktes $\Delta+90/+109$ wurde für die PCR der folgende Primer eingesetzt:

Nic II 5'-AATT**GAATTC**AGATCGTCTTGGGTTATG-3'
ohne TCE as 5'-CGAT**CGGATCC**GAGAAAAAGTTTTAAAAGAATTTTG-3'

Zur Etablierung des *don juan-like-lacZ*-Konstruktes wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

1984prsense 5'-GATC**GAATTC**GGTTTTAATTCATTCAGCTCTGTTCA-3'
1984prantisense 5'-GATC**GGATCC**TATAACGGTAAATTTAGAATTTTTCTTGT-3'

Für die Durchführung der RT-PCRs wurden die folgenden Oligonukleotide benötigt:

B3aa23 5'-ATCATTTC**CGAGGAGCACGGC**-3'
B3aa140 5'-GCC**CAGCGAGT**GCGTCAATTG-3'

1988-Seq 2 5'-GGCGATGATGGAGATGATGACATGG-3'
1988-Rtas 5'-TCTGT**CCTCAGCTTCTCGCAAG**-3'

Folgende Primer wurden zur Generierung des *1988*-Promotor-*lacZ*-Konstruktes *466-min* verwendet:

508-1988-RB 5'-GAT**GAATTC**CCGATCAAACTAGCGCGG-3'
Prom1988-RB as 5'-GAT**GGATCC**GTTTTTTATGCTTTGGTTCCAAAAT-3'

Zur Etablierung des Promotor-*lacZ*-Konstruktes *372-min* wurde für die PCR in Kombination mit dem Primer Prom1988-RB as der folgende Primer eingesetzt:

1988-372 5'-GAT**GAATTC**ATCCCGGAATATATACCGTAT-3'

Zur Etablierung des Promotor-*lacZ*-Konstruktes *280-min* wurde für die PCR in Kombination mit dem Primer Prom1988-RB as der Primer 1988Prom1 benutzt:

1988Prom1 5'-GATC**GAATTC**CCTGGATTTTCAGTATATGCCG-3'

Zur Etablierung des Promotor-*lacZ*-Konstruktes *200-min* wurde für die PCR in Kombination mit dem Primer Prom1988-RB als der Primer 1988Prom2 eingesetzt:

1988Prom2 5'-GATC**GAATTCC**GACTCCGCATAAGAATATTATT-3'

Für die Etablierung des Promotor-*lacZ*-Konstruktes *100-min* wurde für die PCR in Kombination mit dem Primer Prom1988-RB als der Primer 1988Prom3 benötigt:

1988Prom3 5'-GATC**GAATTCC**GGCGCAGATCGGGTCGAAATCC-3'

Zur Etablierung des *min*-Promotor-*lacZ*-Konstruktes Δ 60 wurde für die PCR in Kombination mit dem Primer 508-1988-RB der folgende Primer eingesetzt:

1988TCE as 5'-GAT**GGATCCT**GC AAAAACA AAAACTAAGAGGATTTTC-3'

Zur Etablierung des *min*-Promotor-*lacZ*-Konstruktes Δ 30 wurde für die PCR in Kombination mit dem Primer 508-1988-RB der folgende Primer eingesetzt:

delta 30 1988 5'-GAT**GGATCCC**AGATAATTTTAAGAACA AATCGG-3'

Die Amplifikation der regulatorischen Region des *β 2-tubulin* Gens für die Etablierung der Konstrukte *β 2-dj* und *β 2-myc-dj-like* erfolgte mit Hilfe der folgenden Primer:

Beta2tub sense 5'-GCGATC**GAATTCT**GGGACTCCTCATTGTAGGAG-3'

Beta2tub as 5'-GATC**GGATCCCCC**CTTTTTCACACCGAAAAAATGG-3'

Für die Generierung des Konstruktes *β 2-dj* wurde die *don juan* cDNA mit Hilfe der folgenden Primer amplifiziert:

Babe 5'-GATC**GGATCC**ATGTTTAAGAGAACCGCTTT-3'

TGA2 5'-GATC**GGGGATCC**GCCGCGTTGAACAGA-3'

Zur Etablierung des Konstruktes *β 2-myc-dj-like* wurde die *don juan-like* cDNA mit Hilfe der folgenden Primer amplifiziert:

1984 ORF sense 5'-GATT**CTAGA**ATGCTAAAGAGACCTGCGTTAGTTT-3'

1984 ORF as 5'-GATT**CTAG**A T T A C T T C T T T T C C C C T T T T T G G C C - 3'

Der Sequenzbereich der Gene *don juan* und *min* wurde mit den Primern djprom1sense und djnachORFas bzw. 508-1988-RB und 1988 myc as zur sequenzanalytischen Überprüfung amplifiziert:

DjnachORFas 5'-GCCGCGTTGAACAGAGCTGAATGAATT-3'

djprom1sense 5'-GGATCTAAGAGTTTCGTGGGAGACGAT-3'

1988 myc as 5'-GATTCTAGAGGGCATAGCCAAATCCTGGGAGCC-3'

Die Sequenzierung des *don juan* Genbereichs erfolgte mit den Oligonukleotiden djnachORFas und djprom1sense.

Zur Sequenzierung des *min* Genbereichs wurden neben den Primern 508-1988-RB und 1988-Seq 2 die unten aufgeführten Oligonukleotide benötigt:

1988-Seq 1	5'-CTAAACTTACTCATGCTTCTGCA-3'
1988-Seq 3	5'-GCCATCAAACGAGCGTGTCGAGAAG-3'
1988-Seq 4	5'-AGTGCCGCAAGCAGGCGAAAAAGG-3'
1988-Seq 5	5'-GAAGGAGGTGAAGAAGGAGATCGC-3'

3.8 Plasmide

pBluescript IKS+	Klonierungsvektor, Stratagene, Heidelberg
pBc TTF 1	vollständige <i>don juan</i> -cDNA (0,922 kb) in pBS KS+ (<i>EcoRI</i>), Winhauer, 1995
pChab Δ Sal	auf P-Element Integration basierender Transformationsvektor für <i>Drosophila melanogaster</i> (Thummel <i>et al.</i> , 1988)
pCR II-Topo	Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pCR-Blunt	Klonierungsvektor, Invitrogen, Karlsruhe
pGreen Pelican	P-Element Transformationsvektor mit gypsy-Insulatoren stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle und stromabwärts der codierenden Sequenz für den Reporter eGFP (Barolo <i>et al.</i> , 2000).
p π 25.7wc	Helferplasmid für die P-Element-Transformation mit codierender Sequenz für die P-Element-Transposase, aber ohne P-Flügel (Karess und Rubin 1984).
pW8	auf P-Element Integration basierender Transformationsvektor für <i>Drosophila melanogaster</i> (Klemenz <i>et al.</i> , 1987)
pUAST	Transformationsvektor, um codierende Sequenzen stromabwärts einer GAL4 UAS-Bindestelle („upstream activating sequence“) zu klonieren. Hierzu wurden in den P-Element-Transformationsvektor pCaSpeR3 5 GAL4-Bindestellen, gefolgt von der hsp 70

Promotorsequenz vor die Klonierungsstelle, und die SV40-Polyadenylierungssequenz hinter die Klonierungsstelle inseriert (Brand und Perrimon, 1993)

3.9 Fliegenstämme

white	w ^{1,+} ; Transformationsstamm, Laborzucht der Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl, Marburg.
CSTM	w*; CyO/Sp; Sb/Ubx Multimarkerstamm zur kreuzungsgenetischen Lokalisation inserierter Elemente.
Dj-lacZ ,2,3,4 und 5 Dj-lacZ trans 1 und trans 2	w; P (w+;dj-lacZ): Transgene, P-element tragende Fliegenstämme, die ein <i>don juan</i> Promoter-lacZ Konstrukt auf dem 3.Chromosom tragen.
Dj-lacZ Δ+11/+14	w; P (w+;dj-lacZ): Transgene, P-Element tragende Fliegenstämme, die ein <i>don-juan</i> Promoter-lacZ Konstrukt auf dem 3.Chromosom tragen.
Sgs 58 AB	GAL4-Treiber-Linie, die unter der Kontrolle der Sgs4-regulatorischen Elemente steht. (Zur Verfügung gestellt von A. Hoffmann, Berlin.)
Boule 1/TM3	rezessiv männlich steriler Stamm aufgrund einer P-Element-Insertion im <i>boule</i> Gen (Eberhart <i>et al.</i> , 1996)
Rb79D 2	<i>ry</i> <i>Rb97D</i> ² /TM3 ; <i>ry</i> ^{RK} <i>Sb</i> ; Deletionsmutante des <i>Rb97D</i> -Gens (Heatwole und Haynes 1996; von Susan Haynes zur Verfügung gestellt)
TSR	<i>ry</i> <i>Df(3R)Hrb87F</i> /TM3; männlich sterile Mutante aufgrund der Defizienz <i>Df(3R)Hrb87F</i> (Haynes <i>et al.</i> , 1997; von Susan Haynes erhalten).
aret⁰¹²⁸⁴/TM3	P(<i>ry</i> ^{+t7.2} =PZ)aret ⁰¹²⁸⁴ <i>cn</i> ¹ /CyO; <i>ry</i> ⁵⁰⁶ ;

	rezessiv männlich steriler Stamm aufgrund einer P-Element-Insertion im <i>aret</i> Gen (Spradling <i>et al.</i> , 1999)
<i>can</i>¹²/TM3	rezessiv männlich steriler Stamm aufgrund einer P-Element-Insertion im <i>cannonball</i> Gen (Hiller <i>et al.</i> , 2001)
Bloomington, Defizienz I833	Df(3R)Antp7, <i>red</i> ¹ <i>e</i> ¹ /TM3, <i>Sb</i> ¹ , trägt eine Deletion des genomischen Bereichs von 84B01-02 bis 84D01-04, ist homozygot embryonal letal und wird deshalb über dem Balancer TM3, Sb gehalten.
Bloomington, Defizienz 2009	Df(3R)Scx4; <i>Scr</i> ^{Wrv4} , <i>red</i> ¹ , <i>e</i> ¹ /TM3, <i>Sb</i> ¹ , trägt eine Deletion des genomischen Bereichs von 84B03 bis 84D01-02, ist homozygot embryonal letal und wird deshalb über dem Balancer TM3, Sb gehalten.
Bloomington, Linie 4534	w, <i>Sb</i> ¹ /TM3, P(w+mC=Act-GFP) JMR2, <i>Ser</i> ¹ , Balancerstamm. Fliegen dieser Linie exprimieren GFP-(S65T) unter der Kontrolle des Actin 5C Promotors.
Bloomington, Linie 2574	I(3)84Bc ¹ , pp, <i>cu</i> ¹ /TM3, <i>Sb</i> ¹ , Fliegen dieses Stammes tragen eine durch EMS induzierte rezessiv letale Mutation in dem Gen <i>I(3)84Bc</i> .
Bloomington, Linie 2441	<i>Ki</i> ¹ , <i>roe</i> ² <i>p</i> ^o /TM3, <i>Sb</i> ¹ ; Fliegen dieses Stammes tragen eine durch EMS induzierte rezessive Mutation in dem Gen <i>rotund</i> . Homozygote <i>Drosophilae</i> zeigen einen rauhen Augenphänotyp aufgrund irregulärer Facetten.
<i>rn</i>⁵	w; <i>rn</i> ⁵ / TM3 <i>Sb</i> e rezessiv männlich steriler Stamm aufgrund einer P-Element-Insertion im <i>rotundt</i> Gen
<i>alphaTub84Bnc</i>³³	<i>alphaTub84B</i> ^{nc33} , <i>red</i> ¹ ; <i>e</i> ¹ /TM3; <i>Sb</i> ¹ Fliegen dieses Stammes tragen eine durch EMS induzierte rezessiv männlich sterile Mutation in dem Gen <i>α-tubulin84B</i> .

3.10 Bakterienstämme

Folgende Stämme des Bakteriums *Escherichia coli* K12 wurden für Klonierungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet:

DH5 α

dlac U 169, F⁻, *endA1*,
hsdR17, *sup* E44, *thi-1*,
recA1, *gyrA96*, *relA1*, Φ
80 *dlacZ*, dM15, Lamda⁻

XL1-Blue

supE44, *hsdR17*, *recA1*,
endA1, *gyrA96*, *relA1*,
lac⁻, F' [*proAB*, *lacI*^f, *lacZ*
dM Tn10(*tet*^R)];
Stratogene

3.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen aller DNA-Proben wurden von der Firma SeqLab, Göttingen durchgeführt.

3.12 Computer-Software

Textverarbeitungsprogramm:

Bildbearbeitungsprogramm:

DNA-Analyseprogramme:

Microsoft Word 2000

Adobe Photoshop 5.0

Lasergene Navigator

Clustal X

SequVu

4. Methoden

I. Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

4.1 Zucht und Stammhaltung von *Drosophila melanogaster*

Maismehlagar	90 g Agar
	1 kg Maismehl
	1 kg Malzextrakt
	230 g Zuckerrübensirup
	120 ml 20 % Nipagin in 70 % Ethanol
	360 ml 20 % Propionsäure
	ad 12 l in Wasser

Die Fliegenzucht erfolgt in Kunststoffröhrchen, die zu ca. einem Viertel mit Maismehlagar gefüllt sind. Auf das Zuchtmedium wird als Nahrungsquelle dienende Trockenhefe gestreut. Die Flaschen werden mit Caeprenstopfen verschlossen und die Fliegen bei 18 °C bzw. 24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % gehalten.

Das Umsetzen der Fliegen auf neue Flaschen erfolgt alle zehn bis einundzwanzig Tage in Abhängigkeit ihrer Generationszeit, welche sich nach der Umgebungstemperatur richtet. Beim Ansetzen von Kreuzungsexperimenten bzw. der Auswahl spezieller Individuen zur Nachzucht werden diese vor dem Umsetzen kurz mit CO₂ oder Diethylether betäubt.

4.2 *Drosophila*-Kreuzung

Zur Kreuzung der Fliegen muß gesichert sein, dass sich die weiblichen Fliegen im virginellen Zustand befinden. Hierzu werden die Flaschen, welche schlüpfbereite Fliegen enthalten, von allen bisher geschlüpften Fliegen befreit. Die in den nächsten 6 h bei Raumtemperatur schlüpfenden Fliegen sind mit Sicherheit virginell, da die Spermienentwicklung der Männchen diesen Zeitraum benötigt. Die Spermatogenese kann bei 18 °C auf 21 h verlängert werden. Dafür muß diese Temperatur konstant beibehalten werden.

4.3 Mutagenese adulter Fliegen mit Ethylmethansulfonat

EMS-Lösung	0,26 % EMS in 1% Sucrose-Lösung
Dekontaminierungslösung	1 M NaOH-Lösung
	1,25 % Thioglycolsäure

Das monofunktionell alkylierende Agenz EMS setzt Guanin zu O⁶-Ethylguanin um, was nach der Replikation zur Transition von Guanin zu Adenin führt (Snow *et al.*, 1984; Williams und Shaw, 1987). Die Bildung von O⁴-Ethylthymin führt hingegen von TA zu GC Transitionen. Durch die Alkylierung von Stickstoff kann es auch zur Depurinierung und damit zu Strangbrüchen kommen.

4.3.1 Vorsichtsmaßnahmen beim Arbeiten mit EMS

EMS ist hochgradig mutagen und toxisch. Aus diesem Grund sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen unbedingt eingehalten werden:

Alle Arbeiten müssen unter dem Abzug erfolgen. Der Abzug sollte vor der Mutagenese freigeräumt werden und mit beschichtetem Papier, wie es auch für radioaktives Arbeiten verwendet wird, ausgelegt werden. Das Papier wird anschließend mit Klebeband fixiert. In einem 5 Liter Plastikbecher werden vier Liter der Dekontaminierungslösung angesetzt und mit Alufolie bedeckt in den hinteren Bereich des Abzugs gestellt. Das Volumen der EMS-Lösung sollte genau abgeschätzt werden. Auf keinen Fall sollte eine größere Menge als benötigt angesetzt werden. Die erforderliche Sucrose Menge wird in ein geeignetes Glasgefäß gefüllt. Zur Sicherheit sollten zwei Paar Handschuhe getragen werden, so dass ein Paar unter dem Abzug ausgezogen und dekontaminiert werden kann.

Die Gegenstände sollten mindestens 24 Stunden in der Denaturierungslösung unterm Abzug bleiben. Anschließend können sie gespült werden.

4.3.2 Vorbereiten der Fliegen für die Mutagenese

In der Regel werden 1000 Männchen im Alter von 3-5 Tagen mutagenisiert. Die Fliegen werden zuvor auf 10 leere Fliegenflaschen verteilt, in denen sie vor der Mutagenese 6-12 h hungern.

4.3.3 Mutagenese

Zunächst wird die EMS-Lösung in Sucrose angesetzt. Eine typische EMS-Sucrose (Saccharose) Lösung enthält 1g Sucrose (1 %) und 0,26 ml EMS (25 mM) gelöst in 100 ml Wasser.

Das EMS wird unter die Oberfläche der Sucrose Lösung pipettiert. Man sieht Tropfen einer gelblichen, öligen Flüssigkeit zu Boden sinken. Die Pipettenspitze wird anschließend sofort in die Dekontaminierungslösung geworfen. Mit einer 20 ml Spritze werden nun die öligen Tropfen durch vorsichtiges auf- und abziehen dispergiert bis keine Tropfen mehr sichtbar sind. Auch diese Spritze muß dekontaminiert werden.

Je 30 Männchen werden in einer Flasche mutagenisiert. Hierzu werden je zwei rund zugeschnittene Whatmann Filterpapierstücke in eine große Flasche gelegt. Die Kreise sitzen fest auf dem Boden der Flaschen, so dass sie nicht rausfallen, wenn die Flaschen umgedreht werden um die Fliegen rauszuschütteln. Die Flaschen werden im Abzug platziert. Je 1 ml der EMS Lösung wird in eine Flasche pipettiert. Das ist genug, um das Papier zu befeuchten und eine kleine Lache unter dem Papier zu lassen. Die männlichen Fliegen werden über einen Trichter in diese Flaschen gegeben, die mit Caeprenstopfen verschlossen werden. Die Fliegen sollen das EMS über Nacht aufnehmen. Währenddessen stehen die Flaschen in einer Wanne, die mit einem Deckel bedeckt, aber nicht luftdicht verschlossen ist. Die Frontscheibe des Abzugs sollte komplett verschlossen und mit Klebeband fixiert sein. Der Abzug wird für die Zeit der Mutagenese ausgeschaltet, sollte aber in Betrieb sein, wenn er geöffnet wird. Nach Ablauf der Mutagenese (24 h) werden die Männchen über einen Trichter in Flaschen mit frischem Medium gegeben. Auf dem frischen Medium erholen sich die Fliegen 24 h lang.

Bevor die Fliegen aus den Flaschen, die die EMS-Sucrose Lösung enthalten, entfernt werden, wird die Denaturierungslösung neu angesetzt. Nachdem die Fliegen schließlich auf neues Medium gesetzt worden sind, wird die Denaturierungslösung in die Flaschen geschüttet und die Flaschen bleiben so mindestens 24 h stehen.

4.4 Sammeln von Fliegenembryonen und deren Entchorionisierung

Apfelsaftagar

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

Zur Eiablage werden die Fliegen auf mit Apfelsaftagar gefüllte Petrischalen gesetzt (Durchmesser 5cm), deren Oberfläche mit einer Spatelspitze Hefe bestrichen wird. Große Mengen von gelegten Wildtyp-Embryonen werden auf mit Maismehlagar gefüllten Schalen, die in einen Käfig gestellt werden, gesammelt.

Nach gewünschter Entwicklungszeit werden die Eier von der Agaroberfläche abgesammelt, in ein Stahldrahtkorbchen überführt und mehrfach mit 0,7 % NaCl (+ 0,02 % Triton X-100) gewaschen. Dabei dient die Zugabe des Triton zu der Salzlösung dazu, die Wasserspannung aufzuheben und so ein Festsetzen der Eier am Gefäßrand zu vermeiden. Durch Zugabe einer 1:1 Verdünnung von Klorix (Haushaltsreiniger, Natriumhypochlorid) in Wasser für 1-2 Minuten werden die Eier entchorionisiert. Dabei wird der Grad der Chorionauflösung unter dem Binokular kontrolliert. Schließlich werden die Eier erneut mehrfach mit 0,7 % NaCl (+ 0,02 % Triton X-100) gewaschen.

4.5 Herstellung transgener *Drosophila*-Linien

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

Die von Rubin und Spradling entwickelte Methode der P-Element unterstützten Transformation von *Drosophila melanogaster* mittels Injektion von P-Element-Transposon tragenden Vektoren wurde verwendet, um transgene Fliegenstämme zu etablieren. Die Transformationsvektoren tragen als Erkennungssequenz das *white*⁺-Gen. Dies ermöglicht bei Injektion in Fliegenembryonen mit genetischem *white*⁻-Hintergrund eine Selektion der *white*⁺ exprimierenden, transgenen Tiere. Aufgrund des Wechsels der Augenfarbe von weiß zu rot in der F1 Generation (Klemenz *et al.*, 1987). Die Integration des P-Elements in das Genom ist jedoch nur durch gleichzeitige Injektion eines Transposase tragenden Helferplasmides möglich, da die Transposase in dem Transformationsvektor nicht mehr funktionsfähig ist.

Vorbereitung der Injektions-DNA

Die Plasmid-DNA für die Injektion wurde über Standart-Midi-Präparation (siehe 4.10.2) gewonnen und zur Entfernung toxischer Substanzen aus der Plasmid-Präparation ein weiteres mal über Elutip-D-Säulen (Schleicher und Schüll) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die gefällte DNA wurde in Injektionspuffer aufgenommen (0,1 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,4; 5 mM KCl). Plasmid-DNA-Lösungen der Konzentration von 0,4 µg/µl für den P-Element-Vektor und 0,1 µg/µl für das Helfer-Plasmid (pπ25.7wc) wurden als Gemisch für die Injektion verwendet. Vor

der Benutzung der DNA wurde die Lösung zur Entfernung von Schwebeteilchen für 30 min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert.

Vorbereitung der Embryonen für die Mikroinjektion

200-300 *white*-Fliegen wurden ein bis zwei Tage nach dem Schlüpfen auf mit Hefe bestrichenen Apfelsaftagarschalen in mit Luftlöchern versehenen Plastikflaschen bei 18 °C gehalten. Um eine Synchronisierung des Legeverhaltens der Fliegen zu erreichen, wurden diese Apfelsaftagarschalen am Tag der Injektion zunächst in einstündigen Intervallen gewechselt. Die Injektionsrelevanten Ablagen wurden dann in 15 minütigen Zeitspannen abgesammelt. Dies ist nötig, da sich die zu injizierenden Embryonen alle im gleichen Altersstadium befinden müssen. Die Embryonen konnten nun mit einer 0,7 % igen NaCl-Lösung abgesammelt und in kleinen Waschsieben dechorionisiert werden. Hierzu wurden sie eine Minute mit einer Natriumhypochlorid-Lösung (50 % Dan Klorix® in Wasser) versetzt und anschließend mehrfach mit einer 0,7 % igen-NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurden die Embryonen unter Verwendung einer Präpariernadel auf einen rechteckigen Apfelsaftagarblock in definierter Orientierung aufgereiht, und zwar mit dem posterioren Pol zur Kante des Agarblöckchens. Die so angeordneten Embryonen konnten dann auf ein klebriges Deckgläschen (Klebstoff: in Heptan gelöster Kleber von Tesa®-Packband) übertragen werden. Um den inneren Turgordruck der Embryonen vor dem Injizieren zu verringern und somit ein erfolgreiches Penetrieren der Injektionsnadel in den Embryo zu gewährleisten, wurden die Deckgläser nun 10 Minuten in einem mit Kieselgel gefüllten Exsikkator getrocknet. Um ein weiteres Austrocknen zu verhindern, mußten die Embryonen anschließend sofort mit Voltaleföl überschichtet werden.

Mikroinjektion

Ein Aliquot der zu transformierenden DNA-Lösung wurde mit einer 50 λ -Glaskapillare (Yankee Mikropet) in eine zuvor hergestellte Injektionskapillare überführt. Bei der Injektionsnadel handelt es sich um eine Borosilikat-Kapillare mit Innenfilament (GC 120F-10; Clark Electromedical Instruments), die in einem Kapillarziehgerät (Vertical Pipette Puller 720, Kopf Instruments) zur weiteren Verjüngung der Spitze ausgezogen wurde. Die befüllte Nadel wurde dann in der Halterung eines Mikromanipulators (Leitz) befestigt, der mit dem Injektionsapparat verbunden ist. Die Injektion erfolgte über eine automatisch gesteuerte Druckluft-betriebene Mikroinjektionsapparatur (Eppendorf microinjector model 5242) unter Verwendung eines Inversionsmikroskops (Leitz) bei 200facher Vergrößerung. Der Injektionsdruck wurde so eingestellt, dass keine Lösung aus der Kapillare ausströmt, solange sich

Die Anzucht der Bakterienstämme in Flüssigkultur erfolgt in 3 ml LB-Medium. Zur Herstellung frischer Übernachtskulturen wird das LB-Medium jeweils mit einer Einzelkolonie bzw. 50 µl einer Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler (150 Upm) inkubiert. Nach Transformation ampicillinresistenter Plasmide in die kompetenten Zellen können antibiotikaresistente Bakterienstämme durch Zugabe von Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml selektioniert werden. Für eine kurzfristige Stammhaltung von weniger als zwei Monaten wird die Bakterienkultur auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Die Platten werden im Anschluss über Nacht bei 37 °C gelagert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Zur langfristigen Stammhaltung werden 500 µl LB-Amp-Bakteriensuspension mit 500 µl Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.8 Herstellung kompetenter Zellen

TFBI
100 mM RbCl₂
30 mM KAc
10 mM CaCl₂
15 % v/v Glycerin (steril)
pH 5,8; autoklavieren, anschließend werden 50 mM steril filtriertes MnCl₂ zugegeben.

TFBII
10 mM MOPS
10 mM RbCl₂
75 mM CaCl₂
15 % v/v Glycerin (steril)
pH 6,5; autoklavieren

500 ml LB-Medium werden mit 5 ml einer frischen *E. coli* Kultur angeimpft. Die Kultur wird bei 37 °C schüttelnd inkubiert, bis die Absorption der Zellen eine optische Dichte von 0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm erreicht hat. Im Anschluß werden die Zellen auf 50 ml Falcons verteilt (jeweils 40 ml) und 5 min bei 6000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in jeweils 0,4 VT (15 ml) TFBI resuspendiert (vortexen). Die Suspension wird 90 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 4 °C und 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 2 ml (0,04VT) TFBII gelöst (vortexen) und 15 Minuten auf Eis gestellt. Aliquots von 200 µl werden in Eppendorfreaktionsgefäße gefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

4.9 Transformation kompetenter Bakterien

(Sambrook *et al.*, 1989)

200 µl kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 1-20 µl Plasmid-DNA-Lösung versetzt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung von 5 Minuten bei 37 °C im Wasserbad wird der Ansatz sofort für 10 Minuten auf Eis gelagert. Schließlich werden 300 µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben. Das Reaktionsgefäß wird eine Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Während dieser Zeit bildet sich die Antibiotikaresistenz aus. Der gesamte Ansatz wird anschließend auf entsprechenden Selektionsplatten (Ampicillin 100 µg / ml, Kanamycin 50 µg / ml, IPTG, X-Gal) ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

4.10 Präparation von Plasmid DNA aus *E.coli*

4.10.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (alkalische Lyse)

(Birnboim und Doly, 1979)

Puffer 1 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
 10 mM EDTA
 100 µg RNase A/ml

Puffer 2 200 mM NaOH
 1 % (w/v) SDS

Puffer 3 2,6 M KAc/Essigsäure
 (pH 5,2)

Die Birnboim-Doly-Technik nutzt das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler DNA und Plasmid DNA bei einem Wechsel von saurem zu alkalischem pH aus.

3 ml LB-Medium (+ Antibiotikum) werden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Überführung von ca 1 ml der Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß werden die Zellen abzentrifugiert (6000 UpM; 1 min) und das Medium abgesaugt. Die sedimentierten Zellen werden in 100 µl Puffer 1 resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer 2 und anschließender Inkubation des Ansatzes für 5 Minuten bei Raumtemperatur werden die Zellen durch alkalische

Lyse aufgeschlossen. Die Ausfällung der bakteriellen chromosomalen DNA sowie denaturierter Proteine erfolgt durch Zugabe von 150 µl Puffer 3 und anschließender Zentrifugation (5 Minuten bei 13000 UpM). Der Überstand wird in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 320 µl Isopropanol versetzt. Die DNA wird durch eine 30 minütige Zentrifugation (13000 UpM, 10 °C) pelletiert, durch 10 minütige Zentrifugation mit 70 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und zum Abschluß in 25 µl H₂O gelöst.

4.10.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

(Genomed Jetstar, nach Angaben des Herstellers)

E1-Puffer	50 mM Tris / HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg RNase A / ml	E5-Puffer	800 mM NaCl 100 mM NaAc / Essigsäure (pH 5,0)
E2-Puffer	200 mM NaOH 1 % SDS	E6-Puffer	1250 mM NaCl
E3-Puffer	3,2 mM KAc (pH 5,5)		
E4-Puffer	600 mM NaCl 100 mM NaAc / Essigsäure (pH 5,0) 0,15 % Triton X-100		

Zur Präparation größerer Mengen DNA werden 50 ml LB-Amp-Medium mit 50 µl einer frischen *E.coli*-Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Die Bakterien werden am nächsten Tag in einen 50 ml Falcon überführt und zentrifugiert (6000 UpM, 10 min). Die sedimentierten Zellen werden in 4 ml Puffer E1 resuspendiert und nach Zugabe von 4 ml Puffer E2 fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zellen aufgeschlossen, die DNA denaturiert und die RNA abgebaut. Zur Neutralisierung werden dann 4 ml Puffer E3 zugegeben. Während der anschließenden Inkubation für 10 Minuten auf Eis fallen chromosomale DNA und Proteine aus. Sie werden durch Zentrifugation (30 min, 6000 UpM, RT) sedimentiert. Der plasmidhaltige Überstand wird auf eine zuvor mit Puffer E4 äquilibrierte Genomed-Anionenaustauschersäule geladen. Die Plasmid

DNA bleibt bei diesem Schritt an die Matrix der Säule gebunden. Erst nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 10 ml Puffer E5 erfolgt die Elution der Plasmid DNA mit 5 ml Puffer E6.

Die Plasmid DNA wird mit 0,7 VT Isopropanol gefällt (30 min, 13000 UpM, 10 °C) und mit 70 % igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Präzipitat wird schließlich in 80 µl destilliertem Wasser gelöst.

4.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA / RNA in Agarosegelen

1 × TAE-Puffer 200 mM Tris-Acetat (pH 7,7)
 10 mM EDTA

1 × TBE-Puffer

1 × MOPS 20 mM MOPS (pH 7,0)
 1 mM EDTA
 8 mM Natriumacetat

10 × Auftragspuffer 0,5 % (w/v) Xylencyanol
 0,5 % (w/v) Bromphenolblau
 40 % (v/v) Glycerin in 1 × TAE,
 1 × TBE bzw 1 × MOPS

DNA Fragmente unterschiedlicher Größe zeigen in Agarosegelen ein differenziertes Laufverhalten. Die Poren der Agarose bieten kleineren Fragmenten einen geringeren Widerstand, so dass die kleineren Fragmente schneller wandern als die großen.

Analytische und präparative Gelelektrophoresen wurden mit Horizontalgelen der Größe 6 cm × 9 cm bzw. 8 cm × 12 cm durchgeführt. Je nach gewünschter Trenneigenschaft werden Agarosekonzentrationen von 0,8-2 % (w / v) in 1 × TAE (für analytische DNA-Gele), 1 × TBE (für präparative DNA-Gele), bzw. 1 × MOPS (für RNA-Gele) verwendet. Nach dem Aufkochen der Agarose und anschließendem Abkühlen auf 60 °C wird Ethidiumbromid zugegeben (0,01 µg Ethidiumbromid auf 100 ml Agaroselösung). Als Laufpuffer dient 1 × TAE, 1 × TBE, bzw. 1 × MOPS. Vor dem Auftragen werden die DNA-Proben zur Erhöhung der Dichte mit 1/10 VT 10 × Auftragspuffer versetzt, der analog der DNA bzw. RNA, im elektrischen Feld Richtung Anode "wandert" und somit der Markierung der Lauffront dient. Die

Elektrophorese erfolgt bei 50-100 V Gleichspannung. Anschließend wird das Gel bei UV-Durchlicht analysiert und dokumentiert, wobei die DNA aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids fluoresziert.

4.12 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

(GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech)

Capture Puffer enthält Acetat und chaotrope Salze

Waschpuffer 10 mM Tris / HCl
1 mM EDTA
80 % Ethanol

100 bp bis 48 kp große DNA Fragmente können mit Hilfe der GFX™ PCR DNA und Gel Banden-Extraktionsmethode aus Agarosegelen isoliert werden. Das chaotrope Reagenz, das bei dieser Methode eingesetzt wird, denaturiert Proteine, löst Agarose und fördert die Bindung doppelsträngiger DNA an eine Glasfasermatrix. Das gewünschte DNA-Fragment wird unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Pro 10 mg Gelstück wurden 10 µl Capture Puffer hinzugefügt, bevor der Reaktionsansatz gut gemischt bei 60 °C für 15 Minuten inkubiert wird, um die Agarose zu lösen. Der Reaktionsansatz wird anschließend auf die Glasfasermatrix (GFX)-Säule gegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Zentrifugation (13000 UpM, 30 s) wird die Säule in ein Sammelgefäß gestellt. Die darin aufgefangene Flüssigkeit wird verworfen und 500 µl Waschpuffer werden zum Waschen der säulengebundenen DNA auf die Säule pipettiert. Protein- und Salzverunreinigungen werden hierdurch entfernt. Nach erneuter Zentrifugation (13000 UpM, 30 s) wird das Sammelgefäß nun durch ein Mikroreaktionsgefäß ersetzt. Die DNA wird eluiert, indem 10-25 µl A.dest. auf die Glasfasermatrix der Säule pipettiert werden. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die eluierte DNA durch Zentrifugation (130000 UpM, 1 min) im Reaktionsgefäß aufgefangen.

4.13 Photometrische Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer maximalen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm photometrisch quantifiziert werden. Aus der Absorption (optische Dichte OD) läßt sich unter Berücksichtigung der folgenden Parameter die

Nukleinsäure-Konzentration in $\mu\text{g} / \text{ml}$ bei einer Quarzküvettedicke von 1 cm berechnen:

Doppelsträngige DNA	$\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
Einzelsträngige DNA	$\text{OD}_{260} \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
RNA	$\text{OD}_{260} \times 37 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

4.14 RNA-Präparation aus ganzen *Drosophilae* und *Drosophilae* Testes (RNeasy Mini Kit, Qiagen)

Ca. 100 *Drosophilae* bzw. 100-200 Testes werden in einem Mikroreaktionsgefäß gesammelt, nach Zugabe von 350 μl RLT Puffer in flüssigem Stickstoff gefroren und sofort danach mit einem Teflon-Pistill homogenisiert. Im Anschluß wird das Lysat 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 350 μl 70 % Ethanol versetzt. Durch Pipettieren wird die Flüssigkeit gemischt.

700 μl der Probe werden auf eine RNeasy Mini Säule gegeben, welche anschließend in einem Sammelgefäß 15 Sekunden bei 10000 Upm zentrifugiert wird. Nach Leerung des Sammelgefäßes werden 700 μl RW1 Puffer auf die Säule pipettiert und wieder 15 Sekunden bei 10000 Upm zentrifugiert. Nach Überführung der Säule in ein neues Sammelgefäß werden 500 μl RPE Puffer auf die Säule pipettiert und erneut 15 Sekunden bei 10000 Upm zentrifugiert. Es werden nochmals 500 μl RPE Puffer auf die Säule gegeben, welche abschließend im entleerten Sammelgefäß 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wird, um die RNeasy Membran zu trocknen. Um Sicherzugehen, dass die Membran trocken ist und restlicher Ethanol entfernt wurde kann die Säule nochmals 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert werden. Die Säule wird schließlich in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß transferiert. Direkt auf die Membran werden 30 μl RNase freies Wasser gegeben. Die RNA wird durch Zentrifugation bei 10000 Upm für 1 Minute eluiert.

4.15 Isolierung von PolyA⁺-mRNA aus Gesamt-RNA-Proben (Oligotex® mRNA Mini Kit, Qiagen)

(Die folgenden Angaben beziehen sich auf einen Gesamt-RNA-Gehalt von = 0,25 mg)

Die Gesamt-RNA wird in ein RNase-freies 1,5 ml Mikrozentrifugen-Cup mit 250 μl RNase-freiem Wasser überführt. Nach Zugabe von 250 μl Puffer OBB (kann

präzipitieren; wenn nötig bei 37 °C lösen und bei Raumtemperatur lagern) und 15 µl Oligotex-Suspension (zuvor auf 37 °C erhitzen, vortexen und bei Raumtemperatur lagern) wird das Cup durch Pipettieren oder Schütteln gemischt und für 3 Minuten bei 70 °C inkubiert. Direkt darauf folgt eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei 20-30 °C. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 13000 Upm wird der Überstand vorsichtig abgenommen (am Besten etwa 50 µl zurücklassen, um das Pellet nicht zu verlieren und den abgenommenen Überstand fürs erste aufbewahren), das Pellet in 1 ml Puffer OW2 resuspendiert und erneut für 2 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und der letzte Schritt wiederholt. Danach wird das Pellet durch 3-4maliges auf- und abpipettieren in 20 µl Puffer OEB (70 °C) resuspendiert und zur Elution für 2 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Der die mRNA enthaltende Überstand wird vorsichtig in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß überführt und der letzte Schritt wiederholt. Dazu wird das Pellet erneut in Puffer OEB resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand mit dem ersten vereint. Die Lagerung erfolgt bei -20°C oder -70°C in Elutionspuffer für 2-3 Jahre.

III. Enzymatische Nukleinsäuremanipulation

4.16 Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Vektor und Insert werden mit speziellen Restriktionsenzymen gespalten, wodurch überhängende Enden (sticky ends) entstehen.

Die für die Reaktion erforderliche Menge an Enzym wird in der Einheit Units (U) angegeben. Nach allgemeiner Übereinkunft ist ein Unit die Menge an Enzym mit der 1 µg λ-DNA in einer Stunde vollständig geschnitten wird.

Mit Hilfe der folgenden Formel können die einzusetzenden Enzymeinheiten berechnet werden:

benötigte Units an Enzym = (eingesetzte pmol an DNA x Anzahl der Schnittstellen des Enzyms) / (0,03 x Anzahl der Schnittstellen des eingesetzten Enzyms in λ-DNA).

Bevor das Enzym zugesetzt wird muss die Lösung so eingestellt werden, dass die richtigen Bedingungen für eine optimale Aktivität des Enzyms gewährleistet sind. Die meisten Restriktionsendonukleasen arbeiten bei pH 7,4 optimal, aber die einzelnen

Enzyme benötigen unterschiedliche Ionenstärken (die gewöhnlich durch NaCl bereitgestellt werden) und Mg^{2+} -Konzentrationen. Aus diesem Grund wird ein geeigneter Puffer zugegeben. Der Ansatz wird anschließend bei 37 °C (gilt für die meisten Enzyme) zwei bis drei Stunden inkubiert.

4.17 Dephosphorylierung freier 5' Enden

Um eine Religation linearisierter Vektormoleküle zu vermeiden, wird die Vektor-DNA vor der Ligationsreaktion mit alkalischer Phosphatase behandelt. Dieses Enzym spaltet die Esterbindung zwischen der Phosphatgruppe und dem C5-Atom des offenen Zuckerphosphatgerüsts und verhindert dadurch eine Veresterung mit freien 3'-Hydroxyl-Enden.

Für die Reaktion wird die DNA-Lösung mit 1 U alkalischer Phosphatase und 1 / 10 VT 10 × Reaktionspuffer versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

4.18 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten ist das Vorhandensein von kompatiblen Enden notwendig. 80-100 ng Vektor-DNA werden zusammen mit einem drei- bis zwölffachen molaren Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragmentes eingesetzt. Nach Zugabe von 1 / 10 VT 10 × Ligationspuffer und 1 U T4 DNA Ligase wird in einem Endvolumen von 20 µl ü.N. bei 16 °C ligiert.

4.19 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Saiki *et al.*, 1988; Qiagen, nach Angaben des Herstellers)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich spezifische DNA-Abschnitte amplifizieren. Voraussetzung für die gezielte Vervielfachung eines DNA-Fragmentes ist die Kenntnis endständiger Sequenzbereiche. Diese dienen der Anlagerung synthetisch hergestellter Oligonukleotide, sogenannter Primer. Unter Verwendung der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase werden die Primer komplementär zur Matrizen-DNA elongiert. Durch zyklische Wiederholungen des Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Polymerisierungsschrittes wird eine exponentielle Amplifikation des DNA-Abschnittes erzielt.

Die Reaktionsansätze umfassen ein Gesamtvolumen von 50 µl und setzen sich aus folgenden Komponenten zusammen:

X µl Template-DNA (20-70 ng)
1 µl „Vorwärts“-Primer (25 pmol/µl)
1 µl „Rückwärts“-Primer (25 pmol/µl)
2 µl dNTP-Mix (10 mM pro dNTP)
5 µl 10 × PCR-Puffer
10 µl 5 × Q-Solution (optional)
0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl H₂O

Die PCR wurde in einem Thermoblock nach folgendem Basisprogramm durchgeführt.

1. Schritt: Denaturierung	95 °C	5 Minuten
2. Schritt: Denaturierung	95 °C	1 Minute
3. Schritt: Primerhybridisierung	40-60 °C	1 Minute
4. Schritt: Polymerisierung	72 °C	¹ / ₂ -3 Minuten
5. Schritt: Polymerisierung	72 °C	6 Minuten

Nach Beendigung der DNA-Synthese in Schritt 4 wurde die Reaktion wieder bei Schritt 2 aufgenommen. Die Standard-PCR setzt sich aus 35 Amplifikationszyklen zusammen. Zur Amplifikation von Fragmenten, die im folgenden für Expressionsversuche verwendet werden, wird zur Vermeidung von Falscheinbauten die Pfu Turbo DNA-Polymerase (Stratagene) mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität im entsprechenden Puffersystem verwendet.

IV. Histologische Methoden

4.20 *In situ*-Hybridisierung an mRNA in adulten Testes

(nach Tautz und Pfeifle, 1998)

4.20.1 Markierung der Sonden-DNA

200 ng der zu markierenden Sonden-DNA werden in 11 µl destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wird die DNA für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert und sofort danach in flüssigem N₂ eingefroren. Die Eppendorfcups werden für 30 sec an zentrifugiert und gleich danach werden für die Markierungsreaktion folgende

Komponenten zugegeben: 6 μ l Hexamer-Oligonukleotid-Gemisch (10 mg/ml, Pharmacia) als "Primer"

2 μ l dNTP-Gemisch ("10 \times DIG-Labeling-Mix", Boehringer Mannheim)

1 μ l Klenow-Enzym (5 U/ μ l, USB)

Der Reaktionsansatz wird über Nacht bei RT inkubiert. Währenddessen kommt es zur Polymerisierung durch das Klenow-Enzym, wobei DIG markierte Nukleotide eingebaut werden. Erst nachdem die Sonde mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert worden ist, kann sie getestet werden.

4.20.2 Testen der Sonden-DNA

10 \times DIG I-Puffer	1 M Tris/HCl 1,5 M NaCl, pH 7,5; (autoklavieren)
DIG II-Puffer	DIG I-Puffer 1 % Blocking Reagenz (w/v) für eine Stunde bei 70° C erhitzen
DIG III-Puffer	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ , pH 9,5 (autoklavieren)
Färbelösung	10 μ l NBT 10 μ l X-Phosphat 2 ml DIG III-Puffer

Es werden 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 Verdünnungen der Sonde angesetzt. Je 1 μ l der Verdünnungen wird auf ein kleines Stück Hybond-N-Membran getropft. Nachdem im UV-Crosslinker die DNA kovalent an den Filter gebunden worden ist, wird dieser 1 Minute mit DIG I-Puffer gewaschen und dann 30 Minuten in DIG II-Puffer auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verringern. In der Zwischenzeit wird der Antikörper in DIG I-Puffer verdünnt (1:5000). Der Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragments (0,75 Units / 1 μ l)) ist gegen die Digoxigenin-Markierung der Sonden-DNA gerichtet. Nach der Inkubation in DIG II-Puffer wird der Filter für mindestens 30 Minuten in der Antikörperlösung inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, folgt ein zweimaliges Waschen der Filter in DIG I-Puffer (je 5 Minuten). Während einer 2-minütigen Äquilibrierung in DIG III-Puffer wird die Färbelösung frisch angesetzt. Der Filter wird mit ca. 2 ml Färbelösung in

einer Schale ohne Schütteln und unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Farbreaktion beruht auf der Umwandlung einer farblosen Lösung zu einem blauen Niederschlag, welche durch eine an den Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase ausgelöst wird. Die Färbung kann durch Spülen des Filters mit Leitungswasser gestoppt werden. Ist die Farbintensität der Spots stark genug (nach 10 min sollte bei der 1:10000 Verdünnung ein Signal zu sehen sein), kann die Sonde für die Hybridisierung eingesetzt werden.

4.20.3 Fixierung von adulten Testes

(nach Lantz *et al.*, 1992)

Ca. 20-30 Testes adulter Fliegen werden in PBS (siehe 4.7.1) präpariert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, das mit 100 µl 4 % Formaldehyd in PBS 10 µl DMSO (Permeabilisierungshilfe) sowie 300 µl Heptan gefüllt ist. Die Fixierung der Testes in dieser Lösung erfolgt für 20 Minuten unter Schütteln (900 UpM) bei Raumtemperatur. Nach dem Abziehen der Fixierungslösung werden die Testes zur Entfernung von Formaldehydresten mit 300 µl Methanol und 300 µl Heptan für 10 Minuten auf dem Rüttler inkubiert. Die fixierten Testes sinken danach zu Boden, die Heptan-Methanol-Phase wird verworfen und durch ein frisches Heptan-Methanol-Gemisch im identischen Mengenverhältnis wie zuvor ersetzt. Abschließend werden die Testes zweimal mit Methanol gewaschen und dann endgültig in frischem Methanol bei 4° C aufbewahrt.

4.20.4 Vorbehandlung der Testes für die Hybridisierung

(Die Wasch- und Inkubationsschritte werden, wenn nicht anders angezeigt in einem Volumen von 1 ml bei Raumtemperatur auf dem Schüttler durchgeführt.)

Nach der Fixierung werden die Testes dreimal je 5 Minuten mit PBT gewaschen, bevor zur Erhöhung der Zelldurchlässigkeit für die Sonde eine Behandlung mit Proteinase K (50 µg/ml Proteinase K Endkonzentration in PBT) folgt. Die PBT-Lösung wird hierbei soweit wie möglich von den Testes abgenommen und durch 985 µl frisches PBT ersetzt. 15 µl der Proteinase K-Stammlösung (2,5 mg/ml) werden auf die Innenseite des Reaktionsgefäßdeckels pipetiert. Sofort nach dem Schließen des Reaktionsgefäßes inkubieren die Testes 90 Sekunden auf dem Schüttler. Nachdem alle Testes zu Boden gesunken sind, wird der Überstand abgenommen und verworfen. Zur Inaktivierung der Proteinase K werden die Testes unverzüglich mit 100 µl Glycin-Lösung (Stammlösung 20 mg/ml) und 900 µl PBT für drei Minuten gewaschen. Es folgen zwei Waschschrte mit PBT für je 5 Minuten, ein erneuter

Fixierungsschritt mit 4 % Formaldehyd in PBS von 20 Minuten sowie fünf je fünfminütige PBT-Waschschritte.

4.20.5 Hybridisierung und Detektion

mit alkalischer Phosphatase

Hybridisierungslösung (HS)

50 ml Formamid
25 ml 20 × SSC
0,1 ml Heparin (50 mg/ ml)
0,1 ml 10% Tween 20
pH 6,4
ad 100 ml mit destilliertem
Wasser

Färbepuffer

100 mM NaCl
50 mM MgCl₂
100 mM Tris/HCl (pH 9,5)
1 mM Levamisol

Die Testes werden zehn Minuten in 1 ml PBT/HS (1:1), anschließend dreimal zehn Minuten in 1 ml HS gewaschen und nun zur Prähybridisierung eine Stunde bei 45° C im Heizblock inkubiert. Während dieser Zeit wird die Hybridisierungslösung vorbereitet, indem zu 4 µl Sonden-DNA 36 µl HS zugefügt und der Ansatz fünf Minuten aufgekocht wird. Unmittelbar nach dem Aufkochen muß die jetzt denaturierte Sonden-DNA zu dem Prähybridisierungsansatz gegeben werden. Durch vorsichtiges Schwenken wird die Sonde verteilt und der Ansatz über Nacht bei 45° C inkubiert. Nach dem Hybridisieren wird wiederum mehrfach gewaschen: dreimal mit vorgewärmter HS (45° C) im 45° C Heizblock und anschließend drei mal bei Raumtemperatur mit PBS/HS (1:1) für jeweils 20 Minuten. Es schliessen sich fünf weitere Waschschritte für jeweils 5 Minuten mit PBT bei Raumtemperatur an. Währenddessen wird das an Alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-DIG-Fab Fragment (Antikörper von Boehringer, Mannheim) zum Absättigen unspezifischer Bindungen mit fixierten Wildtypembryonen, die zuvor dreimal 20 Minuten in PBT gewaschen wurden, präinkubiert (ca. eine Stunde) und anschließend mit einer Antikörperkonzentration von 1:2000 in PBT zu den Testes gegeben. Die Antikörperbindung erfolgt für mindestens eine Stunde. Nach viermaligem Waschen der Testes in PBT (jeweils 20 Minuten) schliessen sich zur Vorbereitung der Testes auf die Farbreaktion drei weitere Waschschritte in Färbepuffer (einmal fünf Minuten, zweimal zehn Minuten) an. Schließlich werden die Testes in silikonisierte

Blockschälchen überführt und die Farbreaktion durch Zugabe von 3,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phosphat gestartet. Die Blockschälchen werden im Dunkeln aufbewahrt. Die Färbung kann mit dem Stereomikroskop kontrolliert und bei der gewünschten Farbtintensität mit PBT-Waschungen gestoppt werden. Anschließend werden die Testes auf einen Objektträger mit Glycerin transferiert.

4.21 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wird ähnlich verfahren wie bei der immunhistochemischen *in situ* Hybridisierung, allerdings erfolgt die Detektion nicht immunhistochemisch, sondern durch Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes. Dazu wird das Tyramide Signal Amplification System, Fluorescein-markiert (TSA-Fluorescein), verwendet.

4.21.1 Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte ebenso wie bei der immunhistochemischen *in situ* Hybridisierung.

4.21.2 Detektion (Fluoreszenz)

Nach dem Hybridisieren wird wiederum mehrfach gewaschen: dreimal mit vorgewärmter HS (45 °C) im 45 °C Heizblock und anschließend dreimal bei Raumtemperatur mit PBS/HS (1:1) für jeweils 20 Minuten. Es schliessen sich fünf weitere Waschschritte für jeweils 5 Minuten mit PBT bei Raumtemperatur an. Währenddessen wird der anti-DIG Antikörper zum Absättigen unspezifischer Bindungen mit fixierten Wildtypembryonen, die zuvor dreimal 20 Minuten in PBT gewaschen wurden, präinkubiert (ca. eine Stunde) und anschließend mit einer Antikörperkonzentration von 1:1000 in PBT zu den Testes gegeben. Die Antikörperbindung erfolgt unter leichtem Bewegen für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur, aber meistens bei 4 °C über Nacht.

4.22 *In situ* Hybridisierung an Polytänchromosomen aus larvalen Speicheldrüsen von *Drosophila*

(Langer-Safer *et al.*, 1982; Schmidt, 1992)

20 × SSC:

3 M NaCl

3 M NaH₂PO₄ · trinätriumdihydrat

auf pH 7 einstellen

Hybridisierungslösung:

5× SSC

0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosyl

0,02% (w/v) SDS

1 % (w/v) Blockingreagenz
(Boehringer)

Mit Hilfe dieser Methode können Gene auf Chromosomenebene detektiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur genauen Analyse von defizienten Fliegenstämmen eingesetzt, denen in der genetisch homozygoten Situation bestimmte Gene fehlen. Hierzu werden DNA-Sonden mit der DNA von Polytänchromosomen larvaler Speicheldrüsen (3. Larve) hybridisiert. Fliegen des defizienten Stammes werden mit Fliegen des *white*-Stammes gekreuzt. Die aus der Kreuzung resultierende F1-Generation trägt genotypisch ein defizientes Chromosom über einem Wildtypchromosom. Polytänchromosomen von „wandernden“ Larven dieser Generation werden für die Hybridisierung verwendet. Die F1-Larven werden in kleiner Populationsdichte bei 18 °C aufgezogen, um möglichst große Speicheldrüsen zu erhalten. Die Präparation erfolgt dann in 45 %iger Essigsäure auf einem Objektträger. Bei der Präparation werden die Speicheldrüsen soweit wie möglich von anhaftendem Fettgewebe befreit und schließlich auf einen gelatinisierten Objektträger mit einem Tropfen frischer 45 % iger Essigsäure überführt. Nach 2-3 Minuten wird ein Deckglas (18×18 mm) luftblasenfrei aufgelegt und die überschüssige Essigsäure mit einem Whatmanpapierstreifen abgesaugt. Durch mehrfaches Beklopfen und leichtes Verschieben des Deckglases mit einem Bleistift werden die Chromosomen gespreitet. Nach Auflegen eines Stücks Whatmanpapier werden die Chromosomen mit einem hohen Druck gequetscht. Der Druck muß senkrecht erfolgen ohne seitliches Verschieben, damit die Chromosomen nicht durch Scherkräfte zerissen werden. Das kann unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Sofort danach wird das Präparat in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Umriss des Deckglases wird mit einem Glasschneider markiert und mit einem Skalpell wird das Deckglas zügig abgesprengt. Das Präparat wird für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4 °C, in 100 % Ethanol entwässert. Danach können die Präparate luftgetrocknet werden. Unter dem Mikroskop werden zur Weiterverarbeitung geeignete Präparate ausgesucht.

Für die Behandlung der Objektträger mit Gelatine werden diese zunächst 15 Minuten in 1 M HCl entfettet und anschließend für 30 Minuten in Wasser gelegt. Nachdem die Objektträger an der Luft getrocknet sind, werden sie für 13 Minuten in 0,3 % (w/v) Gelatine, 0,03 % (w/v) Chromalaun gestellt. Abschließend werden die nun mit Gelatine beschichteten Objektträger möglichst staubfrei an der Luft getrocknet.

4.22.1 Vorbereitung der Präparate zur Hybridisierung

Vor der Hybridisierung werden die Präparate zunächst einer RNase-Behandlung unterzogen. Dazu werden die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt. 100 µl einer 2 × SSC Lösung, die 200 µg/ml RNase enthält, werden auf das Präparat aufgetragen, ein 34 × 34 mm Deckglas wird aufgelegt und die Kammer wird für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Deckgläschen in 2 × SSC von den Objektträgern gespült. Die Präparate werden in eine Schiffsche Küvette gestellt, die auf 65 °C vorgewärmtes 2 × SSC enthält, und 30 Minuten bei 65 °C hitzebehandelt. Nach einer 2 minütigen Waschung der Präparate in 2 × SSC bei Raumtemperatur wird die chromosomale DNA acetyliert. Dazu werden 600 ml einer 0.1 M Triethanolamin/HCl-Lösung (Stammlösung 1 M, pH 8,0) in eine Küvette gegeben und mit einem Magnetrührer stark durchmischt. 10 Sekunden nach Zugabe von 375 µl Essigsäureanhydrid wird der Rührer ausgestellt. Sofort werden die Objektträger in die Küvette gestellt und 10 Minuten inkubiert. Nach zwei fünfminütigen Waschschritten in 2 × SSC wird die DNA in einer frisch verdünnten 0,07 M NaOH-Lösung für 3 Minuten denaturiert. Die Präparate werden daraufhin zweimal 5 Minuten mit 2 × SSC gewaschen und im Anschluß einer Ethanolreihe zur Dehydrierung unterworfen. Dabei wurden die Objektträger zweimal 5 Minuten in 70 % Ethanol und schließlich 5 Minuten in 96 % Ethanol inkubiert. Die Präparate werden luftgetrocknet.

Die Digoxigenin-Markierung der für die *in situ* Hybridisierung an Polytänochrosomen eingesetzten Sonden erfolgt nach 4.20.1

4.22.2 Hybridisierung

Die Digoxigenin-markierte Sonden-DNA wird 1:20 in Hybridisierungspuffer verdünnt (0,5 µl Sonde in 10 µl Puffer). Die Probe wird 5 Minuten gekocht und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation werden 10-15 µl der Lösung pro Objektträger für die Hybridisierung eingesetzt. Dazu wird die Lösung auf das

Präparat gegeben und luftblasenfrei mit einem 18 × 18 mm großen Deckglas bedeckt. Durch Umrandung mit Fixogum (Marabu) werden die Präparate abgedichtet. Die Inkubation für 12 bis 18 Stunden erfolgt in einer mit 4 × SSC befeuchteten Kammer bei 58 °C. Durch sehr vorsichtiges Entfernen des Fixogums und Einstellen der Objektträger in eine Küvette mit 2 × SSC werden die Deckgläser entfernt. Danach werden die Objektträger dreimal 15 Minuten bei 53 °C in 2 × SSC gewaschen.

4.22.3 Signal Detektion

Die Objektträger werden zweimal 2 Minuten bei Raumtemperatur in PBS gewaschen und anschließend 2 Minuten in PBT (1 × PBS + 0,1 % Triton-X-100). Abschließend werden sie kurz in eine Küvette mit PBS gestellt. Die Inkubation mit dem Anti-DIG-Peroxidase Antikörper (1:200 verdünnt in PBS) erfolgt in einer feuchten Kammer für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Hierzu werden je 100 µl des verdünnten Antikörpers auf die Präparate pipetiert und 22 × 40 mm große Deckgläser aufgelegt. Nach der Inkubation wird wiederum zweimal 2 Minuten mit PBS, einmal 2 Minuten mit PBT und abschließend kurz mit PBS gewaschen. Die Präparate werden wieder in eine feuchte Kammer überführt. 100 µl einer Lösung bestehend aus 0,5 mg/ml 3,3' Diaminobenzidin und 0,01 % Wasserstoffperoxid in 1 × PBS werden auf die Präparate pipetiert und mit einem 22 × 40 mm großen Deckglas bedeckt. Hierbei werden Handschuhe getragen, da Diaminobenzidin giftig, potentiell teratogen und karzinogen ist. Alle Instrumente einschließlich Pipettenspitzen und Arbeitsplatz werden anschließend mit 50 % Chlorix in Wasser dekontaminiert. Die Objektträger werden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach einer Stunde kann die Farbqualität der Signale unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Bei nicht ausreichender Qualität wird die Farbreaktion verlängert, ansonsten durch mehrmaliges Waschen mit A. dest. gestoppt. Das Wasser wird nach Beendigung der Waschungen mit Chlorix dekontaminiert. Nachdem die Präparate an der Luft getrocknet sind, werden sie durch ein fünfminütiges Methanolbad fixiert. Nach erneutem Trocknen an der Luft erfolgt eine Inkubation in Giemsa-Lösung (1:20 in A.dest., filtrieren) für 1-3 Minuten. Hierdurch erhalten die Polytänchromosomen eine Blaufärbung durch die das charakteristische Bandenmuster hervortritt. Anschließend werden die Objektträger 10 Minuten gewässert und dann luftgetrocknet. Abschließend werden die Präparate zur mikroskopischen Auswertung in Euparal eingebettet.

4.23 Fluoreszenzfärbungen

4.23.1 Immunofluoreszenz an Testes-Quetschpräparaten

(nach Hime *et al.*, 1996)

PBSTD	PBS 0,3% Triton-X100 0,5% Natriumdeoxycholat
PBT	PBS 0,1% Triton-X100

Testes von adulten Fliegen (0-2 Tage) werden in PBS präpariert und auf Polylysin-behandelte (0,1% Lösung) Objektträger überführt. Durch Auflegen der Deckgläser werden die Keimzellen aus dem Testeschlauch freigesetzt. Daraufhin werden die Objektträger in flüssigem Stickstoff schockgefroren; die Gewebeproben werden nach Abschneiden der Deckgläser für mindestens zehn Minuten in gekühltem 95 % Ethanol entwässert. Die Proben werden danach bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd / PBS für sieben bis zehn Minuten fixiert und anschließend zweimal 15 Minuten mit PBSTD permeabilisiert. Zur Verbesserung der Permeabilität kann dieser Waschschrift auf zweimal 30 Minuten verlängert werden. Es folgt ein Waschschrift mit PBT für mindestens zehn Minuten bevor die Proben zur Absättigung unspezifischer Bindestellen mit PBT + 3 % BSA behandelt werden (30 Minuten). Nach dem Blocken werden die Objektträger über Nacht mit dem Erst-Antikörper (anti-DJ, verschiedene Verdünnungen in PBT + 3 % BSA) bei 4° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wird der Zweit-Antikörper 1:100 in PBT + 3 % BSA verdünnt und zur Verbesserung der Spezifität mit präparierten Fliegen-Testes bzw. mit fixierten Embryonen für eine Stunde bei leichtem Schwenken inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Objektträger mit PBT + 3 % BSA für jeweils 15 Minuten erfolgt eine einstündige Inkubation der Präparate mit dem vorbehandelten Zweit-Antikörper bei 37 °C. Die Objektträger werden wie zuvor erneut viermal mit PBT + 3 % BSA gewaschen, wobei beim zweiten Waschschrift 1 µg/ml Hoechst 33258 oder DAPI zur Waschlösung hinzugegeben wird. Abschließend werden die Präparate zur mikroskopischen Auswertung in Citifluor oder Fluoromount eingebettet. Die Auswertung erfolgt an einem mit Epifluoreszenz ausgerüsteten Zeiss Axiophot-Mikroskop.

4.23.2 Whole mount Antikörper-Immunofluoreszenzfärbung

(modifiziert nach Lin *et al.* 1996; Armstrong *et al.* 1995)

PBTx

PBS

0,1 % Triton-X100

4.23.2.1 Whole mount Antikörperfärbung an Testes

Ca. 30 Testes adulter Tiere werden in Ringer-Lösung präpariert und anschließend in 4 % Paraformaldehyd in PBTx plus 1 % DMSO für 25 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln (900 UpM) fixiert. Im Anschluß an die Fixierung werden die Testes in Anwesenheit von fixierten *Drosophila*-Embryonen mit PBTx für eine Stunde unter mehrfachem Wechsel der Waschlösung gewaschen. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper (1:100 in 400 µl PBTx / 2% Ziegen Serum) erfolgt unter leichtem Schwenken bei 4 °C über Nacht. Nach einstündigem Waschen mit PBTx wird der gebundene Erst-Antikörper mit Hilfe eines Fluorescein-gekoppelten anti-Kaninchen IgG-Antikörper nachgewiesen. Der 2. Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:100 in 200 µl PBTx / 2 % Ziegen Serum verwendet. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Während einer abschließenden Waschphase von 60 Minuten werden die Testes mit Hoechst 33258 für 10 Minuten gegengefärbt. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenzmikroskop.

4.23.2.1 Whole mount Antikörperfärbung an Speicheldrüsen

Die präparierten Speicheldrüsen werden zur Fixierung in 4 % Paraformaldehyd in PBTx plus 1 % DMSO für 25 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend werden sie dreimal für fünf Minuten in PBT (PBS + 0,1 % Tween) gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen können die Speicheldrüsen anschließend mit PBT-BSA (1 %) für 60 min auf dem Schüttler inkubiert werden. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper (α -myc 1:100 in 300 µl PBT erfolgt über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler). Die Speicheldrüsen werden am nächsten Tag dreimal kurz und danach viermal für 10 Minuten mit PBT gewaschen. Hierauf folgt die Inkubation mit dem präabsorbierten biotinylierten 2. Antikörper (1:100 in 300 µl PBT) für 1-2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Im Anschluß werden die Speicheldrüsen wieder dreimal kurz und danach viermal für 10 Minuten mit PBT gewaschen. Es folgt eine Inkubation für 0,5-1 h mit der ABC-Lösung (Vectastain Elite PK-6100 Standard ABC-Kit; 5 µl Avidin und 5 µl biotinylierte Peroxidase in 500 µl PBT) auf dem

Schüttler. Der enzymmarkierte Avidin-Biotin-Komplex hat eine hohe Affinität für Biotin. Anschließend wird dreimal kurz und danach viermal für 10 Minuten mit PBT gewaschen. Für die Farbreaktion werden die Speicheldrüsen in 975 µl PBT in Blockschälchen überführt. Es werden 20 µl Diaminobenzidin (Stocklösung: 1 mg/ml in 0,1 M Tris-HCl pH 7,6) und 2,6 µl einer 20 % Nickelchloridlösung zugefügt. Zum Schluß werden 13 µl H₂O₂ einer 1 % Lösung (1 µl der 30 % Stocklösung wird mit 29 µl destilliertem Wasser versetzt. 13 µl davon werden eingesetzt) hinzupipettiert. Nachdem der gewünschte Farbgrad erreicht ist (0,5-24 h bei RT), wird die Färbelösung abgezogen und die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBT gestoppt. Die Speicheldrüsen werden in Glycerin eingebettet.

4.24 β-Galaktosidase-Färbung an larvalen und adulten Testes

(Glaser *et al.*, 1986)

Fixierlösung	60 µl 25 % Glutardialdehyd in 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4)
Färbelösung	10 mM Phosphatpuffer 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 0,3 % Triton X-100 3,3 mM K ₃ [Fe(II)(CN) ₆] 3,3 mM K ₄ [Fe(II)(CN) ₆]
X Gal (8 %)	100 mg X Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-β-D-thiogalactosid (X-Gal) 1,25 ml Dimethylformamid
Hoyer`s Medium	30 g Gummi arabicum, gepulvert 200 g Chloralhydrat 20 g Glycerin 50 ml destilliertes Wasser

Durch Fusion von spezifischen Promotorsequenzen vor das *lacZ*-Reporter gen aus *Escherichia coli* kann die genregulatorische Wirkung dieser Promotorsequenzen, nach erfolgtem Gentransfer, im transgenen Organismus nachgewiesen und analysiert werden, da sich die Expression des vom Reporter gen codierten Genprodukts (in diesem Fall β-Galaktosidase) histochemisch nachweisen lässt. Das

Reporterprotein β -Galaktosidase, das in tierischen Zellen nativ nicht vorkommt, kann durch eine chromogene Reaktion leicht nachgewiesen werden. Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase bildet aus dem Substrat X-Gal einen Indigofarbstoff, der in Reportergeräten exprimierenden Geweben als blauer Niederschlag detektiert werden kann.

Etwa 10 Testes werden aus Larven des dritten Larvenstadiums bzw. aus adulten Fliegen in PBS präpariert und in ein Blockschälchen mit Fixierlösung überführt. Die larvalen Testes inkubieren darin 5 Minuten, die adulten 15 Minuten. Nach der Fixierung und vor Zugabe von 1 ml Färbelösung werden die Testes zweimal mit PBS gewaschen. Schließlich wird die Färbung durch Zugabe von 20 μ l 8 % X-Gal gestartet. Die Färbung findet unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur oder bei 37 °C statt, wobei die höhere Temperatur die Inkubationszeit verkürzt. Bei gewünschter Farbintensität wird die Färbung durch mehrmaliges Waschen mit PBS gestoppt und die Testes in Hoyer's Medium eingebettet.

5. Ergebnisse

I. Regulation der *don juan* Expression

Die testisspezifische Expression des *don juan* Gens wird von kurzen genvorgelagerten Sequenzen reguliert und wird insbesondere durch die Beteiligung von Translationskontrollmechanismen charakterisiert (Blümer *et al.*, 2002). Wie bereits einleitend erwähnt, konnte mit Hilfe des Konstrukts *dj-lacZ* Δ +11/+114 (Abb. 5.1 A) der Nachweis erbracht werden, dass durch eine Deletion der Basenpaare +11 bis +114 der 117 Nukleotide umfassenden Leaderregion die Zelltypspezifität der Expression nicht beeinflusst wird. Das Konstrukt *dj-lacZ* Δ +11/+114 enthält nur die ersten 10 bp des Leaders in Kombination mit 294 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Desweiteren konnte anhand des Reporterengenkonstrukts *dj-lacZ* 4 (Abb. 5.1 B) gezeigt werden, dass nur 23 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts in Kombination mit der Leader-Region für die testisspezifische Expression ausreichend sind. Allerdings war die Reporterproteinexpression im Vergleich zu der Expressionsstärke von Konstrukten mit längerem Promotoranteil bei beiden Konstrukten schwächer. Die Expression des Konstrukts *dj-lacZ* 3 (Abb. 5.1 C), in dem 69 bp stromabwärts des Transkriptionsstarts enthalten sind, erreicht z.B. die volle Stärke. Weitere Promotor-*lacZ*-Konstrukte zeigten, dass 60 bp stromaufwärts des Translationsstarts für die Translationsrepression der *dj*-mRNA in prämeiotischen und frühen postmeiotischen Stadien notwendig sind (Blümer *et al.*, 2002). Mit Promotor-*lacZ*-Analysen sollte nun weiterführend getestet werden, ob die kurze Promotorregion -23 bis +10 für die zelltypspezifische Expression ausreichend ist. Es schließt sich eine nähere Charakterisierung des Translationskontrollelements von *don juan* an.

5.1 Die kurze Promotorregion -23 bis +10 ist alleine nicht ausreichend für eine zelltypspezifische Transkription

Um zu testen, ob die Promotorregion -23 bis +10 des *don juan* Gens für die Steuerung der zelltypspezifischen Expression ausreicht, wurde in dieser Arbeit das Promotor-*lacZ*-Konstrukt *dj-lacZ* 6 etabliert. Anhand des Konstrukts sollte geklärt werden, ob für die Transkription des Reporterengenkonstrukts *dj-lacZ* 4 (siehe Abb. 5.1

B), bei welchem die Promotorregion -23 bis $+114$ mit dem *lacZ*-ORF des Transformationsvektors pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) fusioniert ist, cis-agierende Elemente im Leader notwendig sind. Das Reportergenkonstrukt *dj-lacZ 4* wurde als Basis zur Herstellung des Konstrukts *dj-lacZ 6* verwendet. Das Promotor-*lacZ*-Konstrukt *dj-lacZ 4* wurde mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Bam*HI geschnitten, um das Sequenzelement $+11$ bis $+114$ des Leaders zu entfernen. Aufgrund der Kompatibilität der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Bgl*II konnte durch Religation des Restriktionsansatzes das Konstrukt *dj-lacZ 6* (Abb. 5.1 D) generiert werden. Das Reportergenkonstrukt wurde über P-Element vermittelte Transformation in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* eingebracht, wobei das Helferplasmid p π 25.7wc als Transposasequelle diente. Es konnten sechs unabhängige transgene Fliegenlinien, d.h. Linien, in welchen das P-Element an verschiedenen Orten des Genoms inseriert war, etabliert werden. Durch die Untersuchung mehrerer unabhängiger Fliegenlinien sollte ausgeschlossen werden, dass das Ergebnis durch positionsabhängige Effekte, wie z.B. "Enhancer-Trap"-gesteuerte Expression verfälscht wird.

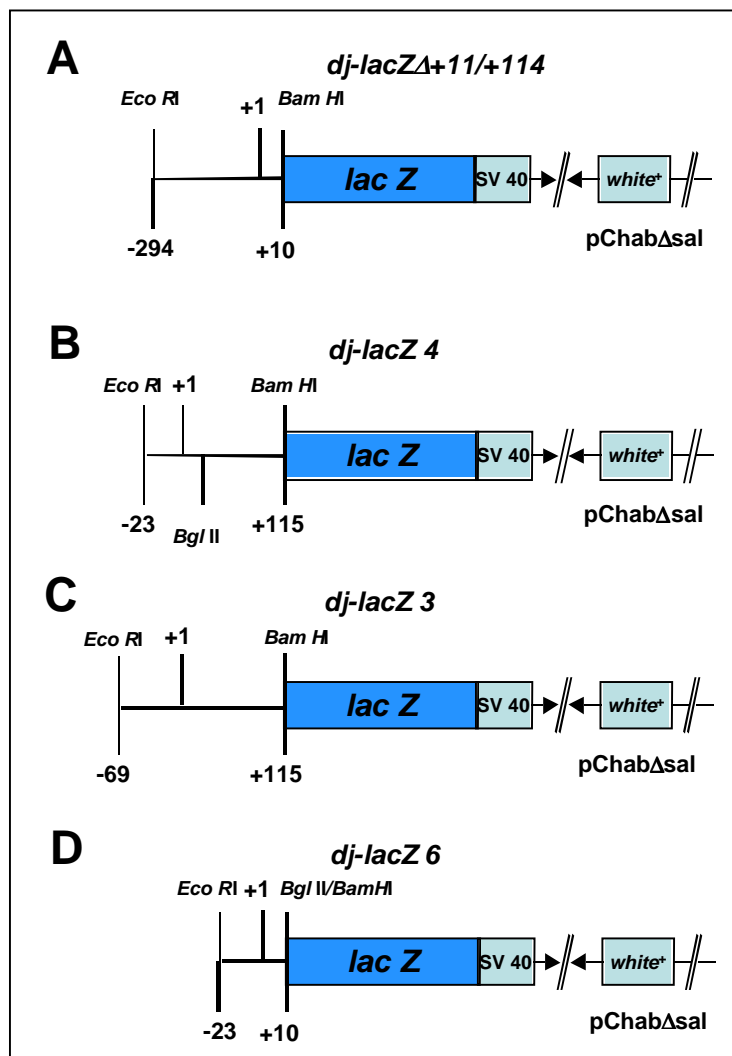


Abb. 5.1: Graphische Darstellung der *don juan*-Promotor-*lacZ*-Transformationskonstrukte *dj-lacZ Δ +11/+114*; *dj-lacZ 4*; *dj-lacZ 3* und *dj-lacZ 6*

(A) In dem Reportergenkonstrukt *dj-lacZ Δ +11/+114* waren 294 bp stromaufwärts des *don juan* Transkriptionsstarts sowie 10 bp der Leaderregion mit dem *lacZ*-ORF des Transformationsvektors pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) fusioniert.

(B) Das Transformationskonstrukt *dj-lacZ 4* wurde zur Etablierung des Reportergenkonstruktes *dj-lacZ 6* (Blümer, 2000) als Basis verwendet. Es enthält 23 bp stromaufwärts und 115 bp stromabwärts des *dj*-Transkriptionsstartes mit dem *lacZ*-ORF des Transformationsvektors pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) fusioniert. Die für die Klonierung relevanten Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

(C) In dem Reporterkonstrukt *dj-lacZ 3* war der regulative Bereich -68 bis $+115$ des *don juan* Gens über die artifiziellen Schnittstellen *Eco*RI und *Bam*HI in den Transformationsvektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) direkt stromaufwärts vor das *lacZ*-ATG inseriert.

(D) Etablierung von *dj-lacZ 6*. Das Konstrukt *dj-lacZ 4* wurde mit den Restriktionsenzymen *Bgl II* und *BamHI* behandelt. Die Schnittstellen beider Enzyme sind kompatibel, sodass durch Religation das Konstrukt *dj-lacZ 6* generiert werden konnte.

Das *white*⁺-Gen dient als Selektionsmarker in den transgenen Fliegen. Die P-Element-Flügel sind als Pfeile eingezeichnet. Die Orientierung der invertierten Endsequenzen der P-Element-Flügel ("inverted repeats"), die für die Exzision und Reintegration des P-Elements notwendig sind, ist durch die Pfeilköpfe dargestellt. Der SV40-Anteil mit dem Polyadenylierungssignal ist ebenfalls dargestellt. Die eingezeichneten Doppelstriche deuten eine Auflösung des angegebenen Maßstabs an.

Mit Hilfe eines histochemischen β -Galaktosidase-Nachweises wurde getestet, ob adulte Testes der transgenen Fliegenlinien, die das Konstrukt *dj-lacZ 6* im Genom integriert trugen, β -Galaktosidase exprimierten. In den analysierten adulten Testes der transgenen Fliegenlinien konnte auch nach mehrstündiger Färbedauer bei 37°C keine Reporterogenaktivität nachgewiesen werden (Abb. 5.2 A). Zur Kontrolle des Färbevorgangs wurden parallel adulte Testes des *dj-lacZ 4* Stammes der Nachweis-Reaktion unterzogen. Diese zeigten eine Blaufärbung analog der in Abb. 5.2 B. Die Promotorregion -23 bis +10 des *don juan* Gens ist folglich für die Proteinexpression nicht ausreichend.

Um die Frage zu klären, ob der in dem Reportergenkonstrukt *dj-lacZ 6* enthaltene sehr kurze Promotorbereich zumindest die Transkription des *lacZ*-Transgens erlaubt, wurden *in situ* Hybridisierungsexperimente mit Digoxigenin-markierten *lacZ*-DNA-Sonden an Testes adulter *Drosophila*e der transgenen Fliegenlinien durchgeführt. Während parallel mit derselben Sonde durchgeführte Kontrollfärbungen von Testes des Stammes *dj-lacZ 4* ein der *dj*-mRNA Verteilung im Wildtyp entsprechendes Transkriptionsmuster zeigten (Abb. 5.2 C), konnten auch nach einer Färbedauer von 48 Stunden keine *lacZ*-Transkripte in den Testes der transgenen Fliegen des Stammes *dj-lacZ 6* detektiert werden (Abb. 5.2 D). Der Sequenzbereich -23 bis + 10 ist somit alleine für die Transkription des Reportergens nicht ausreichend.

5.2 60 bp im 3' Bereich der *don juan* 5' UTR sind für ein hohes mRNA-Level notwendig

Der Sequenzbereich -23 bis + 10 ist für eine Transkription entweder in Kombination mit dem gesamten Leader, wie es am Beispiel des Konstruktes *dj-lacZ 4* zu sehen ist, oder in Kombination mit stromaufwärts gelegenen Sequenzen, wie es z.B. das Konstrukt *dj-lacZ Δ +11/+114* zeigt, in welchem die Leaderregion +11 bis +114 deletiert ist, ausreichend. Cis-agierende Sequenzen in der 5'UTR sind somit unabdingbar für die Transkription, sofern die Region stromaufwärts der Nukleotidposition -23 deletiert ist.

Den Einfluss dieser Region auf die Transkription zeigt eine *in situ* Hybridisierung mit

einer Digoxigenin markierten *lacZ*-DNA-Sonde an Testes adulter Fliegen der Linie *dj-lacZ* Δ +11/+114. Zur Kontrolle wurde die *in situ* Hybridisierung simultan an Testes der Linien *dj-lacZ* 3 (Blümer, 1996; Santel *et al.*, 1997) durchgeführt. In dem Reporterengenkonstrukt *dj-lacZ* 3 ist der *don juan* Promotorbereich –69 bis +114 mit dem *lacZ*-Gen fusioniert. Das detektierte Transkriptionslevel in Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +11/+114 (Abb. 5.2 F) ist deutlich schwächer im Vergleich zu dem Transkriptionslevel, das in Testes der Linie *dj-lacZ* 3 (Abb. 5.2 E) detektiert wurde. Folglich bewirkt die Deletion der Region +11 bis +114 eine Reduktion der Transkription oder eine Minderung der mRNA Stabilität. Um tieferen Einblick in die Regulation der *don juan* Reporterengenexpression auf mRNA Ebene durch die 5' UTR zu gewinnen, wurden die *lacZ*-Expressionsprofile verschiedener *don juan*-Promotor-*lacZ*-Konstrukte, in denen Bereiche des Leaders deletiert waren, mit denen der Linien *dj-lacZ* Δ +11/+114 sowie *dj-lacZ* 3 verglichen. In dem Transgen *dj-lacZ* Δ +11/+54 war der 5'-Anteil des Leaders, die Region +11 bis +54 deletiert (Blümer, 2000). Die Deletion des Konstruktes *dj-lacZ* Δ +54/+114 umfasste den Sequenzbereich +54 bis +114 und somit den 3'-Anteil der 5' UTR (Blümer, 2000). In dem Konstrukt *dj-lacZ* Δ +90/+109 (diese Arbeit, siehe Kap. 5.4) ist die Leaderregion +90 bis +109 deletiert. In Testes aller Linien waren *lacZ*-Transkripte vom primären Spermatozyten Stadium bis zum Stadium elongierter Spermatiden detektierbar. Allerdings waren Unterschiede in der mRNA Quantität offensichtlich. Während in Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +11/+54 (Abb. 5.2 G) ein ebenso hohes *lacZ*-mRNA-Level detektiert werden konnte wie in Testes der Linie *dj-lacZ* 3, war in Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +54/+114 (Abb. 5.2 H) eine ebenso starke Reduktion der mRNA Menge zu beobachten wie in Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +11/+114 (Abb. 5.2 F). Ursache der reduzierten Transkript-Menge kann sowohl eine schwächere Transkriptionsaktivität als auch eine geringere Transkript-Stabilität sein. Da der Sequenzbereich +54 bis +114 eindeutig für ein hohes Transkript-Level notwendig ist, muß innerhalb dieser 60 bp ein Element, welches eine hohe Transkriptionsaktivität oder mRNA-Stabilität vermittelt, lokalisiert sein. Verglichen mit Testes der Linien *dj-lacZ* Δ +11/+114 und *dj-lacZ* Δ +54/+114 konnte in Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +90/+109 (Abb. 5.2 I) ein intermediäres Transkript-Level detektiert werden. Dies spricht dafür, dass der gesamte Sequenzbereich +54 bis +114 für eine hohe mRNA Menge notwendig ist.

5.3 Die Region –69 bis –24 ist für ein hohes Transkriptlevel notwendig.

Ein Promotorelement, das in dem Sequenzbereich –294 bis -24 lokalisiert ist, ist bei Deletion der Region +11 bis +114 für die Transkription notwendig; denn bei zusätzlicher Deletion dieses Bereiches findet, wie das Konstrukt *dj-lacZ 6* zeigt, keine Transkription statt. Das Reportergenkonstrukt *dj-lacZ 4* (Blümer, 2000) ist geeignet, um den Einfluss der Region –24 bis –294 auf die Transkription zu untersuchen. In dem Konstrukt *dj-lacZ 4* ist die Region –294 bis -24 deletiert. Testes adulter Fliegen, die dieses Promotor-*lacZ* Konstrukt im Genom integriert tragen, zeigen ein mengenmässig reduziertes Transkriptionslevel (siehe Abb. 5.2 C). Da mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung nachgewiesen wurde, dass das Transkriptlevel in Testes der Linie *dj-lacZ 4* reduziert ist, kann schlussfolgernd gesagt werden, dass die Region zwischen –69 und -24 für ein hohes Transkriptlevel wichtig ist.

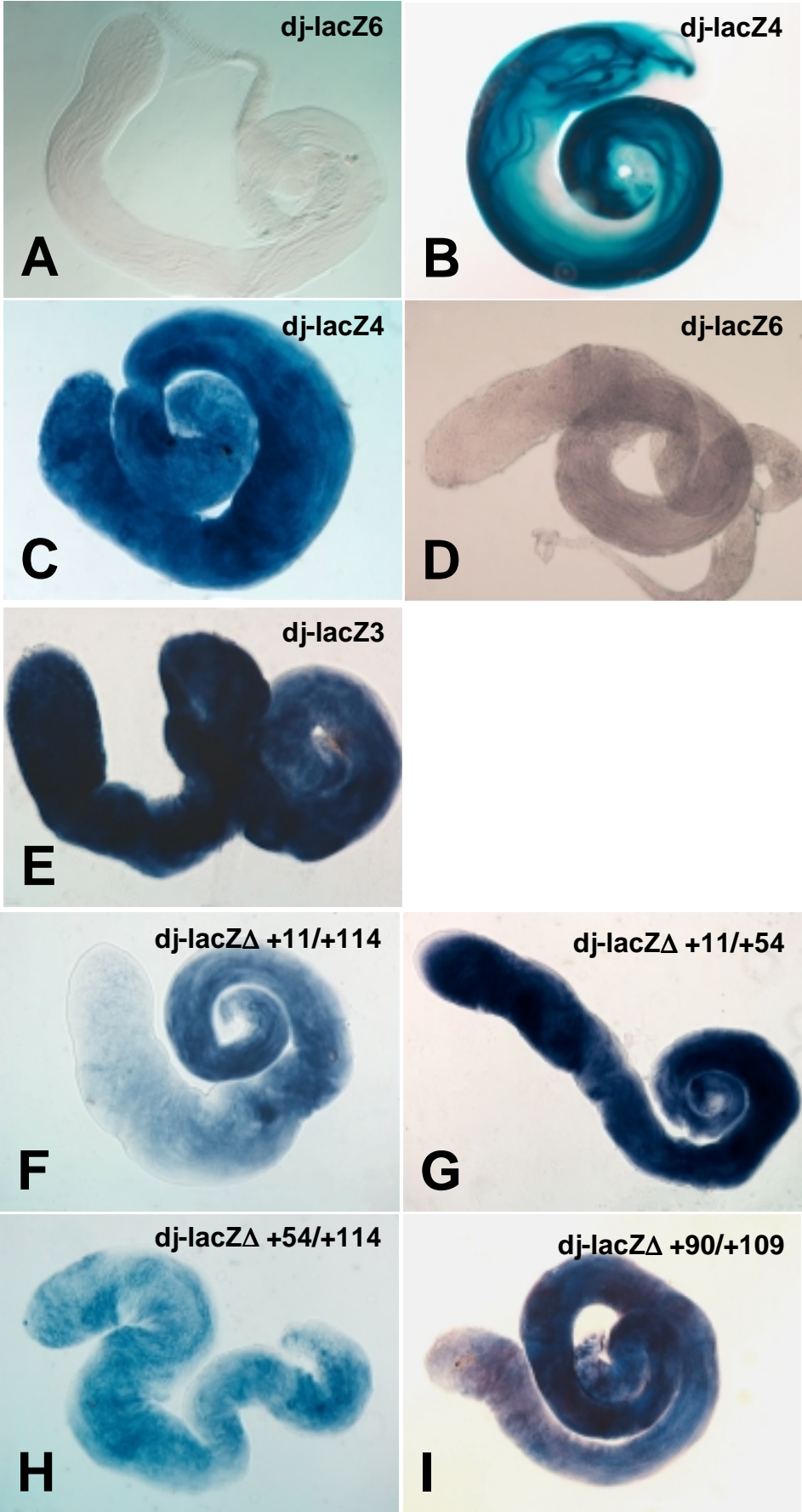


Abb. 5.2 Der in dem Reporterkonstrukt *dj-lacZ 6* enthaltene sehr kurze Promotorbereich -23 bis +10 des *don juan* Gens ist für die Transkription des *lacZ* Transgens nicht ausreichend. Der Sequenzbereich +54 bis +114 der *dj* 5' UTR ist notwendig für ein hohes Transkript-Level.

(A) und (B) β -Galaktosidase-Nachweis, (C) bis (I) *in situ* Hybridisierung zum Nachweis der Reporter-Transkripte.

(A) In adulten Testes der Linie *dj-lacZ 6* ist das Reporterprotein β -Galaktosidase nicht nachweisbar. (B) Parallel zur Kontrolle gefärbte Testes der Linie *dj-lacZ 4* zeigen Reporteraktivität. (C) Das Expressionsmuster der *lacZ*-mRNA in Testes der Linie *dj-lacZ 4* entspricht der Verteilung der *dj*-mRNA im Wildtyp. Das Transkriptlevel ist aber reduziert. (D) Das Reporterkonstrukt *dj-lacZ 6* wird in Testes adulter transgener Fliegen nicht transkribiert. (E) Das in Testes adulter *Drosophila* der Linie *dj-lacZ 3* detektierte Transkriptlevel zeigt die volle Höhe.

Mit Testes adulter transgener Fliegen der Linien *dj-lacZ* Δ +11/+114, *dj-lacZ* Δ +11/+54, *dj-lacZ* Δ +54/+114 und *dj-lacZ* Δ +90/+109 wurde eine *in situ* Hybridisierung unter Verwendung einer Digoxigenin-markierten *lacZ*-Sonde durchgeführt

(F) In adulten Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +11/+114 ist die Transkriptmenge stark reduziert. (G) Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +11/+54 zeigen ein hohes Transkript-Level. (H) Die Menge der *lacZ*-Transkripte ist in Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +54/+114 stark reduziert und entspricht der detektierten Transkriptmenge in Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +11/+114. (I) Die in Testes der Linie *dj-lacZ* Δ +90/+109 detektierte mRNA Menge ist größer als in (H) und geringer als in (G).

5.4 Das TRE_{dj} (Translations-Repressions-Element des *don juan*-Gens) umfasst 35 bp in der 5' UTR und ist von dem Translationskontrollelement der *Mst(3)CGP*-Gene klar zu unterscheiden.

Die *don juan* mRNA unterliegt prämeiotisch und in frühen Spermatidstadien einer Translationskontrolle. Die *don juan*-Transkription wird bereits in primären Spermatozyten initiiert, doch das Protein ist erst in elongierten Spermatiden detektierbar (Santel *et al.*, 1997; 1998). Während in Säugetieren die Translationskontrolle sowohl von Sequenzen in der 5'UTR als auch von Sequenzen in der 3'UTR vermittelt wird, wurden in *Drosophila* bisher nur Translationskontrollbereiche in der 5' UTR gefunden (Schäfer *et al.*, 1995). Wie bereits einleitend erwähnt, ist die Leaderregion +54 bis +114 für die Translationsrepression der *dj*-mRNA notwendig (Blümer 2000). Ein Paradigma der Translationskontrolle in *Drosophila melanogaster* stellen Expressionsstudien dar, die an der Genfamilie *Mst(3)CGP* durchgeführt wurden (Kuhn *et al.*, 1988, 1991; Schäfer *et al.*, 1993) und an deren Beispiel diese Art der Regulation zum ersten Mal in *Drosophila* demonstriert wurde. Die Gene der *Mst(3)CGP*-Familie codieren für strukturelle Proteine des Spermien-Schwanzes, die das kurze repetitive Aminosäuremotiv Cystein-Glycin-Prolin (CGP) enthalten. Die Transkription der *Mst(3)CGP*-Gene findet in primären Spermatozyten statt, doch die Translation wird bis zum Stadium elongierter Spermatiden reprimiert (Kuhn *et al.*, 1988; Schäfer *et al.*, 1993). Innerhalb der 5' UTR der *Mst(3)CGP*-Transkripte ist ein 12 Nukleotide umfassendes Sequenzelement konserviert. Diese als TCE (Translational control

element) identifizierte Sequenz ist in allen Transkripten der Genfamilie an Position +28 bis +39 relativ zum Transkriptionsstartpunkt lokalisiert. Sowohl die Deletion dieses Elementes als auch selektiv durch *in vitro* mutagenese eingeführte Sequenzmodifikationen der Nukleotide 5 (Transversion C → A) und 7 (Transversion A → C) haben den Verlust der Translationsregulation zur Folge.

Da die Transkription in *Drosophila* mit Beginn der meiotischen Teilungen stoppt, besteht in der Spermatogenese von *Drosophila* die Notwendigkeit der Regulation der Genexpression über Translationskontrollmechanismen. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass das TCE generell spermatogenesespezifisch fungiert und somit auch die Translationskontrolle anderer Gene reguliert. Diese Annahme wird durch einen Sequenzvergleich des TCEs mit der 5' UTR des *janus B*-Gens (Yanicostas *et al.*, 1998) unterstützt. Ein für die Translationsrepression notwendiger Sequenzabschnitt des *janus B*-Gens in der 5' UTR (bei Position +43 bis +54) ist in 8 von 12 Basen identisch mit dem TCE der *Mst(3)CGP*-Genfamilie.

Um die Frage zu klären, ob das TCE als putativer genereller Mediator der Translationskontrolle in der Spermatogenese in die Repression der Translation des *don juan*-Gens involviert ist, wurde der für die Translationskontrolle verantwortliche Sequenzbereich des *don juan*-Gens (Position +54 bis + 114) einem Vergleich mit dem TCE und der Translationskontrollregion des *janus B*-Gens unterzogen (Abb. 5.3). Bei Position +90 bis +101 relativ zum Transkriptionsstart wurde in der *don juan* 5' UTR ein Fragment identifiziert, das in 8 von 12 bp Identität zum *Mst(3)CGP*-TCE sowie der Translationskontrollsequenz des *janus B*-Gens zeigt. Die für die Funktion des *Mst(3)CGP*-TCE notwendigen Nukleotide 5 (C) und 7 (A) sind im *don juan*-Sequenzbereich identisch.

<i>Mst(3)CGP</i>-TCE	+28 ACATCAAATTT
<i>don juan</i>	+90 GGTACAAATTT
<i>janus B</i>	+43 GGATCTAATTA

Abb. 5.3 Ein 12 bp Element innerhalb der Translationskontrollsequenz von *don juan* zeigt Sequenzähnlichkeit zum *Mst(3)CGP*-TCE und zur Translationskontrollsequenz des *janus B*-Gens.

Die *janus B*-, *don juan*- und *Mst(3)CGP*-Transkripte unterliegen einer Translationskontrolle. Obwohl die Transkripte bereits prämeiotisch vorliegen, findet die Translation erst postmeiotisch statt. Für die Repression der *Mst(3)CGP*-mRNAs ist ein 12 Nukleotide umfassendes

Sequenzelement in der 5'UTR verantwortlich. Der Sequenzvergleich des charakteristischen *Mst(3)CGP*-TCE mit Translationskontrollsequenzen der Gene *janus B* und *don juan* soll Aufschluss über eine mögliche Konservierung des TCE geben. Die über den DNA-Sequenzen angegebenen Positionen beziehen sich auf den Transkriptionsstart des jeweiligen Gens. Ein bei Position + 90 bis +101 lokalisiertes Sequenzelement des *don juan* Gens zeigt in 8 von 12 bp Identität zum *Mst(3)CGP*-TCE sowie zur Translationskontrollregion des *janus B*-Gens. Die für die Translationsregulation des *janus B*-Gens notwendige Sequenz zeigt ebenfalls in 8 von 12 bp Identität zum *Mst(3)CGP*-TCE.

Es ist auffallend, dass die Position des TCE in der 5' UTR der *Mst(3)CGP*-Genfamilie stark konserviert ist. Die spezifische Position des TCE ist eine notwendige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Translationskontrolle (Schäfer *et al.*, 1995). Eine Fehllokalisierung des TCE hat den Verlust der Translationsrepression zur Folge (Schäfer *et al.*, 1995). Die Identität aufweisenden Sequenzbereiche der Gene *don juan* und *janus B* sind dagegen relativ zum jeweiligen Transkriptionsstart unterschiedlich positioniert. Auch die Positionen der Sequenzbereiche zum jeweiligen Translationsstart differieren im Vergleich zum *Mst(3)CGP*-TCE. Es besteht die Möglichkeit, dass durch eine unterschiedliche Positionierung des TCE innerhalb der 5' UTR der Zeitpunkt des Translationsrepressionsstopps moduliert wird (Schäfer *et al.*, 1995); denn die Translation der *don juan*-, *janusB*- und *Mst(3)CGP*-Transkripte wird in unterschiedlichen Spermatid-Stadien initiiert.

Um die funktionelle Relevanz des Identität zeigenden *don juan*-Sequenzbereichs für die Translationsrepression zu untersuchen, wurde eine *in vitro* Mutagenese durchgeführt. Es wurden transgene Fliegen hergestellt, die *don juan*-Promotor-*lacZ* Reporterkonstrukte trugen, in welchen der Sequenzbereich +90 bis +101 mutiert bzw. deletiert war. Die genomische *don juan* Sequenz –294 bis +115 wurde per PCR unter Verwendung des Konstruktes *dj-lacZ 1* amplifiziert. Neben einem spezifisch hybridisierenden 5'-Primer wurden 3'-Primer verwendet, die in dem Sequenzbereich +90 bis +101 eingeführte Punktmutationen enthielten. Die Primer enthielten artifizielle *EcoRI*- und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen, sodass die PCR-Produkte über *EcoRI/BamHI* zunächst in den Vektor pBluescript KS und darauffolgend in den Transformationsvektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) inseriert werden konnten. Auf diesem Weg wurden die Reporterengenkonstrukte *in vitro* Mutagenese 1, *in vitro* Mutagenese 2 sowie *in vitro* Mutagenese 3 generiert. Die Mutationen, die in den drei Konstrukten in dem Sequenzbereich +90 bis +101 eingeführt wurden, sind in Abb. 5.4 dargestellt.

Sequenzbezeichnung	Sequenzbereich +90 bis +101
wildtyp	5' GGTACAAAATTT 3'
<i>in vitro</i> Mutagenese 1	5' GGTAACAATTT 3'
<i>in vitro</i> Mutagenese 2	5' GATAACCAGCCC 3'
<i>in vitro</i> Mutagenese 3	5' GATA - - - - - 3'

Abb. 5.4 Mittels *in vitro* Mutagenese wurden Reporterengenkonstrukte generiert, die Mutationen in dem 12 bp umfassenden Sequenzbereich des *don juan*-Gens enthalten, welcher Identität zu dem *Mst(3)CGP*-TCE zeigt.

Die erste Zeile der Tabelle zeigt den Bereich +90 bis +101 in der wildtypischen Sequenz. In den folgenden Zeilen sind die veränderten Sequenzen dargestellt. Die mutierten Nukleotide sind in rot dargestellt. Deletierte Nukleotide sind als Striche angezeigt.

Die Nukleotide 5 und 7 des *Mst(3)CGP-TCE* sind für die Translationsrepression relevant. Beide Nukleotide sind in dem Homologie zeigenden *don juan*-Sequenzbereich identisch. Eine Transversion beider Nukleotide innerhalb des *Mst(3)CGP-TCE* ($C \rightarrow A$ und $A \rightarrow C$) führt zum Verlust der Translationskontrolle. Die selben Transversionen an Position 5 und 7 der Region +90 bis +101 wurden in dem Promotor-*lacZ*-Konstrukt *in vitro mutagenese 1* eingeführt. In dem Konstrukt *in vitro Mutagenese 2* wurden an sechs zusätzlichen Positionen des Elements Punktmutationen eingeführt. Das Konstrukt *in vitro mutagenese 2* enthält eine Transition an Position 2 ($G \rightarrow A$). Zusätzlich sind die letzten acht Nukleotide des Sequenzelements deletiert. In Testes transgener Fliegen, die eines der Konstrukte im Genom integriert trugen, konnte keine verfrühte Reporterexpression detektiert werden. Nach durchgeführtem β -Galaktosidase Nachweis zeigen Testes adulter transgener Fliegen ein postmeiotisches Expressionsmuster des Reporterproteins. Auf den Sequenzbereich +90 bis +101 folgt eine Region, welche die Deletion oder die Mutation der letzten 7 Nukleotide des *don juan* Elements kompensieren könnte. Die letzten 7 Basenpaare der auf das *don juan*-Sequenzelement folgenden Region +102 bis +109 (5'-AAAATTT-3') sind mit der Region +95 bis +101 identisch. Um eine Kompensation der fehlenden oder mutierten Region +95 bis +101 in den Konstrukten *in vitro Mutagenese 1,2, und 3* durch den folgenden Sequenzbereich +102 bis +109 auszuschließen, wurde das Reporterkonstrukt *dj-lacZ Δ +90/+109* etabliert, in welchem die gesamte *don juan*-Promotorsequenz +90 bis + 109 deletiert war. Wie zur Generierung der *in vitro* Mutagenese-Konstrukte wurde auch hier der Promotorbereich -294 bis +115 mittels PCR unter Verwendung des Konstruktes *dj-lacZ 1* amplifiziert. Der regulatorische Bereich des Gens *don juan*, der für dieses Konstrukt amplifiziert wurde ist in Abb. 5.5 A dargestellt. Sowohl der spezifisch hybridisierende 5'-Primer „Nic II“, als auch der 3'-Primer „ohne TCE as“, der Nukleotide vor und nach der Region +90 bis +109 enthielt, besaßen artifizielle Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *EcoRI* und *BamHI*. Der 3' Primer hybridisierte spezifisch mit Sequenzen stromaufwärts von +90 und enthielt die Sequenzregion +109 bis +114. Nachdem das PCR-Fragment mit diesen Restriktionsenzymen behandelt wurde, konnte es direkt in den Transformationsvektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) inseriert werden. Testes adulter und larvaler Fliegen der transgenen Linie *dj-lacZ Δ +90/+109* wurden auf β -Galaktosidase Expression getestet. Hierbei konnte kein Verlust der Translationskontrolle festgestellt werden (Abb. 5.5 B und C). Testes adulter transgener Fliegen zeigten β -Galaktosidase Expression in den postmeiotischen Spermatidenbündeln (Abb. 5.5 B, Pfeil). Die Testisspitze (Abb. 5.5 B, Doppelpfeil), sowie der Rand des Testisschlauches (Abb. 5.5 B, Pfeilkopf) blieben ungefärbt. In diesen Regionen sind prämeiotische sowie frühe postmeiotische Keimzellstadien lokalisiert. Da larvale

Testesanlagen ausschließlich diploide Keimzellen und Zellen in der meiotischen Prophase enthielten, wurde zur Kontrolle die Expression des Reportergens *dj-lacZ* Δ +90/+109 in larvalen Testes der transgenen Linien untersucht. Der β -Galaktosidase-Nachweis zeigte, dass das Reporterogen in prämeiotischen Keimzellen während des Larvenstadiums nicht translatiert wurde (Abb. 5.5 C). Es konnte insgesamt der Nachweis erbracht werden, dass die zum *Mst(3)CGP*-TCE Homologie zeigende *don juan*-Region für die Translationskontrolle nicht notwendig ist. Daher ist das Translationsrepressionselement (TRE) von *don juan* im 3' Bereich des Leaders zwischen den Nukleotiden +55 und +89 lokalisiert (Abb. 5.5 C). Das 35 bp umfassende TRE_{*dj*} ist somit klar zu unterscheiden vom *Mst(3)CGP*-TCE, was auch in der Bezeichnung des Sequenzabschnitts mit TRE im Unterschied zu TCE zum Ausdruck gebracht wird.

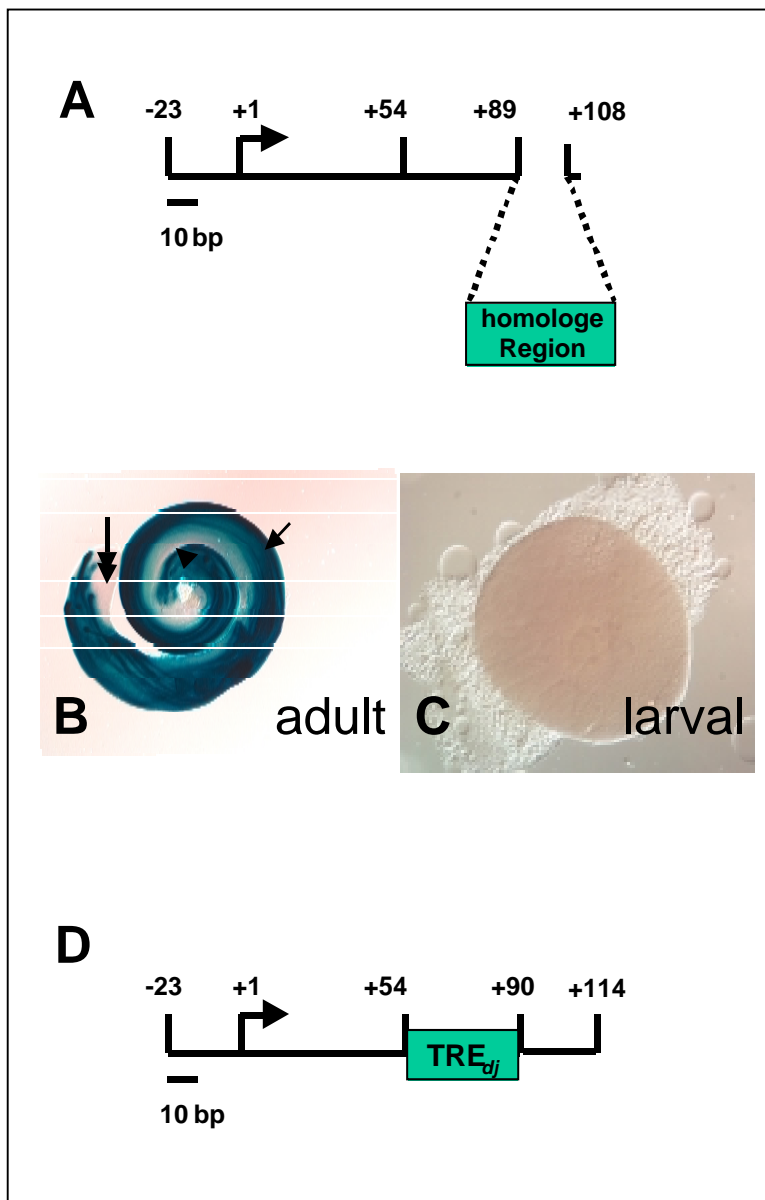


Abb. 5.5 Die Region + 90 bis +109 ist nicht notwendig für die Translationsrepression der *don juan*-mRNA

(A) Schematische Darstellung der regulatorischen *don juan* Region des Reportergenkonstrukts *dj-lacZ* Δ +90/+109. Die zum *Mst(3)CGP*-TCE Homologie zeigende *don juan*-Leaderregion +90 bis +109, relativ zum Transkriptionsstart, ist deletiert. Testes adulter (B) und larvaler (C) *Drosophila* der transgenen Fliegenlinie wurden auf Reporterexpression analysiert. Es konnte ausschließlich postmeiotische Reporterexpression der Spermatidbündel (Pfeil) detektiert werden, während frühe Zellstadien (Doppelpfeil), sowie die Ränder des Testisschlauchs (Pfeilkopf) ungefärbt blieben. (B) Larvale Testes zeigten ebenfalls keine Reporterexpression. (C) Das Translations-Repressions-Element von *don juan* umfasst 35 bp und ist zwischen den Nukleotiden +55 und +89 lokalisiert.

II. Spezifische Expression des *don juan-like*-Gens während der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*

Die Differenzierung einer runden Keimzelle zum hoch spezialisierten Spermium wird von einer großen Anzahl von Genen kontrolliert. Die genaue Anzahl der Gene, die für die Spermienentwicklung benötigt werden, ist nicht bekannt. Microarray Analysen zeigten, dass 2063 Gene (14 % des Genoms) vorwiegend im Testes exprimiert werden (Parisi und Oliver, eingereicht). Die Kenntnis der Genprodukte ist nur auf einige wenige beschränkt, wie z.B. β 2-Tubulin (Fuller 1993). Die Analyse weiterer Gene, die spezifisch oder vorwiegend im Testis exprimiert werden, sowie ihrer Genprodukte könnte helfen die an der zellulären Differenzierung der Spermatogenese beteiligten molekularen Vorgänge besser zu verstehen.

5.5 Das *don juan* Gen bildet mit drei weiteren Transkriptionseinheiten ein Cluster testisexprimierter Gene, die basische Proteine codieren

Eine Untersuchung der genomischen Umgebung des *don juan* Gens mit Hilfe der Datenbank Fly Base zeigte, dass für die benachbarten Transkriptionseinheiten CG1984 sowie *Min* basische Proteine vorhergesagt werden. Beide Transkriptionseinheiten sind im genomischen Bereich 3' von *don juan* lokalisiert. Sowohl für CG1984 als auch für *Min* wurden zudem in Datenbanken (Berkeley *Drosophila* Genome Projekt (BDGP) ESTs (Rubin *et al.*, 2000)) ausschließlich mit Hilfe von Testis-cDNA-Bibliotheken generierte ESTs (expressed sequence tags) identifiziert. Die chromosomale Organisation der Transkriptionseinheiten *don juan*, CG1984 und *Min* sowie ihre relative Länge ist in Abb. 5.6 dargestellt. Die isoelektrischen Punkte der Proteine sind angegeben.

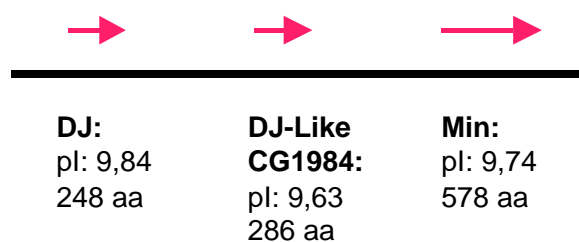


Abb. 5.6 Graphische Darstellung der offenen Leseraster *don juan*, CG1984 (*dj-like*) und *Min* an ihrem cytologischen Lokalisationsort 3R; 84B2.

Der jeweilige isoelektrische Punkt (pI), sowie die Anzahl der Aminosäuren der codierten Proteine sind angegeben.

5.6 Computerunterstützte Analyse des testisspezifischen DJ-Like (CG1984) Genproduktes

Für die potentielle Transkriptionseinheit *CG 1984*, die im 3' genomischen Bereich des *don juan* Gens lokalisiert ist, wird ein 286 Aminosäuren umfassendes basisches Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 9,63 und einer molekularen Masse von 33,8 kD vorhergesagt. *CG1984* zeigt Identität zu dem *don juan* Gen. Diese beträgt auf Nukleotidebene 70% (Abb. 5.7 A) und auf Proteinebene 42% (Abb. 5.7 B). Im C-terminalen Bereich des fiktiven Proteins ist wie auch bei Don Juan ein erhöhtes Vorkommen der Aminosäure Lysin auffällig. Im N-terminalen Bereich ist diese Dominanz nicht mehr zu finden. Aufgrund der Ähnlichkeit des fiktiven *CG1984* Proteins zu Don Juan wurde der Name *don juan-like* (*dj-like*) für die Transkriptionseinheit gewählt. Die Analyse der *dj-like* Nukleotidsequenz bzw. der abgeleiteten Proteinsequenz in Bezug auf Sequenzhomologien zu Genen oder Proteinen anderer Spezies mit Hilfe der Datenbank (GenBank, NCBI, USA) ergab keine signifikanten Homologien.

Mit Hilfe der Datenbanken Prosite Expasy (Falquet *et al.*, 2002) und PSORT II (Nakai *et al.*, 1999) wurde das fiktive Protein auf Proteindomänen und subzelluläre Lokalisierungssignale untersucht. Mit Hilfe dieser Informationssysteme konnte im C-terminalen Bereich des Proteins ein putatives Kernlokalisierungssignal identifiziert werden (Abb. 5.8). Dieses ist durch eine charakteristische Abfolge von basischen und sauren bzw. neutralen Aminosäuren gekennzeichnet. Auf zwei basische Aminosäuren folgen stets 10 neutrale oder saure Aminosäuren. Mindestens drei der hierauf folgenden fünf Aminosäuren sind basisch. Kernlokalisierungssignale dieses Musters werden „bipartite signals“ genannt.

Kernlokalisierte Proteine sind generell reich an basischen Aminosäuren. Übersteigt der Anteil der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin eines Proteins 20 %, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass das betreffende Protein im Kern lokalisiert ist, größer als eine zytoplasmatische Lokalisation. Das fiktive Protein DJ-Like besteht zu 33,2 % aus basischen Aminosäuren.

Basierend auf bekannten Lokalisierungssignal-Konsensussequenzen konnte mit dem Computer-Programm iPsort (Bannai, *et al.*, 2002) ein N-terminales putatives Mitochondrien-Lokalisierungssignal identifiziert werden sowie im N-terminalen Proteinbereich die Konsensussequenz KRS/YH für die Spaltung durch die mitochondriale Peptidase.

Nach Analyse der DJ-Like Primärstruktur ist nach Angaben des PSORT-Programms das Protein mit einer Wahrscheinlichkeit von 91,3 % im Kern und 8,7 % in den Mitochondrien lokalisiert.

A

dj	1	A A T T T C T A T A T G A G A T T T A A T G A A G T T G T A T	30
dj-like	1	- -	20
dj	31	T T A C C G T T T G C A A A T C G G A T T C T T G A A A T A T	55
dj-like	21	- -	50
dj	56	T T C T A G C A A G T C A G T T A A G A T T C T A T T G A T A C T	85
dj-like	51	- -	78
dj	86	T C A A G A G T T C A G T G G G A A G A C G A T T A A A T T C C T	115
dj-like	79	- -	108
dj	116	C A T T A G A A T T T G T C T T G A T C T T A A T G T G A T C T T A A	145
dj-like	109	- -	136
dj	146	G A T A A T A A T G A T C A G T T A A A T C T T T G T A G C T A C T T	175
dj-like	137	- -	165
dj	176	T T G G G G G C T A G G - T T A G A A C G T A A G A C T T C A - -	202
dj-like	166	- -	195
dj	203	A - G T T T A G G A T C A G T G A - T T C A A C A A G A C T A A T A A	230
dj-like	196	- -	224
dj	231	G T C T T C - G G C T A T T G T C T T T T T G C T A A A C T T T T T	260
dj-like	225	- -	252
dj	261	T G T A A A A - A - T C A T T T T G C T A C A A A - A - A A A T	282
dj-like	253	- -	282
dj	283	T T A A A A T T T A T C T G T C G A T A A A T G C T T A A A G A G A	312
dj-like	283	- -	312
dj	313	A C C C G C T T T A A G T T T - A C G A T C G G T G C C T T T C A G	342
dj-like	313	- -	339
dj	343	C C C A C T T T T A A A A G G C C T C A C C A C A T C A A A T	372
dj-like	340	- -	369
dj	373	G T C A C T T G A A G A C T T T A A - A - A A G A A A G G T A T G	399
dj-like	370	- -	399
dj	400	- - - - - - - - - C A G T G A A C T C A T A - - T G C C T G G	419
dj-like	400	- -	429
dj	420	T T A C T A C T T G T T A C G T A C T T A G A A A T A C T T C A	449
dj-like	430	- -	458
dj	450	C A A C C C G A T A G C C A T G C C C A A A T C A A G A G G C A T G	479
dj-like	459	- -	488
dj	480	C A A A A T T T G G T C A G A T G T C T C T A T T C A - G C T G A	507
dj-like	489	- -	518
dj	508	T T C G C - - - - - - - A A C A C A T T C G T T C T G C A C	530
dj-like	519	- -	548
dj	531	T C G C C A G A T C C A A T G C A A C G A A A A T T C T G G G	560
dj-like	549	- -	578
dj	561	A A G A C C T G G A G A A A G C A C A - G A C T G T A G G A	589
dj-like	579	- -	608
dj	590	A - G - A - T C A A A C - C - T - T G G T T A A A G G A A G G A A	611
dj-like	609	- -	638
dj	612	A T C A G T G A T G A A C T T T G A A A A C A T G A T A A A T G	641
dj-like	639	- -	668
dj	642	A A T G C C G A G A G G C T A G C T C A A G A A A T C A T C A	671
dj-like	669	- -	698
dj	672	T G G C T G C T A A A T G A T G G C G A T G T T A C A G A A A G A	701
dj-like	699	- -	728
dj	702	C C T G C A A G G A A C T G G C T G A A A A A A G A A A A G T	731
dj-like	729	- -	758
dj	732	G C A A G C A G A G A A G A A A C T A A A A A A A A A A T G C A	761
dj-like	759	- -	788
dj	762	A G A G A G T T G G C - A G C A - A G A A A - A - A - T G - T G - A - A	774
dj-like	789	- -	818
dj	775	- - - - - - - - - G A A A A C G A A A G T G C G C G A A A G -	793
dj-like	819	- -	848
dj	794	- G - T - A - A - A G A C C A T T G C A A A A A A A A A G	815
dj-like	849	- -	878
dj	816	A T C C T T G C A A A A A G A A A G A A T C C C T T G C T A A A G	845
dj-like	879	- -	908
dj	846	A A G A A A G A T C C T T G C A A A A A A A A A - G - T G - T -	868
dj-like	909	- -	938
dj	869	- - - - - - - - - G A T C C T T G C A A A A A A A A A C - C - A	886
dj-like	939	- -	968
dj	887	- - - - - - - - - G A T C C C C T G C A A A A A A G A A A G A T C	908
dj-like	969	- -	998
dj	909	C T T G C A A A A A A G A A A G G A T C C G A T G C A A A A A A G A	938
dj-like	999	- -	1028
dj	939	A G G G T G G G A C C T A A A A A A A A A A A A G T G C A A A G	968
dj-like	1029	- -	1058
dj	969	A A G T T G G C G G A A A A G G G A A C A A G T G C A A A A A C	998
dj-like	1059	- -	1088
dj	999	T G G C C A A A A A A A A A A A A T T T A A A A A A A T T G C A	1028
dj-like	1089	- -	1118
dj	1029	A G A A A A A T G T G C A A A A A A A C T T G G C T G C A G A A G G	1058
dj-like	1119	- -	1148
dj	1059	A A A A A T G C A A A A A A A A T G G C T A A A A A A G A C A	1088
dj-like	1149	- -	1178
dj	1089	A A T G C A A G G A A A A A G T G C A - A - A - A - G - G - G - A - A - A	1105
dj-like	1179	- -	1208
dj	0	- -	1105
dj-like	1209	A G A A G T A A	1216

B

DJ	1	M F K R T A L I L R R C F Q P T F I R P H H I N V L D N F K	30
DJ-like	1	M L K R P A L V Y R - C L Q T S V K R S Y H L N A H E H L R	29
DJ	31	- - - - - E A D D L P N Q R Q A K F V D V S I H D P Q H I R	55
DJ-like	30	K K E I L K P E S Q P S Q K H K K F G D G S I G V I H V I K	59
DJ	56	- - - S A L V S P M Q R K F L Q D L E Q Q Q T V R I K - - -	79
DJ-like	60	N E Y Y G L P N P M H R K F R E D L E K H Q D R R K E S N L	89
DJ	80	W F K E G N Q D E L E N M K N E C R R L A L E I I M A A K G	109
DJ-like	90	S L K E E K R E D L E K M L K E C Q K L V K E I T M Q A N D	119
DJ	110	G D I K K A C K E L A E K E K C K Q I E L K K K C K E L E K	139
DJ-like	120	G D V T K I C K E L A Q K E K M D K E K I K K K C R E L A A	149
DJ	140	K T K C A K - - - - - - - - - - - K D P C K K K D P C K K	157
DJ-like	150	R E K C E K D K L K K K C K L L K K D K C K K K D T C E E	179
DJ	158	K D P C K K K D P C K K K - - - - - D P C K K K - - - - - D P	178
DJ-like	180	E K P C E E E D P C E K K S C C P K D P C A K K P K K V D P	209
DJ	179	C K K K D P C K K K D P C K K K G G D L K K K C K K L A E K	208
DJ-like	210	C K K K D P C K K E D P C K K K A V N W K K K C K E V A E R	239
DJ	209	E K C K K L A K K E K M K K L Q K K C K K M A Q K E K C K K	238
DJ-like	240	E Q C K K L A E K K K F K K M I K I C K N L A A K E K C K K	269
DJ	239	M A K K D K C K K K - - - - - -	248
DJ-like	270	M A E K E M C R K K A K K G K K K	286

Abb. 5.7 Die Transkriptionseinheit *dj-like* weist Ähnlichkeit zu dem *don juan* Gen auf.

(A) Der Sequenzvergleich zwischen *dj-like* und *don juan* auf Nukleotidebene zeigt, dass 70% der Basen identisch sind. Identische Nukleotide sind gelb unterlegt. (B) Die Identität der Aminosäuren der Proteine DJ-Like und Don Juan beträgt auf Proteinebene 42 %. Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt.

<p style="text-align: center;">↓</p> <p><u>MLKRPALVYRCLQTSVKRSYHLNAHEHLRK</u></p> <p><u>KEILKPESQPSQKHKKFGDGSIGVIHVIKNEY</u></p> <p><u>YGLPNPMHRKFREDLEKHQDRRKESNLSLK</u></p> <p><u>EEKREDLEKMLKECQKLVKEITMQANDGDV</u></p> <p><u>TKICKELAQKEKMDKEKIKKKCRELAAREKC</u></p> <p><u>EKDKLKKKCKLLKDKCKKKDTCEEEKPC</u></p> <p><u>EEEDPCEKKSCCPKDPCA K P K K V D P C K K K</u></p> <p><u>DPCKKEDPCKKKAVNWKKKCKEVAEREQC</u></p> <p><u>KKLAEKKKFKKMIKICKNLAAKEKCKKMAE</u></p> <p><u>KEMCRKKA K K G K K K</u></p>
--

Abb. 5.8 Die Primärsequenz des DJ-Like Proteins enthält subzelluläre Lokalisierungssignale. N-terminal ist ein Mitochondrienlokalisierungssignal (grün) sowie eine Konsensussequenz für die Spaltung durch die mitochondriale Peptidase (schwarz unterstrichen) zu finden. Die präsumtive Schnittstelle der mitochondrialen Peptidase ist mit einem Pfeil markiert. Putative Kernlokalisierungssignale sind rot unterstrichen

5.7 *dj-like* Transkripte sind in männlichen Keimzellen ab dem primären Spermatozytenstadium nachweisbar

Aufgrund der oben beschriebenen Ähnlichkeit des fiktiven Dj-Like Proteins zu Don Juan ist eine funktionelle Redundanz der Proteine denkbar. Voraussetzung hierfür wäre die Expression des *dj-ähnlichen* Gens in männlichen Keimzellen. Um zu klären, ob eine Transkription des *dj-like* Gens im Testis stattfindet, wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin markierten *dj-like* DNA-Sonde an Testes von wildtypischen *Drosophila* durchgeführt. Hybridisierungssignale waren vom Zellstadium der primären Spermatozyten (Pfeil) bis hin zu elongierten Spermatischen (Doppelpfeil) zytoplasmatisch detektierbar (Abb. 5.9 A). Der apikale Testisbereich, in welchem Stammzellen und Spermatogonien lokalisiert sind, wies keine Färbung auf (Pfeilkopf). Transkripte des *dj-like* Gens waren im Reproduktionsapparat nur in Keimzellen nachweisbar. Paragonien und Testishülle, die beide somatischen Ursprungs sind, zeigten keine Expression. Zum Vergleich wurde parallel eine *in situ* Hybridisierung an Wildtyp-Testes mit einer Digoxigenin markierten *don juan* DNA-Sonde durchgeführt. Die *don juan* Transkriptverteilung (Abb. 5.9 B) entspricht dem Färbemuster, das mit Hilfe der *dj-like* Sonde detektiert wurde (Abb. 5.9 A). Auch das Transkriptlevel von *dj-like* und *don juan* ist äquivalent.

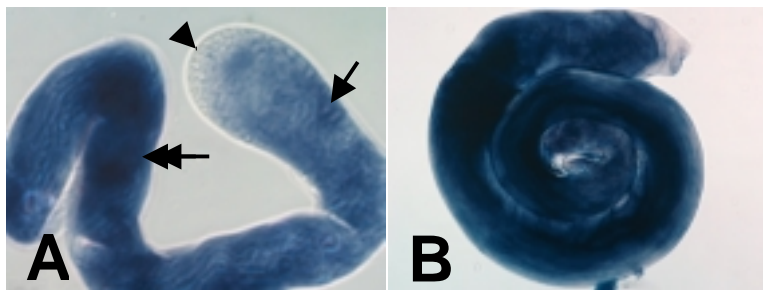


Abb. 5.9 Analog der mRNA-Verteilung von *don juan* sind auch *don juan-like* Transkripte ab dem primären Spermatozytenstadium detektierbar

(A) Nach einer *in situ* Hybridisierung mit einer DIG-markierten *don juan-like* DNA-Sonde waren in Testes adulter wildtypischer *Drosophila*

Transkripte beginnend ab dem primären Spermatozytenstadium (Pfeil) nachweisbar. Stammzellen und Spermatogonien blieben ungefärbt (Pfeilkopf). Postmeiotisch sind Transkripte bis zum Stadium elongierter Spermatischen (Doppelpfeil) detektierbar. (B) Das mit einer DIG-markierten *don juan*-DNA-Sonde detektierte Transkriptmuster in wildtypischen Testes adulter Fliegen entspricht der mRNA-Verteilung von *don juan-like*.

5.8 Charakterisierung regulatorisch aktiver Sequenzen des *dj-like* Gens *in vivo*

Zur Definition des regulativen *dj-like* Promotorbereiches wurden *in vivo*-Analysen durchgeführt. Hierbei wurde mittels P-Element-Transformation ein 650 bp umfassender Sequenzbereich, der dem *dj-like*-Leserahmen stromaufwärts direkt

vorgelagert ist, mit Hilfe des Reportergens β -Galaktosidase auf genregulatorische Kompetenz getestet.

Nachdem mittels *in situ* Hybridisierung das Transkriptmuster des *dj-like* Gens mit dem des *don juan* Gens verglichen werden konnte, ermöglichte ein *dj-like* Promotor-*lacZ*-Konstrukt den Expressionsvergleich mit *don juan* Promoter-*lacZ* Konstrukten auf Proteinebene. Im Falle einer funktionellen Redundanz beider Proteine sollte nicht nur das Transkriptmuster übereinstimmen, sondern auch das Expressionsmuster auf Proteinebene.

5.8.1 Konstruktion eines *dj-like* Promotor-*lacZ* Fusionsgens

Mit spezifischen Primern wurde über eine PCR die putative, 650 bp umfassende, stromabwärts des *dj-like* Translationsinitiationssignals gelegene Regulationssequenz amplifiziert. Neben den für die spezifische Hybridisierung benötigten Basen enthielten die verwendeten Primer zusätzliche Nukleotide, sodass Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *EcoRI* und *BamHI* entstanden. Nach Klonierung des PCR-Produktes in den Topo-PCR II-Vektor (Invitrogen) konnte das amplifizierte Fragment schließlich über *EcoRI* und *BamHI* gerichtet vor ein *E. coli-lacZ*-Gen in den P-Element-Transformationsvektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) inseriert werden. Das auf diese Weise generierte Konstrukt *dj-like*Pr650-*lacZ* ist in Abb. 5.10 dargestellt. Nach Injektion in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* konnten sechs unabhängige transgene Fliegenlinien etabliert werden.

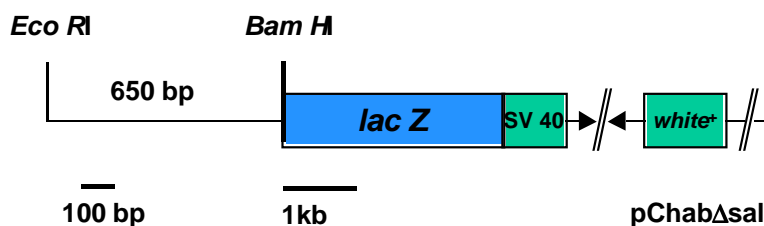


Abb. 5.10 Schema des Konstruktes *dj-like*Pr650-*lacZ*

650 bp stromabwärts des *dj-like* Translationsstartes wurden mit dem Reportergen *lac Z* in dem P-Element-Transformationsvektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) fusioniert. Die Pfeile verdeutlichen die Flügel des P-Elementes.

5.8.2 Die Translation der *dj-like* Transkripte ist bis zum Stadium elongierter Spermatozyten reprimiert.

Um zu klären, ob der ausgewählte putative Promotorbereich zur Aktivierung des

Reportergens ausreichend ist, wurde die Expression des Reportergens auf Proteinebene histochemisch mit Hilfe des X-Gal Substrats nachgewiesen.

In allen untersuchten Linien konnte β -Galaktosidase-Aktivität ausschließlich in postmeiotischen Keimzellen adulter Testes beobachtet werden.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass der gewählte Promotorbereich ausreichend ist, um die Expression des *dj-like* Gens in der männlichen Keimbahn zu aktivieren und gewebespezifische Expression zu steuern. Folglich müssen in dem 650 bp umfassenden Fragment alle für diese Expression notwendigen regulatorischen Elemente vorhanden sein.

Die β -Galaktosidase Reporterproteinverteilung in Testes transgener Fliegen, die das *dj-like* Promotor-*lacZ*-Konstrukt im Genom integriert trugen, spiegelte die DJ-Like-Proteinverteilung wider, da die Expression des Reporterproteins durch den *dj-like*-Promotorbereich gesteuert wurde. Eine Beeinflussung des Expressionsmusters durch die transformierten *lacZ*-Sequenzen war äußerst unwahrscheinlich.

In allen untersuchten Linien wurde β -Galaktosidaseaktivität ausschließlich in postmeiotischen Zellstadien detektiert (Abb. 5.11 A, Pfeil). Stammzellen, Spermatogonien und Spermatozyten zeigten keine Expression (Pfeilkopf). Auch in frühen postmeiotischen Stadien, die in den Randbereichen des Testis zu finden sind, konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Expression der β -Galaktosidase ist somit auf elongierte Spermatischen beschränkt. Individualisierte Spermien zeigen keine Färbung. Dieses Expressionsmuster steht im Gegensatz zur Transkriptverteilung. Testesanlagen transgener Larven wurden ebenfalls auf β -Galaktosidaseaktivität untersucht. Larvale Testes enthalten ausschließlich prämeiotische Keimzellen. Eine fehlende Reporterproteinexpression in larvalen Testes würde daher die Beschränkung der Translation auf postmeiotische Stadien beweisen. Zur Kontrolle der Nachweismethode wurden auch larvale Testes des Stammes *dj-lacZ* $\Delta+11/+114$ einer *in situ* Hybridisierung unter Verwendung einer *lacZ*-Sonde unterzogen. Das im Genom dieser Tiere integrierte *don juan-lacZ*-Promotorkonstrukt exprimierte das Reporterprotein verfrüht in prämeiotischen Stadien aufgrund einer von Blümer *et al.*, 2002 beschriebenen Deletion des Translationsrepressionselements. Tatsächlich konnte in Testesanlagen von Larven, die das Konstrukt *dj-likePr650-lacZ* im Genom integriert trugen keine Färbung detektiert werden (Abb. 5.11 B), wodurch eine prämeiotische *dj-like* Expression endgültig ausgeschlossen werden konnte. In Testesanlagen von Larven der Linie *dj-lacZ* $\Delta+11/+114$ wurden dagegen *lacZ*-Transkripte ab dem Stadium primärer Spermatozyten detektiert (Abb. 5.11 C).

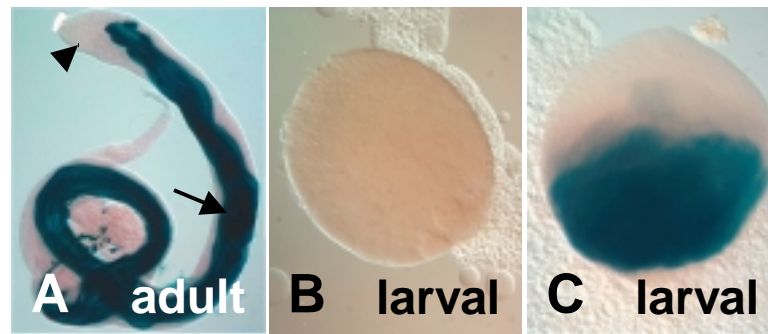


Abb. 5.11 Die Reporterexpression des *don juan like* Promotor-*lacZ* Transgens zeigt, dass die *don juan-like* mRNA unter Translationskontrolle steht.

(A) Die Abbildung zeigt einen Testis einer adulten Fliege der Linie *dj-likePr650-lacZ*. β -Galaktosidase ist nur in elongierten Spermatiden detektierbar (Pfeil). Prämeiotische Stadien zeigen keine Färbung (Pfeilkopf). (B) Testes von Larven enthalten nur prämeiotische Keimzellen. Nach einem β -Galaktosidase-Enzymaktivitätstest bleiben sie ungefärbt. (C) In larvalen Testes der Linie *dj-lacZ* $\Delta+11/+114$ ist Enzymaktivität detektierbar.

5.9 Das Fusionsprotein Myc-DJ-Like ist in den Flagellen und den Köpfen elongierter Spermatiden nachweisbar

Ein erster Schritt zur funktionellen DJ-Like Charakterisierung ist die gewebespezifische subzelluläre Lokalisation des Proteins. Um das Protein *in vivo* zu lokalisieren, wurde DJ-Like an seinem N-Terminus mit 5 Epitopen (EQKLISEEDL) des humanen Proto-Onkogenprodukts c-Myc fusioniert. Diese können von dem monoklonalen Antikörper 9E10 erkannt werden (Evan, *et al.*, 1985). Nach Etablierung transgener Fliegen, die das Fusionsprotein unter der Kontrolle des *dj-like* Promotors exprimieren, kann die subzelluläre Verteilung des Proteins analysiert werden. *Drosophila* Proteine, die mit Epitopen des c-Myc Proteins fusioniert wurden, konnten bereits erfolgreich in transgenen Fliegen lokalisiert werden (Orsulic und Peifer, 1996).

Für die Klonierung des *dj-like-c-myc* Konstrukts wurde das Transformationskonstrukt *dj-likePr650-lacZ*, das 650 bp *dj-like* Promotorbereich stromaufwärts des *lacZ* Reportergens enthält, als Basis verwendet (siehe Abb. 5.10). Die in dem Transformationsplasmid *dj-likePr650-lacZ* enthaltene *dj-like* Promotorregion ist ausreichend für die Regulation der Testis-spezifischen Expression des *dj-like* Gens. Dieser Sequenzbereich enthält demnach alle cis-regulatorischen Elemente, die für die gewebespezifische Transkription und die postulierte Translationskontrolle notwendig sind. Das Konstrukt *dj-likePr650-lacZ* wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I behandelt, so dass das *lacZ*-Reportergen vom übrigen Vektor entfernt werden konnte. Die fünf *myc* Epitope wurden aus dem Plasmid CS2+MT (Roth *et al.*, 1992) per PCR mit spezifischen Primern, die zusätzliche Nukleotide für

eine *Bam*HI Schnittstelle bzw. eine *Xba*I Schnittstelle enthielten amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xba*I in das pChab Δ Sal-Vektorkonstrukt *dj-like*Pr650-*lacZ* ligiert. Schließlich wurde die *dj-like* cDNA über eine PCR mit den Primern „1984 ORF sense“ und „1984 ORF as“ aus genomischer DNA von *white*⁻-Fliegen amplifiziert. Beide Oligonukleotide enthielten artifizielle *Xba*I Restriktionsschnittstellen. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstelle *Xba*I in das mit *Xba*I geöffnete Vektorkonstrukt *dj-like*Pr650-*lacZ* kloniert. Das resultierende Plasmid pChab-*myc-dj-like* trug die *dj-like* cDNA im korrekten Leserahmen mit den fünf *myc* Epitopen fusioniert (Abb. 5.12).

Das *c-myc-dj-like* Fusionsgen wurde somit unter der Kontrolle des natürlichen Promoters im Testis exprimiert und die zelluläre und subzelluläre Lokalisation des Proteins konnte *in vivo* mit Hilfe von Antikörpern verfolgt werden. Nachdem das Fusionsgen-Konstrukt über P-Element vermittelte Transformation stabil in das Fliegen-genom inseriert war, konnten sieben transgene Fliegenlinien etabliert werden.

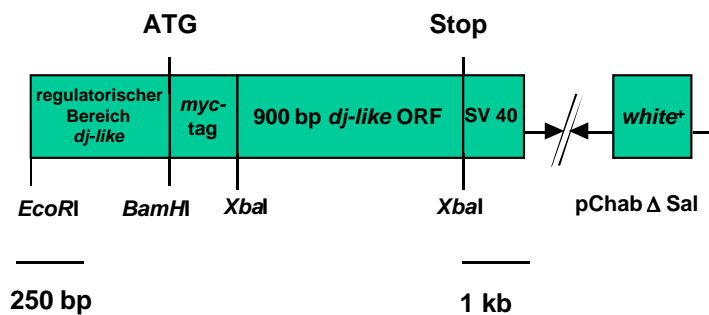


Abb. 5.12 Schematische Darstellung des Transformationskonstruktes pChab-*myc-dj-like*

Der offene *dj-like* Leserahmen wurde an den C-Terminus der codierenden Sequenz des *myc*-Gens fusioniert. Das Fusionsgen stand unter der Kontrolle des 650 bp umfassenden *dj-like* Promotorbereichs. Schnittstellen, die zur Konstruktion verwendet wurden sind eingezeichnet.

Testes adulter Fliegen des transgenen Stammes pChab-*myc-dj-like* wurden auf Expression und Lokalisation des Fusionsproteins untersucht. Hierzu wurden immunohistochemische Färbungen mit einem monoklonalen anti-Myc Antikörper durchgeführt. Für den Immunonachweis wurden Quetschpräparate angefertigt, damit die Keimzellen aus dem Hoden in einer möglichst dünnen Zellschicht auf dem Objektträger vorlagen und so bei der Mikroskopie einzeln betrachtet werden konnten. Nach Durchführung von Immunofluoreszenz-Färbungen nach dem von Hime *et al.* (1996) beschriebenen Protokoll war das Fusionsprotein eindeutig in Testes transgener Fliegen detektierbar. Entsprechend der *dj-like-lacZ*-Reporterexpression war auch die Myc-DJ-Like-Expression auf elongierte Spermatiden beschränkt. Das Fusionsprotein ist im Verlauf der Keimzellentwicklung erst während der Chromatinkondensation in der Postelongationsphase detektierbar. Während dieses zellmorphogenetischen Prozesses elongiert der Spermatidenkern und erhält eine

nadelförmige Struktur. Hierbei wird das Kernvolumen 200fach reduziert. In diesem Stadium ist Myc-DJ-Like vorwiegend in den Spermatidköpfen lokalisiert, während die flagellaren Strukturen nur schwach gefärbt sind (Abb. 5.13 B). Eine Gegenfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33258 lässt eine Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Chromatin während der Kondensationsphase vermuten (Abb. 5.13 A). Abbildung 5.13 C verdeutlicht die Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Chromatin durch eine Übereinanderlagerung der Chromatinfärbung mit der Anti-Myc-Immunofluoreszenzfärbung. Die gefärbten Strukturen sind allerdings nicht völlig deckungsgleich. Nachdem der Spermatidenkern im weiteren Verlauf der Chromatinkondensation an Volumen verloren hat und schließlich seine endgültige nadelförmige Struktur erhalten hat, ist Myc-DJ-Like nicht nur in den Spermatidköpfen, sondern auch deutlich entlang der Flagellen detektierbar (Abb. 5.13 E, H, K). Die Übereinanderlagerungen der Abbildungen 5. 13 D, G und J, welche die Chromatinfärbung zeigen, mit den korrespondierenden Aufnahmen der Anti-Myc-Antikörperfärbung verdeutlichen die Kolokalisation von Chromatin und Myc-DJ-Like (Abb. 5. 13 F, I, L). In individualisierten Spermien ist das Fusionsprotein weder im Kopf noch entlang des Flagellums detektierbar.

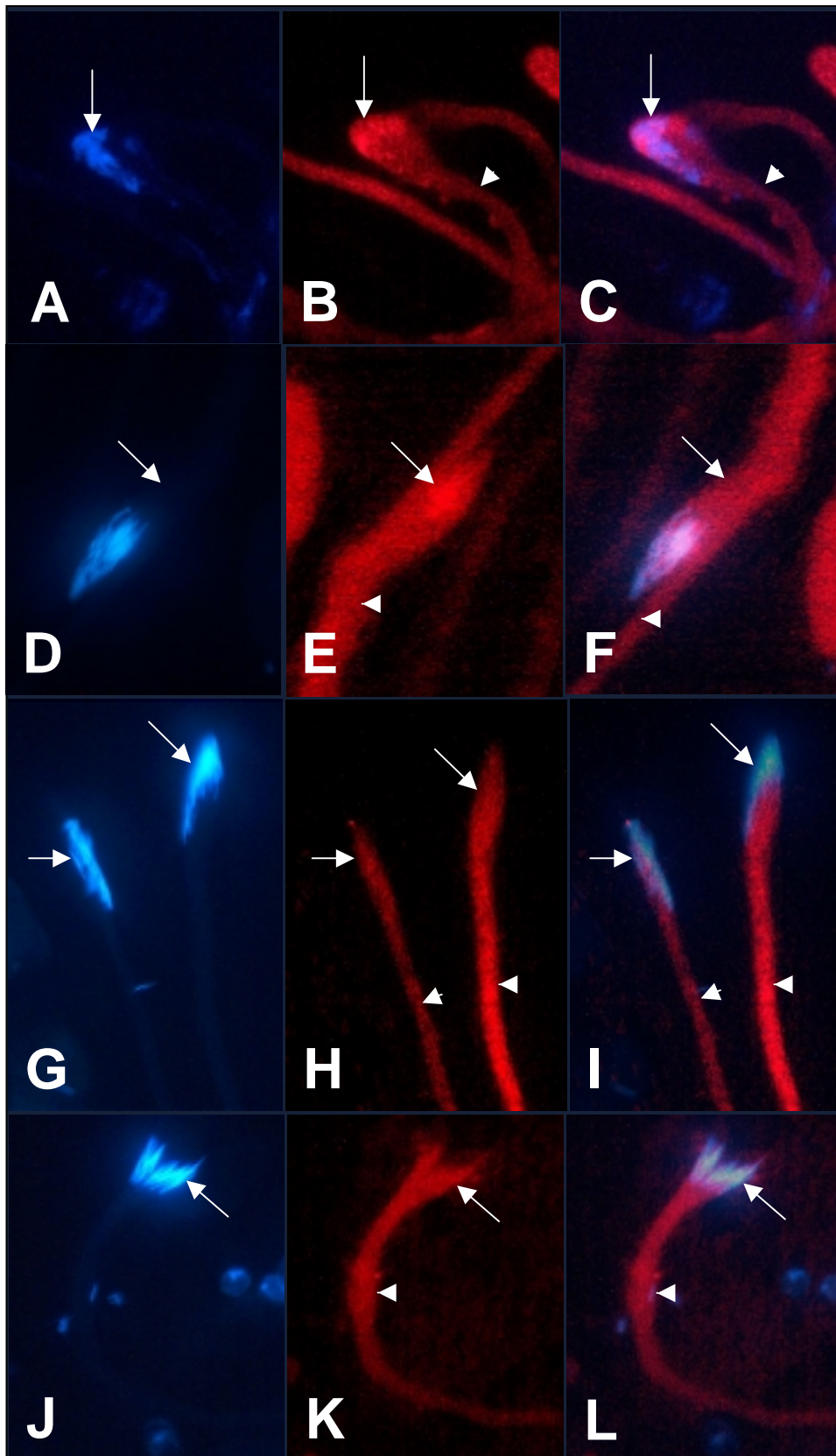


Abb. 5.13 Das Fusionsprotein Myc-DJ-Like ist sowohl in den Köpfen als auch in den Flagellen elongierter Spermatischen detektierbar.

(A) Die Aufnahme zeigt ein Spermatischenbündel bei beginnender Kernkondensation. Das Chromatin ist durch eine Färbung mit Hoechst 33258 markiert (Pfeil). (B) Die mit A korrespondierende Aufnahme einer Immunofluoreszenz mit einem Anti-Myc-Antikörper demonstriert die Lokalisation des Fusionsproteins Myc-DJ-Like in den Spermatischenkernen bei beginnender Chromatinkondensation

(Pfeil). Es fällt auf, dass der Antikörper nahezu dieselben Strukturen markiert wie der Farbstoff Hoechst-33258. Während der Chromatinkondensation sind die Flagellen der Spermatiden nur schwach gefärbt (Pfeilkopf). (C) Die Abbildung zeigt die Übereinanderlagerung der beiden getrennten photographischen Bildaufnahmen A und B. Die durch den Anti-Myc-Antikörper und Hoechst gefärbten Strukturen scheinen teilweise zu kolokalisieren (Pfeil), sind aber nicht völlig deckungsgleich. Die Flagellen zeigen nur schwach Anti-Myc-Immunofluoreszenz (Pfeilkopf). (D) Das Bild zeigt ein Spermatidstadium, in welchem die Zellen die abschließende Kondensation des Chromatins erfahren. Die Kerne haben noch nicht ihre endgültige schmale Form erreicht. Das Chromatin wurde mit Hoechst-33258 gefärbt (Pfeil). (E) Die Abbildung zeigt die entsprechende Aufnahme der Färbung mit einem Anti-Myc-Antikörper, der das Fusionsprotein sowohl in den Spermatidenköpfen (Pfeil) als auch entlang der Flagellen (Pfeilkopf) erkennt. Im Vergleich zur Färbung der Spermatidenköpfe erscheint die Färbung entlang der Flagellen nun deutlicher, aber immer noch schwächer. (F) Durch Übereinanderlagerung der getrennten Aufnahmen D und E wird die Kolokalisation von Myc-DJ-Like und Chromatin demonstriert (Pfeil). Die gefärbten Flagellen sind durch einem Pfeilkopf markiert. (G) Die Aufnahme zeigt im Bild rechts ein älteres Spermatidenbündel mit abgeschlossener Chromatinkondensation. Das linke Spermatidenbündel hat die Chromatinkondensation noch nicht abgeschlossen. Die Fluoreszenz des Farbstoffs Hoechst-33258 markiert das Chromatin (Pfeile). (H) Die Aufnahme zeigt das korrespondierende Bild einer Immunofluoreszenz-Färbung mit einem Anti-Myc-Antikörper. Der Antikörper detektiert das Fusionsprotein in den Spermatidköpfen (Pfeil) und entlang der Flagellen (Pfeilköpfe). Die Färbung der flagellaren Strukturen ist nach abgeschlossener Kernkondensation stärker (Pfeilkopf rechts). (I) Die Übereinanderlagerung der Bildaufnahmen G und H verdeutlicht die Kolokalisation des Fusionsproteins mit dem Chromatin. (J) Die Abbildung zeigt ein Spermatidenbündel nach der Chromatinkondensation. Die Kerne haben ihre endgültige nadelartige Form erreicht. Durch eine Färbung mit dem Farbstoff Hoechst-33258 wurde das Chromatin markiert. (K) Die mit J korrespondierende Aufnahme einer Immunofluoreszenz mit einem Anti-Myc-Antikörper demonstriert die Lokalisation des Fusionsproteins in den Spermatidkernen (Pfeil) und entlang der Flagellen (Pfeilkopf). (L) Die Übereinanderlagerung der beiden getrennten Aufnahmen J und K veranschaulicht die Kolokalisation des Fusionsproteins Myc-DJ-Like mit dem Chromatin während dieses Stadiums (Pfeil). Die fluoreszierenden Flagellen sind durch einen Pfeilkopf markiert.

III. Expressionsregulation des basischen testisspezifischen Proteins Min

5.10 Computerunterstützte Analyse des Proteins Min

Bei der Durchsuchung von Datenbanken (GenBank, NCBI, USA) nach bereits charakterisierten Genen aus *Drosophila* oder anderen Spezies, die Sequenzhomologien zur *min*-Nukleotidsequenz bzw. zur abgeleiteten Min-Proteinsequenz zeigen, wurden keine signifikanten Homologien gefunden.

Die Primärstruktur des Min-Proteins umfasst 578 Aminosäuren und stellt ein Protein mit einer kalkulierten Masse von 66,2 kDa dar. Der isoelektrische Punkt des Proteins beträgt $pI = 9,74$.

Unter Verwendung der Datenbanken Prosite, Expasy (Falquet *et al.*, 2002) und Psort III (Nakai *et al.*, 1999) wurden mehrere Kernlokalisierungssignale detektiert (blau unterstrichen). Ebenso wie die Primärsequenz von Don Juan und Don Juan-Like besitzt auch die Min Proteinsequenz einen relativ hohen Anteil von circa 30% an basischen Aminosäuren, was eine Kernlokalisierung des Proteins wahrscheinlicher macht. Die Primärstruktur von Min besteht zu 32,4 % aus den basischen

Aminosäuren Lysin und Arginin.

Des Weiteren konnte am N-Terminus des Min-Proteins ein mitochondriales Import Signal identifiziert werden (grün), sowie eine Schnittstelle für die Spaltung durch die mitochondriale Peptidase (Pfeil). Die Konsensussequenz LRMYPH für die Spaltung durch die mitochondriale Peptidase ist schwarz unterstrichen. Die Datenbanken sagen eine Lokalisierung des Proteins mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% im Kern und einer Wahrscheinlichkeit von 8% in Mitochondrien voraus.

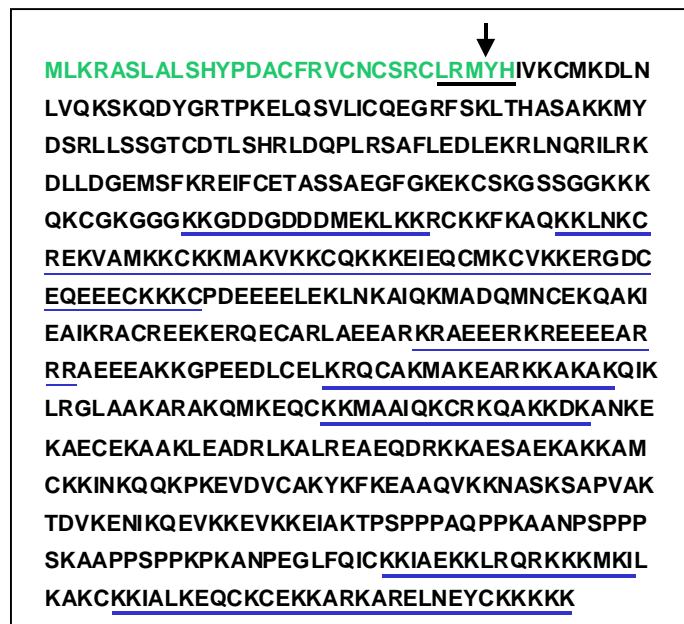


Abb. 5.14 Primärsequenz des Proteins Min

Die Primärstruktur des Proteins Min weist N-terminal ein Mitochondrienimportsignal auf (grün). Ebenfalls N-terminal befindet sich eine Konsensussequenz für die mitochondriale Peptidase (schwarz unterstrichen). Die präsumtive Schnittstelle ist mit einem Pfeil markiert. C-terminal befinden sich putative Kernlokalisierungssignale (blau unterstrichen).

5.11 *min* wird in *Drosophila melanogaster* testisspezifisch exprimiert

Die Gene *don juan*, *don juan-like* und *min* bilden ein Cluster auf dem 3. Chromosom von *Drosophila melanogaster*. Für alle 3 Gene wurden in Datenbanken (dbEST, NCBI; dbEST, BDGP) nur ESTs (Adams *et al.*, 1991) gefunden, die mit Hilfe von Testis-cDNA-Bibliotheken generiert worden waren. Während bereits für *don juan*, als auch für *don juan-like* experimentell die testisspezifische Expression bewiesen wurde (Blümer 2000, Rathke 2003) stand ein Nachweis für die ausschließliche Expression von *min* im Testis aus. Mit dem Ziel ein Profil der Expression von *min* während der Entwicklung von *Drosophila* zu erhalten und eine gewebespezifische Expression im Testis zu untersuchen wurde eine RT-PCR (Reverse Transkriptions-Polymerase Kettenreaktion) durchgeführt. Hierzu wurde aus Testes, Männchen ohne Testes, Larven, Embryonen (16-24 Stunden alt) adulten Männchen sowie adulten Weibchen polyA⁺-mRNA isoliert. Unter Verwendung der Primer „1988-

Sequenzierprimer 2“ und „RT antisense“, die für den offenen Leserahmen des Gens *min* spezifisch waren, wurde mit den mRNA-Proben eine RT-PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt, das mit den genspezifischen Primern amplifiziert werden konnte, umfasste 727 bp und war stromabwärts des *min* Translationsstarts lokalisiert. In einer Kontrollreaktion wurden nur die Primer ohne mRNA eingesetzt. Während in dieser Reaktion wie erwartet kein PCR-Produkt generiert werden konnte, amplifizierten die Primer mit mRNA aus Testes, Männchen und Larven ein 720 bp-Fragment (Abb. 5.15). Mit mRNA aus Weibchen und Embryonen konnte kein Produkt amplifiziert werden. Durch Sequenzierung der RT-PCR-Produkte wurde verifiziert, dass die Sequenz der erhaltenen Fragmente mit der *min* Sequenz übereinstimmte und die Fragmente somit keinen Artefakt darstellten.

Um eine Verunreinigung der mRNA durch DNA auszuschließen, wurde mit jeweils den gleichen mRNA-Proben über eine RT-PCR ein Sequenzstück des *β 3-tubulin*-Gens amplifiziert. Die hierzu verwendeten Primer „B3aa23“ und „B3aa140“ umspannten auf genomischer Ebene ein Intron. Bei vorliegender DNA-Verunreinigung würde neben einem 397 bp großen Fragment, welches die Intron-Sequenz nicht enthält, ein 492 bp umfassendes Produkt amplifiziert werden, das die 95 bp des Introns einschließt. Das *β 3-tubulin*-Gen wurde für dieses Kontrollexperiment ausgewählt, da es sowohl in Embryonen und Larven, als auch in adulten Männchen und Weibchen exprimiert wird (Kimble *et al.*, 1989). In den RT-PCR Reaktionen wurden ausschließlich 397 bp große Fragmente detektiert, was eine DNA-Verunreinigung der mRNA-Proben ausschloss.

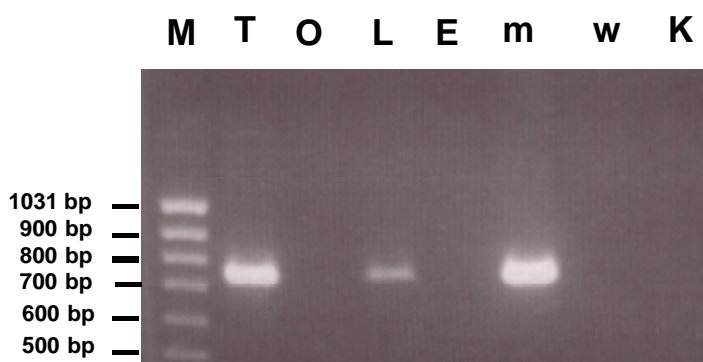


Abb. 5.15 RT-PCR Analyse der *min* Expression

Es wurde polyA⁺-mRNA aus (T) Testes; (O) adulten Männchen ohne Testes; (L) Larven; (E) Embryonen; (m) adulten Männchen und (w) adulten Weibchen eingesetzt. Für die Kontrollreaktion (K) wurde keine mRNA verwendet. Der DNA-Längen-Marker ist mit M gekennzeichnet.

5.12 Die Regulation des testisspezifisch exprimierten Gens *min*

5.12.1 *min*-Transkripte sind im Testis ab dem Stadium primärer Spermatozyten detektierbar

Die RT-PCR hatte den Nachweis erbracht, dass das *min*-Gen im Testis exprimiert wird. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses und zur Untersuchung der *min*-Transkriptverteilung während der Spermatogenese wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin markierten *min*-DNA-Sonde an Testes adulter wildtypischer *Drosophila* durchgeführt. Während an der Testisspitze, wo Stammzellen und Spermatogonien lokalisiert sind, keine Transkripte nachweisbar waren (Pfeilkopf), wurden Transkripte ab dem Stadium primärer Spermatozyten (Pfeil) bis zu den Stadien elongierter Spermatisiden (Doppelpfeil) nachgewiesen. Gewebe somatischen Ursprungs, wie Paragonien und Testishülle, blieben ungefärbt. Das Transkriptmuster entspricht der Verteilung der *don juan*- und *don juan-like* mRNAs im Testis.

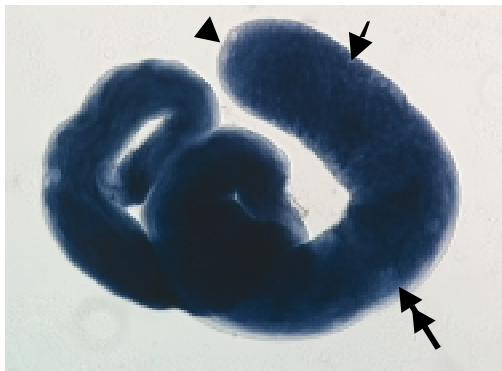


Abb. 5.16. *min*-Transkripte sind ab dem primären Spermatozyten-Stadium nachweisbar.

Unter Verwendung einer Digoxigenin markierten *min*-DNA-Sonde wurden mRNAs prämeiotisch in primären Spermatozyten nachgewiesen (Pfeil). Stammzellen und Spermatogonien, die im apikalen Testisbereich lokalisiert sind blieben ungefärbt (Pfeilkopf). Postmeiotisch sind bis zum Stadium elongierter Spermatisiden Transkripte nachweisbar (Doppelpfeil).

5.12.2 Analyse genregulatorischer Sequenzen des *min*-Gens *in vivo*

Der regulatorisch aktive Bereich eines Gens steuert dessen zeitlich und räumlich korrekte Expression. Zur Eingrenzung des Sequenzbereichs, der für die gezielte Expression des Gens *min* notwendig ist, wurde ein Promotor-*lacZ*-Reportergenkonstrukt hergestellt. In diesem Transformationskonstrukt sind 466 bp der stromaufwärts des Translationsstarts gelegenen genomischen *min*-Sequenz mit dem *lacZ*-Reportergen aus *Escherichia coli* fusioniert. Das 466 bp umfassende Fragment wurde unter Verwendung genomischer DNA von *white*⁻-Fliegen per PCR mit den spezifischen Primern „508-1988-RB“ und „Prom1988-RB as“ amplifiziert, die artifizielle Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* enthielten. Das PCR-Produkt wurde über *EcoRI/BamHI* direkt in den Transformationsvektor

pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) inseriert. Das auf diese Weise generierte Konstrukt 466-*min* ist in Abb. 5.17 dargestellt. Nach Injektion des Konstrukts in *Drosophila melanogaster*-Embryonen des Blastodermstadiums konnten sechs transgene Fliegenstämme erhalten werden. Die chromosomalen Integrationsorte des transformierten Konstrukts wurden mit Hilfe des balancierten Multimarker-Fliegenstammes CSTM kreuzungsgenetisch lokalisiert. Der Integrationsort des Reporterkonstrukts ist bei Linie 2.3 das III. Chromosom; bei Linie 4.2 das II. Chromosom.

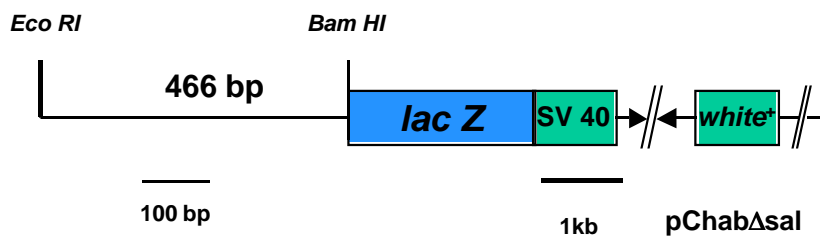


Abb. 5.17 Schematische Darstellung des 466-*min* Promotor-*lacZ*-Konstrukts
466 bp stromaufwärts des *min*-Translationsstartes wurden mit dem *lacZ*-Gen in dem Vektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) fusioniert.

5.12.3 Die *min*-mRNA ist bis zum Stadium elongierter Spermatischen translational reprimiert

Testes adulter transgener Fliegen, die das 466-*min*-Promotor-*lacZ*-Konstrukt im Genom integriert trugen, wurden einem β -Galaktosidase Nachweis unterzogen, um die zelluläre Lokalisation und Verteilung des *lacZ*-Genproduktes zu bestimmen. Da die Expression des Enzyms β -Galaktosidase unter der Kontrolle des *min*-Promotors erfolgt, spiegelt die Expression des Reporterproteins die endogene *min*-Expression wider, sofern der gewählte Promotorbereich alle zur Expression notwendigen regulativen Sequenzen enthält. Der β -Galaktosidase Aktivitäts-Test (Abb. 5.18 A) zeigte, dass das Reporterprotein postmeiotisch in elongierten Spermatischen exprimiert wird (Pfeil). Prämeiotische Stadien der Spermato-genese zeigen keine Färbung (Pfeilkopf). Da das Transkript bereits ab dem Stadium primärer Spermatozyten detektierbar ist, das Reporterprotein sich allerdings erst in elongierten Spermatischen nachweisen lässt, unterliegt die *min*-mRNA einer Translationsrepression. Hierdurch wird die Translation der Transkripte in prämeiotischen und frühen postmeiotischen Stadien der Spermato-genese verhindert. Da larvale Testes nur prämeiotische Zellstadien enthalten, sollten Testes von Larven des gleichen transgenen Stammes nach Durchführung eines β -Galaktosidase Nachweises, aufgrund reprimierter Translation, keine Färbung zeigen. Diese Vorhersage konnte bestätigt werden (Abb. 5.18 B). Zur Kontrolle der Nachweismethode wurden larvale Testes des Stammes *dj*-

lacZ $\Delta+11/+114$ der gleichen Methode unterzogen. Aufgrund einer Deletion des Translationsrepressionselements, exprimierte das im Genom dieser Tiere integrierte *don juan-lacZ*-Promotorkonstrukt das Reporterprotein verfrüht in prämeiotischen Stadien (Blümer *et. al.*, 2002). Während Testes von Larven des Stammes *466-min* keine Färbung zeigten (Abb. 5.18 B), war die β -Galaktosidase Aktivität in Testes larvaler *Drosophilae* des Stammes *dj-lacZ* $\Delta+11/+114$ nachweisbar (Abb. 5.18 C).

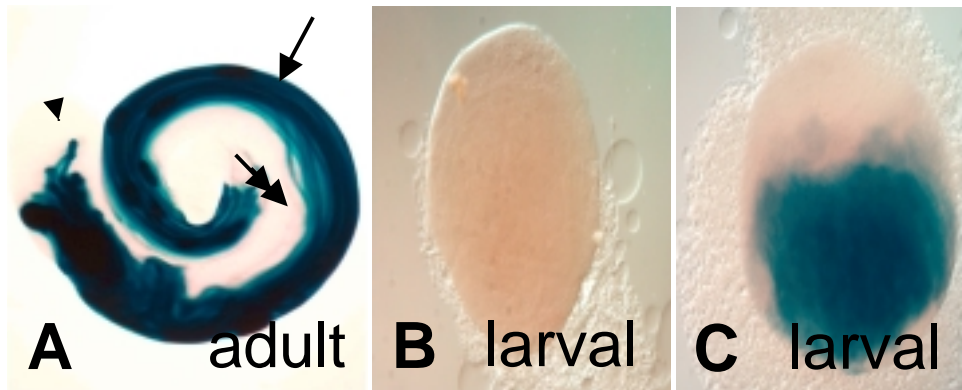


Abb. 5.18 Der Reporterproteinnachweis in Testes transgener Fliegen des Stammes *466-min* zeigt, dass die *min*-mRNA einer Translationkontrolle unterliegt.

Histochemischer β -Galaktosidase Nachweis an Testes adulter (A) und larvaler (B) Tiere der transgenen Fliegenlinie *466-min*, sowie an Testes larvaler Fliegen der Linie *dj-lacZ* $\Delta+11/+114$ (C).

(A) In Testes adulter Fliegen der Linie *466-min* ist das Reporterprotein β -Galaktosidase nur in elongierenden Spermatiden nachweisbar (Pfeil). Im apikalen Testisbereich lokalisierte prämeiotische Stadien (Pfeilkopf), sowie frühe postmeiotische Stadien, die sich an den Rändern des Testisschlauchs befinden (Doppelpfeil), zeigen keine Färbung. (B) Larvale Testes der Linie *466-min* mit ausschließlich prämeiotischen Keimzellstadien zeigen keine Färbung. (C) In larvalen Testes der Linie *dj-lacZ* $\Delta+11/+114$ ist β -Galaktosidase nachweisbar.

5.12.4 Etablierung verkürzter *min*-Promotor-*lacZ*-Reportergenkonstrukte zur Identifizierung essentieller genregulatorischer Sequenzbereiche

Zur weiteren Eingrenzung des Genbereichs, der für die zell- und testisspezifische Expression des *min*-Gens erforderlich ist, sowie zur Identifizierung von Elementen, die hierfür funktionell wichtig sind, wurden weitere Promotor-*lacZ*-Konstrukte generiert. Dabei wurde das 5' Ende der stromaufwärts des Translationsstartes gelegenen genomischen Sequenz sukzessive verkürzt. Die auf diese Weise etablierten Konstrukte besitzen somit jeweils kürzere Promotoranteile. Die stromaufwärts des Translationsstarts gelegene Sequenzregion umfasst bei dem Konstrukt *372-min* 372 bp, bei dem Konstrukt *280-min* ist sie 280 bp lang, bei dem Konstrukt *200-min* 200 bp und bei dem kürzesten Konstrukt *100-min* 100 bp (Abb. 5.19). Für die Amplifizierung der verschiedenen großen Promotorbereiche des *min*-Gens mit Hilfe einer PCR wurden spezifische Primer mit artifizialen *EcoRI* und *BamHI* Restriktionsschnittstellen und genomische DNA von *white*⁻-Fliegen

verwendet. Die über PCR amplifizierten Fragmente wurden direkt in den Transformationsvektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*,1988) integriert. Abbildung 5.19 fasst die auf diese Weise hergestellten Reporterengenkonstrukte zusammen.

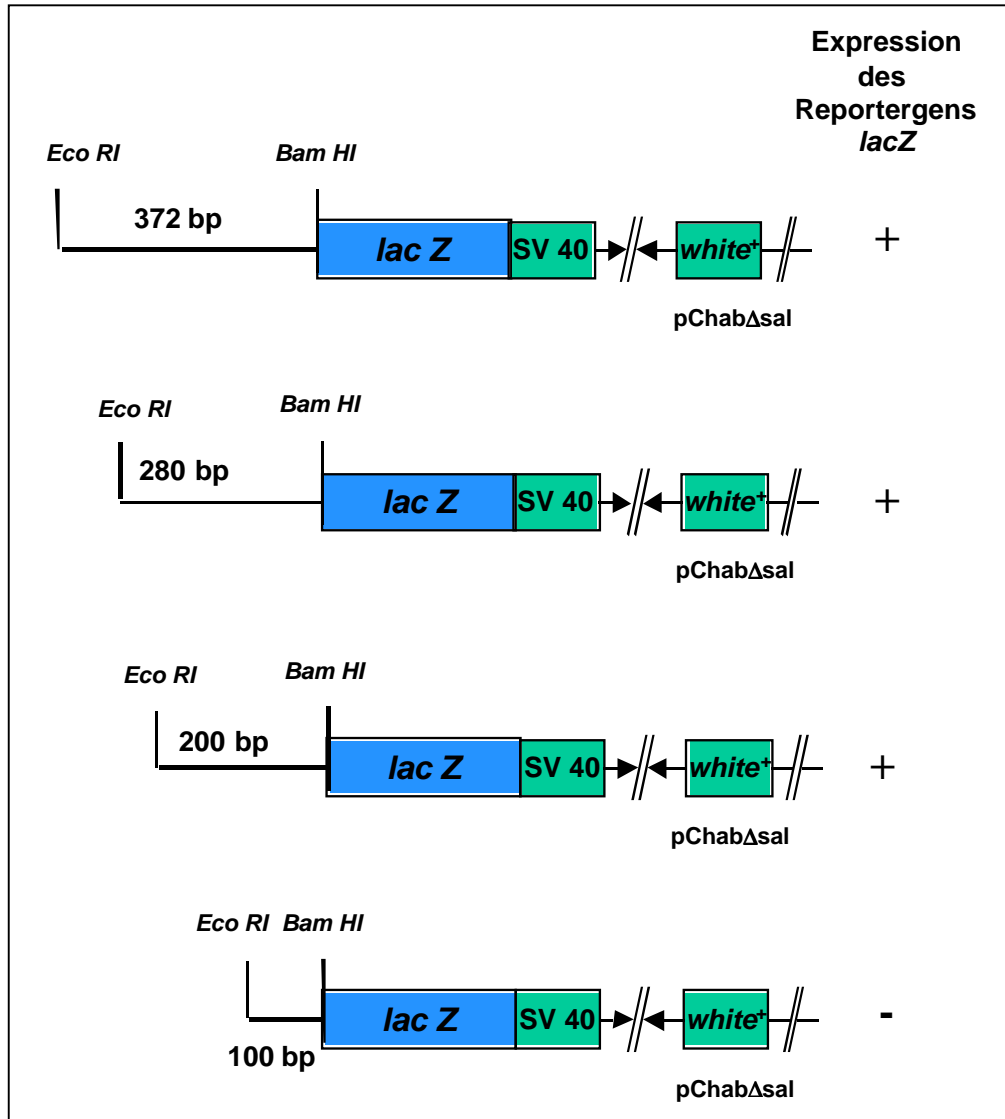


Abb. 5.19 Schematische Darstellung der *min*-Promotor-*lacZ*-Reporterengenkonstrukte 372-*min*; 280-*min*; 200-*min* und 100-*min*

Zur Herstellung der Reporterengenkonstrukte 372-*min*; 280-*min*; 200-*min* und 100-*min* wurde der Promotoranteil systematisch verkürzt und mit dem ATG des *lacZ*-Reportergens fusioniert. Durch Kreuze bzw. Striche ist rechts neben den Konstrukten vermerkt, ob in transgenen Fliegen eine Expression des Reportergens *lacZ* stattfindet.

Die Reporterengenkonstrukte 372-*min*; 280-*min*; 200-*min* und 100-*min* wurden über P-Element vermittelte Transposition in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* eingebracht. Es konnten jeweils 6 unabhängige transgene Fliegenstämme etabliert werden.

5.12.5 200 bp stromaufwärts des *min* Translationsstarts sind ausreichend zur Steuerung der testisspezifischen und postmeiotischen *min*-Expression.

Nach Durchführung eines β -Galaktosidase Nachweises konnte in Testes adulter Fliegen, welche die Konstrukte *370-min*; *280-min* und *200-min* im Genom integriert trugen, Reporterprotein-Aktivität als blauer Niederschlag detektiert werden. In den Testes aller drei Fliegenlinien waren elongierte Spermatidenbündel gefärbt, während prämeiotische Zellstadien und frühe postmeiotische Spermatiden ungefärbt blieben. Testes der Linie *100-min* zeigten keine Expression des Reporterproteins. Zum Vergleich des Expressionsniveaus wurden zeitgleich Testes der Linie *466-min* einem β -Galaktosidase Aktivitätstest unterzogen. Die Testes aller Linien wurden 2 Stunden bei 37 °C gefärbt. Das β -Galaktosidase-Expressionsniveau erschien bei den Fliegenlinien *466-min*; *370-min*; *280-min* und *200-min* einheitlich. Auch nach einer Färbedauer von 12 Stunden bei 37 °C konnte in Testes des Fliegenstamms *100-min* keine β -Galaktosidase-Enzymaktivität festgestellt werden. 100 bp stromaufwärts des Translationsstarts sind daher nicht ausreichend für die Expression des Reporterproteins. *In situ* Hybridisierungsexperimente mit einer Digoxigenin markierten *lacZ*-DNA-Sonde zeigten, dass in den Testes des transgenen Fliegenstammes *100-min* keine Transkription des Reportergens stattfindet (Abb. 5.20 A). In Testes adulter Fliegen der Linien *370-min*; *280-min* und *200-min*, die parallel einer *in situ* Hybridisierung mit einer identischen Sonde unterzogen wurden, konnten Transkripte ab dem primären Spermatozyten-Stadium bis zu den elongierenden Spermatiden detektiert werden. Die nachgewiesene Transkriptmenge war in Testes aller untersuchten Linien identisch. Exemplarisch ist in Abbildung 5.20 B ein Testis der Linie *200-min* nach einer *in situ* Hybridisierung mit einer *lacZ*-Sonde dargestellt. In Stammzellen und Spermatogonien, die im apikalen Testisbereich lokalisiert sind, konnten Transkripte nicht nachgewiesen werden. Das detektierte Transkript-Muster entsprach der Verteilung der endogenen *min*-mRNA. Aufgrund der fehlenden Reportergen-Transkription in Testes des Stammes *100-min* wurde geschlossen, dass der 100 bp umfassende Sequenzbereich, der zusätzlich in dem Konstrukt *200-min* enthalten ist, für die Transkription essentielle cis-aktive Elemente enthält. Während durch diese 100 bp in Testes transgener Fliegen des Stammes *200-min* ein hohes Transkriptions- und Translationsniveau des Reporters ermöglicht wird, führt die Deletion dieses Bereiches im Konstrukt *100-min* zum Verlust der Transkription und folglich auch der Translation des Reporters in Testes transgener Tiere.

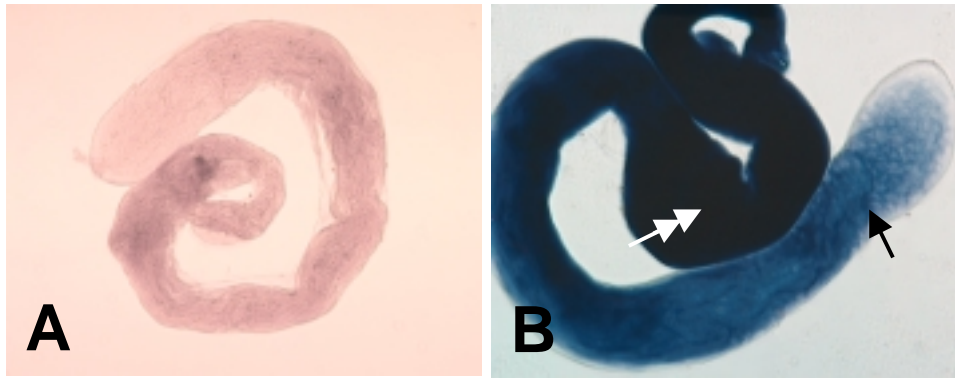


Abb. 5.20 In Testes der transgenen Fliegenlinie *100-min* erfolgt keine Transkription des *lacZ*-Reportergens

(A) Adulte Testes der transgenen Fliegenlinie *100-min* wurden einer *in situ*-Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten-*lacZ*-Sonde unterzogen. Es wurde kein Transkriptionsmuster festgestellt. (B) Parallel wurden Testes der Linien *200-min*, *280-min*, *372-min* und *466-min* einer *in situ*-Hybridisierung unterzogen. Es trat eine der endogenen *min*-Transkriptverteilung analoge Färbung der Spermatozyten (Pfeil) und der späten Spermienbündel (Doppelpfeil) auf. Das Transkriptionsmuster sowie die Menge der Transkripte war in allen Linien einheitlich. Exemplarisch ist ein Testis der Linie *200-min* abgebildet.

5.12.6 Die *min*-Transkriptmenge ist in homozygoten *cannonball*-Mutanten stark reduziert

Wie bereits einleitend erwähnt, ist für die stadien- und gewebespezifische Transkription von Genen, deren Produkte für die Spermiogenese benötigt werden, die Funktion des Proteins Cannonball erforderlich (Hiller *et al.*, 2001). Cannonball ist ein Homolog von dTAFII80 und wird nur im Testis exprimiert. Die Expressionshöhe verschiedener *cannonball*-abhängiger Transkripte ist in homozygot *cannonball*-mutanten Testes im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert (Hiller *et al.*, 2001). Die Transkripte des Gens *min* stehen unter Translationskontrolle und werden erst in postmeiotischen Stadien translatiert. Es ist daher wahrscheinlich, dass auch die Transkription des *min*-Gens von *cannonball* abhängig ist. Um dies zu testen, wurden Testes adulter homozygot *can*¹²-mutanter *Drosophila* einer *in situ* Hybridisierung unterzogen, wobei eine Digoxigenin-markierte *min*-DNA-Sonde verwendet wurde. Zur Kontrolle wurde das Experiment parallel an Testes adulter wildtypischer Fliegen durchgeführt. In Testes homozygot *cannonball*-mutanter Fliegen stoppt die Spermatogenese vor der Meiose. Aufgrunddessen akkumulieren primäre Spermatozyten und postmeiotische Zellen fehlen (Lin *et al.*, 1996). Tatsächlich wurden in homozygot *can*¹²-mutanten Testes im Vergleich zur Wildtypsituation (Abb. 5.21 B) Transkripte stark reduziert nachgewiesen (Abb. 5.21 A).

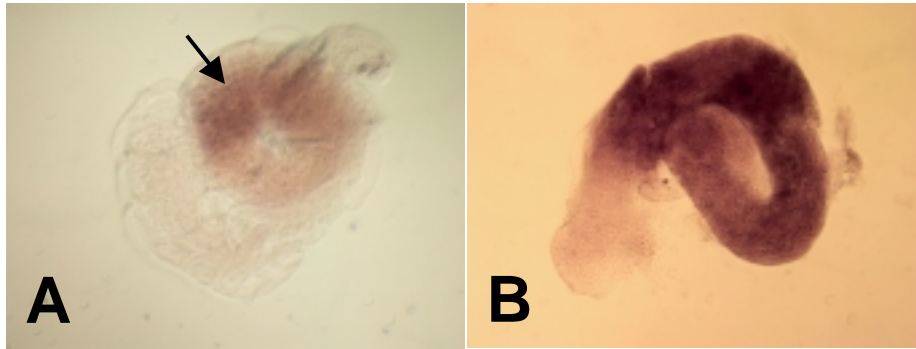


Abb. 5. 21 Die *min*-Transkriptmenge in homozygot *can*¹²-mutanten Testes ist stark reduziert

(A) Adulte Testes homozygot *can*¹²-mutanter *Drosophila* wurden einer *in situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *min*-DNA-Sonde unterzogen. Es konnten nur sehr wenige Transkripte im caudalen Testisbereich (Pfeil) detektiert werden. (B) Parallel wurde eine *in situ* Hybridisierung an Testes wildtypischer Fliegen durchgeführt. Transkripte wurden ab dem Stadium primärer Spermatozyten bis zu elongierten Spermatiden detektiert.

5.12.7 30 bp stromaufwärts des Translationsstarts von *min* sind notwendig für die Translationsrepression der mRNA

Während in der Oogenese von *Drosophila melanogaster* Translationsrepression über die 3' UTR vermittelt wird, sind alle bisher bekannten Translationskontrollelemente von mRNAs, die während der Spermatogenese von *Drosophila* exprimiert werden, in der 5' UTR lokalisiert.

Der Vergleich der *min*-Transkriptverteilung in prämeiotischen und postmeiotischen Keimzellstadien mit der auf elongierte Spermatiden beschränkten Reporterproteinaktivität in Testes von *Drosophila*, welche die *min*-Promoter-*lacZ* Konstrukte im Genom integriert trugen, hatte gezeigt, dass auch die *min*-mRNA in prämeiotischen, meiotischen und frühen postmeiotischen Stadien translational reprimiert vorliegt. Zur Identifizierung von Sequenzen der 5' UTR, die für die Repression der Transkripte relevant sind, wurde ein weiteres Promotor-*lacZ* Konstrukt generiert. Darin sind 60 bp direkt vor dem Translationsstart deletiert. Da der Transkriptionsstart des Gens *min* bisher nicht bestimmt wurde, ist die genaue Länge des Leaders nicht bekannt. 5'UTRs haben bei Spermatogenese relevanten mRNAs gewöhnlich eine Länge von 100-200 bp. 200 bp stromaufwärts des Translationsstarts von *min* sind ausreichend für eine hohe testisspezifische Transkription und Translation, deshalb kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Leader des Gens *min* kürzer als 200 bp ist. Da außerdem 100 bp stromaufwärts des Translationsstarts keine Transkription mehr erlauben, ist anzunehmen, dass der Transkriptionsstart circa zwischen 100 und 200 bp stromaufwärts des ATG lokalisiert ist. Die im 3' Bereich um 60 bp verkürzte regulative Region des Gens *min* wurde mit den Primern „1988TCE as“ und „508-1988-RB“ durch eine PCR amplifiziert. Die Primer enthielten artifizielle Schnittstellen für die

Enzyme *EcoRI* und *BamHI*. Als Template diente das Konstrukt 466-*min*. Das PCR-Produkt wurde nach Restriktion mit *EcoRI* und *BamHI* direkt in den Transformationsvektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) inseriert. Nach Transformation des Konstruktes Δ 60 (Abb. 5.22 A) in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* wurden 6 unabhängige transgene Fliegenstämme etabliert.

Testes adulter transgener Fliegen des Stammes Δ 60 wurden einem β -Galaktosidase-Enzymaktivitätstest unterzogen. β -Galaktosidase war in Testes der Linie Δ 60 nicht nur in postmeiotischen Stadien, sondern auch prämeiotisch in Spermatozyten nachweisbar (Abb. 5.22 B, Doppelpfeil). Stammzellen und Spermatogonien zeigten keine Färbung (Abb. 5.22 B, Pfeil). Um die prämeiotische Reporterproteinexpression zu bestätigen, wurde auch mit larvalen Testes der Linie Δ 60 der Enzymnachweis durchgeführt. Die detektierte Färbung in Spermatozyten larvaler Testes (Abb. 5.22 C) bestätigte den Befund verfrühter Translation. Stammzellen und Spermatogonien zeigten auch hier keine Färbung (Abb. 5.22 C, Pfeil). Folglich sind die deletierten 60 bp notwendig für die Repression der *min*-mRNA.

Zur Eingrenzung der für die Repression relevanten Region wurde ein weiteres Promoter-*lacZ* Konstrukt generiert, in dem nur 30 bp der regulativen *min* Region deletiert waren. Der deletierte Bereich befand sich direkt stromaufwärts des Translationsstartes. Zur Amplifikation des für das Konstrukt Δ 30 benötigten regulativen Bereichs wurde das Konstrukt 466-*min* als Template verwendet. Das mit Hilfe der Primer „508-1988-RB“ und „delta 30 1988“, die artifizielle Schnittstellen für die Enzyme *EcoRI* und *BamHI* enthielten, amplifizierte Fragment wurde nach Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *BamHI* in den Transformationsvektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) inseriert. Nach Transformation des Konstruktes Δ 30 (Abb. 5.22 D) in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* wurden 6 unabhängige transgene Fliegenstämme etabliert.

Ebenso wie in larvalen und adulten Testes der Linie Δ 60 wurde nach Durchführung eines β -Galaktosidase-Nachweises in larvalen und adulten Testes der Linie Δ 30 bereits in prämeiotischen Keimzellstadien das Reporterprotein detektiert (Abb. 5.22 E, Doppelpfeil und Abb. 5.22 F). Stammzellen und Spermatogonien blieben ungefärbt (Abb. 5.22 E und F, Pfeile).

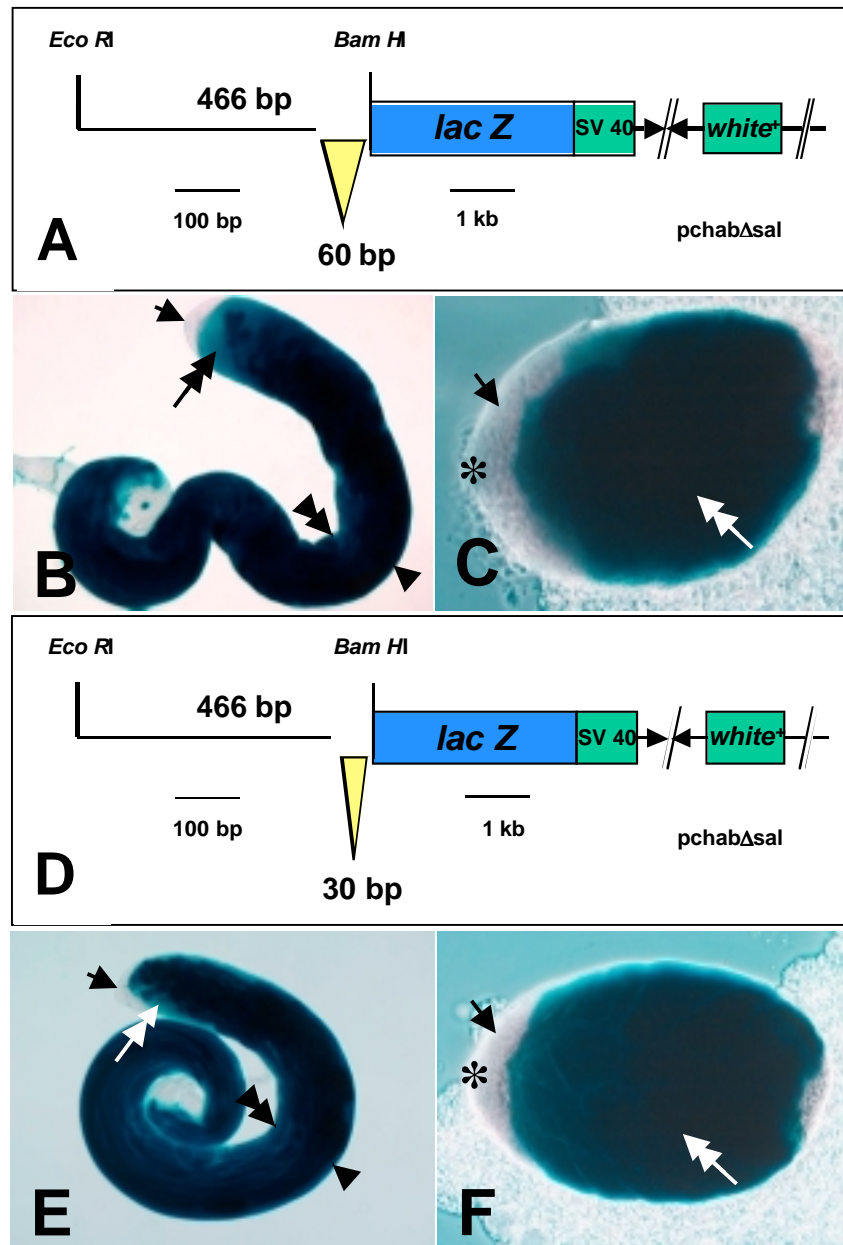


Abb. 5.22 Die postmeiotische β -Galaktosidase-Expression wird von 30 Nukleotiden direkt stromaufwärts des *min*-Translationsstarts kontrolliert

Zur Analyse der *min* 5' UTR *in vivo* wurden Promotorkonstrukte mit partiell deletierter 5' UTR etabliert. Anschließend wurde der Einfluss der Deletionen auf die ausschließlich postmeiotische Reporter-Translation untersucht. (A) Die schematische Darstellung zeigt das Konstrukt Δ 60. In der 5' UTR sind 60 Nukleotide direkt stromaufwärts des *min*-ATG deletiert. Die für die Klonierung relevanten Schnittstellen sind angegeben. Sowohl Testes adulter (B), als auch larvaler (C) *Drosophilae* der Linie Δ 60 wurden auf Reporterexpression analysiert. (B) In dem Testes einer adulten Fliege der Linie Δ 60 sind späte Spermienbündel (Pfeilkopf), aber auch prämeiotische Spermatozyten im Apikalbereich (Doppelpfeil) gefärbt. Die Färbung an den Rändern des Testisschlauches (doppelter Pfeilkopf) deutet auf β -Galaktosidase-Expression in prämeiotischen und meiotischen Stadien hin. Stammzellen und Spermatogonien, die an der Testisspitze lokalisiert sind, bleiben ungefärbt (Pfeil). (C) Die Färbung in Spermatozyten des larvalen Testis der Linie Δ 60 (Doppelpfeil), welcher ausschließlich prämeiotische Zellstadien enthält, bestätigt die verfrühte, prämeiotische Reporterexpression. Die apikale „Hub“-Region ist mit einem Stern markiert. Stammzellen und Spermatogonien zeigen keine Färbung (Pfeil). (D) Graphische Darstellung des Konstruktes Δ 30. 30 Nukleotide direkt stromaufwärts des *min*-Translationsstarts sind deletiert. Für die Klonierung des Konstruktes relevante Schnittstellen sind eingezeichnet. (E) Adulte Testes der Linie Δ 30 zeigen nach enzymatischem β -Galaktosidase-

Nachweis sowohl eine Färbung in elongierten Spermatiden (Pfeilkopf), als auch in Spermatozyten im apikalen Bereich des Testis (Doppelpfeil). Desweiteren ist eine Färbung der testikulären Randbereiche zu erkennen (doppelter Pfeilkopf). Auch hier bleiben Stammzellen und Spermatogonien ungefärbt (Pfeil). (F) Die Färbung der larvalen Spermatozyten (Doppelpfeil) bestätigt die verfrühte Reporterexpression in Testes der Linie Δ 30. Der Stern markiert die „Hub“-Region der larvalen Gonade. Ungefärbte Stammzellen und Spermatogonien sind im apikalen Bereich des Testis lokalisiert (Pfeil).

5.12.8 In homozygot *boule*-mutantem Hintergrund wird die *min-lacZ*-Reporter mRNA verfrüht translatiert

An die Identifizierung cis-regulatorischer Elemente auf mRNA-Sequenzebene, die für die Translationsrepression notwendig sind, schließt sich die Suche nach Proteinen an, die an diese Sequenzen binden und die mRNA dadurch für Ribosomen unzugänglich machen können.

Zur Identifikation von Proteinen, die mit dem Translationskontrollbereich von *min* interagieren, wurde das *min*-Expressionsmuster im genetischen Hintergrund männlich steriler bzw semisteriler Fliegenlinien verfolgt, die mutant für die RNA-bindenden Proteine Tsr, Boule, Rb97D sowie die testisspezifische Isoform von Bruno sind. Im Fall einer Beteiligung der getesteten RNA-bindenden Proteine an dem Repressionsprozess der *min*-mRNA, würde im mutanten Hintergrund eine verfrühte *min*-Translation erwartet werden. Um die *min*-Genexpression in Testes mutanter Fliegen verfolgen zu können, wurde das Transgen 466-*min-lacZ* kreuzungsgenetisch in den jeweiligen homozygot mutanten Hintergrund eingebracht. Da die Gene *tsr* und *RB97D* auf dem 3. Chromosom lokalisiert sind, aber *boule* und *bruno* auf dem 2. Chromosom, wurde für die Kreuzungsgenetik sowohl eine Fliegenlinie verwendet, die das Transgen 466-*min-lacZ* auf dem 2. Chromosom trug, als auch ein Stamm, bei dem das Transgen auf dem 3. Chromosom integriert war. Adulte Testes der homozygot mutanten Fliegen wurden einem histochemischen β -Galaktosidase-Enzymnachweis unterzogen. Ein verändertes *min*-Expressionsprofil zeigte sich nur im *boule* (*bol*¹)-mutanten Hintergrund. Nach einer Färbedauer von 6 Stunden bei 37 °C konnte das Reporterprotein ab dem Stadium primärer Spermatozyten in Testes adulter Fliegen detektiert werden (Abb. 5.23 A). Im Vergleich zur Kontrollfärbung, die mit Testes der Linie 466-*min* durchgeführt wurde, war die Expressionshöhe jedoch deutlich reduziert. In Testes homozygot *boule*-mutanter Fliegen, die das 466-*min-lacZ*-Transgen nicht im Genom integriert trugen, ließ sich nach der gleichen Färbedauer keine β -Galaktosidase Expression nachweisen (Abb. 5.23 B). Die verfrühte β -Galaktosidase Expression war auch in larvalen Testes homozygot *boule* mutanter Fliegen, die das 466-*min-lacZ*-Transgen trugen, detektierbar (Abb. 5.23 C). Dagegen zeigten larvale Testes homozygot *boule* mutanter Fliegen, in deren Genom das Transgen nicht integriert war, keine Expression (Abb. 5.23 D). Der gestörte

Mechanismus der *min*-Translationskontrolle deutet auf eine direkte oder indirekte Interaktion des Proteins Boule mit der *min*-mRNA hin.

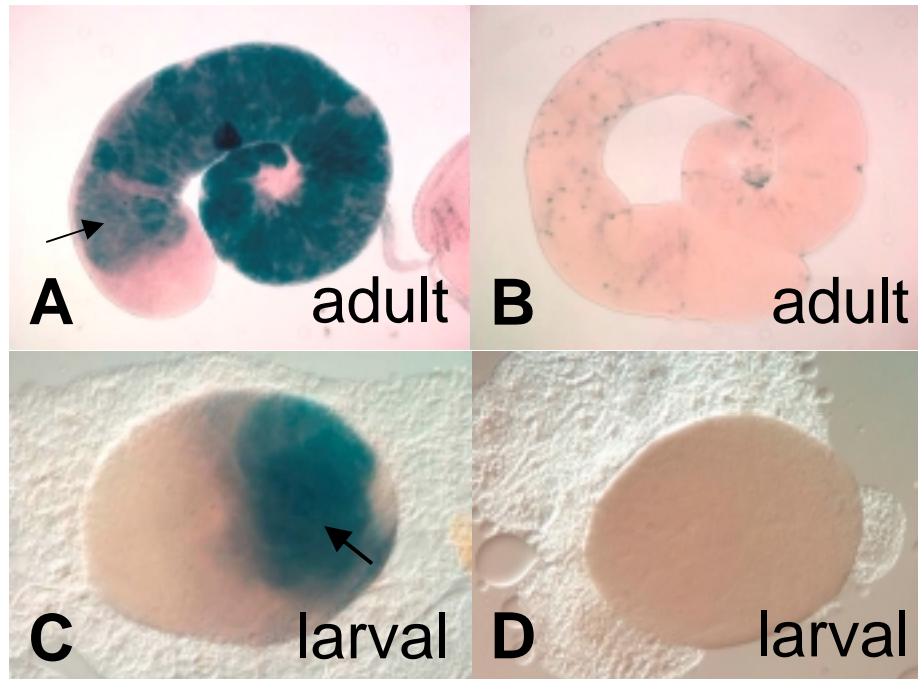


Abb. 5.23 Die von dem Reportergenkonstrukt *466-min-lacZ* vermittelte β -Galaktosidase Expression ist in dem genetisch homozygot mutanten *boule*-Hintergrund verändert.

(A) In Testes adulter, homozygot *boule* mutanter Fliegen, die das Transgen *466-min* trugen, war Reporterexpression zytoplasmatisch ab dem Stadium primärer Spermatozyten detektierbar (Pfeil). (B) Testes adulter, homozygot *boule* mutanter Fliegen, die parallel einem β -Galaktosidase-Nachweis unterzogen wurden, zeigten keine Färbung. (C) In larvalen Testes der homozygoten *466-min / boule-Drosophila* ist eine zytoplasmatische Färbung der prämeiotischen Spermatozyten detektierbar (Pfeil). (D) Testes homozygot *boule* mutanter Larven, die parallel einem β -Galaktosidase-Nachweis unterzogen wurden, blieben ungefärbt.

IV. Funktionsanalyse der Gene *don juan*, *don juan-like* und *min*

5.13 Verfrühte Expression als experimenteller Ansatz zur Funktionsanalyse von Don Juan und Don Juan-Like

Ein Ansatz zur Analyse der Genfunktion ist die gezielte gewebespezifische Fehlexpression des Gens. Die Untersuchung möglicher daraus resultierender Phänotypen würde erste Einblicke in die Funktion des Proteins erlauben. So könnte die ektopische Expression von *don juan* und *don juan-like* in prämeiotischen Spermatogenesestadien Einfluss auf die Differenzierung der Keimzellen nehmen und morphologische Aberrationen auslösen. Resultierende Abnormalitäten könnten

Rückschlüsse auf die Funktion von Don Juan bzw. Don Juan-Like zulassen. Phänotypische Konsequenzen einer verfrühten Expression sind allerdings nur indirekte Hinweise auf die Funktion eines Proteins. Direkte Hinweise können nur durch die phänotypische Charakterisierung einer genspezifischen *don juan*- bzw. *don juan-like*-Mutante erhalten werden. Zudem gibt eine verfrühte Expression des Gens Aufschluss über die Relevanz der translationalen Repression der *don juan* bzw. *don juan-like* mRNA in prämeiotischen und frühen postmeiotischen Keimzellen. Es ließe sich somit klären, ob die Beschränkung der Translation beider Proteine auf Stadien elongierender Spermatiden für die normale Differenzierung der Spermatiden notwendig ist.

5.13.1 Expression des Don Juan Proteins in prämeiotischen Keimzellstadien

In vorangegangenen Experimenten war bemerkt worden, dass die zelluläre Lokalisation eines DJ-GFP-Fusionsproteins nicht der Lokalisation des endogenen DJ-Proteins entsprach (Santel *et al.*, 1998). Aufgrund dessen wurde auf GFP verzichtet und unmarkiertes Don Juan Protein unter der Kontrolle des *β 2-tubulin* Promotors prämeiotisch exprimiert. Dieser Promotor wurde als regulatoriver Bereich für die verfrühte Expression gewählt, da die *β 2-tubulin* mRNA keiner Translationskontrolle unterliegt. *β 2-tubulin* wird wie das *don juan* Gen in primären Spermatozyten transkribiert. Mit der Transkription setzt auch die Translation der *β 2-tubulin*-mRNA ein. Die *β 2-tubulin*-mRNA bleibt auch in postmeiotischen Stadien stabil. Zur Konstruktion eines Transgens wurde der regulatorische Bereich -511 bis +156 relativ zum Transkriptionsstart des *β 2-tubulin* Gens mit Hilfe der Primer „Beta2tub sense“ und „Beta2tub as“ aus genomischer DNA über eine PCR amplifiziert. In diesem Bereich liegen alle für die Expression des *β 2-tubulin* Gens notwendigen cis-regulatorischen Elemente zur gewebespezifischen Transkription und Translation (Michiels *et al.*, 1989). Die Primer enthielten artifizielle Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI*, über die das PCR Produkt in den P-Element-Transformationsvektor pW8 (Klemenz *et al.*, 1987) eingefügt wurde. Die *don juan* cDNA beginnend mit dem ATG wurde über eine PCR mit den Primern „Babe“ und „TGA2“, die beide artifizielle *BamHI* Schnittstellen enthielten, aus dem Vektor pBTBF1 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit *BamHI* behandelt und in den mit *BamHI* geöffneten Vektor pW8, der bereits den *β 2-tubulin* Promotor enthielt, inseriert. Die SV40-Polyadenylierungssequenz wurde über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *XbaI* und *PstI* aus dem Vektor pChab Δ Sal (Thummel *et al.*, 1988) geschnitten und in den Vektor pW8 (Klemenz *et al.*, 1987) eingefügt. Das zur Verdeutlichung in Abb. 5.24 dargestellte Konstrukt wurde mit dem P-Element-

Transformationssystem stabil in das Fliegen genom integriert.

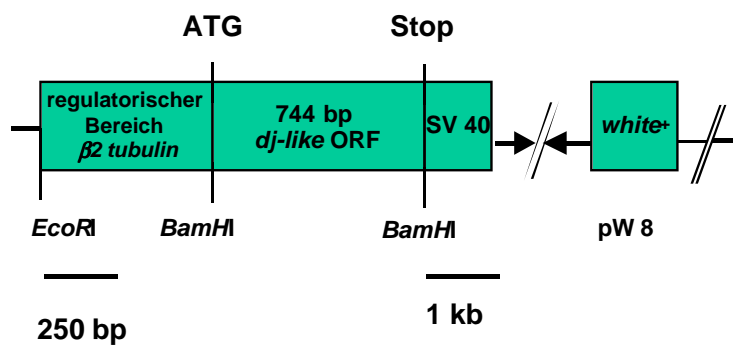


Abb. 5.24 schematische Darstellung des Konstruktes $\beta 2$ -tubulin-dj.

Die codierende *don juan*-Sequenz steht unter der Kontrolle des $\beta 2$ -tubulin Promotors. Die zur Konstruktion verwendeten Schnittstellen sind angegeben.

Testes transgener Fliegen, welche homozygot das Konstrukt $\beta 2$ -tubulin-dj im Genom integriert trugen, wurden lichtmikroskopisch analysiert. Hinsichtlich der Morphologie und Differenzierung der Keimzellen konnten keine Unterschiede zur Wildtypsituation beobachtet werden. Männliche Fliegen des Stammes $\beta 2$ -tubulin-dj wiesen motile individualisierte, reife Spermien auf und waren fertil. Da für den immunhistochemischen Nachweis der verfrühten Expression des Don Juan Proteins zur Zeit kein funktionsfähiger Don Juan-spezifischer Antikörper verfügbar war, konnte die verfrühte Expression des Don Juan Proteins nicht nachgewiesen werden.

5.13.2 Verfrühte Expression des Fusionsproteins Myc-DJ-Like in prämeiotischen Keimzellen

Zur verfrühten Expression von DJ-Like wurde ein Myc-DJ-Like Fusionsprotein verwendet. Das Fusionsgen wurde unter Kontrolle des $\beta 2$ -tubulin Promotors gestellt. Das $\beta 2$ -tubulin-Gen wird im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der β -tubulin-Genfamilie als einziger Isotyp ausschließlich in den Keimzellen exprimiert (Bialojan *et al.*, 1984; Kaltschmidt *et al.*, 1991). Da das Transkript unter der Kontrolle des $\beta 2$ -tubulin Promotors nicht translational reprimiert wird, wurde dieser Promotor zur Steuerung des Fusionsgens ausgewählt.

Der $\beta 2$ -tubulin Sequenzbereich -511 bis +156, welcher die vollständige genregulatorische Region des Promotors umfasste, wurde über die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *EcoRI* und *BamHI* aus dem Konstrukt $\beta 2$ -dj isoliert. Im Anschluß konnte das Fragment in den Transformationsvektor pChab Δ sal inseriert werden. Das *myc*-Gen konnte durch Restriktion des Konstruktes pChab-myc-dj-like mit den Enzymen *BamHI* und *XbaI* isoliert werden und wurde darauf

folgend in das Transformationsplasmid pChab Δ sal inseriert, das bereits den $\beta 2$ -*tubulin* Promotor enthielt. Der offene Leserahmen des *dj-like* Gens konnte ebenfalls durch Restriktion des Konstruktes pChab-*myc-dj-like* isoliert werden. Hierbei wurde das Enzym *Xba*I verwendet. Das erhaltene Fragment wurde ungerichtet über die *Xba*I Schnittstelle in den mit *Xba*I geöffnenden Vektor pChab Δ sal ligiert, der sowohl den $\beta 2$ -*tubulin* Promotor, als auch den offenen Leserahmen des *myc*-Gens enthielt. In dem auf diese Weise etablierte Konstrukt $\beta 2$ -*c-myc-dj-like* (Abb. 5.25) war der *dj-like* Leserahmen in der richtigen Orientierung und im korrekten Leseraster mit dem *c-myc*-Gen verbunden. Es konnten sieben auf diesem Konstrukt basierende transgene Fliegenlinien etabliert werden.

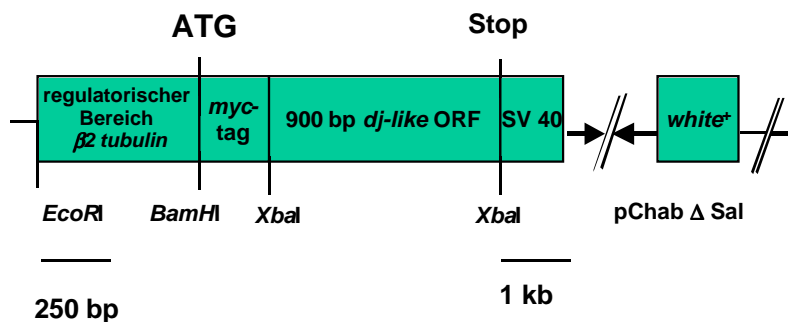


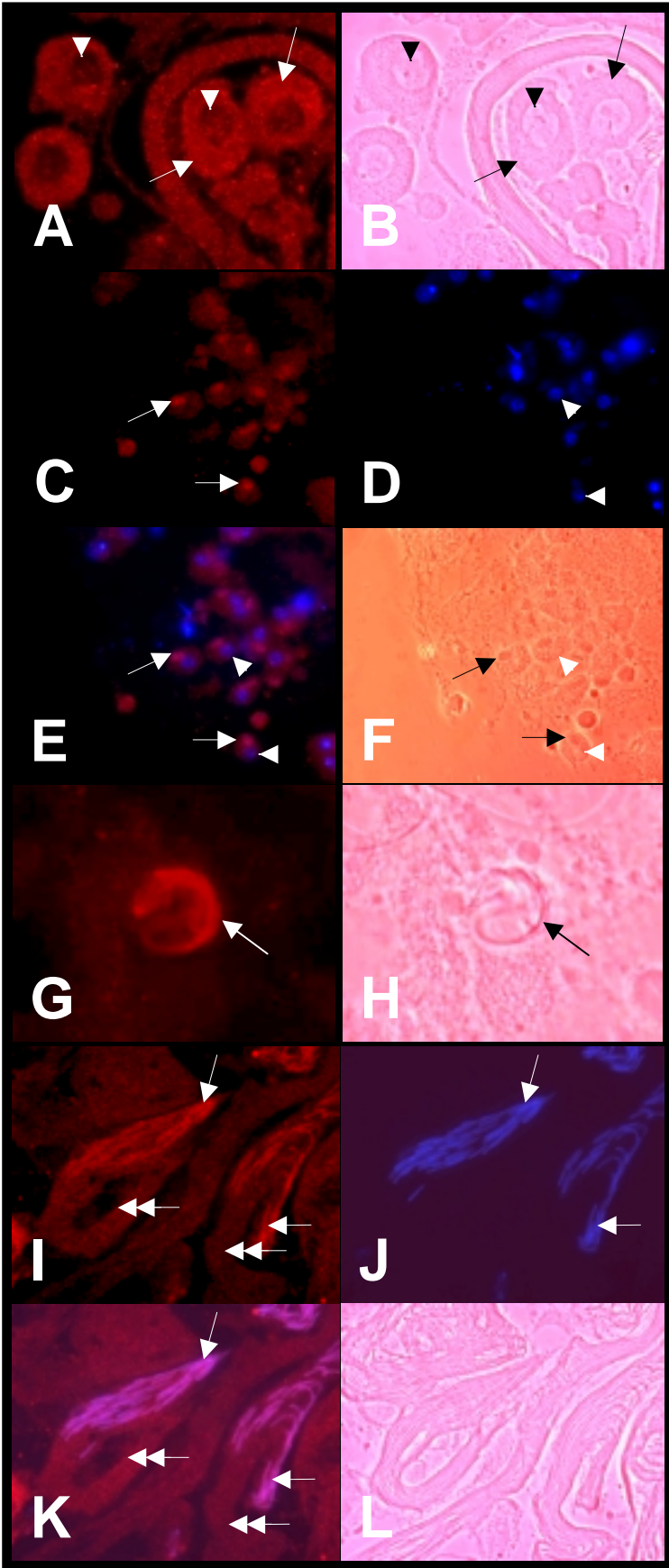
Abbildung 5.25 Schematische Darstellung des Konstrukts $\beta 2$ -*c-myc-dj-like*

Die codierende Sequenz des *c-myc*-Gens wurde N-terminal mit dem offenen Leserahmen des *don juan-like*-Gens verbunden. Das Fusionsgen *c-myc-dj-like* steht unter der Kontrolle des regulativen $\beta 2$ -*tubulin* Bereiches. Die zur Konstruktion verwendeten Schnittstellen sind angegeben.

5.13.3 Das verfrüht exprimierte Fusionsprotein Myc-DJ-Like ist in Nebenkernen und Flagellen elongierender Spermatisiden lokalisiert

Zur Bestätigung der prämeiotischen und frühen postmeiotischen Expression des Fusionsproteins wurde zunächst an Testes von Fliegen, die das Konstrukt $\beta 2$ -*c-myc-dj-like* im Genom integriert trugen, eine Anti-myc Antikörperfärbung durchgeführt. DJ-Like-myc ist ab dem Stadium der primären Spermatozyten im Zytoplasma der Zelle nachweisbar (Abb. 5.26 A, Pfeil). In frühen Spermatisidstadien ist eine Kolo-kalisation des Fusionsproteins mit den mitochondriellen Derivaten zu beobachten. In Abbildung 5.26 C-F sind Nebenkernstadien dargestellt. Die Anti-Myc-Immunofluoreszenz dekoriert die neben dem Kern (Abb. 5.26 D und E, Pfeilkopf) lokalisierten Mitochondrien (Abb. 5.26 C und E, Pfeil). In jungen unvollständig elongierten Spermatisiden kann das Fusionsprotein entlang der Flagellen detektiert werden (Abb. 5.26 G, Pfeil). Eine Assoziation des Fusionsproteins mit dem Kern ist erst in elongierten Spermatisiden, während der Kernkondensation zu beobachten (Abb. 5.26

I, K, M und O, Pfeil) Zu diesem Zeitpunkt wird DJ-Like nativ exprimiert. Flagellare Strukturen sind in diesem Stadium nur schwach dekoriert (Abb. 5.26 I, K, M und O, Doppelpfeil). Wenn der Kern schließlich nadelförmig ist, kann Anti-Myc-Immunfluoreszenz sowohl entlang der Flagellen (Abb. 5.26 Q und S, Doppelpfeil), als auch in den Spermatidköpfen (Abb. 5.26 Q und S, Pfeil), detektiert werden. In individualisierten Spermien konnte das Fusionsprotein nicht detektiert werden.



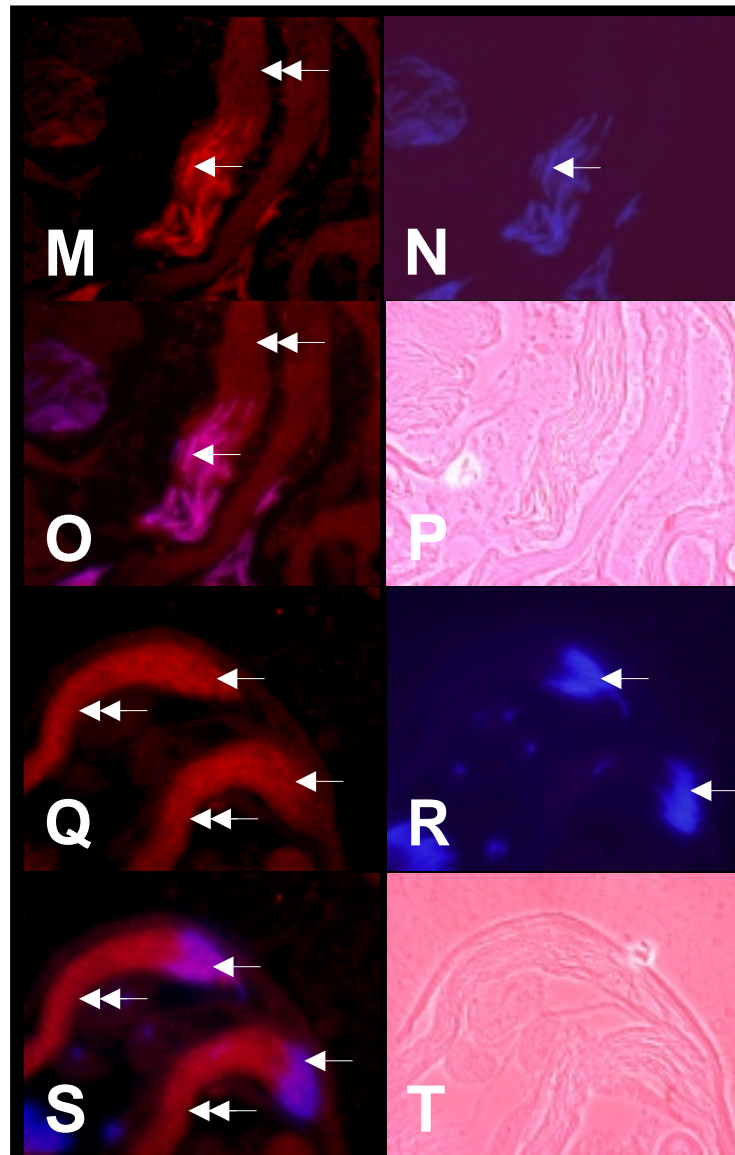


Abb. 5.26 Lokalisierung des verfrüht exprimierten Fusionsproteins Myc-DJ-Like in prämeiotischen und postmeiotischen Spermatogenese-Stadien.

(A) Die Aufnahme zeigt einen immunohistologischen Nachweis von Myc-DJ-Like im Zytoplasma primärer Spermatozyten (Pfeile). Die Zellkerne (Pfeilköpfe) zeigen keine Färbung. (B) Die Abbildung stellt die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme von A dar. Die Zellkerne sind als helle kreisförmige Strukturen innerhalb des Zytoplasmas erkennbar (Pfeilköpfe). (C) Die Aufnahme einer Immunofluoreszenz mit dem Anti-Myc-Antikörper demonstriert die Lokalisation des Fusionsproteins Myc-DJ-Like in den Nebenkernen des „Onion-Stadiums“ früher Spermatisden (Pfeile). (D) Die Aufnahme zeigt das korrespondierende Bild nach einer Gegenfärbung mit Hoechst 33258. Die Fluoreszenz markiert das Chromatin der neben den Nebenkernen lokalisierten Zellkerne (Pfeilköpfe). (E) Die Übereinanderlagerung der beiden photographischen Aufnahmen C und D verdeutlicht die Lokalisation des Fusionsproteins in den sphärischen mitochondrialen Derivaten (Pfeile), die neben dem Zellkern (Pfeilköpfe) lokalisiert sind. (F) In der mit C, D und E korrespondierenden Phasenkontrastaufnahme sind die Nebenkernkerne als dunkle kreisförmige Strukturen (Pfeile) direkt neben den hellen Kernen (Pfeilköpfe) zu erkennen. (G) Der Anti-Myc-Antikörper erkennt das Fusionsprotein entlang der elongierenden Flagellen sich differenzierender Spermatisden (Pfeil). (H) Die Abbildung zeigt die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme. Die flagellaren Strukturen der elongierenden Spermatisden sind mit einem Pfeil markiert. (I) Die Immunofluoreszenzfärbung mit dem Anti-Myc-Antikörper demonstriert die Lokalisation des Myc-DJ-Like Fusionsproteins während der Chromatinkondensation in Spermatisdenkernen (Pfeile). In diesem Stadium ist das Fusionsprotein nur noch schwach entlang der Flagellen detektierbar (Doppelpfeile). (J) Eine Gegenfärbung mit dem chromatinmarkierenden Farbstoff Hoechst 33258 zeigt, dass der Farbstoff dieselben Strukturen

markiert wie der Antikörper in Abbildung I. (K) Die Abbildung zeigt durch Übereinanderlagerung der beiden getrennten Bildaufnahmen I und J die Kolokalisation des Myc-DJ-Like-Proteins mit dem Chromatin (Pfeile). Die Doppelpfeile markieren durch Anti-Myc-Antikörperfluoreszenz schwach dekorierte flagellare Strukturen. (L) Die Aufnahme stellt das den Abbildungen I, J und K entsprechende Phasenkontrastbild dar. (M) Ebenso wie Abbildung I demonstriert auch dieser immunhistologische Nachweis von Myc-DJ-Like die Lokalisation des Fusionsproteins während der Chromatinkondensation in den Spermatidenkernen. (N) Nach Gegenfärbung mit dem Farbstoff Hoechst 33258 markiert die Fluoreszenz identische Strukturen wie nach der Färbung mit dem Anti-Myc-Antikörper in Abbildung M. (O) Die Übereinanderlagerung der getrennten Aufnahmen M und N verdeutlicht die Kolokalisation von Myc-DJ-Like und Chromatin in Spermatidenkernen. (P) Die Abbildung zeigt das mit den Abbildungen M, N und O übereinstimmende Phasenkontrastbild. (Q) Die Abbildung zeigt ein älteres Spermatidenbündel mit abgeschlossener Kernkondensation. Der Anti-Myc-Antikörper detektiert das Fusionsprotein sowohl in den Flagellen als auch in den Kernen. (R) Zum Vergleich ist eine Hoechst-33258-Chromatinfärbung dargestellt. (S) Die Übereinanderlagerung der Aufnahmen Q und R demonstriert die Kolokalisation des Fusionsproteins Myc-DJ-Like mit dem Chromatin während dieses Stadiums.

Die Übereinanderlagerungen getrennter photographischer Bildaufnahmen erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop.

5.13.4 Die verfrühte Expression des Fusionsproteins Myc-DJ-Like hat keine Differenzierungsstörungen während der Spermatogenese zur Folge

Um zu überprüfen, ob die prämeiotische und frühe postmeiotische Expression des Fusionsproteins morphologische Abnormalitäten während der Spermiendifferenzierung zur Folge hat, wurden unfixierte Testes-Quetschpräparate transgener Fliegen der Linie *β2-c-myc-dj-like* lichtmikroskopisch in Phasenkontrastoptik untersucht und mit der Wildtypsituation verglichen. In keiner der sieben fertilen transgenen Fliegenlinien konnten Differenzierungsstörungen festgestellt werden. In Testes transgener Fliegen waren alle Keimzellstadien der Spermatogenese vorhanden, die sich morphologisch nicht von den Differenzierungsstadien im Wildtyp unterschieden. Als Endprodukte des Zelldifferenzierungsprozesses konnten individualisierte, reife Spermien beobachtet werden, die frei und beweglich waren. Insgesamt konnten bei lichtmikroskopischer Analyse im Phasenkontrast keine Unterschiede zur Wildtypsituation entdeckt werden.

5.14 Ektopische Expression der Fusionsproteine Myc-DJ-Like und Myc-DJ in Speicheldrüsen unter Verwendung des GAL4-UAS-Systems

Das von Brand und Perrimon entwickelte GAL4-UAS-System (Brand und Perrimon 1993; Brand *et al.*, 1994) ermöglicht die gezielte Fehlexpression eines beliebigen Genproduktes in verschiedenen Geweben oder Zelltypen. Hierzu muß die zu exprimierende Gensequenz unter die Kontrolle des GAL4-Promotors der Hefe *S.*

cerevisiae gebracht werden. Dies wird erreicht, indem das zu untersuchende Gen in einen Vektor kloniert wird, der mehrere Kopien des Enhancer-Elements UAS (**u**pstream **a**ctivating **s**equence) aus Hefe, sowie die *hsp 70* TATA-box und den Transkriptionsstart des Hitzeschockpromotors *hsp 70* aus *Drosophila* enthält. Transgene Fliegen, die dieses Konstrukt in der Keimbahn integriert tragen (UAS-Stämme) sind nur bei gleichzeitigem Vorhandensein des entsprechenden Transaktivators GAL4 in der Lage das gewünschte Genprodukt zu exprimieren. Hierzu sind zunächst Fliegenlinien notwendig, die das Gen des Hefe-Transaktivators GAL4 unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Enhancers exprimieren (GAL4-Treiberstämme). Wenn UAS-Stämme mit transgenen GAL4-Stämmen gekreuzt werden, erkennt der Transkriptionsaktivator GAL4 in Geweben der Nachkommen, in welchen er exprimiert wird, die UAS-Sequenz, wodurch der Transkriptionsinitiationskomplex aktiviert wird und das sich hinter dem UAS-Element befindende Zielgen spezifisch angeschaltet wird (Abb. 5.27). Durch Wahl eines entsprechenden GAL4-Treiberstammes lässt sich somit die Expression des Zielgens beliebig lenken.

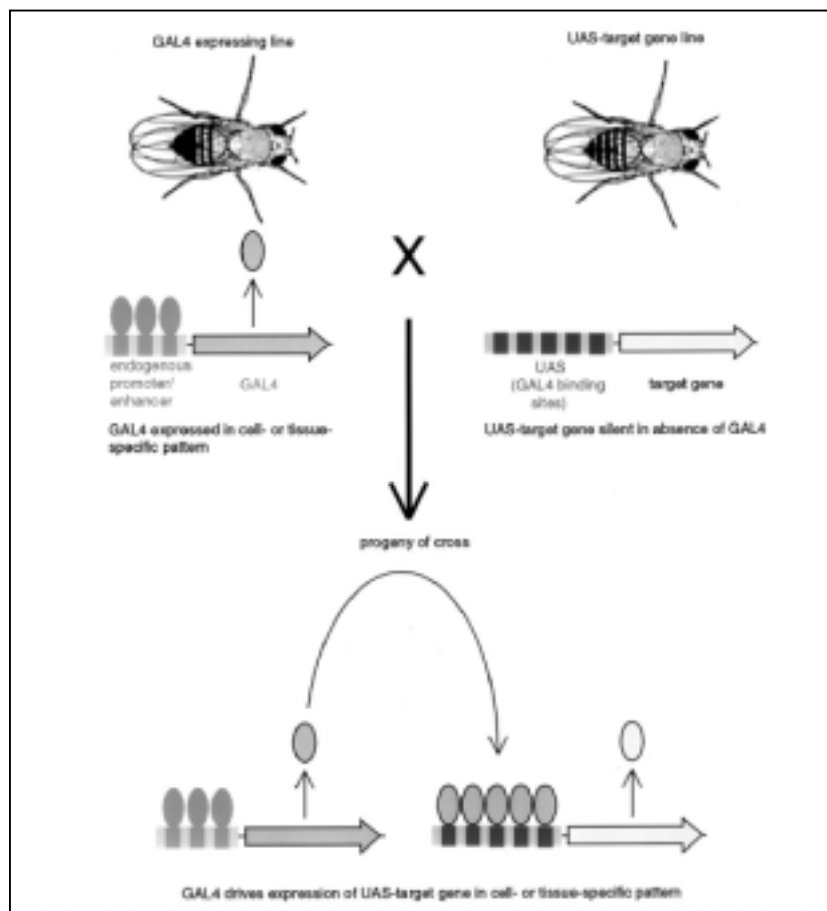


Abbildung 5.27 Ektopische Genexpression mit dem UAS/GAL4-System (Phelps und Brand, 1998)

Die schematische Darstellung wird im Text erläutert.

Die Antikörper Immunofluoreszenzanalysen zur Lokalisierung des Fusionsproteins Myc-Don Juan-Like weisen ebenso wie die Primärstruktur des DJ-Like Proteins, die sowohl Kernlokalisierungssignale als auch ein Mitochondrienimportsignal enthält, auf eine duale Lokalisierung des Proteins im Kern und in den Mitochondrien hin. Ebenso konnte das Don Juan Protein mit anti-Don Juan Antikörpern in Kernen elongierender Spermatiden während der Chromatinkondensation und in Flagellen detektiert werden. Zum Nachweis einer Assoziation der Fusionsproteine mit Mitochondrien oder Kernstrukturen, wie z.B. dem Chromatin wurde ektopisch exprimiertes Myc-DJ-Like sowie Myc-Don Juan in Speicheldrüsen untersucht. Aufgrund eines ausgedehnten Zytoplasmas und großer Chromosomen eignen sich Speicheldrüsen zum Studium der subzellulären Lokalisation sowie einer möglichen Assoziation mit dem Chromatin. Zudem könnten phänotypische Folgen, die aufgrund der ektopischen Expression des Fusionsgens entstehen könnten, Rückschlüsse auf die entwicklungsbiologische Funktion der Proteine zulassen.

Bereits im Vorfeld wurde Don Juan-GFP ektopisch in Speicheldrüsen exprimiert (Santel *et al.*, 1998). Don Juan-GFP assoziierte im Zytoplasma mit Mitochondrien und war um den Kern konzentriert. Die ausschließliche Lokalisation des ektopisch exprimierten Fusionsproteins in Mitochondrien der Speicheldrüsen steht im Kontrast zur dualen Lokalisation des Don Juan Proteins in Kernen und mitochondrialen Strukturen der Flagellen während der Spermatogenese. Ein möglicher Grund für das Unvermögen des Fusionsproteins DJ-GFP in den Kern zu translocieren könnte die Deletion der letzten 11 C-terminalen Aminosäuren sein, die zum Kernlokalisierungssignal gehören. Andererseits ist es auch möglich, dass das fusionierte GFP C-terminale Kernimportsignale maskiert. Durch die Fusion mit GFP wird die Masse des Don Juan Proteins nahezu verdoppelt. Es ist bekannt, dass kleine basische Proteine passiv in den Kern diffundieren können (zur Übersicht: Görlich und Mattaj, 1996). Proteine, deren molekulare Masse 40 kDa überschreitet, sind von diesem Import ausgeschlossen. Folglich könnte es auch sein, dass das Fusionsprotein aufgrund seiner molekularen Masse von 56 kDa im Gegensatz zum kleineren Don Juan Protein, das eine Masse von 29 kDa aufweist, vom passiven Kerntransport ausgeschlossen ist.

Aufgrundessen wurde für die Lokalisation von ektopisch exprimiertem Don Juan und Don Juan-Like in Speicheldrüsen das im Vergleich zu GFP um zwei Drittel kleinere c-Myc als Reporterprotein verwendet. Dieses wurde N-terminal mit dem offenen Leserahmen der Proteine fusioniert.

Das Konstrukt *UAS-c-myc-dj-like* enthält die Codierungssequenz des *c-myc-dj-like* Fusionsgens unter der Kontrolle eines *hsp 70*-Promotors und der Hefe-Aktivierungssequenz UAS (Abb. 5.28 A). Zur Generierung dieses Konstrukts wurde der Transformationsvektor pUAST verwendet, welcher 5 Gal4-Bindestellen gefolgt von der *hsp 70* Promotorsequenz stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle,

enthält. Das *c-myc*-Gen konnte durch Restriktion des Konstruktes pChab-*myc-dj-like* mit den Enzymen *Bam*HI und *Xba*I isoliert werden. Die überhängenden Enden, die durch Restriktion mit den Enzymen *Bgl*II und *Bam*HI entstehen, sind kompatibel, sodass das *c-myc*-Gen in das mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Xba*I behandelte Transformationsplasmid pUAST inseriert werden konnte. Das resultierende Konstrukt *UAS-c-myc* wurde mit *Xba*I geschnitten, so dass der offene Leserahmen des *dj-like* Gens, welcher durch Restriktion des Konstrukts pChab-*myc-dj-like* mit dem Enzym *Xba*I isoliert wurde, eingefügt werden konnte. Die Orientierung des *don juan-like* Leserahmens wurde sowohl mit Hilfe von enzymatischen Restriktionen als auch durch Sequenzierung überprüft. Nach Injektion konnten 7 unabhängige Fliegenlinien identifiziert werden.

Transgene Fliegenlinien, die das in Abb. 5.28 B dargestellte Konstrukt *UAS-c-myc-dj* im Genom integriert trugen, wurden freundlicherweise von Sunil Jayaramaya Raja zur Verfügung gestellt. In dem Konstrukt liegt der Leserahmen des *c-myc*-Gens N-terminal mit der codierenden *don juan* Sequenz fusioniert vor. Beide Leserahmen wurden in den P-Element –Transformationvektor pUAST inseriert.

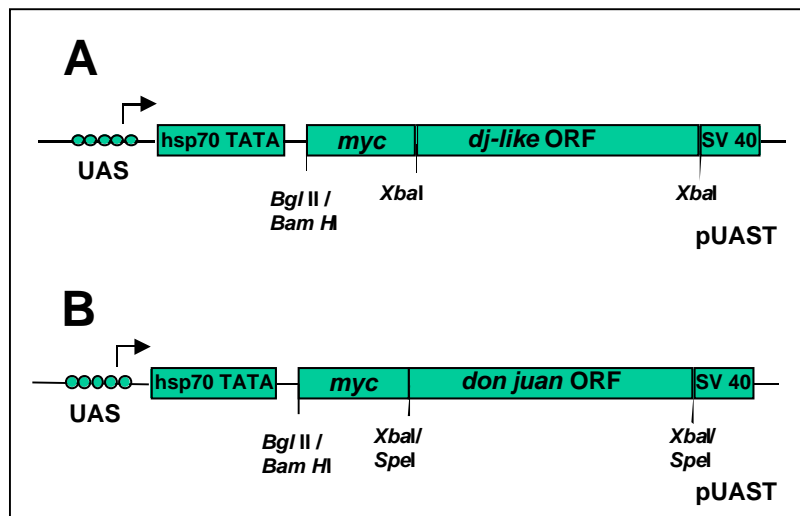


Abb. 5.28 Graphische Darstellung der Konstrukte *UAS-c-myc-dj-like* und *UAS-c-myc-dj* zur ektopischen Expression von Myc-DJ und Myc-DJ-Like

(A) Der Leserahmen des *c-myc* Gens ist N-terminal mit der codierenden Sequenz des *don juan-like* Gens verbunden. Beide Leserahmen sind in den P-Element-Transformationsvektor pUAST inseriert. Die für die Konstruktion verwendeten Schnittstellen sind angegeben. (B) Der mit den Enzymen

*Bam*HI und *Xba*I behandelte Leserahmen des *c-myc*-Gens wurde in den mit *Bgl*II und *Xba*I geöffneten pUAST-Vektor inseriert. Die durch Restriktion mit den Enzymen *Bgl*II und *Bam*HI entstandenen überhängenden Enden sind kompatibel. Der Leserahmen des *don juan* Gens wurde mit Primern amplifiziert, die artifizielle Schnittstellen für das Enzym *Spe*I enthalten. Da die durch Restriktion mit den Enzymen *Spe*I und *Xba*I entstehenden überhängenden Enden kompatibel sind, konnte der amplifizierte ORF des Gens *don juan* nach Restriktion mit *Spe*I in den mit *Xba*I geöffneten pUAST-Vektor inseriert werden. Für die Klonierung relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

Zur Induktion der gewebespezifischen Expression der Fusionsproteine Myc-Dj-Like und Myc-DJ in Speicheldrüsen wurde der GAL4-Treiber-Stamm Sgs 58 AB (A. Hoffmann; unveröffentlicht) verwendet. Nach Kreuzung der UAS-Stämme *UAS-c-myc-dj-like* bzw. *UAS-c-myc-dj* mit der GAL4-Treiberlinie Sgs 58 AB, setzt die Expression des Transkriptionsfaktors GAL4 in larvalen Speicheldrüsen der

Nachkommen die Expression des Transgens (*UAS-c-myc-dj-like* bzw. *UAS-c-myc-dj*) in Gang. Die ektopische Expression der Fusionsproteine hat keine morphologischen Abberationen der Speicheldrüsen zur Folge. Zur Lokalisierung der Fusionsproteine in den Speicheldrüsenzellen von Larven des dritten Stadiums wurde eine anti-Myc-Antikörperfärbung durchgeführt. Die Fusionsproteine konnten dabei eindeutig in Kernen nachgewiesen werden (Abb. 5.29 A, B, C, D Pfeile). Eine zusätzliche mengenmässig geringere Lokalisation der Proteine in Mitochondrien kann nicht ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle wurden Speicheldrüsen des Treiberstammes *Sgs 58 AB* (Abb. 5.29 E) sowie Speicheldrüsen der Linien *UAS-c-myc-dj-like* bzw. *UAS-c-myc-dj* ebenfalls einer anti-Myc-Antikörperfärbung unterzogen (Abb. 5.29 F und G). Hierbei konnte keine Färbung detektiert werden

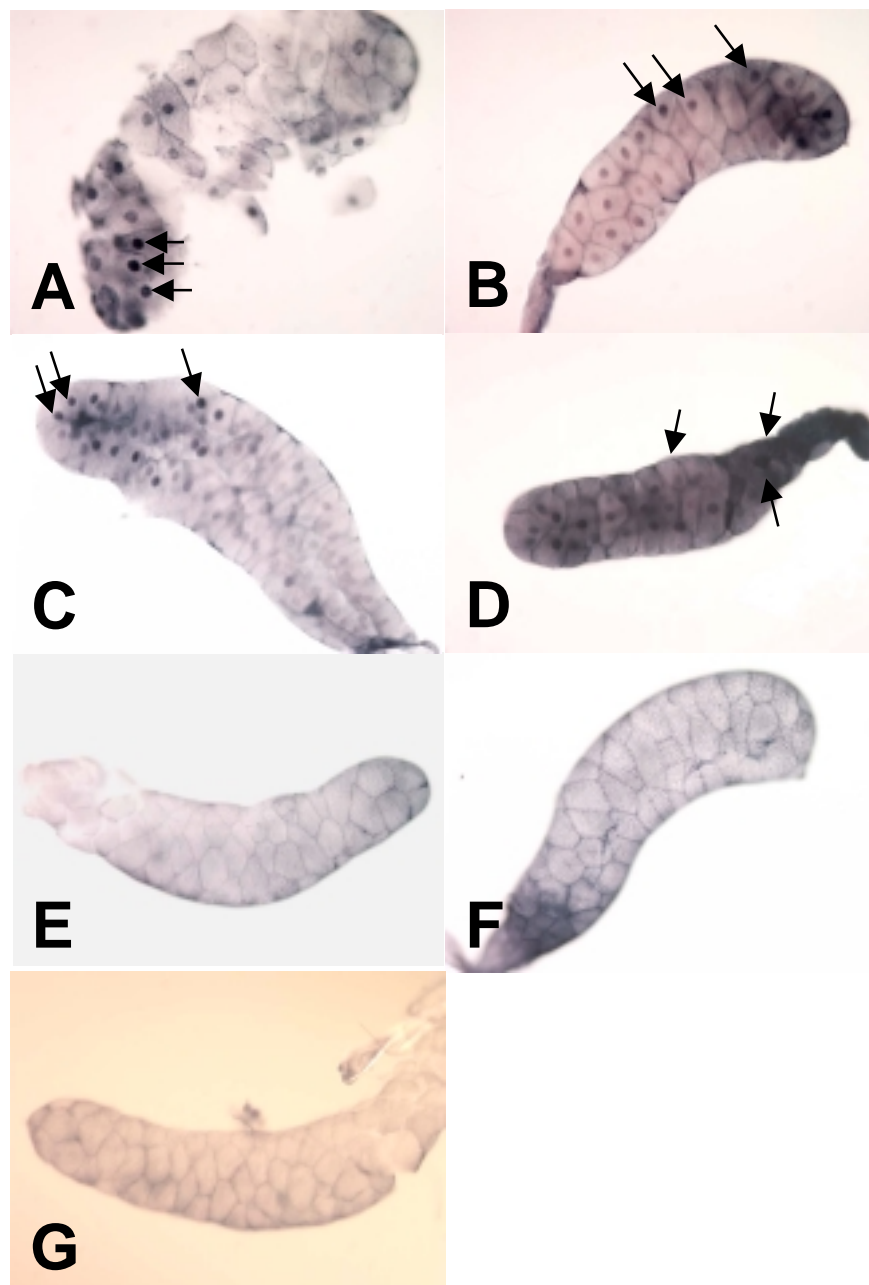


Abb. 5.29 Die ektopisch in Speicheldrüsen exprimierten Fusionsproteine Myc-DJ-Like und Myc-DJ sind in den Kernen nachweisbar

(A) und (B) Mit Hilfe einer anti-Myc-Antikörperfärbung wurde das Fusionsprotein Myc-DJ-Like in den Kernen der Speicheldrüsen detektiert (Pfeile). (C) und (D) Das Fusionsprotein Myc-DJ ist nach ektopischer Expression ebenfalls in Kernen von Speicheldrüsen nachweisbar (Pfeile). (E) Speicheldrüsen des Treiberstammes Sgs 58 AB zeigen nach einem anti-Myc-Immunonachweis keine Färbung. (F) Speicheldrüsen der Linie *UAS-c-myc-dj-like* sowie Speicheldrüsen der Linie *UAS-c-myc-dj* (G) zeigen nach einem anti-Myc-Immunonachweis ebenfalls keine Färbung.

5.15 Die ektopische Expression von *myc-don juan* und *myc-dj-like* in der Augenimaginalscheibe hat einen partiellen Verlust der Ommatidien zur Folge

Um weitere Hinweise auf die Funktion von DJ und DJ-Like zu erhalten, wurden die Fusionsproteine Myc-DJ und Myc-DJ-Like ektopisch in Augenimaginalscheiben exprimiert. Mit Hilfe des UAS/GAL4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) ist es möglich Gene spezifisch in den Augenimaginalscheiben zu exprimieren und die Effekte der Überexpression auf die Augenentwicklung zu untersuchen. Das Komplexauge einer adulten *Drosophila* enthält ca. 750 hexagonale Ommatidien. Diese bestehen wiederum aus jeweils 20 Zellen, wobei 8 Photorezeptoren für die Verarbeitung der visuellen Information verantwortlich sind. Bei den übrigen 12 akzessorischen Zellen eines Ommatidiums handelt es sich um Pigment-, Kristallkegel- und Borstenzellen. Interommatidialzellen bilden eine Zellschicht zwischen den Ommatidien, wodurch definierte Abstände entstehen. Aufgrund der regelmäßigen Anordnung der Ommatidien können Störungen der „Gitterstruktur“ des Komplexauges, die aus der ektopischen Überexpression resultieren, einfach erkannt werden. Zudem sind Fliegen ohne Komplexaugen bzw. mit gestörter Augenstruktur unter Laborbedingungen lebensfähig. Zur Fehlexpression der Fusionsproteine wurde der Treiberstamm GMR (glass multiple reporter)-GAL4 (Freeman, 1996) verwendet. Diese Fliegenlinie exprimiert GAL4 während des 2. und 3. Larvenstadiums in der Augenimaginalscheibe in allen Zellen posterior zur morphogenetischen Furche. Die Insertion des GAL4-Transgens ist bei den Fliegen dieses Stammes auf dem 2. Chromosom lokalisiert. *Drosophilae* dieser Linie, die homozygot für das GAL4-Transgen waren, wurden mit Tieren der Linien *UAS-c-myc dj* und *UAS-c-myc dj-like* gekreuzt, die ebenfalls homozygot für die jeweiligen P-Element-Integrationen waren und diese auf dem 3. Chromosom trugen. Tiere der ersten Filialgeneration enthielten folglich sowohl eine Kopie des Transgens, das für den GAL4-Transaktivator kodierte, als auch eine Kopie der *UAS-c-myc-dj*, bzw. *UAS-c-myc-dj-like* Konstrukte.

Augen von *UAS-c-myc-dj*, bzw. *UAS-c-myc-dj-like* Fliegen zeigten vor den Kreuzungen keinen Phänotyp. Tiere, die eine Kopie des GMR-GAL4-Konstrukts

trugen, entwickelten ebenfalls keinen Phänotyp (Abb. 5.30 C). Ektopische Expression von Myc-DJ (Abb. 5.30 A) und Myc-DJ-Like (Abb. 5.30 B) in Augenimaginalscheiben unter Verwendung einer Kopie des GMR-GAL4-Treibers hatte den Verlust von Ommatidien insbesondere im posterioren Bereich zur Folge. Dadurch war die Größe des Facettenauges reduziert. Die in der Wildtypsituation geordnete gitterähnliche Struktur der Ommatidien erschien oft unregelmässig (Abb. 5.30 A). Im posterioren Bereich mehrerer Komplexaugen waren im Gegensatz zum Wildtypauge verdickte Borsten zu beobachten (Abb. 5.30 B, Pfeil). Die zwischen den Ommatidien sitzenden Borsten schienen sowohl nach ektopischer Myc-DJ, als auch nach ektopischer Myc DJ-Like Expression gleichmässig angeordneten zu sein.

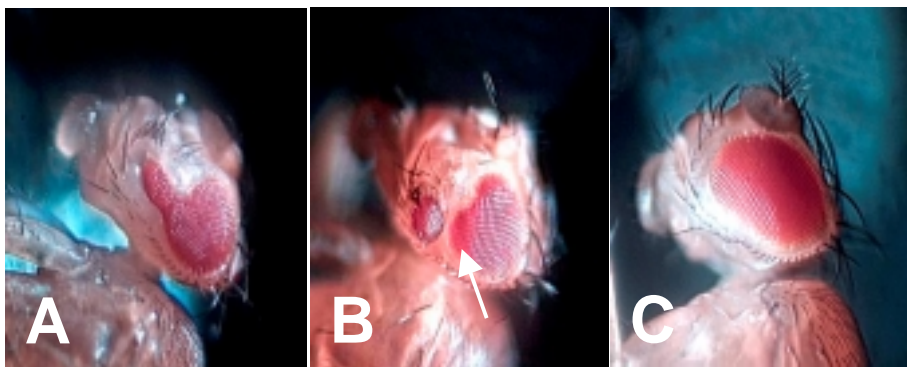


Abb. 5.30 Mikroskopische Analyse von Facettenaugen mit Myc-DJ bzw. Myc-DJ-Like Expression

(A) Die Aufnahme zeigt ein Komplexauge nach ektopischer Expression von Myc-DJ in den Augenimaginalscheiben. Die Anordnung der Ommatidien erscheint unregelmässig. Aufgrund des Verlustes von Ommatidien ist die Größe des Facettenauges reduziert. (B) Die Abbildung zeigt ein Facettenauge nach ektopischer Expression von Myc-DJ-Like. Auch hier ist die Größe des Auges aufgrund des Verlustes von Ommatidien reduziert. Im posterioren Bereich sind verdickte Borsten zu sehen (Pfeil). (C) Die Abbildung stellt zum Vergleich das Komplexauge eines Tieres, das eine Kopie des GMR-GAL4-Konstrukts trägt, dar (Wildtypkontrolle). Die Oberfläche des Auges erscheint gleichmässig, aufgrund der gitterähnlichen Anordnung der Ommatidien.

5.16 Vom Genotyp zum Phänotyp über Mutagenese und „Gene silencing“

Um die Funktion eines Gens zu verstehen, von dem die Sequenz und die Genomposition bekannt sind, ist die Anwendung von Methoden notwendig, welche die Genfunktion zerstören und auf diesem Weg zum morphologischen Phänotyp des mutierten Gens führen. Dieser Prozess wird als „reverse genetics“ bezeichnet. Im Gegensatz hierzu führt der konventionelle Weg vom mutanten Phänotyp zur Entdeckung des Gens und wird als „forward genetics“ bezeichnet. Methoden, die zum mutanten Phänotyp eines Gens führen, können in zwei Klassen eingeteilt

werden. Zur ersten Klasse gehören chemische- und P-Element Mutagenesen, die indirekt zum gesuchten Phänotyp führen, da die Mutationen hierbei nicht gezielt in dem zu untersuchenden Gen gesetzt werden können, sondern ungerichtet geschehen. Die erzeugten Mutationen müssen anschließend über genetische Testverfahren dem zu untersuchenden Gen zugeordnet werden. In der zweiten Klasse werden Methoden zusammengefasst durch welche die Funktion des relevanten Gens spezifisch verändert oder zerstört werden kann. Hierzu gehören neuere Technologien wie die homologe Rekombination (Rong und Golic, 2000; Dickson 2000) und RNA Interferenz (Fire *et al.*, 1998). Die Methode über homologe Rekombination gezielte Genmodifikation durchzuführen ist für *Drosophila* noch relativ neu. Bisher wurden nur wenige Gene von *Drosophila* über homologe Rekombination mutagenisiert und die generelle Anwendbarkeit der Methode muß noch bewiesen werden (Rong und Golic, 2001; Rong *et al.*, 2002).

5.16.1 EMS-Mutagenese als funktionsanalytischer Ansatz der Gene *don juan*, *dj-like* und *min*

Die Anwendung chemischer Mutagene ist ein weit verbreitetes Mittel zur Induzierung von Mutationen. Ethylmethansulfonat (EMS) wurde 1968 von Lewis und Bacher vorgestellt und ist seitdem das bei *Drosophila* am häufigsten verwendete chemische Mutagen. Der Vorteil von EMS ist die relativ hohe Mutationsrate und geringe Toxizität für die Fliegen. EMS ist ein alkylierendes Agens, durch dessen Wirkung vorwiegend G/C zu A/T Transitionen entstehen, seltener kleine Deletionen (Ashburner, 1989). Selten können auch Chromosomen-Abberationen entstehen (Ashburner *et al.*, 1982). Die meisten G/C Basenpaare sind folglich potentielle Ziele der EMS-Mutagenese, weshalb die Wahrscheinlichkeit für eine im gewünschten Gen induzierte Mutation von der Größe des selben abhängig ist.

Die Proteine Don Juan, DJ-Like und Min besitzen neben dem Kernlokalisierungssignal ein Mitochondrienimport Signal. Da EMS vorwiegend Punktmutationen erzeugt, könnten durch unabhängige Mutationen in verschiedenen Proteindomänen verschiedene Allele der Gene erzeugt werden und dadurch die Proteindomänen analytisch voneinander getrennt werden. Deshalb erscheint die Anwendung des chemischen Mutagens EMS sinnvoll für eine umfassende Funktionsanalyse der drei Proteine. Voraussetzung zur Durchführung einer EMS-Mutagenese ist die Festlegung eines hypothetischen Phänotyps der Gene *don juan*, *dj-like* und *min*. Da das Expressionsmuster der Gene sich auf männliche Keimzellen beschränkt, kann sowohl eine spezifische als auch essentielle Funktion der Proteine während der Spermio-genese postuliert werden. Somit wird erwartet, dass Mutationen

der Gene männliche Sterilität hervorrufen. Auf diesen Phänotyp kann mit Hilfe von Sterilitätstests spezifisch selektiert werden.

5.16.1.1 Die Fliegenlinien 2009 und 1833 sind defizient für die Gene *don juan*, *dj-like* und *min*

Zur Durchführung einer EMS-Mutagenese ist ein *don juan*-, *dj-like*- und *min*-defizienter Fliegenstamm notwendig, gegen den alle erzeugten EMS-Stämme auf männliche Sterilität getestet werden müssen. Das *don juan* Gen ist auf dem rechten Arm des 3. Chromosoms an Position 84B2 lokalisiert. Die Genloci *dj-like* und *min* liegen direkt im genomischen Bereich 3' von *don juan*. Über das "Bloomington Stock Keeping Center" sind defiziente Fliegenstämme erhältlich. Die ungefähren Bruchpunkte der durch EMS- oder Röntgenstrahlenmutagenese erzeugten Defizienzen sind bekannt. Es wurden zwei defiziente Fliegenstämme ausgewählt, deren angegebene Bruchpunkte auf dem 3. Chromosom darauf schließen ließen, dass die jeweilige Defizienz die drei Gene einschloss. Da in den ausgewählten defizienten Stämmen mehrere zum Teil essentielle Gene deletiert waren, waren sie embryonal letal und mussten aus diesem Grund über einem Balancer-Chromosom gehalten werden. Linie Nummer 1833 (Df(3R)*Antp7, red, e/TM3, Sb*) war defizient für den genomischen Bereich 84B1 bis 84D1-4) und Linie Nummer 2009 (Df(3R) *Scx4, Scr, red, e/TM3 Sb*) war defizient für den genomischen Bereich 84B1 bis 84D1-2. Um im Vorfeld zu testen, ob die Deletionen der Fliegenlinien *dj*, *dj-like* und *min* einschlossen, wurden Allelietests mit Fliegen der Linie BL2441 durchgeführt, die das rezessive *rotund* Allel *rn^{roe-2}* trugen, sowie mit Fliegen der Linie BL2572, die das rezessive Allel *I(3)84Bc¹* des Gens *I(3)84Bc* trugen (Lewis *et al.*, 1980; Cavener *et al.*, 1986). Das *rotund* Gen ist 3' von *dj*, *dj-like* und *min* lokalisiert an Position 84D, der Letalfaktor *I(3)84Bc* 3' von *dj*, *dj-like* und *min* an Position 84B2 (Abb. 5.31). Fliegen des Stammes BL2441 wurden gegen die defizienten Stämme gekreuzt. Von der F1-Generation wurden Fliegen selektiert, die nicht den Marker *Stubbled* des Balancer Chromosoms trugen. Diese Fliegen der F1-Generation besaßen bezüglich des 3. Chromosoms ein *rotund*-Allel tragendes Chromosom gegenüber einem defizienten Chromosom. Fehlte das *rotund*-Gen in dem defizienten Chromosom, so sollte der Phänotyp der rezessiven Mutation in diesen Fliegen zum Tragen kommen. Die Fliegen würden in diesem Fall einen „rauh“ Augenphänotyp zeigen, der auf einer irregulären Anordnung der Facetten beruht. Ebenso wurden Fliegen der Linie BL2572 gegen die defizienten Stämme gekreuzt. Auch hier sollte in *Drosophila* der F1-Generation, die nicht den *Stubbled*-Marker trugen und somit das *I(3)84Bc*-Allel tragende Chromosom über dem defizienten Chromosom besaßen, die rezessive Mutation zum Tragen kommen, wenn das Gen *I(3)84Bc* in dem defizienten

Chromosom deletiert war. In diesem Fall hätte die rezessive Mutation des Gens *l(3)84Bc* embryonale Letalität zur Folge. Die Auswertung der Allelietests zeigte, dass sowohl das Gen *rotund* als auch das Gen *l(3)84Bc* in den defizienten Chromosomen der beiden Fliegenlinien deletiert waren, sodass es wahrscheinlich war, dass *dj*, *dj-like* und *min* deletiert waren. Die Deletion des *don juan* Genlokus in den defizienten Chromosomen der zwei Stämme sollte nun über *in situ* Hybridisierung an Polytänchromosomen mit einer Digoxigenin-markierten *dj*-cDNA-Sonde bestätigt werden. Polytänchromosomen aus larvalen Speicheldrüsen sind riesige Chromosomen, die in vielen Dipteren zu finden sind. Die enorme Größe ist auf wiederholte DNA-Replikationsrunden ohne Zellteilung (Endoreplikation) zurückzuführen. Die potentiell für das *don juan*-Gen defizienten Fliegenlinien wurden mit Fliegen gekreuzt, die den dominanten Marker *Stubbled* (*Sb*) über dem Balancer-Chromosom TM3, *Act-GFP Ser* trugen (Linie: BL4534) (Kreuzungsschema Abb. 5.32). In dem Balancerchromosom war das Konstrukt *P(Act-GFP)* integriert (Reichhart and Ferrandon, 1998; Freilich *et al.*, 1999; Peyre and Aigaki, 1999). Fliegen, die dieses Konstrukt in ihrem Genom trugen, exprimierten das grün fluoreszierende Protein GFP-(S65T) (Chalfie *et al.*, 1994; Heim *et al.*, 1995) unter der Kontrolle des *Actin 5C*-Promotors. Aus der F1-Generation wurden Fliegen selektiert, die das jeweils defiziente Chromosom über dem Balancer-Chromosom TM3, *Act-GFP Ser* trugen. Diese Fliegen zeigten den Phänotyp des dominanten Flügel-Markers *Serrate* (*Ser*) und konnten aufgrunddessen leicht an ihren „gezackten“ Flügeln erkannt werden. Durch eine Kreuzung dieser F1-Fliegen mit wildtypischen *white*⁻-Fliegen konnten in der folgenden F2-Generation Larven die den Balancer TM3, *Act-GFP Ser* über einem wildtypischen Chromosom trugen, von Larven differenziert werden, welche das jeweils defiziente Chromosom der Linien 2009 bzw. 1833 über einem wildtypischen Chromosom trugen. Aufgrund ihrer GFP-Fluoreszenz im larvalen Mitteldarm konnten Larven, die das Balancer Chromosom TM3, *Act-GFP Ser* trugen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Binokulars ausgesondert werden und die verbleibenden Larven, die das jeweils defiziente Chromosom trugen und keine Fluoreszenz zeigten, zur Anfertigung von Polytän-Chromosomen-Präparaten für die *in situ* Hybridisierung selektioniert werden.

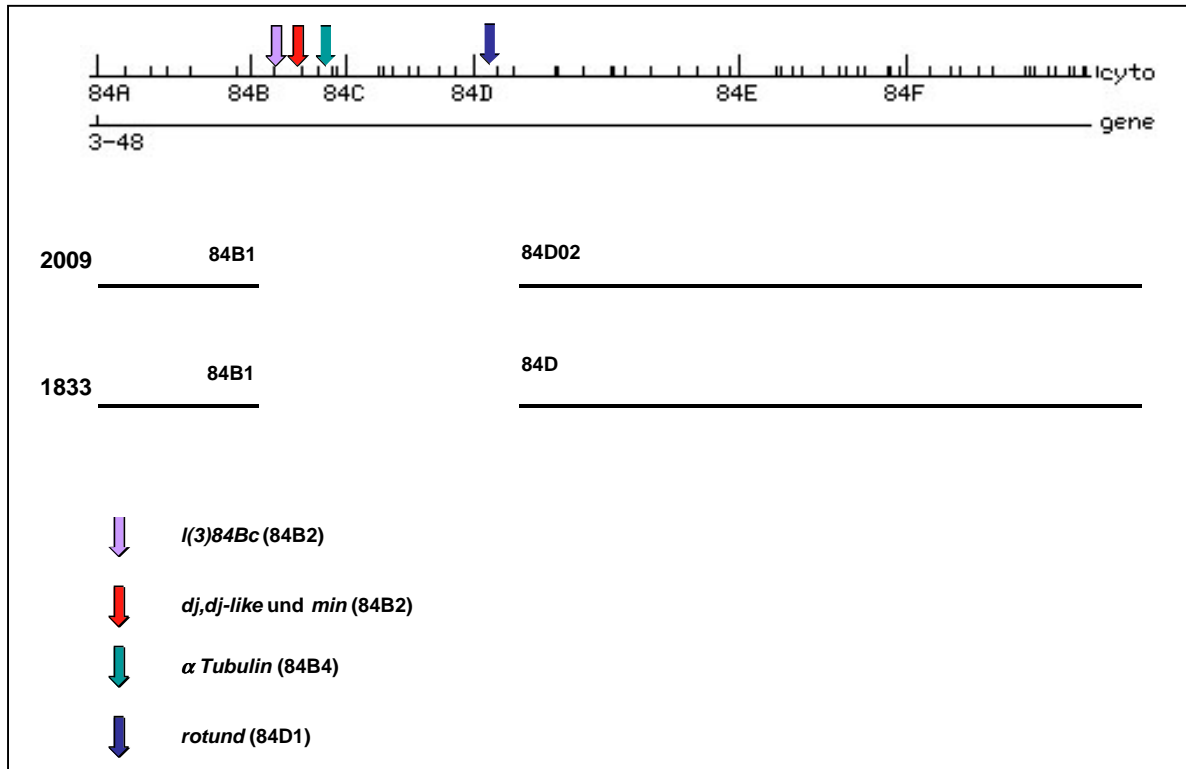


Abb. 5.31. Die Graphik zeigt eine cytogenetische Karte der Region 84 des dritten Chromosoms. Die Lokalisation der Gene *dj*, *dj-like*, *min*, *rotund*, α -*tubulin* und des Letalfaktors *l(3)84Bc* ist eingezeichnet. Die ungefähren Bruchpunkte der Defizienzen der Fliegenstämme 2009 und 1833 sind angegeben. Die defiziente Region ist durch die Unterbrechung der Linie gekennzeichnet.

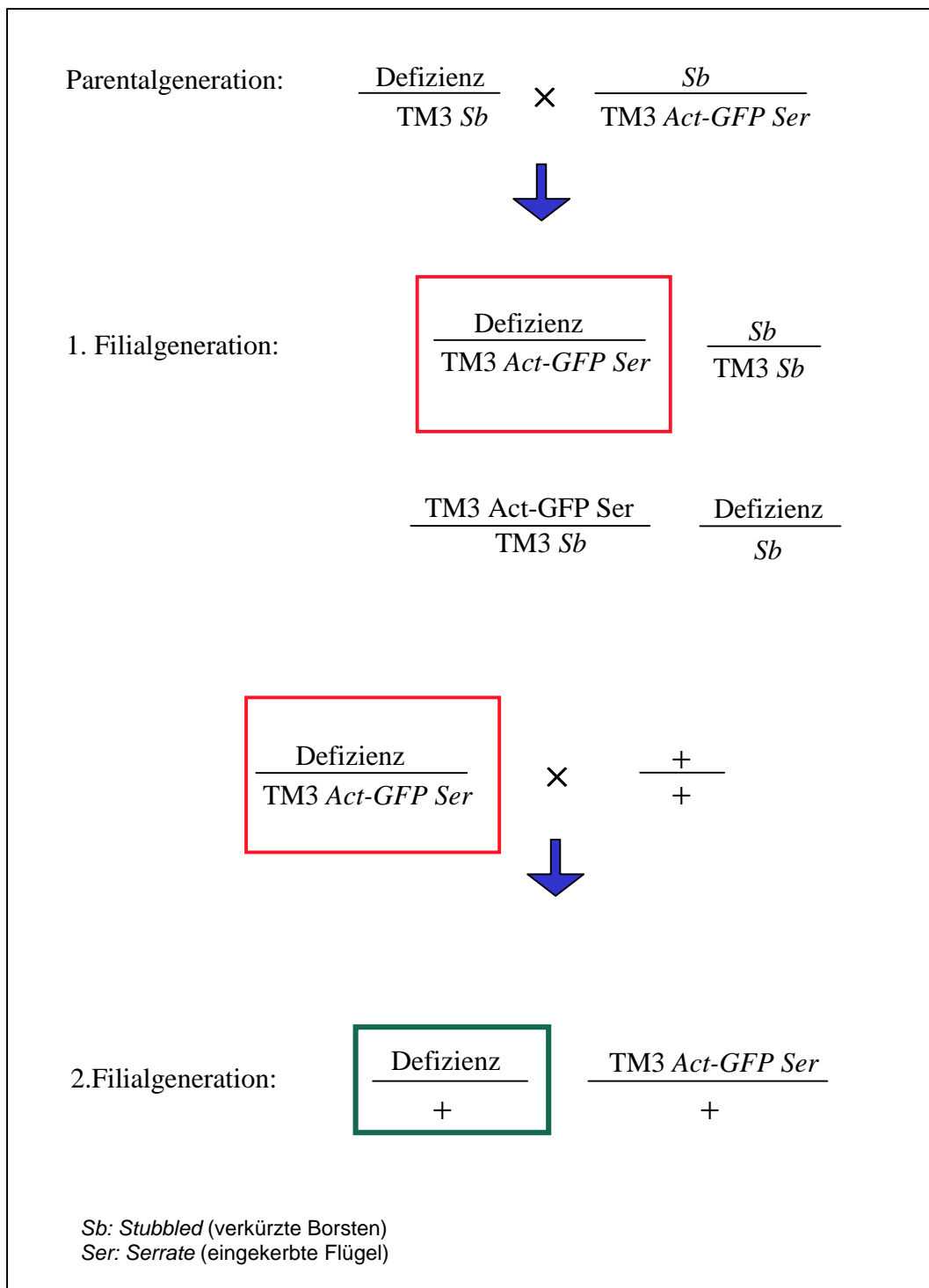


Abb. 5.32. Kreuzungsschema: Larven, die das jeweils defiziente Chromosom über einem Wildtyp-Chromosom trugen, wurden für die *in situ* Hybridisierung an Polytäanchrosomen selektioniert.

Die Defizienzen der Linien 1833 und 2009 sind auf dem 3. Chromosom lokalisiert und werden über dem Balancer TM3, Sb gehalten. Fliegen der Linie BL4534 tragen den Marker Sb über dem Balancerchromosom TM3, Act-GFP, Ser. In dem Kreuzungsschema sind nur die 3. Chromosomen dargestellt. Fliegen der defizienten Linien wurden mit Fliegen der Linie BL4534 gekreuzt. *Drosophila*e, die das defiziente Chromosom über dem Balancer-Chromosom trugen, wurden aus der F1-Generation selektioniert und mit Wildtyp-Fliegen gekreuzt. In der zweiten Filialgeneration wurden Larven ausgewählt, die das defiziente Chromosom über einem Wildtyp-Chromosom trugen.

Im Falle einer Deletion des *don juan* Gens im defizienten Chromosom sollte nach durchgeführter *in situ* Hybridisierung nur ein die halbe Breite des Riesenchromosoms bedeckendes Signal detektierbar sein. Dieses Signal würde dem *don juan* Gen des Wildtyp-Chromosoms entsprechen. Zur Kontrolle wurde zusammen mit der *don juan* Sonde eine Digoxigenin markierte $\beta 2$ -*tubulin* Sonde für die Hybridisierung eingesetzt. $\beta 2$ -*tubulin* ist auf dem 3. Chromosom an Position 85D lokalisiert. Am Genlokalisationsort von $\beta 2$ -*tubulin* sollte nach Hybridisierung ein über die gesamte Breite des Chromosoms verlaufendes Signal detektierbar sein.

Nach *in situ* Hybridisierung an Polytäanchromosomen von Larven, die jeweils die defizienten Chromosomen der Stämme 2009 und 1833 über einem Wildtypchromosom trugen konnte in allen beiden Fällen am chromosomalen *don juan* Lokalisationsort nur ein über die Hälfte der Chromosomenbreite reichendes Signal detektiert werden (Abb. 5.33. Pfeile), während der $\beta 2$ -*tubulin*-Genloкус ein über die gesamte Chromosomenbreite verlaufendes Signal aufwies (Abb. 5.33.; Pfeilköpfe). Folglich ist das *don juan* Gen in den defizienten Chromosomen der zwei Linien deletiert.

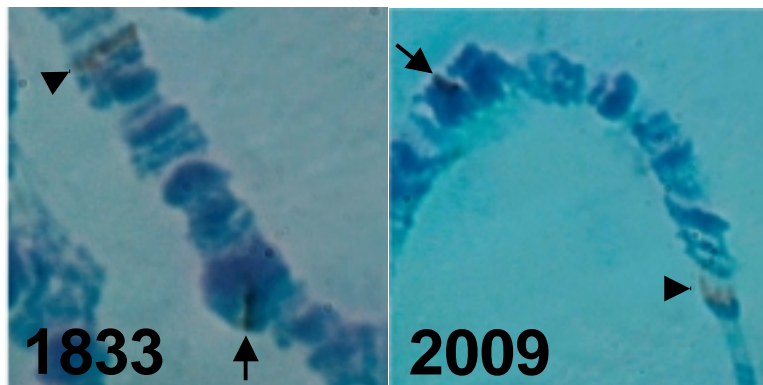


Abb. 5.33 *in situ* Hybridisierung an Polytäanchromosomen von Larven, die das defiziente Chromosom der Linien 2009 und 1833 über einem wildtypischen Chromosom trugen.

In den Abbildungen ist ein Abschnitt des 3. Chromosoms gezeigt. In dem defizienten Chromosom beider Linien ist am *don juan*-Lokus nur ein über die Hälfte des Chromosoms

verlaufendes Signal detektierbar (Pfeile), während am Lokalisationsort des $\beta 2$ -*tubulin* Gens ein über die gesamte Breite des Chromosoms reichendes Signal nachweisbar ist (Pfeilköpfe). Folglich ist das *don juan* Gen auf dem jeweils defizienten Chromosom der Fliegenlinien 2009 und 1833 deletiert.

5.16.1.2 Zur Selektion zu Sterilität führender Mutationen, die potentiell die Gene *don juan*, *don juan-like* oder *min* betreffen, wird die *dj*-defiziente Linie 1833 eingesetzt

Das *don juan* Gen ist in den defizienten Chromosomen der Linien 2009 und 1833 deletiert. Nach Kreuzung gegen diese Stämme können somit EMS-mutagenisierte Männchen in transheterozygoter Situation mit den *don juan* umfassenden Defizienzen auf Allelie getestet werden. Hierbei dient männliche Sterilität als Selektionsmarker. Allelische EMS-Stämme gelten als potentielle *dj*-Mutanten und

müssen anschließend molekularbiologisch auf Mutationen im *don juan* Gen untersucht werden. Der Stamm 1833 wurde für die Selektion potentieller *don juan*, *dj-like* und *min* Mutationen eingesetzt. Aufgrund der Kartierung der Defizienz durch die positiven Allelietests mit den Linien BL2441 und BL2572, die ein rezessives *rotund*-Allel bzw. ein rezessives Allel des Gens *I(3)84Bc* trugen, können 40 weitere Gene benannt werden, die ebenfalls in der Defizienz lokalisiert sind. Ein Allel des in der Defizienz lokalisierten Gens *α -tubulin* erzeugt männliche Sterilität. Ebenso existiert ein zu Sterilität in Weibchen und Männchen führendes *rotund*-Allel. Um abschätzen zu können, wie viele sterile Linien nach durchgeführter Mutagenese zu erwarten sind, wurde ermittelt wieviele der in der Defizienz lokalisierten Gene im Testis exprimiert werden. Hierbei stellte sich heraus, dass von 14 Genen ESTs aus adulten Testes existieren. Von 5 dieser Gene existieren ausschließlich ESTs aus adulten Testes. Hierzu gehören auch *don juan*, *dj-like* und *min*.

5.16.1.3 EMS-Mutagenese zur Erzeugung steriler *don juan*-, *don juan-like*- und *min*-Mutanten

Für die Mutagenisierung mit EMS wurde ein Fliegenstamm ausgewählt der verschiedene rezessive Marker über das zu mutagenisierende Chromosom verteilt trug. Durch die rezessiven Marker ist es möglich nach vielen Kreuzungsschritten zu kontrollieren, ob noch mit einem mutagenisierten Chromosom gearbeitet wird. Außerdem ermöglichen die Marker eine Entkopplung des mutierten Lokus vom übrigen Chromosom durch meiotische Rekombination. Der für die Mutagenese gewählte Fliegenstamm war homozygot für die rezessiven Merkmale *roughoid* (*ru*); *hairy* (*h*); *scarlet* (*st*) und *rosy* (*ry*). Der Multimarkerstamm wurde zunächst isogenisiert. Hierbei wird ein neuer Stamm ausgehend von einem einzigen Chromosom etabliert. Durch die Isogenisierung wurden rezessiv letale oder sterile Mutationen, die sich spontan im Laufe der Zeit ereignen und in der heterozygoten Situation oft auftreten könnten, ausgeschlossen. Das Kreuzungsschema ist in Abb. 5.34 dargestellt.

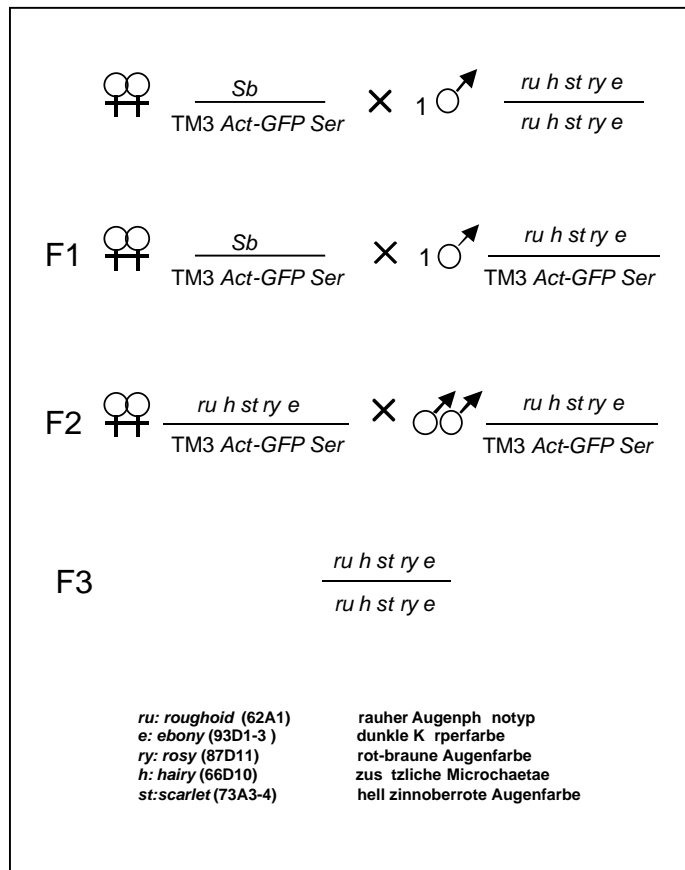


Abb. 5.34 Isogenisierung des zu mutagenisierenden Chromosoms

Durch Vervielfältigung eines Chromosoms können rezessive letale oder sterile Spontanmutationen, die innerhalb der Population zu einem hohen Prozentsatz akkumuliert sein können, ausgeschlossen werden. Männliche Fliegen des Multimarkerstammes wurden mit virginellen Weibchen des Stammes BL4534 gekreuzt. Diese trugen den dominanten Marker *Stubbled* über dem Balancerchromosom TM3, *Act-GFP Ser*. Aus der F1-Generation wurde ein Männchen, welches das Multimarkerchromosom über dem Balancerchromosom TM3, *Act-GFP Ser* trug, ausgewählt und erneut mit Weibchen der Linie BL4534 gekreuzt. Fliegen der F2-Generation, die das Multimarkerchromosom über dem Balancerchromosom TM3 *Act-GFP Ser* trugen, wurden untereinander gekreuzt. In der F3-Generation wurden Fliegen selektiert, die homozygot für das Multimarkerchromosom waren. Mit diesen Fliegen wurde ein neuer Stamm generiert.

Eintausend männliche Fliegen dieses Stammes wurden einer EMS-Mutagenese unterworfen. Männliche postmeiotische Keimzellstadien sind sehr sensitiv für Mutagene (Vogel *et al.*, 1982). Jedes Männchen produziert eine sehr große Anzahl an Spermien. Diese sind nach Durchführung einer Mutagenese in Bezug auf die induzierten Mutationen unterschiedlich. Eine große Anzahl individueller Mutationen kann somit durch Kreuzung mit mehreren Weibchen propagiert werden. Je 30 der durch Fütterung mit EMS mutagenisierten Männchen wurden anschließend mit 100 virginellen Weibchen des Balancerstammes *Sb/ TM3, Act-GFP Ser* (BL4534) gekreuzt. Aus der F1-Generation wurden 1950 Männchen ausgewählt, die ein mutagenisiertes Chromosom über dem Balancerchromosom TM3, *Act-GFP Ser* trugen. Jedes dieser Männchen repräsentierte ein individuell mutagenisiertes drittes Chromosom und eine separate Linie. Jedes dieser Männchen wurde mit drei virginellen Weibchen der *dj*-defizienten Linie 1833 gekreuzt. Waren Fliegen der F3-Generation, die das mutagenisierte Chromosom über dem defizienten Chromosom trugen, lebensfähig, so wurde mit jeweils 6 männlichen Fliegen ein Sterilitätstest durchgeführt. Hierbei wird jeweils ein Männchen mit 3 virginellen *white*⁻ Weibchen gekreuzt. Fliegen der F3-Generation, die das mutagenisierte Chromosom über dem Balancerchromosom TM3, *Act-GFP Ser* trugen, wurden untereinander gekreuzt um einen stabilen Stamm zu generieren. Das Kreuzungsschema ist in Abb. 5.35 dargestellt.

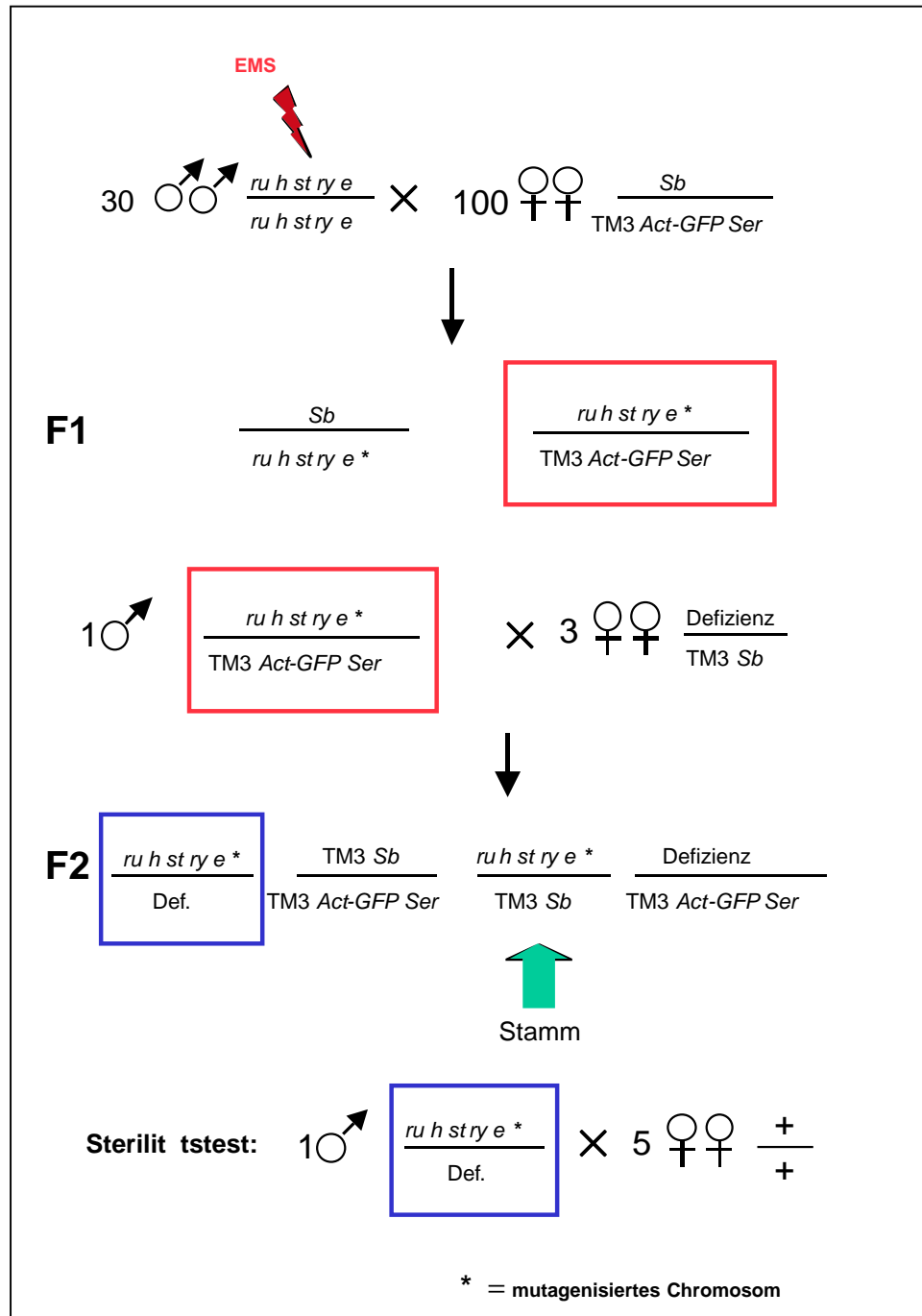


Abb. 5.35 Mutagenisierung homozygoter *ru h st ry e*-Männchen und Selektion auf sterile Mutationen im Bereich 84C3-4 bis 84D1-4.

Je 30 der 1000 durch Fütterung mit EMS mutagenisierten Männchen wurden mit 100 Weibchen des Balancerstammes BL4534 gekreuzt. Männchen der F1-Generation, die das mutagenisierte Chromosom über dem Balancer trugen, wurden mit Weibchen des Defizienz-Stammes 1833 gekreuzt. Männchen der F3-Generation, die das mutagenisierte Chromosom über dem defizienten Chromosom trugen, wurden einem Sterilitätstest unterworfen.

Insgesamt wiesen 15 Männchen der F1-Generation letale Mutationen in dem Multimarkerchromosom auf. Nach Kreuzung dieser Männchen mit Weibchen der Linie 1833 traten in der F3-Generation keine Fliegen auf, die das mutagenisierte Chromosom über dem defizienten Chromosom trugen. In den Chromosomen dieser

Männchen war es folglich zu einer Mutation in Genen gekommen, die für die Vitalität essentiell waren.

Neben einem sterilen Stamm (I 54) konnte ein semi-steriler Stamm (B 99) etabliert werden.

Bei allen Sterilitätstests, die mit jeweils einem Männchen, welches das mutagenisierte Chromosom der Linie I 54 über dem defizienten Chromosom trug, sowie jeweils drei Wildtyp-Weibchen durchgeführt wurden, traten keine Nachkommen auf.

Männchen, die ein mutagenisiertes Chromosom der Linie B 99 über dem defizienten Chromosom trugen, waren vermindert fertil. Bei drei Testkreuzungen, die mit diesen Männchen angesetzt wurden, traten keine Nachkommen auf. Bei drei weiteren, positiven Fertilitätstests lag die Anzahl der Nachkommen mit 17 Individuen im ersten Test, 26 Individuen im zweiten Test und 31 Individuen im dritten Test, weit unter der normalen Nachkommenzahl. Die Zahl der F1-Nachkommen eines Kreuzungsansatzes mit einem Männchen und drei Weibchen beträgt normalerweise 200-300 Individuen.

5.16.1.4 Die mit EMS mutagenisierten Fliegenlinien I 54 und B 99 sind keine *don juan* bzw. *min* Mutanten

Von den in der Defizienz lokalisierten Genen *rotund* und *α -tubulin84B* ist bekannt, dass Mutationen zu männlicher Sterilität führen können. Allele dieser Gene, die homozygot oder transheteroallelisch männliche Sterilität verursachen, wurden mit den mutagenisierten Chromosomen der Linien I54 und B99 auf Allelie getestet. Hierzu wurden zunächst Fliegen der Linie BL2237, welche das *α -tubulin*-Allel *nc33* (Hays *et al.*, 1989; Hutchens *et al.*, 1997) über einem Balancer trugen, mit Fliegen der Linie I 54 bzw B 99 gekreuzt. Männliche Nachkommen der Kreuzung, die das *α -tubulin*-Allel *nc33* über dem jeweils mutagenisierten Chromosom trugen, wurden auf Sterilität getestet. Da keine männliche Sterilität festgestellt wurde, konnte eine Allelie der mutagenisierten Chromosomen mit *nc33* ausgeschlossen werden. Ebenso wurden männliche Fliegen, die das *rotund*-Allel *rn5* in der transheterozygoten Situation über dem mutagenisierten Chromosom der Linie I 54 bzw. B 99 trugen, auf Sterilität getestet. Auch hier wurde Sterilität und somit Allelie mit *rn5* ausgeschlossen. Die Linien I 54 und B 99 wurden auch untereinander einem Allelietest unterzogen. Der Test zeigte, dass die Linien nicht allelisch sind. Es folgte eine sequenzanalytische Untersuchung der Linien auf kleine Deletionen oder Punktmutationen innerhalb der Gene *don juan* und *min*. Hierzu wurde genomische DNA aus homozygot mutanten Fliegen isoliert. Zur Amplifikation der Genbereiche

von *don juan* und *min* wurde eine Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität („proof reading polymerase“) benutzt. Diese zeichnet sich durch hohe Genauigkeit in der DNA-Synthese aus. Jeweils drei unabhängig generierte Amplifikationsprodukte wurden sequenziert, um sowohl Sequenzierfehler, als auch Fehler der Amplifikationsreaktion auszuschließen. Abweichungen von der von Adams *et al.* (2000) veröffentlichten Genom Sequenz von *Drosophila melanogaster*, die in den PCR-Produkten detektiert wurden, stellten potentiell sterilitätsverursachende Mutationen dar. Um zu überprüfen, ob diese Sequenzabweichungen bereits in dem für die Mutagenese eingesetzten isogenisierten Stamm vorhanden waren und somit nicht ursächlich für die Sterilität waren, wurde zu Kontrolle genomische DNA aus Fliegen des isogenisierten Stammes, der für die EMS-Mutagenese verwendet wurde, isoliert und für PCR-Reaktionen zur Amplifikation der *don juan*- und *min*-Genbereiche eingesetzt. Es wurden ebenfalls drei unabhängig amplifizierte PCR-Produkte sequenziert, um Fehler auszuschließen. Alle detektierten Sequenzabweichungen konnten in den Sequenzen des isogenisierten Stammes ebenfalls nachgewiesen werden und sind somit unabhängig von dem sterilen Phänotyp. Folglich ist in den EMS-mutagenisierten Linien I 54 und B 99 weder das Gen *don juan* noch *min* mutiert. Eine Mutation in dem Gen *dj-like* konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Rathke 2003).

5.16.2 RNA Interferenz als Mittel zur experimentellen Manipulation der Genexpression

Das Phänomen der RNA Interferenz wurde zuerst bei dem Nematoden *C. elegans* entdeckt. Injektion doppelsträngiger RNA resultierte in einer Sequenz-spezifischen Ausschaltung der Genfunktion (Fire *et al.*, 1998). RNA Interferenz ist eine wirksame Methode zur spezifischen Ausschaltung von Zielgenen auf post-transkriptionalem Level.

Diese spezifische Ausschaltung der Genfunktion kann in verschiedenen Organismen durch Einführung homologer doppelsträngiger DNA (dsRNA) erreicht werden. Die eingeführte doppelsträngige RNA vermittelt den Abbau sequenzhomologer RNA. Der Mechanismus, durch den dieser Abbau erreicht wird, ist bis heute weitgehend unbekannt. Doppelsträngige RNA kann auf verschiedene Weise in den Organismus eingeführt werden, wie zum Beispiel durch Injektion. Injektion spezifischer Doppelstrang-RNA in den frühen *Drosophila* Embryo resultiert in Interferenz während der gesamten embryonalen Entwicklung. Im adulten Stadium scheint die RNA Interferenz stark reduziert (Kennerdell und Carthew, 1998; Misquitta und Paterson, 1999), so dass die Interferenz transienter Natur ist und nicht vererbbar. Eine alternative Methode zur Einführung doppelsträngiger RNA in *Drosophila* ist die

Transkription eines im Genom integrierten Konstruktes, das aus zwei invertierten identischen Sequenzen (inverted repeats) besteht. Zur Herstellung eines solchen Konstruktes wurde das Konstrukt *β2-tubulin-dj* mit dem Restriktionsenzym *Xba*I geschnitten. Eine Schnittstelle für das Enzym *Xba*I befindet sich auf das ATG folgend nach 303 bp in der *don juan* cDNA, eine andere direkt hinter der *don juan*-cDNA. Somit wurden durch die Restriktion die letzten 437 bp der cDNA entfernt. Ein als Spacer dienendes Fragment des *eGFP*-Gens wurde über eine PCR mit den Primern „GFP sense“ und „GFP antisense“ amplifiziert. Für die Amplifikation dieses 330 bp langen *eGFP*-Fragmentes wurde das Plasmid pGreen Pelican, welches den vollständigen 720 bp umfassenden Leserahmen von *eGFP* enthält als Matrizen Template benutzt (Barolo *et al.*, 2000). Unter Verwendung der artifiziellen Schnittstellen *Spe*I und *Xba*I, die in Primersequenzen enthalten waren, konnte das *eGFP*-Fragment in das mit *Xba*I geöffnete Konstrukt *β2-tubulin-dj* eingefügt werden. Die korrekte Orientierung des Spacers in dem nun als *β2-tubulin-dj-GFP* benannten Konstrukt wurde über Restriktion getestet. Anschließend wurden die ersten 303 bp der *don juan*-cDNA mit Primern amplifiziert, die artifizielle *Xba*I Schnittstellen enthielten. Als Matrizen-DNA wurde das Konstrukt *β2-tubulin-dj* verwendet. Mit Hilfe der *Xba*I Schnittstellen wurde das cDNA-Fragment in das mit *Xba*I geöffnete Konstrukt *β2-tubulin-dj-GFP* inseriert. Die Orientierung des *don juan* Fragments in dem erhaltenen Konstrukt *β2-tubulin-dj-GFP-dj* (Abb. 5.36) wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Verkürzung des 5' Bereiches der im Konstrukt verwendeten *don juan*-cDNA sollte garantieren, dass bei der Expression kein vollständiges Transkript bzw. funktionsfähiges Protein entsteht.

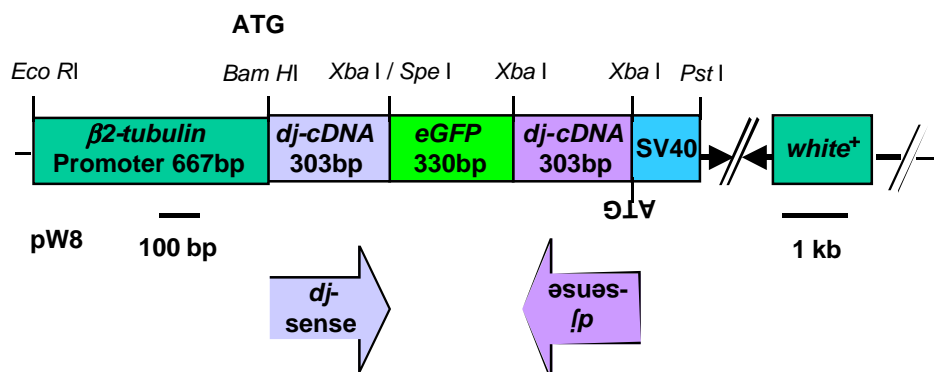


Abb 5.36 Schematische Darstellung des Konstruktes *β2-tubulin-dj-GFP-dj*

das Konstrukt enthält als invertierte Sequenz, beginnend mit ATG, 303 bp der codierenden *don juan* Region. Die palindromischen Sequenzen werden durch einen 330 bp umfassenden *eGFP*-Spacer getrennt. Das Transgen wird unter der Kontrolle des *β2-tubulin*-Promotors exprimiert. Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsstellen sind angegeben.

Nach Transformation des Konstruktes wurden mehrere unabhängige transgene Fliegenlinien erhalten, in welchen das Transgen *β2-tubulin-dj-GFP-dj* auf dem 2.,

beziehungsweise auf dem 3. Chromosom lokalisiert wurde. Männliche Fliegen, die das Konstrukt im Genom integriert trugen, zeigten allerdings keine Störungen während der Spermatogenese und waren fertil. Um eine fehlende Expression des Transgens als Ursache des Ausbleibens von Entwicklungsstörungen auszuschließen, wurde zunächst getestet, ob das Konstrukt transkribiert wurde. Hierzu wurde eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt, wobei Transkripte des Transgens spezifisch detektiert und von endogenen *don juan* Transkripten unterschieden werden mußten. Um dies zu gewährleisten wurde das 330 bp große *eGFP*-Fragment als Digoxigenin markierte DNA-Sonde eingesetzt. Mit Hilfe der Sonde konnten $\beta 2$ -*tubulin-dj-GFP-dj*-Transkripte ab dem Spermatozytenstadium eindeutig, aber in geringer Menge detektiert werden (Abb 5.37 A). Eine parallel durchgeführte *in situ* Hybridisierung mit der *eGFP* DNA Sonde an Wildtyp-Testes ergab keine Färbung (Abb. 5.37 B). Das Vorfinden einer nur geringen Transkriptmenge in Testes der Linie $\beta 2$ -*tubulin-dj-GFP-dj* kann darauf zurückgeführt werden, dass die Transkripte als Doppelstrang-RNA nicht stabil sind und den eigenen Abbau sowie die Degradation der homologen endogenen Transkripte einleiten.

Mittels Kreuzungsgenetik wurde die Kopienzahl des $\beta 2$ -*tubulin-dj-GFP-dj* Transgens erhöht, sodass ein Fliegenstamm vorlag, der das Konstrukt sowohl homozygot auf dem 2., als auch auf dem 3. Chromosom trug. Auf diese Weise sollte der posttranskriptionale Silencing-Effekt erhöht werden. Auch nach Erhöhung der Gendosis konnten keine morphologischen Abnormalitäten in Testes transgener Fliegen beobachtet werden.

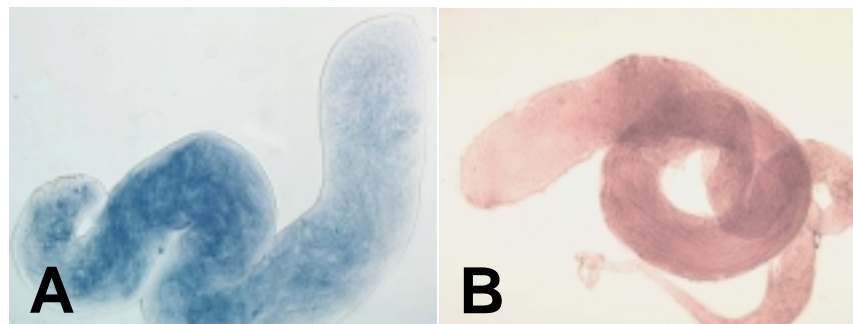


Abb. 5.37 Transkripte des Transgens $\beta 2$ *tubulin-dj-GFP-dj* sind in Testes der Linie $\beta 2$ *tubulin-dj-GFP-dj* detektierbar

(A) Unter Verwendung einer DIG-markierten *eGFP*-DNA-Sonde sind Transkripte des RNAi-Konstruktes ab dem Spermatozytenstadium in Testes transgener Fliegen nachweisbar. (B) Wildtyp Testes, an welchen parallel mit der gleichen Sonde eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt wurde, blieben ungefärbt.

Da kein Don Juan-spezifischer Antikörper mehr verfügbar war, der zum Nachweis des Don Juan Proteins in Immunofluoreszenzfärbungen eingesetzt werden konnte,

war es nicht möglich direkt zu prüfen, ob die Expression des RNAi-Konstruktes in transgenen Fliegen tatsächlich eine Reduktion oder einen Verlust des Don Juan Proteins zur Folge hatte.

Unter zu Hilfenahme eines Fliegenstammes, der das Fusionsprotein Don Juan-GFP unter der Kontrolle des *don juan* Promoters exprimiert, wurde getestet, ob die Expression des *β2-tubulin-dj-GFP-dj* Transgens tatsächlich ein Gensilencing bewirkt und somit einen Verlust oder eine deutliche Reduktion des Don Juan-GFP Proteins zur Folge hat. Nach kreuzungsgenetischer Etablierung eines Fliegenstammes, der das Transgen *don juan-GFP* homozygot auf dem 2. Chromosom trug und das RNAi Konstrukt *β2-tubulin-dj-GFP-dj* homozygot auf dem 3. Chromosom und somit beide Konstrukte zeitgleich in Spermatogenesestadien exprimiert, wurde in Testes dieses Stammes überprüft ob Fluoreszenz des Don Juan-Fusionsproteins detektierbar ist. Sollte die Transkription des RNAi Konstruktes zu effektiver posttranskriptionaler Genausschaltung führen, so sollten auch die Transkripte des Transgens *don juan-GFP* degradiert werden und folglich keine GFP-Fluoreszenz nachweisbar sein. Tatsächlich war in Testes von Fliegen, die beide Konstrukte im Genom integriert trugen, keine GFP-Fluoreszenz detektierbar (Abb. 5.38 B). Zum Vergleich sind in Abbildung 5.38 A fluoreszierende elongierte Spermatozoonen der Linie *don juan-GFP* dargestellt.

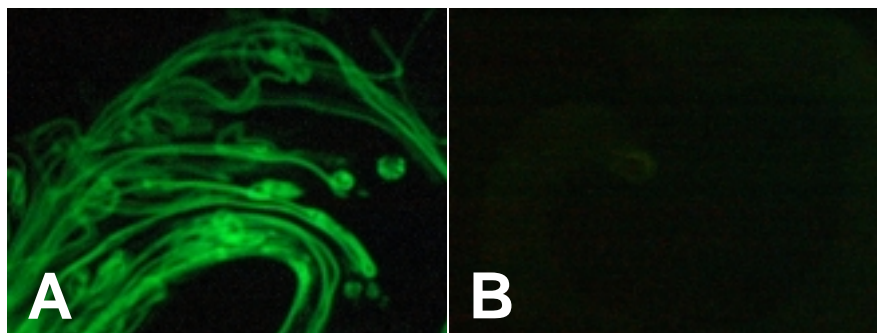


Abb. 5.38 In Testes von *Drosophila*, die die Konstrukte *don juan-GFP* und *β2-tubulin-dj-GFP-dj* im Genom integriert trugen, war keine GFP-Fluoreszenz detektierbar.

(A) Die Fluoreszenzanalyse unfixierter Testes-Quetschpräparate zeigte deutliche GFP-Fluoreszenz in elongierten Spermatozoonen der Linie *don juan-GFP*. Das Fusionsprotein dekorierte die Flagellen der gesamten Spermatozoonen-Bündel. (B) In Testes von Fliegen, die sowohl das Konstrukt *dj-GFP* als auch das Konstrukt *β2-tubulin-dj-GFP-dj* im Genom integriert trugen, war keine Fluoreszenz detektierbar.

Dieser Befund bedeutet entweder, dass DJ für die Spermatogenese nicht essentiell ist, oder durch DJ-Like funktionell kompensiert wird.

6. Diskussion

6.1 Regulation der Gene *don juan*, *don juan-like* und *min* in der Spermatogenese bei *Drosophila melanogaster*

Die Gene *don juan*, *dj-like* und *min* bilden ein Cluster auf dem 3. Chromosom und werden ausschließlich in männlichen Keimzellen und zwar in primären Spermatozyten transkribiert. Die mRNAs der drei Gene werden bis zum elongierten Spermatiden-Stadium translationsreprimiert. Gene mit ähnlichem Expressionsprofil oder einer ähnlichen Funktion sind oft in Clustern organisiert. Es wird als sehr wahrscheinlich diskutiert, dass solche Gene von denselben Transkriptionsfaktoren reguliert werden (Jakt *et al.*, 2001). Da sämtliche bisher existierende ESTs der Transkriptionseinheiten *don juan*, *dj-like* und *min* ausschließlich aus Testis-cDNA-Bibliotheken stammen, ist anzunehmen, dass die Gene ein ähnliches Expressionsprofil haben.

Sofern die Regulation der Gene über einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor erfolgt, sollten in den stromaufwärts des Transkriptionsstarts gelegenen Bereichen der Transkriptionseinheiten ähnliche cis-regulatorische Elemente vorzufinden sein. Sequenzähnlichkeiten konnten in diesen Regionen allerdings nicht gefunden werden.

Die Transkriptionseinheit *dj-like* ist 3' von *don juan* Gens lokalisiert. Bezüglich der Gen- und Proteinsequenz zeigte *dj-like* Ähnlichkeit zu *don juan*. Das, wie auch Don Juan, sehr basische DJ-Like Protein besitzt im C-terminalen Bereich zweimal hintereinander das für DJ charakteristische Hexapeptidmotiv DPCKKK. Aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Proteine ist es möglich, dass beide Gene aus einer Duplikation resultieren und somit funktionell redundant sind oder noch überlappende Funktionen besitzen. Der paarweise Vergleich der Proteinsequenzen von Don Juan und Don Juan-Like ergab eine Identität von 42% der Alignementlänge, so dass möglicherweise eine funktionelle Redundanz vorliegt.

Bis heute sind bei *Drosophila* nur wenige Gene funktionell charakterisiert worden, deren Expression auf die männliche Keimbahn beschränkt ist, so z.B. die Gene *janusB* (Yanicostas und Lepesant, 1990), *?2 tubulin* (Michiels *et al.*, 1989), *boule* (Eberhardt *et al.*, 1996) oder die sogenannten MST-Gene (Kuhn *et al.*, 1991). Mit Hilfe von Erkenntnissen, die an *Drosophila* über die Funktion testisspezifischer Proteine sowie regulatorischer Mechanismen gewonnenen wurden, kann ein besseres Verständnis Spermatogenese-spezifischer Prozesse bei anderen Organismen ermöglicht werden.

6.1.1 Kurze Promotoren charakterisieren *dj*, *dj-like* und *min*

3' von *dj-like* ist die Transkriptionseinheit *min* lokalisiert. Ebenso wie DJ und DJ-Like stellt auch dieses Genprodukt ein sehr basisches Protein dar.

Der regulativ aktive Promotorbereich der 3 Gene *dj*, *dj-like* und *min* konnte mit Hilfe von Promotor-*lacZ*-Konstrukten eingegrenzt werden. Die für die testisspezifische Expression notwendige regulativ aktive Region des *don juan*-Gens wurde auf die Sequenzregion -23 bis +115 festgelegt (Blümer, 2000). Der regulativ aktive Sequenzbereich von *dj-like* konnte zunächst auf 650 bp stromaufwärts des Translationsstarts festgelegt werden. Weitere Promotor-*lacZ*-Konstrukte zeigten schließlich, dass 106 bp stromaufwärts des Translationsstarts für die testisspezifische Expression ausreichend sind (Rathke, 2003).

Für die spezifische Expression von *min* in männlichen Keimzellen sind 200 bp stromaufwärts des Translationsstarts ausreichend. Von nur 100 bp stromaufwärts des Translationsstarts kann die Reporterexpression nicht mehr gesteuert werden. Es ist anzunehmen, dass in den 100 bp stromaufwärts des *min*-Translationsstarts der Transkriptionsstart nicht enthalten ist, oder der Bereich stromaufwärts des Transkriptionsstarts zu kurz ist für eine effiziente Bindung der Transkriptionsinitiationsmaschinerie. Folglich sollte der Transkriptionsstart des Gens *min* in dem Bereich um 100 bp stromaufwärts des Translationsstarts lokalisiert sein.

Für die weitere Suche nach regulatorischen Elementen ist die Bestimmung des Transkriptionsstarts essentiell. Die Kenntnis des Transkriptionsstarts würde eine gezielte Interpretation der Promotorkonstrukte ermöglichen.

Da eine Deletion von 52 bp direkt vor dem ATG die Transkription von *dj-like* noch erlaubt (Rathke, 2003), sollte der Transkriptionsstart des Gens *dj-like* innerhalb der 52 bp lokalisiert sein, die zwischen dem 106. und dem 52. Nukleotid stromaufwärts von ATG liegen. In diesem Bereich sind zwei Elemente lokalisiert, die zum Teil mit der Konsensussequenz des *Drosophila*-Initiators (Purnell *et al.*, 1994) bzw. mit der Konsensussequenz des Arthropoden-Initiators (Cherbas und Cherbas, 1993) übereinstimmen (Abb. 6.1 A). Während das Element GTAGTG in 5 von 6 Nukleotiden mit dem *Drosophila*- und dem Arthropoden-Initiator übereinstimmt, zeigt das zweite putative Initiator-Element TCAAAA nur eine Übereinstimmung in 3 von 6 Nukleotiden mit dem *Drosophila*-Initiator und in 4 von 6 Nukleotiden mit dem Arthropoden-Initiator. Es ist daher wahrscheinlicher, dass CTAGTG das Initiatorelement von *dj-like* ist.

Der Bereich in dem der Transkriptionsstart lokalisiert sein muß konnte auch bezüglich des *min*-Gens eingegrenzt werden. Eine Deletion von 60 bp direkt vor dem ATG wirkt sich nicht auf die Transkription des *min*-Gens aus. Somit sollte der Transkriptionsstart in der Region zwischen dem 200. und dem 60. Nukleotid stromaufwärts des ATG lokalisiert sein. In diesem Bereich sind mehrere mögliche

Initiatorelemente lokalisiert, die teilweise Übereinstimmungen mit dem Arthropoden- bzw. *Drosophila*-Initiator (Cherbas und Cherbas, 1993; Purnell *et al.*, 1994) zeigen. In Abb. 6.1 B sind sieben Elemente in dem zwischen dem 200. und dem 60. Nukleotid stromaufwärts des ATG lokalisierten *min*-Sequenzbereich rot markiert. Alle diese Elemente zeigen in 4 von 6 Nukleotiden Übereinstimmung mit dem *Drosophila*- und in 5 von 6 Nukleotiden Übereinstimmung mit dem Arthropoden-Initiator.

Der mit Hilfe eines Primer-Extension-Experiments bestimmte Transkriptionsstart des *dj*-Gens ist innerhalb der Region -23 bis +10 vergleichsweise in Abb. 6.1 C dargestellt (Blümer, 2000).

Alle drei Transkriptionseinheiten stellen somit Gene dar, deren testisspezifische Transkription über sehr kurze Regionen kontrolliert wird. Wie bereits einleitend erwähnt, wird auch die testisspezifische Transkription der Gene *?2-tubulin* (Michiels *et al.*, 1989) und *Mst87F* (Kuhn *et al.*, 1988; Gigliotti *et al.*, 1997) von kurzen genvorgelagerten Bereichen reguliert, sodass es sich hierbei um ein generelles Merkmal von Genen handelt, die spezifisch in der männlichen Keimbahn exprimiert werden.

A *dj-like*

CATGTTTGG**GTAGTGTTCAAAA**ATTGTGAAGTTTGGTTATTTCCCTTTGCTTAGC

B *min*

ATATTATTATTTAATAATAGTCTACT**TCACTATTT**CAC**ACACTT**ACTGTGATAATT
ACGTCAAAT**ACAGGCCATTT**ACTT**CCAGTTT**CGGA**ACATAATGGCGCAGAT**
CGGGTCGAAATCCTCTTAGTTTTTGCA

C *don juan*

TTAAACTTGTATAGTTTTGGG**GGCAGG**TTAGATC

D Arthropoden-Initiator

G G
A **C A T** N Cherbas und Cherbas, 1993
T T

E *Drosophila*-Initiator

G G
A **C A T G** Purnell *et al.*, 1994
T T

Abb. 6.1 Vergleichende Sequenzanalyse der regulativen Regionen von *dj-like*, *min* und *dj* mit bereits beschriebenen konservierten Initiatorelementen.

(A) Die regulative *dj-like* Region zwischen dem 200. und dem 60. Nukleotid stromaufwärts des ATG enthält zwei potentielle Initiatorelemente (rot unterlegt). Da die Übereinstimmung des Elementes GTAGTG (unterstrichen) mit dem *Drosophila*- und Arthropoden-Initiator größer ist. Ist dieses Element der wahrscheinlichere *dj-like*-Initiator (B) Die Sequenz zwischen dem 200. und dem 60. Nukleotid stromaufwärts des *min*-ATGs enthält sieben putative Initiator-Elemente, die alle in 4 von 6 Nukleotiden mit dem *Drosophila*-Initiator und in 5 von 6 Nukleotiden mit dem Arthropoden-Initiator übereinstimmen. (C) Der innerhalb der Region -23 bis +10 rot hervorgehobene Sequenzbereich um den *dj*-Transkriptionsstart zeigt in 5 von 6 Basen Identität zu den von Cherbas und Cherbas (1993) sowie Purnell *et al.* (1994) beschriebenen Initiatorelementen. (D) Die für die Expression essentiellen Basen der in Arthropoden konservierten Initiator-Sequenz sind rot unterlegt. (E) Für die Expression essentielle Basen der in *Drosophila* konservierten Initiator-Sequenz sind ebenfalls rot unterlegt.

6.1.2 Cannonball/TAF_{II}80 kontrolliert die Transkription von *dj* und *min*

Die Transkription der Gene *don juan*, *Mst 87F*, *Mst 84 Da-d*, *Mst98Ca/b* und *janus B*, deren Transkripte einer Translationsrepression unterliegen, ist von den Proteinen Always early (Aly), Cannonball (Can), Meiotic arrest (Mia) und Spermatocyte arrest (Sa) abhängig (White-Cooper *et al.*, 1998). In Mutanten der Gene *always early (aly)*, *cannonball (can)*, *meiotic arrest (mia)* und *spermatocyte arrest (sa)* akkumulieren prämeiotische Zellen beim Übergang von der G₂-Phase in die Meiose I (Lin *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu translational reprimierten mRNAs werden mRNAs die keiner Translationskontrolle unterliegen in diesen Mutanten exprimiert. Dies deutet daraufhin, dass Gene, deren Transkripte, translational reprimiert werden, einer anderen Transkriptionskontrolle unterliegen, als Gene, deren Transkripte sofort translatiert werden (White-Cooper *et al.*, 1998). Das molekular charakterisierte Gen *cannonball* codiert für ein testisspezifisches TAF-Homolog, TAF_{II}80, und kontrolliert selektiv die Transkription von Genen, deren mRNAs translational reprimiert werden. Für die keimzellspezifische Transkription von mRNAs, die erst nach der Meiose translatiert werden, wird folglich ein anderer Transkriptionsinitiationskomplex an den Promotor rekrutiert. Auch für das Gen *min* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Transkription von *cannonball* abhängig ist. Laufende Experimente sollen klären, ob auch die Transkription von *dj-like* von *cannonball* abhängt (C. Rathke, persönliche Mitteilung). Eine mögliche Erklärung für das Merkmal der sehr kurzen Promotorbereiche, das den Genen *don juan*, *don juan-like*, *min*, *Mst 87F*, *janusB* und *dhod* gemeinsam ist, könnte die Transkriptionsregulation durch einen testisspezifischen Transkriptionsinitiationskomplex sein, welche entsprechende regulative Bereiche erfordert. Der Transkriptionsinitiationskomplex ist wahrscheinlich alleine ausreichend für die testisspezifische Expression, sodass möglicherweise keine weiteren Transkriptionsregulatoren notwendig sind und deshalb ein kurzer Regulationsbereich für die Expression der Gene genügt.

6.1.3 Der Promotorbereich und die 5' UTR können sich funktionell in der Genaktivierung von *don juan* ersetzen

Mit Hilfe von *don juan* Promotor-*lacZ*-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die Leaderregion +11 bis +114 nicht für die testisspezifische Expression notwendig ist, sofern 249 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts in dem Promotorkonstrukt enthalten sind. Dies führte zu der Vermutung, dass die Region -23 bis +10 für die testisspezifische Expression ausreichend sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines Promotor-*lacZ*-Konstrukts nachgewiesen, dass die Region -23 bis +10 zur Regulation der testisspezifischen Expression alleine nicht ausreichend ist. Die Region -23 bis +10 ist für eine effiziente Transkription zu kurz. Somit sind cis-agierende Sequenzen in der 5'UTR unabdingbar für die Transkription, sofern die Region stromaufwärts der Nukleotidposition -23 deletiert ist.

Sind die in der 5'UTR gelegenen cis-aktiven Sequenzen deletiert, wie es auch in dem Konstrukt *dj-lacZ* ? +11/+114 der Fall ist, so kann Transkription nur stattfinden, wenn das Fehlen der Sequenzen durch stromaufwärts der Nukleotidposition -23 gelegene cis-agierende Sequenzen kompensiert wird. Der Bereich -23 bis +10 ist sowohl in Kombination mit dem Leader als auch in Kombination mit stromaufwärts gelegenen Sequenzen für eine testisspezifische Transkription ausreichend. Die cis-regulativen Sequenzen stromaufwärts der Position -23 und stromabwärts der Position +10 werden sehr wahrscheinlich durch trans-aktive DNA-bindende-Faktoren erkannt. Die Bindung solcher Regulatoren ermöglicht dem Transkriptionsapparat die Initiation der RNA-Synthese an spezifischen Core-Promotor Sequenzen. Im *dj*-Promotor an Position -30 wurde ein TATA-Box ähnliches Element identifiziert (Blümer, 1996). Es ist möglich, dass diese Sequenz die regulative Region darstellt, welche die Deletion cis-aktiver Elemente der 5' UTR kompensiert und somit die Transkription ermöglicht. Umgekehrt könnte ein Element in der 5' UTR die Deletion der TATA-Box kompensieren.

Für viele Gene konnte gezeigt werden, dass die 5'UTR an der transkriptionalen Genregulation beteiligt ist (Jarrell und Meselson, 1991; Arkhipova und Ilyin, 1991; Fridell und Searles, 1992; McLean *et al.*, 1993; Minchiotti *et al.*, 1997). Neben genspezifischen cis-Elementen wurden „downstream Elemente“ beschrieben, die synergistisch mit dem Initiator agieren und DPE (downstream promoter element) genannt werden (Burke und Kadonaga, 1996, 1997). Das DPE ist 30 Nukleotide stromabwärts der Transkriptionsstartstelle lokalisiert und stellt ein 4 Basenpaare umfassendes Sequenzmotiv dar. Das DPE Sequenz-Motiv kommt ebenso häufig in *Drosophila* Core-Promotoren vor wie die TATA-Box (Kutach und Kadonaga, 2000). Das DPE ist zur TATA-Box funktionell analog. Beide Elemente sind

Erkennungsstellen für die Bindung von TFIID. Ein DPE-Motiv in der 5'UTR kann den Funktionsverlust der TATA-Box ausgleichen (Burke und Kadonaga 1996). Der Vergleich der *don juan* Sequenz im Bereich +30 mit bisher bekannten funktionell aktiven DPE-Motifen ergab keine Übereinstimmungen.

6.1.4 Die 5' UTR reguliert die Transkriptmenge von *don juan* und *dj-like*

Mittels *in situ* Hybridisierung an Testes transgener Fliegen wurde das *lacZ*-Transkriptniveau verschiedener *don juan*-5'UTR-Deletionskonstrukte miteinander verglichen. Im Vergleich zu Fliegen, die ein Promotor-*lacZ*-Konstrukt mit der regulatorischen Region -69 bis + 115 (*dj-lacZ 3*) im Genom trugen, wurden weniger *lacZ*-Transkripte in Testes transgener Fliegen, die das Deletionskonstrukt *dj-lacZ ? +11/+114* im Genom trugen, nachgewiesen. Eine ebenso geringe Transkriptmenge, wie in Testes dieser Fliegen wurde in Testes von *Drosophilae* der Linie *dj-lacZ? +54/+114* festgestellt. Dagegen entsprach die in Testes von Fliegen der Linie *dj-lacZ? +11/+54* detektierte Transkriptmenge dem in Testes der Linie *dj-lacZ 3* nachgewiesenen Level. Es konnte somit klar gezeigt werden, dass die 3' Hälfte des Leaders, die Region +54 bis +114, für hohe Transkriptmengen notwendig ist. In dieser Region ist folglich ein Element lokalisiert, das entweder eine höhere transkriptionale Aktivität vermittelt oder die mRNA-Stabilität erhöht. Reguliert das Element nur die Transkriptionsstärke und nicht die Stabilität der Transkripte, so sollte bei Deletion dieser regulativen Region eine Akkumulation der mRNAs in postmeiotischen Stadien zu beobachten sein. Reguliert das Element dagegen nicht die Transkriptionsaktivität, sondern posttranskriptional die mRNA-Stabilität, so sollte nach Beendigung der Transkription, in meiotischen und postmeiotischen Stadien eine Reduktion der mRNA-Menge zu beobachten sein. Michiels *et al.* (1993) konnten z.B. zeigen, dass der Verlust eines regulativen 18 bp umfassenden Elementes in der 5' UTR des *?2-tubulin*-Gens zur Reduktion der Transkriptmenge ab Beginn der Meiose und in postmeiotischen Stadien führte. Dieses Element fungiert zudem als DPE (Santel *et al.*, 2000). Ebenso ist in der 3' UTR des Gens *Mst84Db* ein Element lokalisiert, welches die Stabilität der Transkripte erhöht (Gigliotti *et al.*, 1997).

Eine Verminderung der *lacZ*-mRNA Stabilität in Testes der Linien *dj-lacZ? +11/+114* und *dj-lacZ? +54/+114* hätte somit zur Folge, dass die Färbung, die durch *in situ* Hybridisierung erzeugt wurde, in jüngeren Keimzell-Stadien stärker ist als in späteren. Tatsächlich ist aber in Spermatidstadien eine stärkere Färbung zu beobachten als in Spermatozyten, in welchen die Reporter-gen-Transkription beginnt (Abb. 5.2 E und G). Dies deutet auf eine Akkumulation der Transkripte hin und damit auf erhöhte mRNA Stabilität. Folglich muß in dem 60 bp umfassenden

Sequenzbereich +54 bis +114 ein Element lokalisiert sein, das eine hohe Transkriptmenge vermittelt. Da in Testes der Linie *dj-lacZ ? +90/+109* mit Hilfe einer *in situ* Hybridisierung ein intermediäres Transkript-Level detektiert wurde (Abb. 5.2 H), kann geschlossen werden, dass der gesamte Sequenzbereich +54 bis +114 für eine hohe mRNA Menge notwendig ist.

Da das regulative cis-Element der 5' UTR in der Region + 54 bis +114 lokalisiert ist, und eine Deletion der Region +11 bis +54 keine Transkriptreduktion zur Folge hat, kann das Vorhandensein eines klassischen DPEs (Burke und Kadonaga, 1996, 1997) in der *don juan* Leader-Region ausgeschlossen werden; denn alle bisher identifizierten DPE-Motive sind an Position +28 bis +33 relativ zum Transkriptionsstart lokalisiert (Kutach und Kadonaga, 2000).

Auch die 5' UTR des Gens *dj-like* reguliert die Transkriptmenge. Die Deletion von 52 bp direkt stromaufwärts des ATG hat eine Reduktion der Transkriptmenge zur Folge (Rathke, 2003). Da Sequenzbereiche direkt vor dem ATG sowohl die Transkriptmenge von *dj* als auch von *dj-like* quantitativ beeinflussen, wurde vermutet, dass diese Bereiche die gleichen cis-Elemente enthalten. Allerdings konnten keine Sequenzähnlichkeiten der 5' UTR von *dj-like* und des Leaderbereichs von *don juan* festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu hat eine Deletion von 60 bp bzw. 30 bp direkt stromaufwärts des ATG von *min* keinen Einfluss auf die Transkriptmenge.

6.1.5 Die Translationsrepression der Transkripte von *dj*, *dj-like* und *min* wird vom Leader vermittelt

Das Translationsrepressionselement von *don juan*, TRE_{dj} , ist in der 5'UTR des Gens lokalisiert. Auch für andere während der Spermatogenese von *Drosophila* exprimierte Gene konnten Elemente, die für die Translationskontrolle relevant sind, in der 5' UTR identifiziert werden. Im Gegensatz zur Spermatogenese reguliert in der Oogenese die 3'UTR die Translationsrepression. Cis-agierende Sequenzen, die in der Säuger-Spermatogenese die Translation kontrollieren, sind sowohl in der 3' UTR als auch in der 5' UTR lokalisiert. Die Translationsregulation während der Spermatogenese von *Drosophila* ist sehr gut am Beispiel der *Mst87F*-mRNA untersucht. *Mst87F* gehört zur *Mst(3)CGP*-Genfamilie, die vermutlich Axonem stabilisierende Proteine codiert (Schäfer *et al.*, 1995). Anhand der *Mst 87F*-mRNA konnte erstmalig gezeigt werden, dass die 5' UTR die translationale Repression vermittelt (Kuhn *et al.*, 1988). Das in der 5'UTR der *Mst 87F*-mRNA lokalisierte Translationskontrolelement reprimierte die Translation bis zur Spermienindividualisierung (Schäfer *et al.*, 1990). Trotz einer hohen Sequenzähnlichkeit zwischen dem TCE_{Mst87F} und der Leaderregion +90 bis +109 von *don juan*, zeigten Deletionsanalysen und *in vitro* mutagenese Experimente,

dass sich die Translationskontrollregion von *don juan* klar vom TCE_{Mst87F} unterscheidet. *don juan*-Promotor-*lacZ*-Analysen zeigten, dass das Translationsrepressionselement von *don juan* in der Leaderregion +55 bis +89 lokalisiert ist. Auch der Zeitpunkt der Translationsaktivierung von *don juan* und den Genen der *Mst(3)CGP*-Familie ist unterschiedlich. Don Juan wird zuerst während der Chromatinkondensation im Kern exprimiert und später zu Beginn der Individualisierung im Flagellum (Santel *et al.*, 1998). *Mst(3)CGP*-codierte mRNAs werden zu einem späteren Zeitpunkt in elongierten Spermatischen exprimiert (Blümer *et al.*, 2002). Die Regulation der Translationsrepression der *don juan*-mRNA und der *Mst(3)CGP*-codierter mRNAs ist folglich unterschiedlich, sodass die Proteine zum jeweils passenden Zeitpunkt translatiert werden.

In der *Xenopus* Oogenese enthalten viele translationskontrollierte mRNAs konservierte Elemente, werden aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiviert. Es ist wahrscheinlich, dass der Zeitpunkt der Aktivierung von der Positionierung des Elementes relativ zum Transkriptionsstart abhängt (Vassali und Stutz, 1995).

Mit Hilfe von *dj-like* und *min*-Promotor-*lacZ*-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die Expression des Reporterproteins β -Galaktosidase erst in elongierten Spermatischen erfolgt. Die Reporterexpression spiegelt die Expression von *dj-like*- bzw. von *min* wider. Folglich konnte postuliert werden, dass DJ-Like und Min wie auch Don Juan ihre Funktionen postmeiotisch während der Spermiogenese ausüben. Da die Transkription von *dj-like* und *min* prämeiotisch erfolgt, stehen die Transkripte ebenso wie die *dj*-mRNA unter Translationskontrolle. Die translationale Repression der Transkripte in prämeiotischen Spermatogenesestadien und die somit fehlende Reporterproteinexpression in diesen Keimzellen konnte anhand eines β -Galaktosidase-Nachweises an larvalen Testes, die ausschließlich prämeiotische Keimzellstadien enthielten, verifiziert werden. Die Promotor-*lacZ*-Konstrukte zeigten, dass die 5'UTR die Translationsrepression vermittelt. Während die Translationsrepression von *dj-like* von 52 bp stromaufwärts des ATG vermittelt wird (C. Rathke, persönliche Mitteilung), sind nur 30 bp stromaufwärts des ATG von *min* für die Regulation der Translation ausreichend. Die für die Transkriptrepression notwendigen Sequenzen der Gene *dj-like*, *don juan* und *min* sind unterschiedlich, sodass davon auszugehen ist, dass Sekundärstrukturbereiche der RNAs für die Erkennung durch regulative Proteine verantwortlich sind.

Zur Klärung der Frage durch welchen Mechanismus die Translation der mRNAs reprimiert wird, ist ein wichtiger Schritt die Identifizierung und Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen den für die Translationsrepression relevanten Bereichen der *dj-like*- und *min*-mRNAs und RNA-bindenden Proteinen sowie ihre Bedeutung für die Translationskontrolle. Eine Untersuchung der Konserviertheit der

Interaktion zwischen beteiligten cis- und trans-wirkenden Faktoren könnte Aufschluß über grundlegende Translationskontrollmechanismen geben.

6.1.6 Das Boule Protein ist in die Translationsrepression der *min*-mRNA involviert

Für den generellen Mechanismus der Translationsrepression scheinen RNA-bindende Proteine essentiell zu sein (Venables und Eperon, 1999). Die Spezifität der Wechselwirkung wird durch cis-Elemente in der untranslatierten Region der mRNA vermittelt. Proteine binden an diese Sequenzen und koordinieren so die Repression und Aktivierung der Translation.

Von verschiedenen Genen, die während der Spermatogenese von *Drosophila* exprimiert werden, konnten cis-regulatorische Elemente charakterisiert werden, die für die Translationskontrolle der codierten mRNAs notwendig sind. So sind beispielsweise die Translationskontrollelemente der Gene *don juan*, *janB*, *dhod* sowie der Genfamilie *Mst(3)CGP* bekannt. Darüberhinaus konnte in einigen Fällen gezeigt werden, dass Proteine an die regulatorischen Elemente binden (Kempe *et al.*, 1993; Blümer *et al.*, 2002). Allerdings gibt es bisher keine direkten Beweise, dass diese Proteine tatsächlich für die Repression der Translation verantwortlich sind. Verschiedene RNA-bindende-Proteine, die in *Drosophila* analysiert wurden, sind für die männliche Fertilität notwendig (zur Übersicht: Renkawitz-Pohl *et al.*, 2004) und sind somit Kandidaten für die Translationsregulation testisexprimierter, translationskontrollierter Transkripte, wie z.B der *min*-mRNA. Beispielsweise hat eine Mutation in dem testisspezifisch exprimierten Gen *tsr* eine gestörte Spermatidentwicklung sowie reduzierte männliche Fertilität zur Folge (Haynes *et al.*, 1997). Das in Spermatozyten und jungen Spermatischen exprimierte zytoplasmatische Protein Tsr enthält zwei RNA-bindende-Domänen, die sequenzspezifisch RNA binden können. (Nagai *et al.*, 1995). Solche Domänen, genannt RNA recognition motif (RRM), sind in vielen RNA-bindenden Proteinen, die in posttranskriptionale Regulation involviert sind enthalten (Birney *et al.*, 1993; Burd *et al.*, 1994). In den Spermatozyten männlicher TSR Fliegen werden einige Testis-Proteine verfrüht exprimiert, was darauf schließen lässt, dass TSR die Expression dieser Proteine negativ reguliert (Haynes *et al.*, 1997).

Ein weiteres RNA-bindendes-Protein, das regulativ in die Translationskontrolle der *min*-mRNA involviert sein könnte, ist Boule. Das *Drosophila* Gen des RNA-bindenden Proteins Boule (Eberhart *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2001) ist ein Homolog des humanen Y-chromosomalen Gens *deleted in azoospermia (daz)*, dessen Funktion für die männliche Fertilität benötigt wird (Cooke *et al.*, 1996; Shan *et al.*, 1996; Saxena *et*

al., 2000). Autosomale Homologe von DAZ (DAZL und Boule) wurden nicht nur in *Drosophila*, sondern auch in zahlreichen anderen Spezies einschließlich Menschen (Saxena *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2001), Mäusen (Cooke *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2001), Xenopus (Houston und King, 2000) identifiziert. In *Drosophila boule* Mutanten initiieren die Keimzellen die meiotischen Teilungen nicht. Trotzdem findet zum Teil Spermatiddifferenzierung statt, wobei die Keimzellen allerdings nicht das Stadium elongierter Spermatiden erreichen (Eberhart *et al.*, 1996). Die subzelluläre Verteilung des Boule Proteins zeigt einen zweiphasigen Verlauf. Während der Reifung primärer Spermatozyten ist das Protein im Kern lokalisiert. Diese nukleare Lokalisation ist abhängig von dem Y-Chromosom Fertilitätsfaktor *ks-1*. Kurz vor der Meiose ist das Protein nicht mehr im Kern detektierbar, sondern im Zytoplasma lokalisiert. Auch noch im Stadium elongierter Spermatiden ist Boule zytoplasmatisch nachweisbar (Cheng *et al.*, 1998). Das Boule Protein ist für die effiziente Translation der Cdc25 Phosphatase Twine unmittelbar vor der Meiose notwendig (Maines *et al.*, 1999). Diese wird für die Transition des Zellzyklus von der G2 in die M-Phase benötigt.

Das RNA-bindende Protein Rb97D ist ausschließlich im Spermatozytenkern detektierbar, wo es mit den Lampenbürsten Schleifen des Y-Chromosoms assoziiert ist. Das Protein Rb97D ist ebenfalls essentiell für die männliche Fertilität von *Drosophila* (Karsch-Mizrachi und Haynes, 1993; Heatwole und Haynes, 1996). Bisher ist nicht bekannt, ob Rb97D in mRNA Prozessierungsprozesse wie Spleißen oder Polyadenylierung involviert ist oder ein Translations-Repressions-Protein darstellt. Eine Bindung des Proteins Rb97D an die *min*-mRNA ist allerdings unwahrscheinlich, da die *min*-mRNA im Cytoplasma lokalisiert ist, während Rb97D mit dem *ks-1* Fertilitätsfaktor des Y-Chromosoms im Kern assoziiert ist. Eine indirekte Beteiligung an dem Translationskontrollprozess von *min* ist dennoch denkbar.

Ein weiterer Kandidat für die Regulation der *min*-Translation ist die testisspezifische Isoform des RNA-bindenden Proteins Bruno (Webster *et al.*, 1997). Bruno vermittelt die Repression der *oskar*-mRNA in der *Drosophila*-Oogenese über spezifische Interaktion mit den BREs (bruno response elements) in der 3' UTR des Gens (Kim-Ha *et al.*, 1995). Darüber hinaus scheint Bruno auch über Bindung an die 3' UTR die Repression der *gurken*-mRNA während der Oogenese zu vermitteln (Filardo und Ephrussi, 2003). Die translationskontrollierte Expression von *min* erfolgt über die 5' UTR. In der regulativen 5' UTR des Gens konnten keine BRE-ähnlichen Sequenzen gefunden werden. Es ist aber auch möglich, dass die Interaktion mit dem Bruno Protein in der Spermatogenese von *Drosophila* über andere cis-aktive Elemente funktioniert.

Mit dem Ziel trans-aktive Regulatoren der *min*-Translation zu finden wurde mit Hilfe kreuzungsgenetischer Experimente die *min*-Expression im genetischen Hintergrund homozygoter Mutanten oben erwähnter RNA-bindender Proteine verfolgt. Hierzu wurde das Transgen 466-*min-lacZ* kreuzungsgenetisch in den jeweiligen homozygot

mutanten Hintergrund eingebracht. In Mutanten der Proteine Tsr, Rb97D und Bruno wurde das Reporterprotein normal exprimiert. Eine veränderte β -Galaktosidase-Expression wurde nur in *boule* (*bol*¹) Mutanten beobachtet. Das Reporterprotein war in prämeiotischen Stadien detektierbar, während es in einem genetisch „wildtypischen“ Hintergrund ausschließlich postmeiotisch exprimiert wird. Diese Fehlexpression impliziert eine mögliche Beteiligung von Boule an der Repression der *min*-mRNA. Durch die Mutation des Boule-Proteins würde es dann zur Störung des Translationsrepressionsmechanismus kommen, wodurch die verfrühte Expression der β -Galaktosidase erklärbar werden würde. Die Expression des Boule Proteins stimmt zeitlich jedoch nicht mit der Repression der *min*-mRNA überein, sodass eine direkte Repression durch Boule ausgeschlossen werden kann. Die *min*-mRNA wird ab dem Stadium primärer Spermatozyten transkribiert und ist zytoplasmatisch detektierbar. Boule wird zwar in primären Spermatozyten translatiert, ist aber während der gesamten Wachstumsphase der Zellen im Kern lokalisiert. Erst kurz vor der Meiose ist das Protein im Zytoplasma detektierbar, wo die Repression der *min*-mRNA noch andauert (Cheng *et al.*, 1998). Die Repression der *min*-mRNA wird ab dem Stadium elongierter Spermatisden aufgehoben. In diesem Stadium ist das Boule Protein immer noch zytoplasmatisch detektierbar (Cheng *et al.*, 1998).

Es ist denkbar, dass Boule in Kooperation mit einem zweiten Faktor die mRNA eines möglichen Translationsaktivators von *min* reprimiert. Zunächst indem es die entsprechende mRNA im Kern zurückbehält. Die Degradation des zweiten für die Repression notwendigen Faktors in elongierten Spermatisd-Stadien würde zur Translationsaktivierung der *min*-mRNA führen, während die Aktivität von Boule nun eine effiziente Translation des *min*-Transkripts bewirken würde.

Maines *et al.* (1999) konnten zeigen, dass Boule für die effiziente Translation der Cdc25 Phosphatase Twine notwendig ist. Boule stabilisiert aber nicht die *twine*-mRNA, da die *twine*-mRNA-Stabilität im *boule*-mutanten Hintergrund nicht beeinträchtigt ist. Folglich spielt Boule bei der Translation von Twine eine wichtige Rolle. Da Boule ein RNA-Erkennungs-Motiv (RRM) besitzt, wird angenommen, dass Boule die Twine Expression durch direkte Bindung an die *twine*-mRNA beeinflusst. Da *boule* Mutanten teilweise Defekte in der Spermatisdifferenzierung aufweisen, was *twine* Mutanten nicht zeigen, ist klar, dass nicht nur die Expression von *twine*, sondern auch die Expression anderer Gene von Boule reguliert wird (Eberhart *et al.*, 1996). Die Funktion von Boule ist somit nicht nur für die Meiose, sondern auch für die Spermatisdifferenzierung wichtig. Die Aufgabe von Boule könnte sein beide Prozesse zu koordinieren.

Da im *boule* (*bol*¹)-mutanten Hintergrund die durch den *min*-Promotor gesteuerte β -Galaktosidase-Expression in prämeiotischen Zellstadien zwar vorhanden, aber gering war, ist anzunehmen, dass Boule auch die Expression von *min* quantitativ

reguliert. Möglicherweise sind in *boule* Mutanten, oder auch generell in prämeiotischen und frühen postmeiotischen Stadien, Faktoren, die für die volle *min*-Expression benötigt werden, nicht vorhanden.

Auch die Expression von DJ wurde in Testes einiger homozygoter Mutanten RNA-bindender Proteine analysiert. Sowohl im *tsr*-mutanten-, als auch im *Rb97D*-mutanten Hintergrund ist das DJ-Expressionsmuster nicht verändert (Blümer *et al.*, 2002). In Testes *bol*¹-mutanter *Drosophila* erreichen die Keimzellen das Stadium elongierter Spermatiden, in welchen die Translation von Don Juan beginnt, nicht. Mit Hilfe eines Western-Blot-Experiments konnte das DJ-Protein in Testes homozygot *bol*¹-mutanter Männchen nicht nachgewiesen werden (Santel, 1997). Folglich findet in homozygot mutanten *bol*¹-Männchen keine verfrühte Expression von DJ statt. Damit ist Boule nicht in die Translationsrepression der *don juan*-mRNA involviert, was im Gegensatz zu *min* steht.

Die Proteine Rb97D, Tsr und Boule sind somit entweder nicht funktionell an der Regulation der DJ-Expression beteiligt oder ihre Funktion ist redundant.

Die Translation von *Mst87F* ist ebenfalls unabhängig von der Expression der Proteine Tsr und Rb97D (Schäfer *et al.*, 1995). Die translationskontrollierte Expression der *Drosophila* Protamine A und B wurde auch in den Testes homozygoter *Rb97D*- und *Tsr*-Mutanten getestet. Das Expressionsmuster unterschied sich hier ebenfalls nicht von der Wildtypsituation (persönliche Mitteilung, S. Jayaramaiah Raja).

Ob die Proteine Boule, Tsr, Rb97D und Bruno funktionell an der Regulation der *dj-like* Translation beteiligt sind, wird zur Zeit getestet. Die unten stehende Tabelle (Abb. 6.2) fasst den Einfluss der RNA-bindenden Proteine Boule, Tsr, Rb97D und Bruno auf die Transkripte der Gene *twine*, *don juan*, *dj-like*, *min*, *Mst87F* und *Protamin A* und *B* zusammen.

mRNA	RNA-bindende-Proteine			
	Rb97D	Boule	Tsr	Bruno
<i>twine</i>	?	T	?	?
<i>min</i>	?	R+T	?	?
<i>don juan</i>	?	?	?	?
<i>dj-like</i>	?	?	?	?
<i>Mst87F</i>	?	?	?	?
<i>protamin A</i>	?	?	?	?
<i>protamin B</i>	?	?	?	?

Abb. 6.2: Zusammenfassung der Ergebnisse über den Einfluss der RNA-bindenden-Proteine Rb97D, Boule, Tsr und Bruno auf die Translation der Transkripte der Gene *twine*, *min*, *don juan*, *dj-like*, *Mst87F*, *protamin A* und *B*

R: notwendig für die Translationsrepression der mRNA

T: notwendig für effiziente Translation

?: noch nicht untersucht

?: keine Bedeutung für diese mRNA

6.1.7 Vermitteln regulative Proteine über Bindung an das 35 bp umfassende TCE_{dj} die Translationsrepression der *dj*-mRNA?

Die Identifizierung des Translationsrepressors der *dj*-mRNA stellt den nächsten Schritt zur Klärung des Translationskontrollmechanismus des *dj*-Transkripts dar. Obwohl für das TCE der *Mst 87F*-mRNA komplexe Protein-RNA Interaktionen mit Testesproteinen nachgewiesen werden konnten (Kempe *et al.*, 1993; Penningers *et al.*, 1995), konnte in der *Drosophila*-Spermatogenese bisher noch kein Translationsrepressor näher charakterisiert werden. Vielfach konnte gezeigt werden, dass regulierende Faktoren spezifische Regionen der RNA aufgrund der Ausbildung definierter Sekundärstrukturen erkennen (Theil, 1993; Shi *et al.*, 1997; Schlicker *et al.*, 1997). Deshalb wurde die *don juan* 5'UTR mit Hilfe des Computer Programmes mfold 2.3 (Jaeger *et al.*, 1989; Walter *et al.*, 1994; Zuker *et al.*, 1999) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mireille Schäfer (Kassel) auf Sekundärstrukturen untersucht. Sekundärstrukturen werden in der gesamten Leaderregion gebildet. Innerhalb der für die Translationsrepression funktionell relevanten Region wird eine große „stem-loop“-Struktur mit zwei internen Schleifen gebildet (Abb. 6.2 A) In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mireille Schäfer (Kassel) wurden *in vitro* RNA-Retardationsanalysen (band-shifts) durchgeführt, um RNA-bindende Proteine zu finden, die mit dem *don juan* Leader interagieren. Für diese Experimente wurden die zentralen 25 Nukleotide der „stem-loop“-Struktur (+61 bis +85) als radioaktiv markiertes *in vitro* Transkript verwendet und mit Testis-Proteinextrakten inkubiert. Resultierende Komplexe wurden in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mehrere radioaktiv markierte Proteinbanden wurden detektiert. Wurden unmarkierte Oligoribonukleotide zur Konkurrenz eingesetzt, so verschwand nur die Bande, die zuvor als stärkste Bande im 62 kDa Bereich detektiert worden war (Abb 6.2 B). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass ein Protein mit einem Molekulargewicht von 62 kDa in eine sequenz- oder strukturspezifische Interaktion mit dem 25 Nukleotid-Segment des *don juan* Leaders involviert ist (Blümer *et al.*, 2002). Das Molekulargewicht der RNA-bindenden Proteine Tsr, Rb97D und Boule ist geringer als 62 kDa. Es kann somit hierdurch zusätzlich ausgeschlossen werden, dass diese Proteine an der initialen Interaktion mit der *don juan* Sequenz beteiligt sind. Proteine interagieren oft sequenz-spezifisch mit Nukleotiden, die einzelsträngig in Schleifen lokalisiert sind. Doppelsträngige Regionen sind dabei notwendig um die einzelsträngigen Bereiche in der für die Bindung erforderlichen Orientierung zu präsentieren (Wyatt und Tinoco, 1993). Der Nukleotidbereich, der als *in vitro* Transkript für das Experiment eingesetzt wurde, schließt eine der zwei internen Haarnadelschleifen der stammförmigen Sekundärstruktur ein. Diese Haarnadelschleife besteht aus drei Uridin Nukleotiden. Um zu sehen, ob diese

Schleife an der Proteinbindung beteiligt ist, wurden Oligoribonukleotide, in welchen diese drei Nukleotide deletiert waren und somit die interne Schleife fehlte, hergestellt und zur Konkurrenz eingesetzt. Das mit diesen Oligonukleotiden durchgeführte Experiment zeigte, dass die Fähigkeit der Oligonukleotide zur Konkurrenz deutlich reduziert war (Abb 6.3 B, zum Vergleich: Linie 2 und 4). Nach Inkubation des radioaktiv markierten mutierten Oligoribonukleotids mit Testis-Proteinextrakten konnte keine Bande im 62 kDa Bereich detektiert werden (Blümer *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass die interne Haarnadelschleife des Nukleotidbereichs +61 bis +85 maßgebend an der Proteinbindung beteiligt ist und somit in diesem Fall die Erkennung der RNA tatsächlich über die Sekundärstruktur erfolgt. Auch in einigen anderen Fällen konnte gezeigt werden, dass die RNA-Erkennung von der Sekundärstruktur abhängig ist. Beispielsweise bindet das Protein B52 RNAs in denen ein konserviertes Motiv den Kernteil eines Sekundärstruktur-Elementes bildet. In diesem Element konnte die Bindestelle des Proteins als 20 Nukleotide umfassende Haarnadelschleife identifiziert werden (Shi *et al.*, 1997). Ebenso bindet ein zytoplasmatisches Protein, das an der translationalen Repression des *transition Proteins 2* in der Säugerspermatogenese beteiligt ist, an ein 8 bp umfassendes Motiv, das ein essentieller Bestandteil einer „stem-loop“-Struktur in der 3' UTR der *transition Protein 2*-mRNA ist (Schlicker *et al.*, 1997).

Zwar konnte nur ein Protein identifiziert werden, das spezifisch an das radioaktiv markierte *don juan in vitro* Transkript bindet, aber es besteht die Möglichkeit dass zusätzliche Proteinkomponenten für die Translationskontrolle durch Protein-Protein Wechselwirkungen rekrutiert werden. Die Translationsrepression der *hunchback*-mRNA ist ein gut charakterisiertes Beispiel für eine sukzessive Komplexbildung. Hierbei bindet zunächst Pumilio an die NRE's („nanos response elements“) in der 3' UTR der *hunchback*-mRNA und ermöglicht dadurch die Rekrutierung von Nanos durch Protein-Protein- und Protein-RNA Wechselwirkungen (Wharton *et al.*, 1998; Parisi und Lin, 2000). Schließlich bindet das Protein „Brain tumor“ (Brat) an den Protein-RNA Komplex. Der auf diese Weise gebildete Komplex ist für die Repression der maternal bereitgestellten *hunchback*-Transkripte im posterioren Bereich des *Drosophila* Embryos notwendig.

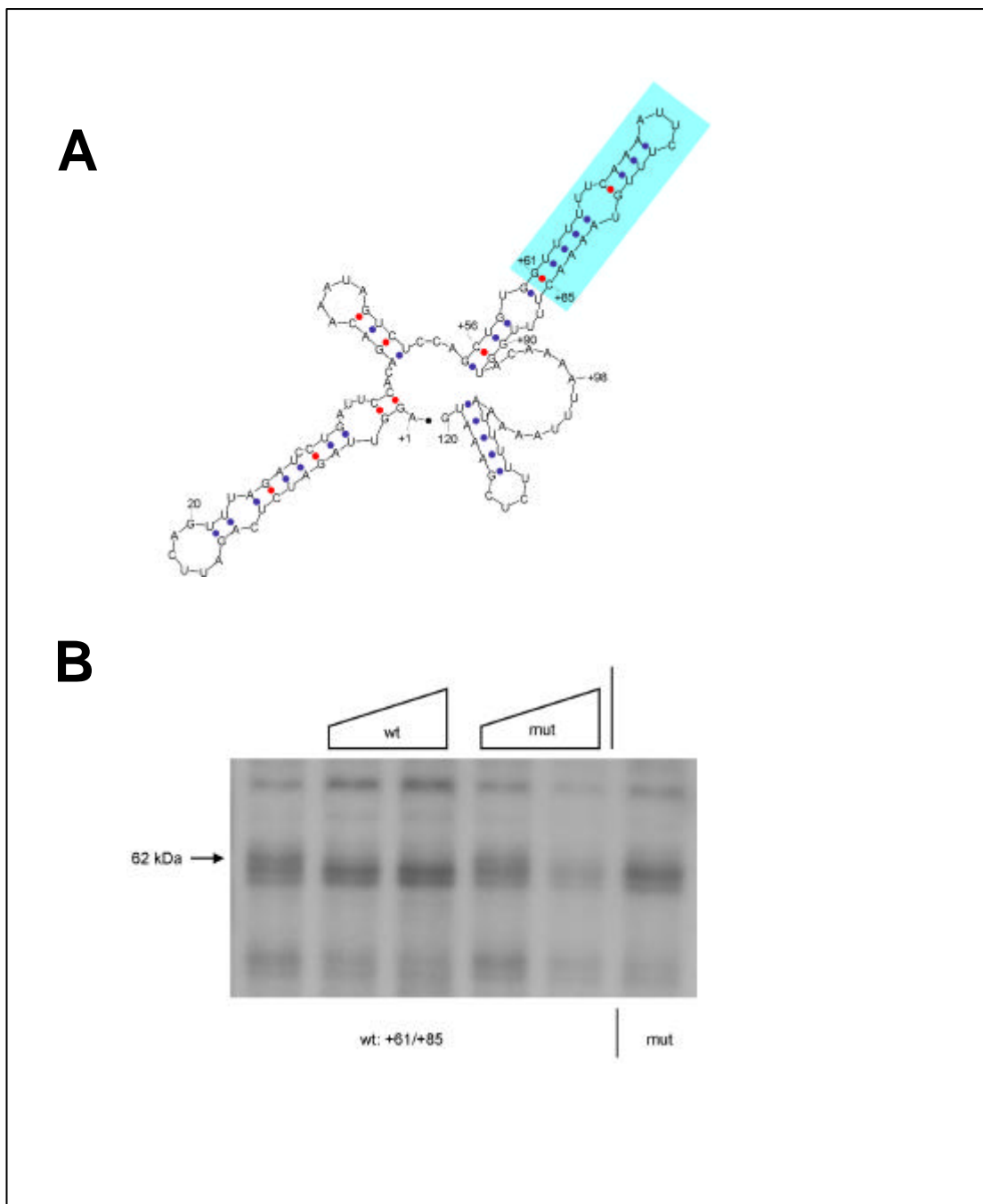


Abb. 6.3. (A) Sekundärstruktur der 5' UTR von *don juan*.

Die Sekundärstruktur des kompletten *don juan*-Leaders wurde mit dem Computer Programm mfold 2.3 (Jaeger *et al.*, Walter *et al.*, 1994; Zuker *et al.*, 1999) berechnet. Das Oligonukleotid, das für das UV-Crosslinking Experiment verwendet wurde, ist blau unterlegt. Die Zahlen definieren die Nucleotidposition in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt.

(B) Ein 62 kDa Protein bindet in der regulatorisch relevanten stem-loop Struktur des *don juan*-Leaders.

Testesproteinextrakt wurde mit radioaktiv markierten Oligoribonucleotiden (Wildtypsequenz in den Spuren 1 bis 5, mutierte Sequenz in Spur 6) inkubiert, mit UV-Licht bestrahlt und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die steigende Konkretorkonzentration (120-fach; 1200-fach) ist jeweils für die nicht markierte Wildtyp Sequenz (wt) bzw. für die unmarkierte mutierte Sequenz (mut) über dem Gel angedeutet. Die einzige Proteinbande, die spezifisch kompetiert werden kann, ist mit ihrem berechneten relativen Molekulargewicht und einem Pfeil gekennzeichnet.

6.2 Vergleich der subzellulären Lokalisation von Myc-DJ-Like mit der von Don Juan

Die computerunterstützte Analyse der DJ-Like Primärstruktur zeigte sowohl die Möglichkeit der Kernlokalisierung des Proteins als auch die Möglichkeit der mitochondrialen Lokalisation auf. Um die DJ-Like Verteilung auf zellulärer Ebene zu verfolgen, wurden zur gewebespezifischen Expression eines Myc-markierten DJ-Like Proteins transgene Fliegenstämme etabliert. Die über Immunolokalisation verfolgte Expression des Fusionsproteins war zuerst in elongierten Spermatiden während der Kernkondensation nachweisbar. Das Myc-Don Juan-Like-Fusionsprotein war in diesem Stadium sowohl in den Kernen, als auch entlang der Flagellen detektierbar, wobei die Immunofluoreszenz entlang der Flagellen deutlich schwächer war. Der Expressionsbeginn und somit der Zeitpunkt der Aufhebung der Translationsrepression von *don juan* und *dj-like* waren somit derselbe. Im Unterschied zur Myc-DJ-Like-Expression war die DJ-Expression in diesem Stadium zuerst ausschließlich im Kern zu beobachten. Erst darauffolgend trat sie in den flagellaren Bereich der elongierten Spermatiden über. In der späten Postelongationsphase war Don Juan nur noch als Proteinkomponente des Flagellums detektierbar. Im Gegensatz hierzu war Myc-DJ-Like mit Beginn der Kernkondensation während der gesamten Postelongationsphase in Spermatidenköpfen nachweisbar. Während das DJ-Protein auch noch im Flagellum individualisierter Spermien detektierbar war, wurde DJ-Like in Keimzellen dieses Stadiums nicht mehr nachgewiesen. Vermutlich wurde das Protein während des Prozesses der Individualisierung in den Cystic bulges entfernt. Abbildung 6.4 vergleicht den zeitlichen Expressionsverlauf des Myc-DJ-Like Proteins mit der DJ-Expression während der Spermiogenese. Aufgrund des mitochondrialen Signalpeptids, das sich im N-terminalen Bereich des DJ-Like Proteins befindet, wird vermutet, dass das Myc-DJ-Like Protein entlang der Flagellen in den Mitochondrien lokalisiert ist. Allerdings ist auch denkbar, dass es mit anderen flagellaren Strukturen assoziiert ist. Sofort nach dem Import in die mitochondriale Matrix wird die Signalsequenz von einer Protease, der Signalpeptidase, abgeschnitten. Da das Myc-Protein N-terminal mit dem DJ-Like-Protein fusioniert ist, würde es bei diesem Vorgang abgespalten werden und würde somit in den Mitochondrien von DJ-Like getrennt detektiert werden. Andererseits kann es sein, dass das N-terminal fusionierte Myc-Protein die Erkennung des Signalpeptids durch die mitochondrialen Rezeptoren verhindert.

Diese Analysen zur Lokalisation des DJ-Like Proteins müssten mit einem C-terminalen Tag wiederholt werden oder mit DJ-Like spezifischen Antikörpern, um die Lokalisation des Proteins eindeutig festzulegen.

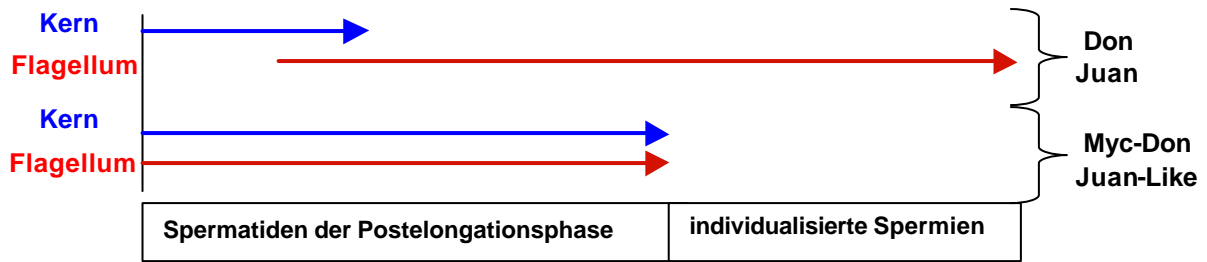


Abb. 6.4 Schematische Darstellung des zeitlichen Expressionsverlaufs des Myc-DJ-Like Proteins im Vergleich zur DJ-Expression während der Spermiogenese

Zu Beginn der Postelongationsphase ist das DJ-Protein mittels Immunofluoreszenz im Kern nachweisbar und im Anschluss daran im Flagellum. In individualisierten Spermien ist DJ im Flagellum detektierbar. Die Myc-DJ-Like Expression ist in Spermatiden der Postelongationsphase im Kern und im Flagellum zu finden.

6.3 Funktionsanalyse der Proteine DJ, DJ-Like und Min

6.3.1 Prämeiotische Expression von DJ und DJ-Like in Keimzellen

Das basische spezifisch in der männlichen Keimbahn von *Drosophila* exprimierte Protein Don Juan konnte sowohl in den Spermienköpfen postmeiotischer Stadien, als auch in den Flagellen detektiert werden (Santel *et al.*, 1998). Neben der Kolokalisation des Proteins mit dem Chromatin der Spermatiden während der Kernkondensationsphase konnte eine Assoziation mit den Mitochondrien nachgewiesen werden. Deshalb kann eine duale Funktion von DJ postuliert werden, welche einerseits eine Beteiligung des Proteins an dem Chromatinreorganisationsprozess (Kernkondensation), andererseits eine Funktion bezüglich der Mitochondrienmorphogenese gegen Ende der Spermiogenese einschließt.

Bei der Befruchtung gelangt das gesamte ca. 1,8 mm lange Spermium in die Eizelle (Karr, 1991; Pitnick *et al.*, 1995). Nach der Befruchtung ist das Fusionsprotein DJ-GFP (Santel *et al.*, 1997) immer noch entlang des Flagellums detektierbar (Fitch und Wakimoto, 1998). Deshalb ist auch denkbar, dass DJ eine Funktion im befruchteten Ei übernimmt.

Um Hinweise auf die endogene Funktion des DJ Proteins zu erhalten, wurde Don Juan verfrüht in prämeiotischen Stadien exprimiert.

Im Vorfeld wurde bereits das Fusionsprotein DJ-GFP in prämeiotischen Keimzellstadien ektopisch exprimiert. Das Fusionsprotein war in primären Spermatozyten und jungen Spermatiden des „onion-Stadiums“ mit Mitochondrien assoziiert vorzufinden (Santel, 1997; Blümer, 2000). In elongierten Spermatiden und reifen Spermien wurde Don Juan-GFP entlang des Flagellums detektiert (Santel,

1997; Blümer, 2000). Das endogene Don Juan Protein ist mit Beginn der Postelongationsphase in Spermatischen zuerst in den Kernen detektierbar und später entlang des Flagellums. Das GFP-markierte DJ-Protein ließ sich dagegen in keinem Zellstadium über GFP-Fluoreszenz in den Kernen der Keimzellen nachweisen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass möglicherweise der Kerntransport durch die Fusion des GFP an die Kernsignal-enthaltende C-terminale Domäne inhibiert wurde. Defekte, die nach verfrühter Don Juan-GFP-Expression beobachtet wurden, betrafen nur die postmeiotische Mitochondrienmorphogenese. Die verfrühte Expression von DJ-GFP hatte sehr heterogene Effekte zur Folge (Blümer, 2000). Es wurden teilweise missgebildete oder degenerierte Mitochondrien beobachtet. Da die GFP-Markierung eine Lokalisation des verfrüht exprimierten Fusionsproteins in Kernen zu verhindern schien, konnten durch die Fehlexpression verursachte potentielle Defekte der Kerne oder des Chromatins nicht analysiert werden.

Um Hinweise zur Funktion des endogenen DJ-Proteins im Kern zu erhalten, sollte das DJ-Protein ohne GFP verfrüht exprimiert werden. Ohne GFP sollte das fehlexprimierte DJ-Protein ebenso wie das endogene DJ in den Kern transferiert werden. Die verfrühte Expression von DJ-GFP in prämeiotischen Stadien wurde durch Deletion der Region +11 bis +114 der *don juan* 5'UTR erreicht. Da die Transkription aufgrund der Deletion dieses Leaderbereiches stark reduziert ist, wurde für die verfrühte Expression von DJ der *?2-tubulin* Promotor sowie die 5'UTR gewählt. Die verfrühte Expression von DJ hatte hinsichtlich der Morphologie und Differenzierung der Keimzellen keine Defekte und Störungen zur Folge. Es ist möglich, dass DJ für seine Funktion in postmeiotischen Stadien einen Interaktionspartner benötigt, der prämeiotisch noch nicht verfügbar ist. Da die DJ-Antikörper *in vivo* keine spezifische Detektion des endogenen Proteins mehr erlauben (Hempel, 2000; Hoffmann, 2000), konnte die verfrühte Expression von DJ nicht nachgewiesen werden. Die Überexpression von DJ könnte alternativ mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR (Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion) überprüft werden. Auf diese Weise kann zum einen die Präsenz und zum anderen die Menge der für das *?2-dj*-Transgen spezifischen mRNAs bestimmt werden. Hierzu müssen die aus Testes isolierten mRNAs für die Amplifikation mittels PCR zunächst in cDNA umgeschrieben werden (Reverse Transkription). Für diesen enzymatischen Vorgang werden Reverse Transkriptasen (RTasen) eingesetzt. Die entstehende komplementäre DNA (cDNA) kann dann für die PCR eingesetzt werden. Die Transkripte des *?2-dj*-Transgens können von dem endogenen DJ differenziert werden, da sich die 5'UTRs unterscheiden. Für die Amplifikation der cDNAs müssen somit unterschiedliche Primer verwendet werden. Mit Hilfe der PCR-Produkte könnte so das Mengenverhältnis der *?2-dj*-Transkripte zu den *don juan*-Transkripten bestimmt werden.

Das unter der Kontrolle des *γ2-tubulin* Promotors prämeiotisch exprimierte Fusionsprotein Myc-DJ-Like konnte im Zytoplasma von Spermatozyten detektiert werden. In frühen postmeiotischen Spermatozytenstadien wurde Myc-DJ-Like in den mitochondrialen Nebenkernstrukturen nachgewiesen. Folglich kann postuliert werden, dass ebenso wie DJ auch DJ-Like in den Flagellen mit Mitochondrien assoziiert ist. Es wird vermutet, dass das in Spermatozyten exprimierte Fusionsprotein spätestens in Spermatozyten des Nebenkernstadiums in die Mitochondrien importiert wird und während der weiteren Keimzeldifferenzierung mit ihnen stabil assoziiert bleibt. Auch hier ist zu berücksichtigen, dass Myc nach dem Transport des Fusionsproteins in die Mitochondrien in der mitochondrialen Matrix zusammen mit dem Signalpeptid sehr wahrscheinlich abgespalten wird. Die Lokalisation des Fusionsproteins in Nebenkernen zeigt aber, dass die N-terminale Fusion mit dem Myc-Protein den Transport in Mitochondrien nicht verhindert. Somit stört die Fusion sehr wahrscheinlich nicht die Erkennung des Signalpeptids.

Während das postmeiotisch exprimierte Fusionsprotein Myc-DJ-Like in elongierten Spermatozyten sowohl in den Kernen als auch in den Flagellen detektiert werden konnte, war das verfrüht exprimierte Myc-DJ-Like Protein in prämeiotischen und frühen postmeiotischen Zellen nicht in den Kernen zu finden. Vermutlich sind Faktoren, die für den Kernimport benötigt werden erst ab dem Stadium elongierter Spermatozyten verfügbar. Es konnten histologisch keine Störungen der Keimzeldifferenzierung nach ektopischer Myc-DJ-Like-Expression festgestellt werden. Es bleibt zu klären, ob DJ-Like seine Funktion prämeiotisch aufgrund fehlender Interaktionspartner und/oder fehlender Faktoren für den Kernimport nicht ausüben kann und deshalb auch keine Auswirkungen zu beobachten waren oder ob in prämeiotischen Zellen funktionell aktives Myc-DJ-Like Protein keine Störungen der Spermatogenese hervorruft.

Aufgrund der transienten Lokalisation von Don Juan und Myc-DJ-Like in den Kernen der Spermatozyten kann eine Beteiligung beider Proteine am Chromatinkondensationsprozess postuliert werden. Von einer solchen Funktion der Proteine ausgehend wäre eine Veränderung des Chromatins durch prämeiotische DJ- und DJ-Like-Expression zu erwarten gewesen. So hätten die Proteine beispielsweise eine verfrühte Verdichtung der Chromatinstrukturen bewirken können. Dies hätte sich wiederum reprimierend auf die Genexpression auswirken können. Eine Voraussetzung hierfür wäre allerdings die Lokalisation der ektopisch exprimierten Proteine in den Kernen prämeiotischer und früher postmeiotischer Zellen gewesen.

In Mäusen initiieren Transitionsproteine die Kernkondensation, die später von Protaminen vollendet wird. Während einige Säuger nur ein *protamin* Gen besitzen (Dadoune, J.P., 2003), sind in Mäusen und Menschen zwei *protamin* Gene

vorhanden, die beide für die Fertilität wichtig sind (Cho *et al.*, 2001). Wie *don juan* und *dj-like* wird auch das *protamin1* Gen in Mäusen translational reguliert. Um zu klären, ob eine zeitlich korrekte Translation des *protamin 1* Gens für einen nativen Ablauf der Spermatogenese notwendig ist, wurden transgene Mäuse erzeugt, die Protamin 1 in runden Spermatiden verfrüht exprimierten. Die verfrühte Translation verursachte eine frühzeitige Chromatinkondensation in Spermatiden. Die transgenen Mäuse wiesen in Spermatiden später Stadien eine abnormale Kopfmorphogenese auf und konnten keine reifen Spermien produzieren. Allerdings beeinflusste die verfrühte Translation von *protamin 1* die Transkription anderer postmeiotisch exprimierter Gene nicht negativ (Lee *et al.*, 1995). Die Transkription wird durch Linker-Histone *in vivo* ebenfalls nicht generell reprimiert (Prymakowska-Bosak *et al.*, 1996; Shen und Gorovsky, 1996; Steinbach *et al.*, 1997). Es konnte zum Beispiel der Nachweis erbracht werden, dass die Überexpression des somatischen Histon H1 im Tabak zwar zu einer deutlichen Zunahme der Chromatinkondensation führt, aber die grundlegenden zellulären Funktionen dadurch nicht beeinträchtigt werden (Prymakowska-Bosak *et al.*, 1996)

6.3.2 Sind die ektopisch in Speicheldrüsen exprimierten Proteine Myc-DJ und Myc-DJ-Like mit dem Chromatin assoziiert?

Myc-DJ-Like und Don Juan sind während der Chromatinkondensation im Spermatidenkopf detektierbar. Es ist daher denkbar, dass beide Proteine an diesem Prozess funktionell beteiligt sind. Desweiteren wird vermutet, dass beide Proteine entlang der Flagellen mit mitochondrialen Strukturen assoziiert sind. Zum Nachweis einer Assoziation mit Mitochondrien oder Kernstrukturen wurde Myc-Don Juan und Myc-DJ-Like in Speicheldrüsen exprimiert. Die ektopische Expression der Fusionsproteine in Speicheldrüsen hatte keine Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der Larven oder der adulten Fliegen. Mit Hilfe einer Anti-Myc-Antikörperfärbung konnten die Fusionsproteine eindeutig in den Kernen der Speicheldrüsen nachgewiesen werden. Im Fall einer funktionellen Beteiligung beider Proteine an dem Prozess der Chromatinkondensation, sollten beide Proteine mit den Polytäanchrosomen assoziiert vorzufinden sein. Ob tatsächlich eine Assoziation der Fusionsproteine mit dem Chromatin vorliegt, soll in laufenden Experimenten mit Hilfe einer anti-Myc-Antikörperfärbung an Polytäanchrosomen überprüft werden. Da eine schwache Färbung des Zytoplasmas beobachtet wurde, sollte in zukünftigen Experimenten überprüft werden, ob die Fusionsproteine zusätzlich in geringerer Menge in den Mitochondrien lokalisiert sind. Hierzu könnte an Speicheldrüsen neben einer anti-Myc-Antikörperfärbung eine Färbung mit einem Mitotracker-Farbstoff, der spezifisch Mitochondrien färbt, durchgeführt werden.

6.3.3 Sind die ektopisch in Augenimaginalscheiben exprimierten Proteine Myc-DJ-Like und Myc-DJ in den Kernen lokalisiert?

Die ektopische Expression von Myc-DJ und Myc-DJ-Like in Augenimaginalscheiben hatte Defekte der Komplexaugen zur Folge. Insbesondere konnte der Verlust von Ommatidien beobachtet werden. Im Fall einer funktionellen Beteiligung der Proteine DJ und DJ-Like an der Chromatinkondensation auch in somatischen Zellen sind morphologische Defekte nach Expression beider Proteine in Augenimaginalscheiben zu erwarten. Die beobachteten Defekte sind sehr wahrscheinlich auf kondensiertes oder teilweise kondensiertes Chromatin der Augenimaginalscheiben zurückzuführen. Das hätte zur Folge, dass Gene, die für die korrekte Entwicklung der Augen notwendig sind, nicht transkribiert werden können. Voraussetzung hierfür wäre die Lokalisation der Fusionsproteine in den Kernen der Augenimaginalscheiben. Die Lokalisation beider Fusionsproteine in den Kernen der Augenimaginalscheibe soll in künftigen Experimenten mit Hilfe von anti-Myc Antikörperfärbungen überprüft werden.

6.3.4 Reverse Genetik in *Drosophila*

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist seit mehr als 90 Jahren ein wichtiger Modellorganismus für genetische Studien. Die Analyse der veröffentlichten Genomsequenz von *Drosophila* führte zu der Vorhersage von mehr als 13600 Genen (Adams *et al.*, 2000). In der bisher veröffentlichten Literatur wurden nur ca. 20% der Gene diskutiert und nur ca. 10 % der Gene wurden mit Hilfe von genetischen Methoden charakterisiert. Es ist deshalb eine notwendige Aufgabe die Funktion neu entdeckter Gene aufzuklären. Die beste Möglichkeit hierfür ist die Inaktivierung des Gens. Die Auswirkungen der Inaktivierung auf den Phänotyp können studiert werden, wobei der Mutanten-Phänotyp Rückschlüsse auf die Funktion des inaktivierten Gens erlaubt. Die selektive Ausschaltung eines Gens wird als reverse Genetik bezeichnet. In vielen Modellorganismen, wie z.B. Maus oder Hefe, wird die Inaktivierung eines Gens durch homologe Rekombination erreicht. In *Drosophila* fehlt zur Zeit noch ein effizientes Knock Out-System mit welchem gezielt einzelne Gene mutagenisiert werden können. Von Rong und Golic wurde im Jahr 2000 eine Knock Out-Methode für *Drosophila* vorgestellt (Rong und Golic, 2000; Rong und Golic, 2001; Rong *et al.*, 2002). Diese hat aber bisher aufgrund noch sehr mangelhafter Effizienz keine breite Anwendung gefunden.

Mutationen können demzufolge nur zufällig mit Hilfe von Mutagenese-Experimenten in *Drosophila* erzeugt werden. Zur Mutagenisierung der Gene *don juan*, *dj-like* und *min* wurde eine Mutagenese mit dem Mutagen Ethylmethansulfonat durchgeführt

(Lewis und Bacher, 1968). Da EMS vorzugsweise Punktmutationen erzeugt, könnten durch selektive Mutagenisierung von Genbereichen, die unterschiedliche funktionelle Proteindomänen betreffen, verschiedene Allele eines Gens erzeugt werden. Dies hätte den Vorteil, dass möglicherweise verschiedene Funktionen des mutagenisierten Genprodukts getrennt analysiert werden könnten. 1950 mutagenisierte Fliegenlinien wurden auf Allelie gegenüber der *dj*-, *dj-like*- und *min*-defizienten Fliegenlinie 1833 getestet, wobei auf männliche Sterilität selektioniert wurde. Die EMS-mutagenisierten Fliegenlinien I 54 und B 99 erwiesen sich gegenüber der Linie 1833 als allelisch. Sequenzanalytisch konnte aber keine Mutation in den Genen *dj* oder *min* festgestellt werden. Auch das Gen *dj-like* war nicht betroffen (Rathke, 2003).

6.3.4.1 Die durchgeführte EMS-Mutagenese war nicht sättigend

Die meisten G/C-Nukleotidpaare sind potentielle Angriffsziele für das chemische Mutagen EMS. Die Frequenz mit der ein Gen mutiert wird, hängt daher von der Größe des selben ab, aber auch von der Anzahl der funktionell relevanten Basenpaare, welche die Kodierungsregion enthält, sowie von der Größe der notwendigen genregulatorischen Region. Ein kleines Gen wird folglich seltener mutiert als ein Großes. Mit einer cDNA-Größe von 744 bp, 858 bp und 1734 bp stellen *don juan*, *don juan-like* und *min* kleine Gene dar. Die Wahrscheinlichkeit, dass in der durchgeführten Mutagenese alle innerhalb der Defizienz 1833 lokalisierten Gene mutagenisiert wurden, ist sehr gering, denn nur 1950 mutierte Chromosomen wurden gegenüber der Defizienz 1833 untersucht. Hierbei wurde nur eine sterile und eine semisterile Fliegenlinie mit stark reduzierter Fertilität erhalten, obwohl von 14 der Gene, die in der Defizienz lokalisiert sind, ESTs aus adulten Testes existieren, z.B. *dj*, *dj-like* und *min*. 14 mutagenisierte Fliegenlinien zeigten gegenüber der Defizienz einen embryonal letalen Phänotyp. Insgesamt werden aber 37 der in der Defizienz lokalisierten Gene bereits im Embryo exprimiert und könnten daher für die Lebensfähigkeit des Organismus essentiell sein. Von 17 der 37 Gene existieren zu embryonaler Letalität führende Allele. Eine sättigende, d.h. eine alle Gene erfassende, Mutagenese des 3. Chromosoms wurde 1984 von Jürgens *et al.* durchgeführt. Hierzu waren 14000 auf dem 3. Chromosom mutagenisierte Fliegenlinien hergestellt worden und es konnten von jedem embryonal letalen Gen durchschnittlich 4,5 Allele erzeugt werden. Die beiden bei der Mutagenese erzeugten sterilen, bzw. semisterilen Linien I 54 und B 99 waren weder untereinander allelisch noch zeigten sie Allelie zu den zwei in der Defizienz lokalisierten Genen *rotund* und *?-tubulin84B*, die bei Mutation zu männlicher Sterilität führen können (Couso und

Bishop, 1998; Hays *et al.*, 1998). Die sequenzanalytische Untersuchung beider Linien zeigte, dass keine Mutationen innerhalb der Gene *dj*, *dj-like* und *min* vorhanden waren. Bei einer sättigenden Mutagenese hätten nicht nur *don juan*, *dj-like* und *min* Allele, sondern auch zu Sterilität führende Allele der Gene *rotund* und *?-tubulin84B* detektiert werden müssen. Allerdings können Allele der Gene *rotund* und *?-tubulin84B* auch zu Letalität führen. Die Linien I 54 und B 99 scheinen somit Mutationen in anderen in der Defizienz 1833 lokalisierten Genen zu tragen, die ebenfalls im Testis exprimiert werden und für die Spermatogenese essentiell sind.

6.3.4.2 Sind Don Juan und Don Juan-Like funktionell redundant?

Wie bereits erwähnt kann aus der beschriebenen Ähnlichkeit der Gene *dj* und *dj-like* empirisch geschlossen werden, dass die Transkriptionseinheiten aus einer Genduplikation hervorgegangen sind und somit eine gemeinsame Vorläufersequenz besitzen. Solche Gene haben meist vergleichbare Funktionen. Beide Proteine können sich jedoch auch divergent entwickelt haben. Für eine identische, gemeinsame oder ähnliche Funktion spricht die sehr ähnliche subzelluläre Lokalisation der beiden testisspezifischen Proteine. Beide Proteine besitzen im C-terminalen Bereich ein putatives Kernlokalisierungssignal und im N-terminalen Bereich ein präsumtives Mitochondrien-Lokalisierungssignal, sowie eine Konsensussequenz für die Spaltung durch die mitochondriale Peptidase und konnten entlang des Flagellums elongierter Spermatiden detektiert werden, sowie im Spermatidenkopf während der Chromatinkondensationsphase. Allerdings konnte Don Juan im Gegensatz zu DJ-Like im Flagellum reifer Spermien nachgewiesen werden.

Alternativ zur EMS-Mutagenese wurde mit Hilfe von RNA Interferenz (RNAi) versucht den Funktionsverlust des *don juan* Gens durch posttranskriptionales „Gene-Silencing“ herbeizuführen. RNAi wurde bereits in verschiedenen Organismen wie Pflanzen, Nematoden, *Drosophila*, Zebrafisch und Mäusen erfolgreich angewendet (Baulcombe, 1999; Fire *et al.*, 1998; Kennerdell und Carthew 1998; Zamore *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). Die natürliche Funktion der RNAi scheint zu sein, das Genom gegen die Invasion von mobilen genetischen Elementen wie Transposons oder Viren, die sobald sie aktiv werden aberrante RNA oder dsRNA in der Wirtszelle produzieren, zu schützen (Jensen *et al.*, 1999; Ketting *et al.*, 1999; Ratcliff *et al.*, 1999; Tabara *et al.*, 1999; Malinsky *et al.*, 2000). Die spezifische Zerstörung der mRNA verhindert die Replikation des Transposons oder des Virus. Allerdings können einige Viren den Degradationsprozess verhindern, indem sie Proteine exprimieren, die das posttranskriptionale „Gene-Silencing“ unterdrücken (Anandalakshmi *et al.*,

2000; Lucy *et al.*, 2000; Voinnet *et al.*, 2000). RNAi erfordert die Applikation Transkript-spezifischer, doppelsträngiger RNA-Moleküle (dsRNA) (Fire *et al.*, 1998). Applizierte dsRNA wird im Organismus von der RNase Dicer erkannt. Das Enzym spaltet dsRNA als Dimer in ca. 22 Nukleotide lange siRNAs (small interfering RNAs) (Bernstein *et al.*, 2001; Blaszczyk *et al.*, 2001). Die siRNAs gelangen schließlich zu dem Effektor Komplex RISC (RNA-induced silencing complex), der die siRNAs benutzt um die homologe mRNA zu finden und zu degradieren (Hammond *et al.*, 2000). Ein für *Drosophila* etablierter Weg zur Einschleusung von dsRNA in den Organismus ist die Injektion von *in vitro*-synthetisierter doppelsträngiger RNA in *Drosophila*-Embryonen (Misquitta und Paterson, 1999). Mutationen von Genen wie *frizzled*, *even-skipped* und *fushi tarazu*, die zu embryonalen Phänotypen führen, konnten auf diese Weise phänotypiert werden (Kennerdell und Carthew, 1998). Der Vorteil der Microinjektion von dsRNA in den Embryo ist, dass sowohl die maternale mRNA, als auch die zygotisch exprimierte mRNA degradiert wird. Die dsRNA Injektion ermöglicht es daher sowohl die zygotischen Funktionen von Genen als auch Funktionen der maternalen Komponente aufzuklären (Kennerdell und Carthew, 1998; Bhat *et al.*, 1999). Ein Nachteil der Injektion von dsRNA ist allerdings, dass die Penetranz der embryonal induzierten RNAi-Effekte im Laufe der Entwicklung sukzessive abnimmt, so dass nach dsRNA-Injektion nur in sehr seltenen Fällen adulte Phänotypen erzeugt werden konnten (Fire *et al.*, 1998; Timmons und Fire, 1998; Misquitta und Paterson, 1999). Als Alternative zu dsRNA-Injektionsexperimenten ist es möglich RNAi-Effekte mit Hilfe eines Transgens zu induzieren. Ein Vorteil ist, dass hierbei die Stadienspezifität umgangen werden kann. Mit Hilfe stabil in das Genom integrierter Transgene, welche aus zwei invertierten identischen Sequenzen bestehen (IR-Konstrukte) und die Expression sowie die Bildung doppelsträngiger RNA *in vivo* ermöglichen, konnten bereits mehrfach in *C. elegans*, *Arabidopsis* und *Drosophila melanogaster* Phänotypen erzeugt werden (Giordano *et al.*, 2002; Fortier und Belote, 2000; Lam und Thummel, 2000; Piccin *et al.*, 2001; Tavernarakis *et al.*, 2000). Die Klonierungsrate invertierter identischer Sequenzen in *E.coli* ist äußerst ineffizient (Fortier und Belote, 2000; Tavernarakis *et al.*, 2000; Piccin *et al.*, 2001). Durch Einführung einer organismusfremden DNA-Sequenz, die als Spacer fungiert, kann die Effizienz extrem gesteigert werden (Piccin *et al.*, 2001). Werden die palindromischen identischen Sequenzen durch einen Spacer getrennt, so besteht die Möglichkeit, dass die RNA durch Faltung eine doppelsträngige Haarnadelschleifen-Struktur bildet (Piccin *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde für die Klonierung des *don juan*-RNAi-Konstruktes *?2 tubulin dj-GFP-dj* als Spacer ein 330 bp langes eGFP-Fragment verwendet. Mit Hilfe eines Fliegenstammes, der das Fusionsprotein Don Juan-GFP unter der Kontrolle des *don juan*-Promotors exprimierte, konnte gezeigt werden, dass die Expression des *?2-*

tubulin dj-GFP-dj-Konstruktes tatsächlich ein „Gene-silencing“ von *don juan* bewirkt. Fehlende Phänotypen in transgenen Fliegen, die das Konstrukt *?2 tubulin dj-GFP-dj* im Genom integriert tragen, können daher entweder darauf zurückgeführt werden, dass der Funktionsverlust von *don juan* keine Entwicklungsstörungen in der Spermatogenese bewirkt, oder aber, dass die Funktion von *don juan* redundant ist. Ein Kandidatengen, das *don juan* funktionell ersetzen könnte, wäre *dj-like*.

6.3.5 Potentielle Funktionen von Don Juan, Don Juan-Like und Ausblick

Wie bereits erwähnt wird für Don Juan eine duale Funktion in mitochondrialen Strukturen des Flagellums sowie im Spermatidenkern postuliert. Auch Myc-DJ-Like konnte in frühen postmeiotischen Spermatid-Stadien in mitochondrialen Nebenkernstrukturen nachgewiesen werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass auch DJ-Like wie Don Juan entlang des Spermatidflagellums mit mitochondrialen Strukturen assoziiert ist und eine Funktion während der Mitochondrienmorphogenese ausführt. Neben der funktionellen Beteiligung von Don Juan und Don Juan-Like an den Prozessen der Mitochondriendifferenzierung, wird für beide Proteine eine Funktion bezüglich der Chromatinkondensation vermutet. Für Don Juan konnte eindeutig eine Kolokalisation mit dem Chromatin während der Kernkondensationsphase nachgewiesen werden (Santel *et al.*, 1998). Unter der Kontrolle des *dj-like* Promotors exprimiertes Myc-DJ-Like wurde in den Spermatidenköpfen während der Chromatinkondensation nachgewiesen. Eine eindeutige Kolokalisation mit dem Chromatin während der Kernkondensationsphase wurde nach verfrühter Expression des Fusionsproteins festgestellt. Für beide Proteine wurde eine Rolle als Transitionsprotein während der Chromatinkondensation in Erwägung gezogen. Transitionsproteine sind intermediäre Proteine, die während der Elongations- und Kondensationsphase der Spermiogenese bei vielen Säugern die Kernkondensation initiieren und die Histone ersetzen (Meistrich *et al.*, 2003). Die Kernkondensation wird später durch Protamine vollendet, die die Transitionsproteine ersetzen. In *Drosophila* wurden zwei Gene identifiziert, *Mst35Ba* und *Mst35Bb*, die Homologie zu Protaminen zeigen (Russell und Kaiser, 1993; Andrews *et al.*, 2000). Kürzlich konnte mit Hilfe von *Mst35Ba*- und *Mst35Bb*-GFP Fusionsproteinen der Nachweis erbracht werden, dass beide Gene tatsächlich für Protamine kodieren und dass diese die Hauptkomponente des Spermienchromatins darstellen (Jayaramaiah und Renkawitz-Pohl, eingereicht). Gene, die homologe Proteine von Transitionsproteinen kodieren, konnten im Genom von *Drosophila* nicht gefunden werden. Mit Hilfe einer Fliegenlinie, die ein für Histon H2A-GFP kodierendes Transgen trägt (Clarkson und Saint, 1999), konnte gezeigt

werden, dass das Histon H2A in elongierten Spermatiden mit nadelförmigen Kernen nicht mehr nachweisbar ist. Die GFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins wird während des als „bananenförmig“ bezeichneten Kernstadiums schwächer. In diesem Stadium haben sich die Spermatidenkerne bereits an einer Seite deutlich abgeflacht und erscheinen „bananen-“ oder „kanuförmig“ (Fuller, 1993). In späteren Stadien ist die Fluoreszenz verschwunden. Beide *Drosophila* Protamin-GFP Fusionsproteine kolokalisieren mit dem Chromatin bereits während der Chromatinkondensation, wenn die Spermatidenkerne „bananenförmig“ erscheinen (Jayaramaiah und Renkawitz-Pohl, eingereicht). Folglich scheinen die Histone in *Drosophila* direkt durch die Protamine ersetzt zu werden und in *Drosophila* keine Transitionsproteine zu existieren.

Zeitgleich mit den Protaminen können auch die Proteine Myc-DJ-Like und Don Juan detektiert werden. Ebenso wie die Protamine kolokalisieren sie mit dem Chromatin während des als „bananenförmig“ bezeichneten Kernstadiums. Im Gegensatz zu den Protaminen können die Proteine Myc-DJ-Like und Don Juan in den Kernen individualisierter Spermien nicht mehr nachgewiesen werden, sondern sind nur transient während der Chromatinkondensation im Spermatidenkopf detektierbar. Eine Funktion als Transitionsproteine kann somit für Don Juan und DJ-Like ausgeschlossen werden. Es ist aber möglich, dass die Proteine Don Juan und DJ-Like eine unterstützende Funktion bei der Initiation der Kernkondensation ausüben.

Wie kann eine Funktion der Proteine Don Juan und DJ-Like im Kern während der Chromatinkondensation mit einer Funktion in den Mitochondrien vereinbart werden? Kernkodierte basische Proteine können als chromatinorganisierende Komponenten der mitochondrialen DNA fungieren. Beispielsweise wurden drei kernkodierte, basische Histon-H1-ähnliche Proteine mit einer putativen Mitochondrien-Import-Sequenz aus dem Trypanosomen *Crithidia fasciculata* isoliert. Diese Proteine binden an mitochondriale DNA und können ihre Chromatinkondensation *in vitro* bewirken. Die mitochondriale DNA der Trypanosomen (Kinetoplast DNA) besteht aus „Minicircles“ und „Maxicircles“, die miteinander verkettet sind und in der Zelle als kompakte Struktur vorliegen. Es wird vermutet, dass die drei Proteine, die mit dieser Struktur kolokalisieren, eine Rolle bei der Organisation und Segregation der kDNA (Kinetoplast DNA) spielen (Xu *et al.*, 1996). Wie für DJ und DJ-Like wird auch für das Histon H1 des Seeigels *Paracentrotus lividus* eine duale Funktion postuliert. Das H1 Protein ist an der Chromatinorganisation im Kern beteiligt und stellt zusätzlich ein Protein des Spermienflagellums dar. Als axonemale Komponente stabilisiert es flagellare Mikrotubuli (Multigner *et al.*, 1992). Es ist also möglich, dass ein Protein mehrere Funktionen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle übernehmen kann. Eine duale Lokalisation von Proteinen, die sowohl ein Kern- als auch ein Mitochondrienlokalisierungssignal besitzen, wurde für verschiedene Proteine

nachgewiesen. Beispielsweise konnte eine Lokalisation in Kern und Mitochondrien für die humane Topoisomerase III β (Wang *et al.*, 2002), die humane RNA Helicase MDDX28 (Valgardsdottir *et al.*, 2001; Valgardsdottir und Prydz, 2003) und das Hefe Protein Nfs1p, das in Mitochondrien an der Eisen-Schwefel Protein Biosynthese beteiligt ist und notwendig ist für das Zell-Wachstum, nachgewiesen werden. Die Funktion von Nfs1p im Nukleus ist essentiell für das Überleben der Zellen (Nakai *et al.*, 2001). Auch das Reparatur Enzym Apn1p aus der Hefe besitzt eine Mitochondrien- und eine Kernlokalisierungssequenz. Der Transport dieses Proteins in die Mitochondrien, wo es wahrscheinlich an der Reparatur mitochondrialer DNA beteiligt ist, wird durch Interaktion des C-terminalen Proteinendes mit dem Protein Pir1p gefördert (Vongsamphanh *et al.*, 2001). Ein weiteres Beispiel für die duale Lokalisation von Proteinen in Kern und Mitochondrien ist Kanadaptin, ein Protein bislang unbekannter Funktion, das in den Nieren von Ratten exprimiert wird und nukleare Export-Aktivität besitzt (Hubner *et al.*, 2003).

Die duale Funktion von DJ und DJ-Like im Kern und in Mitochondrien und ebenso die Funktion von Min kann am Besten über eine phänotypische Analyse genspezifischer Mutanten geklärt werden. Die Suche nach genspezifischen Mutanten und deren Charakterisierung steht somit weiter im Mittelpunkt der funktionellen Analyse. Homologe Rekombination stellt eine erst vor kurzem von Rong und Golic für *Drosophila* vorgestellte Methode zur Erzeugung genspezifischer Mutanten dar. Hierbei wird zunächst über eine Standard-P-Element-Keimbahntransformation ein Donor-Konstrukt in das Genom von *Drosophila* eingebracht. Dieses Konstrukt enthält eine dem zu mutagenisierenden Zielgen homologe Region, in welcher aber eine Mutation enthalten ist. In der Fliege kann dann mit Hilfe von zwei ebenfalls transgen vorliegenden Hefeenzymen, einer Flip-Rekombinase und der I-SceI-Endonuklease, die Rekombination der Genkopie in den Zielgen-Lokus erfolgen. Die Flip-Rekombinase katalysiert hierbei zunächst die Rekombination zwischen den an beiden Enden des Donor-Konstrukts lokalisierten FRTs (Flip-Rekombinase Targets). Hierdurch wird eine zirkuläre DNA ausgeschnitten, die die homologe Gensequenz enthält. Durch Expression des I-SceI-Enzyms *in vivo* wird die zirkuläre DNA geschnitten, wodurch ein lineares Fragment entsteht. Die Enden des Doppelstrangbruchs sind homolog zum Zielgen. Das linearisierte Donorgen kann nun das Zielgen finden und rekombinieren (Rong und Golic, 2000; Rong und Golic, 2001, Rong *et al.*, 2002). Der Vorteil der Methode besteht darin, dass die Zielgene direkt und gezielt mutagenisiert werden können. Wie bereits erwähnt stellte sich die Effizienz der Methode bisher noch als zu gering dar.

Da die Möglichkeit besteht, dass die Funktionen von DJ und DJ-Like redundant sind, wäre es sinnvoll Mutanten zu erzeugen, in denen beide Gene mutiert sind. Neben der sukzessiv oder parallel durchgeführten homologen Rekombination ist RNAi eine

geeignete Technik zur Ausschaltung beider Genfunktionen. Hierzu müsste eine transgene Fliegenlinie hergestellt werden, die nicht nur ein *don juan*-IR-Konstrukt im Genom integriert trägt, sondern zusätzlich ein *dj-like*-IR-Transgen. Die durch Transkription beider Konstrukte entstandenen dsRNAs würden ein posttranskriptionales „Gene-Silencing“ der Gene *dj* und *dj-like* bewirken.

7. Literaturverzeichnis

- Adams,M.D., Celniker,S.E., Holt,R.A., Evans,C.A., Gocayne,J.D., Amanatides,P.G., Scherer,S.E., Li,P.W., Hoskins,R.A., Galle,R.F., George,R.A., Lewis,S.E., Richards,S., Ashburner,M., Henderson,S.N., Sutton,G.G., Wortman,J.R., Yandell,M.D., Zhang,Q., Chen,L.X., Brandon,R.C., Rogers,Y.H., Blazej,R.G., Champe,M., Pfeiffer,B.D., Wan,K.H., Doyle,C., Baxter,E.G., Helt,G., Nelson,C.R., Gabor,G.L., Abril,J.F., Agbayani,A., An,H.J., Andrews-Pfannkoch,C., Baldwin,D., Ballew,R.M., Basu,A., Baxendale,J., Bayraktaroglu,L., Beeson,K.Y., Benos,P.V., Berman,B.P., Bhandari,D., Bolshakov,S.,Borkova,D., Botchan,M.R., Bouck,J., Brokstein,P., Brottier,P., Burtis,K.C., Busam,D.A., Butler,H., Cadieu,E., Center,A., Chandra,I., Cherry,J.M., Cawley,S., Dahlke,C., Davenport,L.B., Davies,P., de Pablos,B., Delcher,A., Deng,Z., Mays,A.D., Dew,I., Dietz,S.M., Dodson,K., Doup,L.E., Downes,M., Dugan-Rocha,S., Dunkov,B.C., Dunn,P., Durbin,K.J., Evangelista,C.C., Ferraz,C., Ferreira,S., Fleischmann,W., Fosler,C., Gabrielian,A.E., Garg,N.S., Gelbart,W.M., Glasser,K., Glodek,A., Gong,F., Gorrell,J.H., Gu,Z., Guan,P., Harris,M., Harris,N.L., Harvey,D., Heiman,T.J., Hernandez,J.R., Houck,J., Hostin,D., Houston,K.A., Howland,T.J., Wei,M.H., Ibegwam,C., Jalali,M., Kalush,F., Karpen,G.H., Ke,Z., Kennison,J.A., Ketchum,K.A., Kimmel,B.E., Kodira,C.D., Kraft,C., Kravitz,S., Kulp,D., Lai,Z., Lasko,P., Lei,Y., Levitsky,A.A., Li,J., Li,Z., Liang,Y., Lin,X., Liu,X., Mattei,B., McIntosh,T.C., McLeod,M.P., McPherson,D., Merkulov,G., Milshina,N.V., Mobarry,C., Morris,J., Moshrefi,A., Mount,S.M., Moy,M., Murphy,B., Murphy,L., Muzny,D.M., Nelson,D.L., Nelson,D.R., Nelson,K.A., Nixon,K., Nusskern,D.R., Pacleb,J.M., Palazzolo,M., Pittman,G.S., Pan,S.,Pollard,J., Puri,V., Reese,M.G., Reinert,K., Remington,K.,Saunders,R.D., Scheeler,F., Shen,H., Shue,B.C., Sidenkiamos,I.,Simpson,M., Skupski,M.P., Smith,T., Spier,E., Spradling,A.C., Stapleton,M., Strong,R., Sun,E., Svirskas,R., Tector,C., Turner,R.,Venter,E., Wang,A.H., Wang,X., Wang,Z.Y., Wassarman,D.A., Weinstock,G.M., Weissbach,J., Williams,S.M., WoodageT, Worley,K.C., Wu,D., Yang,S., Yao,Q.A., Ye,J., Yeh,R.F., Zaveri,J.S., Zhan,M., Zhang,G., Zhao,Q., Zheng,L., Zheng,X.H., Zhong,F.N., Zhong,W., Zhou,X., Zhu,S., Zhu,X., Smith,H.O., Gibbs,R.A., Myers,E.W., Rubin,G.M. and Venter,J.C. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster* *Science* **287**: 2185-2195
- Albright, S.R., and R.Tjian (2000). TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm oldest ideas. *Gene* **242**: 1-13
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, Jr., J.M., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V.B. (2000) A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene-silencing in plants. *Science* **290**: 142-144
- Andrews, J., Bouffard, G.G., Cheadle, C., Lu, J., Becker, K.G., and oliver, B. (2000) Gene discovery using computational and microarray analysis of transcription in the testis. *Genome Res.* **10**: 2030-2043
- Arkhipova, I.R. and Ilyin, Y. (1991) Properties of promoter regions of mdg 1 *Drosophila* retrotransposon indicate that it belongs to a specific class of promoters. *EMBO J.* **10**: 1169-1177.
- Armstrong, C.G., Mann, D.J., Berndt, N. and Cohen, P.T.W. (1995). *Drosophila* PPY, a novel male specific protein serine/threonine phosphatase localised in somatic cells of the testis. *J. Cell Sci.* **108**: 3367-3375.
- Ashburner, M., Aaron, C. S., Tsubota, S. (1982) The genetics of a small autosomal region of *Drosophila melanogaster*, including the structural gene for Alcohol Dehydrogenase. V. Characterization of X-ray-induced Adh null mutations. *Genetics* **102**: 421-435.
- Ashburner, M. (1989) *Drosophila*: A laboratory handbook. CSH Laboratory Press
- 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**: 2841-2852

Balhorn, R., Weston, S., Thomas, C. and Wyrobek, A.J. (1984)

DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins.
Exp. Cell. Res. **150**: 298-308

Barkoff, A., Ballantyne, S., Winckens, M. (1998)

Meiotic maturation in *Xenopus* requires polyadenylation of multiple mRNAs.
EMBO J. **17**: 3168-3175

Barolo, S., Carver, L.A., Posakony, J. W. (2000).

GFP and β -Galactosidase transformation vectors for Promoter/enhancer analysis in *Drosophila*.
Development **110**: 791-804.

Bartel, D. P. (2004)

MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanisms and Function.
Cell **116**: 281-297

Bath, M.A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K., Choi, K., Bellen, H.J. (1999)

Discs lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity.
Cell **96**: 833-845.

Baulcombe, D. (1999)

Gene silencing: RNA makes RNA makes no protein.
Curr. Biol. **9**: R599-601

Baulcombe, D. (2002)

DNA events. An RNA microsom.
Science **297**: 2002-2003

Berk and Sharp (1977)

Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids.
Cell **12**: 721-732

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001)

Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.
Nature **409**: 363-366

Bialojan, S., Falkenburg, D, Renkawitz-Pohl, R. (1984)

Characterization and developmental expression of β tubulin genes in *Drosophila melanogaster*.
EMBO J. **3**: 2543-2548

Birboim, H.C. and Doly, J. (1997).

A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. **7**: 1513-1523.

Birney, E., Kumar, S., and Krainer, A.R. (1993)

Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors.
Nucleic Acids Res. **21**: 5803-5816

Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunenko, M., Routzahn, K.M., Waughs, D.S., Court, D.L., Ji, X. (2001)

Crystallographic and modelling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage.
Structure **12**: 457-466

Blümer, N. (1996)

Translationsregulation in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*. Nachweis der postmeiotischen Expression des *don juan*-Gens.
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg

Blümer N. (2000)

Das *don juan*-Gen in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*. Analyse eines extrem kurzen Transkriptionskontrollbereichs und eines Translationsrepressionselementes in der 5'-UTR sowie erste funktionelle Hinweise
Dissertation, Philipps-Universität Marburg

Blümer N., Schreiter K., Hempel L., Hollmann M., Schäfer M.A. and Renkawitz-Pohl R. (2002)

A new translational repression element and unusual transcriptional control regulate expression of *don juan* during *Drosophila* spermatogenesis.
Mech. Dev. **110**: 97-112.

Brand, A. und Perrimon, N. (1993)

Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.
Development **118**: 401-415.

Brand, A. H., Manoukian, A.S., Perrimon N. (1994)

Ectopic expression in *Drosophila*.
Methods Cell. Biol. **44**: 635-654.

Braun, R.E. (1998)

Post-transcriptional control of gene expression during spermatogenesis.
Semin Cell Dev Biol. **9**: 483-489

- Braun, R.E. (2000)**
Temporal control of protein synthesis during spermatogenesis
Int J Androl. **23**: 92-94
- Braun, R.E. (2001)**
Packaging paternal chromosomes with protamine.
Nat Genet. **28**: 10-12
- Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell R.B., Cohen S.M. (2003)**
Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*.
Cell **113**: 25-36
- Burd, C.G., and Dreyfuss, G. (1994)**
Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins.
Science **265**: 615-621.
- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. (1996)**
Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters.
Genes ? Dev. **10**: 711-724
- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. (1997)**
The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*.
Genes Dev. **11**:3020-3031.
- Burley, S.K. and R.G. Roeder (1996).**
Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID).
Annu. Rev. Biochem. **65**: 769-799
- Castelli-Gair Hombria, J. And Brown S. (2002)**
The fertile field of *Drosophila* JAK/STAT signalling.
Curr. Biol. **12**: R569-R575.
- Cataldo, L., Mastrangelo, M.-A. und Kleene, K.C. (1999)**
A quantitative sucrose gradient analysis of the translational activity of 18 mRNA species in testes from adult mice.
Mol Hum. Reprod. **5**: 206-213
- Cavener, D.R., Otteson, D.C., Kaufman, T.C. (1986)**
A rehabilitation of the genetic map of the 84B-D region in *Drosophila melanogaster*.
Genetics **114**: 111-123
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994).**
Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression.
Science **263**: 802-805
- Chalkley, G.E. and Virrijzer, C.P. (1999)**
DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: ATAFII250-TAFII150 complex recognizes the initiator.
EMBO J. **18**: 4835-4845
- Cheng, M.H., Maines, J.Z., Wasserman, S.A. (1998)**
Biphasic subcellular localization of the DAZL-related protein Boule in *Drosophila* spermatogenesis.
Dev Biol. **204**: 567-76.
- Cherbas, L. and Cherbas, C. (1993)**
The arthropod initiator: the capsite consensus plays an important role in transcription.
Insect Biochem. **201**: 134-139
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2001)**
Haploinsufficiency of *protamine-1* or *-2* causes infertility in mice.
Nature Genetics **28**: 82-86
- Cooke, H.J., Lee, M., Kerr, S. and Ruggiu, M. (1996)**
A murine homologue of the human *DAZ* gene is autosomal and expressed only in male and female gonads.
Human Molecular Genetics **5**: 513-516
- Crowley, T.E., Hoey, T., Liu, J.K., Jan, Y.N., Jan, L.Y, and Tjian, R. (1993)**
A new factor related to TATA-binding protein has highly restricted expression patterns in *Drosophila*.
Nature **361**: 557-561.
- Dadoune, J.P. (1995)**
The nuclear status of human sperm cells.
Micron **26**: 323-345
- Dadoune, J.P. (2003)**
Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins.
Micros. Res. Techn. **61**: 56-75.
- Das, C.C., Kaufmann, B.P., and Gay, H., (1964)**
Histone-protein transition in *Drosophila melanogaster*. I. Changes during spermatogenesis.
Exptl. Cell Res. **35**: 507-514.

- Dickson, B. J. (2000)**
Reverse gear for *Drosophila*.
Nature **405**: 896-897.
- Doench J.G., Petersen, C.P., and Sharp, P.A. (2003)**
SiRNAs can function as miRNAs.
Genes Dev. **17**: 438-442
- Fabrizio, J.J., Hime, G., Lemmon, S.K. and Bazinet, C. (1998)**
Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*.
Development **125**: 1833-1843
- Eberhart, C.G., Martines, J.Z., Wasserman, S.A. (1996)**
Meiotic cellcycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia.
Nature **381**: 783-785
- Eddy, E.M. (1998)**
Regulation of gene expression during spermatogenesis
Semin Cell Dev Biol. **9**: 451-457
- Evan G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G. and Bishop, J.M. (1985)**
Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product.
Mol. Cell. Biol. **12**: 3610-3616
- Filardo, P., Ephrussi, A. (2003)**
Bruno regulates gurken during *Drosophila* oogenesis.
Mech. Dev. **120**: 289-297
- Fire, A., Xu, S. Montgomery, M.K., Kostas, S.D.A., Driver, S.E. Mello, C.C. (1998)**
Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.
Nature **391**: 806-811.
- Fitch, R.K. and Wakimoto, B.T. (1998)**
The paternal effect gene *ms(3)sneaky* is required for sperm activation and the initiation of embryogenesis in *Drosophila melanogaster*
Dev. Biol. **197**: 270-282
- Fortier, E. & Belote, J.M. (2000)**
Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*.
Genesis **26**: 240-244
- Freeman, M. (1996)**
Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye.
Cell **87**: 651-660
- Freilich, S., Oron, E., Kapp, Y., Nevo-Caspi, Y., Orgad, S., Segal, D., Chamovitz, D.A. (1999)**
The COP9 signalosome is essential for development of *Drosophila melanogaster*.
Curr. Biol. **9**: 1187-1190
- Fridell, Y.-W. C. and Searles, L.L. (1992)**
In vivo transcriptional analysis of the TATA-less promoter of the *Drosophila melanogaster* *vermillion* gene.
Mol. Cell. Biol. **12**: 4571-4577.
- Fuller M.T. (1993)**
Spermatogenesis. In The development of *Drosophila* (eds. M. Bate and Martinez-Arias), Vol. 1, pp. 71-147. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Fuller M.T. (1998)**
Genetic control of cell proliferation and differentiation in *Drosophila* spermatogenesis.
Semin. Cell Dev. Biol. **9**: 433-444
- Gaballe A.P., Morris D.R. (1994)**
Initiation codons within 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation.
Trends Biochem Sci. **19**: 159-64
- Gebauer, F., Xu, W., Cooper, G.M., Richter, J.D. (1994)**
Translational control by cytoplasmic polyadenylation of *c-mos* mRNA is necessary for oocyte maturation in the mouse.
EMBO J. **13**: 5712
- Gigliotti, S., Balz, V., Malva, C., Schäfer, M.A. (1997)**
Organisation of regulatory elements in two closely spaced *Drosophila* genes with common expression characteristics.
Mech. Dev. **68**: 101-113
- Gingras, A.C., Raught, B. Sonenberg, N. (1999)**
EIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation.
Annu.Rev. Biochem. **68**: 913-963
- Giordano, E. Rendina, R., Peluso, L., Furia, M. (2002)**
RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster*.
Genetics **160**: 637-648.
- Glaser, R.L. and Lis, J.T. (1990)**
Spatial and temporal pattern of *hsp 26* expression during normal development.
EMBO J. **5**: 747-754

- Goodrich, J., Cutler, G., and Tjian, R. (1996)**
Contacts in contexts: Promoter specificity and macromolecular interactions in transcription.
Cell **84**: 825-830
- Goossen, B., Caughman, S.W., Harford, J.B., Klausner, R.D., Hentze, M.W. (1990)**
Translational repression by a complex between the iron-responsive element of *ferritin* mRNA and its specific cytoplasmic binding protein is position-dependent in vivo.
EMBO J. **9**: 4127-33
- Görlich, D., Mattaj, I.W. (1996)**
Nucleocytoplasmic transport.
Science **271**: 1513-1518
- Gould-Somero, M. and Holland, L. (1974)**
The timing of RNA synthesis for spermiogenesis in organ cultures of *Drosophila melanogaster*.
Roux's Archives Dev. Biol. **174**: 122-148.
- Gray, N.K.; Quick, S., Goossen, B., Constable, A., Hirling, H., Kuhn, L.C. and Hentze, M.W. (1993)**
Recombinant iron-regulatory factor functions as an iron-responsive-element-binding protein, a translational repressor and an aconitase. A functional assay for translational repression and direct demonstration of the iron switch.
Eur. J. Biochem. **218**: 657-667.
- Gray, N.K., Hentze, M.W. (1994)**
Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and *eALAS* mRNAs.
EMBO J. **13**: 3882-91.
- Green, M.R. (2000)**
TBP-associated factors (TAF_{II}s): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes.
Trends Biochem. Sci. **25**: 59-63
- Hackstein J.H.P., Hochstenbach R. (1995)**
The elusive fertility genes of *Drosophila*: the ultimate haven for selfish genetic elements.
Trends Genet. **11**: 195-200
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000)**
An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells.
Nature **404**: 293-296
- Hansen, S.K., Takada, S., Jacobsen, R.H., Lis, J.T. and Tjian, R. (1997)**
Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF.
Cell **91**: 71-83
- Haynes S.R., Cooper M.T., Pype S., Stolow D.T. (1997)**
Involvement of a tissue-specific RNA recognition Motif Protein in *Drosophila* Spermatogenesis.
Mol Cell Biol **17**: 2708-2715
- Hays, T.S., Deuring, R., Robertson, B., Prout, M., Fuller, M.T. (1989)**
Interacting proteins identified by genetic interactions: a missense mutation in *alpha-tubulin* fails to complement alleles of the testis-specific *beta-tubulin* gene of *Drosophila melanogaster*.
Mol. Cell. Biol. **9**: 875-884
- Hazzelrigg, T., Tu, C. (1994)**
Sex-specific processing of the *Drosophila exuperantia* transcript is regulated in male germ cells by *tra-2* gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 10752-10756.
- Heatwole and Haynes (1996)**
Association of Rb97D, an RRM protein required for male fertility, with a Y chromosome lampbrush loop in *Drosophila* spermatocytes.
Chromosoma **105**:285-292
- Hecht, N. B. (1988)**
Post-meiotic gene expression during spermatogenesis.
Prog Clin Biol Res. **267**: 291-313
- Hecht, NB (1989a)**
Mammalian Protamines and their expression. In Hnilica L, Stein G, Stein J (eds) Histones and other basic nuclear proteins. CRC Press, Boca Raton, pp 347-373
- Hecht, N.B. (1989b)**
The molecular biology of spermatogenesis: regulation of mammalian protamines from gene to proteins. In: Serio M (ed) Perspectives in Andrology. Sero Symposia, Raven Press, pp 25-35
- Hecht, N.B. (1990a)**
Gene expression during spermiogenesis. In: Hamilton DW, Waites GMH (eds) Cellular and molecular events in spermiogenesis. Cambridge University Press, pp 265-283
- Hecht, N.B. (1990b)**
Regulation of haploid expressed genes in male germ cells.
J Reprod Fertil **88**: 679-693
- Hecht, N. (1998)**
Molecular mechanisms of male germ cell differentiation.
Bioessays **20**: 555-561

Heidaran, M.A., Showman, R.M., and Kistler, W.S. (1988)

A cytochemical study of the transcriptional and translational regulation of Nuclear Transition Protein 1 (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids.

J. Cell. Biol. **106**: 1427-1433

Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995)

Improved green fluorescence.

Nature **373**: 663-664.

Heynes, S.R., Cooper, M.T., Pype, S. and Stolow, D.T. (1997)

Involvement of a Tissue-Specific RNA Recognition Motif Protein in *Drosophila* Spermatogenesis.

Mol. Cell. Biol. **17**: 2708-2715

Hicks, J. L., Deng, W.-M., Rogat, A. D., Miller, K. G. and Bownes M. (1999)

Class VI Unconventional Myosin is required for spermatogenesis in *Drosophila*.

Mol. Biol. Cell **10**: 4341-4353.

Hill, J.R., and Morris, D.R. (1993)

Cell specific translational regulation of *S-adenosylmethionine decarboxylase* messenger RNA-dependence on translation and coding capacity of the cis-acting upstream open reading frame.

J. Biol. Chem. **268**: 726-731.

Hiller M.A., Lin T.-Y., Wood C. and Fuller M.T. (2001)

Developmental regulation of transcription by a tissue specific TAF homolog.

Genes Dev. **15**: 1021-1030

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.

Houston, D.W. and King, M.I. (2000)

A critical role for *Xdazl*, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*.

Development **127**: 447-456

Huarte, J., Stutz, A., O'Connell, M.L., Gubler, P., Belin, D., Darrow, A.L., Strickland, S., Vassalli, J.D. (1992)

Transient translational silencing by reversible mRNA deadenylation.

Cell **69**:1021-30.

Hubner, S., Bahr, C., Grossmann, H., Efthymiadis, A., Drenckhan, D. (2003)

Mitochondrial and nuclear localization of kanadaplin

Eur. J. Cell. Biol. **82**: 240-252

Hutchens, J.A., Hoyle, H.D., Turner, F.R., Raff, E.C. (1997)

Structurally similar *Drosophila alpha-tubulins* are functionally distinct *in vivo*.

Molec. Biol. Cell **8**: 481-500

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., Zamore, P.D. (2001)

A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA.

Science **393**: 834-838

Hutvagner, G., Zamore, P.D. (2002)

A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex.

Science **297**: 2056-2060.

Jaeger, J.A., Turner, D.H., Zuker, M. (1989)

Improved predictions of secondary structures for RNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 7706-7710

Jakt, L.M., Liang, C., Cheah, K.S.E., Smith, D.K. (2001)

Assessing Clusters and Motifs from Gene Expression Data.

Genome Res. **11**: 112-123

Jarrell, K.A. and Meselson, M. (1991)

Drosophila retrotransposon promoter includes an essential sequence at the initiation site and requires a downstream sequence for full activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 102-104.

Jensen, S., Gassama, M.P., and Heidmann, T. (1999)

Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing.

Nat. Genet. **21**: 209-212

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

Kaltschmidt, B., Glatzer, K.H., Michiels, F., Leiss, D., Renkawitz-Pohl (1991)

During *Drosophila* spermatogenesis beta 1, beta 2 and beta 3 tubulin isotypes are cell-type specifically expressed but have the potential to coassemble into the axoneme of transgenic flies.

Eur J. Cell. Biol. **54**: 110-120

Karess, R.E., Rubin, G.N. (1984)

Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*.

Cell **38**: 135-146

Karsch-Mizrachi, I.; Haynes, S. R. (1993)

The RB97D gene encodes a potential RNA-binding protein required for spermatogenesis in *Drosophila*.

Nucleic Acids Res. **21**: 2229-2235

Karr, T.L. (1991)

Intracellular sperm/egg interactions in *Drosophila*: a threedimensional structural analysis of a paternal product in developing egg.

Mech. Dev. **34**: 101-111.

Kempe, E., Muhs, B. and Schäfer, M. (1993)

Gene regulation in *Drosophila* spermatogenesis: analysis of protein binding at the translational control element TCE.

Dev. Genet. **14**: 449-459

Kennerdell, J.R., Carthew, R.W. (1998)

Use of ds-RNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *fizzled 2* act in the Wingless pathway.

Cell **95**: 1017-1026

Ketting, R.F., Haverkamp, T.H., van Luenen, H.G., and Plasterk, R.H. (1999)

Mut-7 of *C.elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD.

Cell: **99**: 133-141

Kierszenbaum, A.L., Tres L.L. (1975)

Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome.

J Cell Biol **65**: 258-270

Kierszenbaum, A. (1994)

Mammalian Spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. *Endocrin Rev.* **15**: 116-134

Kiger, A.Ajones D.L., Schulz C., Rogers M.B. and Fuller M.T. (2001)

Stem cell selfrenewal specified by JAK-STAT activation in response to a support cell cue.

Science **294**: 2542-2545

Kimble, M., Dettman, R.W., Raff, E.C. (1989)

The *beta 3-tubulin* gene of *Drosophila melanogaster* is essential for viability and fertility.

Genetics **126**: 991-1005

Kim-Ha, J., Kerr, K. and Macdonald P.M. (1995)

Translational regulation of *oskar* mRNA by Bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential.

Cell **81**: 403-412.

Klausner, R.D. Rouault T.A., Harford, J.B. (1993)

Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism.

Cell **72**: 19-28

Kleene, K.C. (1989)

Poly(A) shortening accompanies the activation of translation of five mRNAs during spermiogenesis in the mouse.

Development **106**: 367-373

Kleene, K.C. (1993)

Multiple controls over the efficiency of translation of the mRNAs encoding transition proteins, protamines, and the mitochondrial capsule selenoprotein in late spermatids in mice.

Dev. Biol. **159**: 720-731

Kleene, K.C. (1996)

Patterns of translational regulation in the mammalian testis

Mol Reprod Dev **43**: 268-81

Kleene, K.C. (2001)

A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells

Mech. Dev. **106**: 3-23

Klemenz, R, Weber,, U. and Gehring, W.J. (1987).

The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*.

Nucleic Acids Res. **15**: 3947-3959.

Kozak M. (1987b)

Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes.

Mol Cell Biol **7**: 3438-3445

Kramer, J.M. and Staveley, B.E. (2003)

GAL4 causes developmental defects and apoptosis when expressed in the developing eye of *Drosophila melanogaster*.

Gen. Mol. Res. **2**: 43-37

Kuhn, R., Schäfer, U., 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., Borsch, D., Glatzer, K.H., Schäfer, U., Schäfer, M. (1991)

A cluster of four genes selectively expressed in the male germ line of *Drosophila melanogaster*.
Mech Dev. **35**: 143-51.

Kutach, A.K. and Kadonaga J.T. (2000)

The Downstream Promoter Element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* Core Promoters.
Mol Cell Biol. **20**: 4754-4764

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., J., Lendeckel, W., Tuschel, T. (2001)

Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.
Science **294**: 853-858

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschel, T. (2002)

Identification of tissue specific microRNAs from mouse
Curr Biol **12**: 735-739

Lam, G. & Thummel, C.S. (2000)

Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*.
Curr. Biol. **10**: 957-963.

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**: 75-78.

Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., Bartel, D.P. (2001)

An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*.
Science **294**: 858-854

Lee, K., Haugen, H.S., Clegg, C.G., and Braun, R. (1995)

Premature translation of *protamin 1* RNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 12451-12455

Lee, R.C., Ambros, V., (2001)

An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*.
Science **294**: 862-864

Lee, Y.- Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., Kim, V.N. (2002)

MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.
EMBO J **21**: 4663-4670.

Lewis, E. B. and Bacher, F. (1968)

Method of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males.
Dros. Inf. Serv. **43**: 193.

Lewis, R.A., Kaufman, T.C., Denell, R.E. and Tallerico, P. (1995)

Genetic analysis of the Antennapedia gene complex (ANT-C) and adjacent chromosomal regions of *Drosophila melanogaster*.
Genetics **95**: 367-381

Lin, T.-Y., Viswanathan, S., Wood, C., Wilson, P., Wolf, N. and Fuller, M.T. (1996).

Coordinate developmental control of the meiotic cell cycle and spermatid differentiation in *Drosophila* males.
Development **122**: 1331-1341.

Lin, H. (2002)

The stem cell niche theory: lessons from flies.
Nature Reviews Genet. **3**: 931-940

Lindsley, D. and Tokuyasu, K.T. (1980) Spermatogenesis.

In: Genetics and Biology of *Drosophila*. Vol. 2d (eds. M. Ashburner and T. R. F. Wright) pp 225-294. Academic press, New York.

Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. (2002)

Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of arabidopsis miRNA.
Science **297**: 2053-2056

Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., and Ding, S.W. (2000)

Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus.
EMBO J. **19**: 1672-1680

Ma, J., Katz, E. and Belote, J.M., (2002)

Expression of proteasome subunit isoforms during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*.
Insect Mol Biol **11**: 627-639.

- Maines, J.Z and Wasserman, S.A. (1999)**
Post-transcriptional regulation of the meiotic Cdc25 protein Twine by the Dazl orthologue Boule.
Nat. Cell Biol. 1: 171-174
- Malinsky, S., Bucheton, A., and Busseau, I. (2000)**
New insights on homology-dependent silencing of I factor activity by transgenes containing ORF1 in *Drosophila melanogaster*.
Genetics 156: 1147-1155
- Martianov, I., Fimia, G.M., Dierich, A., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2001)**
Late arrest of spermiogenesis and germ cell apoptosis in mice lacking the TBP-like TLF/TRF2 gene.
Mol. Cell 7: 509-515
- Mazumder, B., Seshadri V., Imataka H., Sonenberg, N., Fox, P.L. (2001)**
translational silencing of ceruloplasmin requires the essential elements of mRNA circularization: poly(A) tail, poly(A) binding protein, and eukaryotic translation initiation factor 4G.
Mol. Cell. Biol. 21: 6440-6449.
- Mazumder, B., Seshadri, V., Fox P.L. (2003)**
Translational control by the 3'UTR: the ends specify the means.
Trends Bioch. Sci. 28: 91-98
- McLean, C., Bucheton, A. and Finnegan, D.J. (1993)**
The 5' untranslated region of the I factor, a long interspersed nuclear element-like retrotransposon of *Drosophila melanogaster*, contains an internal promoter and sequences that regulate expression.
Mol. Cell. Biol. 13: 1042-1050.
- Meistrich M.L., Brock W.A., Grimes S.R., Platz R.D., Hnilica L.S. (1977)**
Nuclear protein transition during spermatogenesis.
Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol 37: 2522-2525
- Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., and Zhao, M. (2003)**
Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis.
Chromosoma 111: 483-488
- Michiels, F., Gasch A., Kaltschmidt B. and Renkawitz-Pohl R. (1989)**
A 14 bp promoter element directs the testis-specificity of the $\beta 2$ tubulin gene.
Embo J. 8: 1559-1565
- Michiels, F. Buttgereit, D., Renkawitz-Pohl, R. (1993)**
An 18 bp element in the 5' untranslated region regulates the level of the *Drosophila* $\beta 2$ -tubulin mRNA during postmeiotic stages of spermatogenesis.
Eur. J. Cell Biol. 62: 66-74
- Minchiotti, G., Contursi, C. and Di Nocera, P.P. (1997)**
Multiple downstream promoter modules regulate the transcription of the *Drosophila melanogaster* I, Doc and F elements.
J. Mol. Biol. 267: 37-46
- Misquitta, L., Paterson, B.M. (1999)**
Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation.
Proc Natl Acad Sci USA 6: 1451-.1456
- Morgan, T.H. (1912)**
Complete linkage in the second chromosome of the male.
Science 36: 719-720
- Morgan, T.H. (1914)**
No crossing over in the male of *Drosophila* of genes in the second and third pairs of chromosomes.
Biol. Bull. 26: 195-204
- Morris, D.R. and Galalle, A.P. (2000)**
Upstream open reading frames as regulators of mRNA Translation.
Mol Cell Biol 20: 8635-8642
- Moss, E.G., Poethig, R.S. (2002)**
MicroRNAs: something new under the sun.
Curr Biol. 15: R688-R690
- Muckenthaler, M., Gray, N.K., Hentze, M.W. (1998)**
IRP-1 binding to *ferritin* mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F.
Mol Cell. 2: 383-388
- Multigner, L., Gagnon, J., Van Dorselaer, A. and Job, D. (1992)**
Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1.
Nature 360: 33-39
- Nagai, K., Oubridge, C., Ito, N., Avis, J. and Evans, P. (1995)**
The RNP domain: a sequence-specific RNA-binding domain involved in processing and transport of RNA.
Trends Biochem. Sci. 20: 235-241

Nakai, K., Kanehisa, M. (1992)

A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells.

Genomics **14**: 897-911.

Nakai, Y, Nakai, M, Hayashi, H. and Kagamiyama, H. (2001)

Nuclear localization of Yeast Nfs1p is required for cell survival.

J. Biol. Chem. **276**: 8314-8320

Nayernia, K., Burhardt, E., Beimesche, S., Keime, S. and Engel W. (1992)

Germ cell specific expression of a proacrosin-CAT fusion gene in transgenic mouse testis.

Mol. Reprod. Dev. **31**: 241-248

Oliva R., Dixon G.H. (1991)

Vertebrate *protamine* genes and the histone-to-protamine replacement reaction.

Prog. Nucleic Acids Res Mol Biol **40**: 25-94

Olivieri G. und Olivieri A. (1965)

Autoradiographic study of nucleic acid synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*.

Mutat. Res. **2**: 366-380

Olsen, P.H., Ambros, V. (1999)

The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking Lin-14 protein synthesis after the initiation of translation.

Dev Biol **216**: 671-680

Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996)

The general transcription factors of RNA polymerase II.

Genes ? Dev. **10**: 2657-2683

Orsulic, S. und Peifer, M. (1996)

An *in vivo* structure-function study of Armadillo, the β -catenin Homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling.

J. Cell. Biol. **5**: 1283-1300

Ozer, J., Moore, P.A., and Lieberman, P.M. (2000)

A testis-specific transcription factor IIA (TFIIA?) stimulates TATA-binding protein-DNA binding and transcription activation.

J. Biol. Chem. **275**: 122-128.

Parisi, M. and Lin, H. (2000)

A duet of Nanos and Pumilio.

Curr. Biol. **10**: R81-R83

Penttilä, T.L., Yuan, L., Mali, P., Höög, C., Parvinen, M. (1995)

Haploid gene expression: temporal onset and storage patterns of 13 novel transcripts during rat and mouse spermatogenesis.

Biol. Reprod. **53**: 499-510

Peyre, J-B., und Aigaki, T. (1999)

A poor man's GFP desktop viewer.

Dros. Inf. Serv. **82**: 97-98.

Phelps, C.B., Brand, A.H. (1998)

Ectopic Gene Expression in *Drosophila* Using GAL4 System

Methods. **14**: 367-379

Piccin, A., Salameh, A., Benna, C., Sandrelli, F., Mazzotta, G., Zordan, M., Rosato, E., Kyriacou, C.P., Costa, R. (2001)

Efficient and heritable functional knock out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer.

Nucleic Acids Res. **29**: E55

Pirotta, V. (1986).

Cloning *Drosophila* genes.

In: Roberts, D.B. (eds): *Drosophila*: a practical approach.

IRL Press, Oxford, 83-100.

Pitnick, S., Spicer, G.S., Markow, T.A. (1995)

How long is a giant sperm?

Nature **375**: 109

Purnell, B.A., Muro-Pastor, M.I., Scazzocchio, C. and Gonzalez, R. (2000).

TFIID sequence recognition of the initiator and sequences downstream in *Drosophila* class II genes.

Genes Dev. **5**: 1935-1945.

Prymakowska-Bosak, M.; Przewloka, M.R.; Iwkiewicz, J.; Egierszdorff, S.; Kuras, M.; Chaubet, N.; Gigot, C., Spiker, S. and Jerzmanowski, A. (1996)

Histone H1 overexpressed to a high level in tobacco affects certain developmental programs but has limited effect on basal cellular functions.

Proc. Natl. Acad. Sci. **93**: 10250-10255.

Rabenstein, M.D., Zhou, S., Iis, J.T., and Tjian, R. (1999)

TATA-box binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family.

Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 4791-4796

Ratcliff, F.G., MacFarlane, S.A., and Baulcombe, D.C. (1999)

Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses.
Plant Cell **11**: 1207-1216

Rathke, C. (2003)

Das neu identifizierte, testisspezifisch exprimierte Gen *don juan like* aus *Drosophila melanogaster* ist durch kurze Genkontrollregionen und ein Translationsrepressionselement auf mRNA-Ebene charakterisiert.
Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.

Reichhart, J.M., and Ferrandon, D. (1998)

Green balancers.
Dros. Inf. Serv. **81**: 201-201

Reinhart, B. J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G. (2000)

The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.
Nature **403**: 901-906

Renkawitz-Pohl R., Hollmann M., Hempel L. and Schäfer M.A. (2004)

Spermatogenesis.
In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology, Editors: Lawrence I. Gilbert, Kostas Iatrou, Sarjeet Gill
Invited review, in press.

Roeder, R.G. (1996)

The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II.
Trends Biochem. Sci. **21**: 327-335

Rong, Y. S. and Golic, K. G. (2000)

Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*.
Science **288**: 2013-2018

Rong, Y. S. and Golic, K. G. (2001)

A targeted gene knockout in *Drosophila*.
Genetics **157**: 1307-1312

Rong, Y. S., Titen, S. W., Xie, H. B., Golic M. M. Bastiani M., Bandyopadhyay, P., Olivera B. M., Rubin, G. M., and Golic, K. G. (2002)

Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*.
Genes Dev. **16**: 1568-1581

Rubin, G.M. and Spradling, A.C. (1982).

Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors.
Science **218**: 348-353

Rubin, G.M., Hong, L., Brokstein, P., Evans-Holm, M., Frise, E., Stapleton, M., and Harvey, D.A. (2000)

A *Drosophila* complementary DNA resource.
Science **287**: 2222-2224

Russel, S.R.H., and Kaiser, K. (1993).

Drosophila melanogaster male germ line-specific transcripts with autosomal and Y-linked genes.
Genetics **134**: 293-308

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988).

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science **239**: 487-491.

Salles, F.J., Lieberfarb, M.E., Wreden, C., Gergen, J.P., Strickland, S. (1994)

Coordinate initiation of *Drosophila* development by regulated polyadenylation of maternal messenger RNAs.
Science **266**: 1996-1999

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989)

Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)

DNA sequencing with chain terminating 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 acid motif.
Mech. Dev. **64**: 19-30

Santel, A. (1997)

Molekulare Analyse von Genexpression und Differenzierungsprozessen in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* am Beispiel des *don juan*- und *?2 Tubulin*-Gens.
Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Santel, A., Blümer, N., Kämpfer, M. and Renkawitz-Pohl, R. (1998)

Flagellar mitochondrial association of the male-specific Don Juan protein in *Drosophila* spermatozoa. *Journal of Cell Science* **111**: 3299-3309

Santel, A., Kaufmann, J., Hyland, R. and Renkawitz-Pohl, R. (2000)

The initiator element of the *Drosophila* *22 tubulin* gene core promoter contributes to gene expression *in vivo* but is not required for male germ-cell specific expression.

Nucleic Acids R. **28**: 1439-1446

Sassone-Corsi P. (2002)

Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis.

Science **296**: 2176-2178

Saxena, R., Brown, L.G., Hawkins, T., Alagappan, R.K., Skaletsky, H., Reeve, M.P., Reijo, R., Rozen, S., Dinulos, M.B., Disteche, C.M., Page, D.C. (1996)

The *DAZ* gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned.

Nat Genet. **14**: 292-299

Saxena, R., de Vries, J.W., Repping, S., Alagappan, R.K., Skaletsky, H., Brown, L.G., Chen, E., Hoovers, J.M., Page, D.C., (2000)

Four *DAZ* genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome

Genomics **67**: 256-67

Schäfer, M., Kuhn, R., Bosse, F., Schafer, 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**: 178-1718

Schäfer, M., Nayernia, K., Engel, W., Schäfer U. (1995)

Translational control in spermatogenesis

Dev. Biol. **172**: 344-352

Schlicker, M., Reim, K., Schlüter, G. and Engel, W. (1997)

Specific binding of a 47-kilodalton protein to the 3' untranslated region of rat *transition protein 2* messenger ribonucleic acid.

Biol. Reprod. **56**: 697-706

Seggerson, K., Tang, L., Moss, E.G. (2002)

Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation.

Dev Biol. **243**: 215-225

Shan, Z., Hirschmann, P., Seebacher, T., Edelman, A., Jauch, A., Morell, J., Urbitsch, P. and Vogt, P.H. (1996)

A *SPGY* copy homologous to the mouse gene *Dazl* and the *Drosophila* gene *boule* is autosomal and expressed only in the human male gonad.

Human Molecular Genetics **5**: 2005-2011

Shen, X. and Gorovsky, M.A. (1996)

Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription *in vivo*.

Cell **86**: 475-483

Shi, H., Hoffman, B.E. and Lis, J.T. (1997)

A specific RNA hairpin loop structure binds the RNA recognition motifs of the *Drosophila* SR protein B52.

Mol. Cell. Biol. **17**: 2649-2657.

Simon, R., Wu, L., Richter, J.D. (1996)

Cytoplasmic polyadenylation of activin receptor mRNA and the control of pattern formation in *Xenopus* development.

Dev Biol. **179**: 239-250

Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., (2000)

The *lin-41 RBCC* gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the *lin-29* transcription factor.

Mol Cell **5**: 659-669

Spradling, A.C. and Rubin, G.M. (1982)

Transposition of cloned P elements into the *Drosophila* germline chromosomes.

Science **218**: 341-347

Spradling, A.C., Stern D., Beaton A., Rhem E.J., Laverty T., Mozden N., Misra S., Rubin G.M. (1999)

The Berkeley *Drosophila* genome project gene disruption project. Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes.

Genetics **153**: 135-177

Steger, K. (1999)

Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids.

Anat. Embryol. **199** : 471-481

Steger, K. (2001)

Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs.

Anat Embryol **203**: 323-334

Steinbach, O.C., Wolffe, A.P. and Rupp, R.A.W. (1997)

Somatic linker histones cause loss of mesodermal competence in *Xenopus*.

Nature **389**: 395-399

Steller, H. and Pirotta, V. (1996).

P transposons controlled by the heat shock promoter.

Mol. Cell Biol. **6**: 1640-1649.

Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C.C. (1999)

The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C.elegans*.

Cell **99**: 123-132

Tang, F.C., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., Zamore, P.D. (2003)

A biochemical framework for RNA silencing in plants

Trends Plant Sci. **8**: 307-309

Tansey, W.P. and Herr, W. (1997)

TAFs: Guilt by association?

Cell **88**: 729-732

Tarun, S.Z., and Sachs, A.B., (1996)

Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G.

EMBO J. **15**: 7168-7177

Tautz, D. and Pfeifle, C. (1989).

A non radioactive in situ hybridization method for localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals a translational control of the segmentation gene *hunchback*.

Chromosoma **98**: 81-85.

Tavernarakis, N., Wang, S.L., Dorovkov, A., Driscoll, M. (2000)

Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes.

Nat. Genet. **24**: 180-183

Teichmann, M., Wang, Z., Martinez, E., Tjernberg, A., Zhang, D., Vollmer, F., Chait, B.F., and Roeder, R.G. (1999)

Human TATA-binding protein-related factor-2 (hTrf2) stably associates with hTFIIA in HeLa cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 13720-13725

Timmons, L. and Fire, A. (1998)

Specific interference by ingested dsRNA.

Nature **395**: 854

Theil, E.C. (1993)

The IRE (iron regulatory element) family: structures which regulate mRNA translation or stability.

BioFactors **4**: 87-93

Thummel, C.S., Boulet, A.M. and Lipshitz, H.D. (1988)

Vectors for the *Drosophila* P-element mediated transformation and tissue culture transfection.

Gene **7**: 445-456

Tokuyasu, K.T., Peacock, W.J., and Hardy, R.W. (1972)

Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. I. Individualization process.

Z. Zellforsch. **124**, 479-506

Tulina N. and Matunis E. (2001)

Control of stem cell self-renewal in *Drosophila* spermatogenesis by JAK-STAT signaling.

Science **294**: 2546-2549

Upadhyaya, A.B., Lee, S.H., and DeJong, J. (1999)

Identification of a general transcription factor TFIIA¹ homolog selectively expressed in testis.

J. Biol. Chem. **274**: 18040-18048.

Valgardsdottir, R., Brede, G., Eide, L.G., Frengen, E., Prydz, H. (2001)

Cloning and characterization of MDDX28, a putative DEAD-box helicase with mitochondrial and nuclear localization.

J. Biol. Chem **276**: 32056-32063

Valgardsdottir, R., Prydz, H. (2003)

Transport signals and transcription-dependent nuclear localization of the putative DEAD-box helicase MDDX28.

J. Biol. Chem **278**: 21146-21154

Vassali, J.-D., Stutz, A., (1995)

Awakening dormant mRNAs.

Curr. Biol. **5**: 476-479.

Venables, J., and Eperon, I. (1999)

The roles of RNA-binding Proteins in spermatogenesis and male infertility.

Curr. Opin. Genet. Dev. **9**: 346-354.

Verrijzer, C.P. and Tjian, R. (1996)

TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity.

TIBS **21**: 338-342

Vinson, C.R., LaMarco, K.L., Johnson, P.F., Landschulz, W.H. and McKnight, S.L (1988).

In situ detection of sequence-specific DNA-binding activity specified by a recombinant bacteriophage.

Genes Dev. **2**: 801-806

Voinnet, O., Lederer, C., and Baulcombe, D.C. (2000)

A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*.

Cell **103**: 157-167

Vogel, W., Blijleven, W. G. H., Kortselius, M. J. H., Zijlstra (1982)

A search for some common characteristics of the efforts of chemical mutagenes in *Drosophila*.

Mutat. Res. **92**: 69-87

Vongsamphanh, R., Fortier, P.-K., and Ramotar, D. (2001)

Pir1p mediates translocation of the Yeast Apn1p Endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability.

Mol. Cell. Biol. **21**: 1647-1655

Walter, A.E., Turner, D.H., Kim, J., Lyttle, M.H., Muller, P., Mathews, D.H., Zuker, M. (1994)

Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding.

PNAS **91**: 9218-9222

Wang, Y., Lyu, Y.L., Wang, J.C. (2002)

Dual localization of human DNA topoisomerase III β to mitochondria and nucleus.

PNAS **99**:12114-12119

Wang Z. and Mann R.S. (2003)

Requirement for two novelnearly identical TGIF-related homeobox genes in *Drosophila* spermatogenesis. *Development* **130**: 2853-2865.

Webster, P.J., Liang, L. Berg, C.A., Lasko, P. and Macdonald P.M. (1997)

Translational repressor *bruno* plays multiple roles in development and is widely conserved.

Gen Dev. **11**: 2510-2521

Wells, S.E., Hillner, P. E., Vale, R.D. and Sachs, A.B. (1998)

Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors.

Mol. Cell **2**: 135-140

Wharton, R. P., Sonoda, J., Lee, T., Patterson, M. and Murata, Y. (1998)

The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator.

Mol. Cell. **1**: 863-872

White-Cooper, H., Schäfer, M.A., Alphey, L.S., Fuller, M.T. (1998)

Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*.

Development **125**: 125-134

White-Cooper, H., Leroy, D., MacQueen, A., Fuller, M.T. (2000)

Transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes depends on a conserved chromatin associated protein, whose nuclear localisation is regulated.

Development **127**: 5463-5473

Winhauer, T. (1995)

Regulation der gewebsspezifischen Expression des β *Tubulin*-Gens in der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* durch trans-aktivierende Faktoren und die Identifikation ähnlich dem β *Tubulin*-Gen regulierter Gene.

Dissertation, Philipps-Universität-Marburg.

Wormington, M., Searfoss, A.M., Hurney, C.A. (1996)

Overexpression of poly(A) binding protein prevents maturation-specific deadenylation and translational inactivation in *Xenopus* oocytes.

EMBO J. **15** : 900-909

Wouters-Tyrou D., Martinage A., Chevaillier P., Sautiere P. (1998)

Nuclear basic proteins in spermiogenesis.

Biochim Biophys Acta **80**: 117-128

Wreden, C. Verrotti, A.C., Schisa, J.A., Lieberfarb, M.E., Strickland, S. (1997)

Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA.

Development **124**: 3015-3023

Wyatt, J.R., and I. Tinoco, Jr. (1993)

RNA structural elements and RNA function, p. 465-496. In R.F. Gesteland and J.F. Atkins (ed.), *The RNA world*. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Xu, C.W., Hines, J.C., Engel, M.L., Russell, D.G. and Ray, D.S. (1996)

Nucleus-encoded Histone H1-like Proteins are associated with kinetoplast DNA in the Trypanosomatid *Crithidia fasciculata*.

Mol. Cell. Biol. **16**: 564-576

Xu, E.Y., Moore, F.L. and Pera, R.A. (2001)

A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans.

PNAS **98**: 7414-7419

Yamashita Y.M., Jones D.L., Fuller M.T. (2003)

Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome

Science **301**: 1547-1550

Yanicostas C., Lepesant, J.A. (1990)

Transcriptional and translational cis regulatory sequences of the spermatocyte-specific *Drosophila janus B* gene are located in the 3' exonic region of the overlapping *janus A* gene.

Mol. Gen. Genet. **224**: 450-458.

Yang, D., Lu, H. and Erickson, J.W. (2000)

Evidence that processed small dsRNA may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos.

Curr. Biol. **10**: 1191-1200

Yang J., Porter L. and Rawls J. (1995)

Expression of the *dihydroorotate dehydrogenase gene, dhod*, during spermatogenesis of *Drosophila melanogaster*.

Mol. Gen. Genet. **246**: 334-341

Zambrowicz, B.P., Harendza, C.J., Zimmermann, J.W., Brinster, R.L., Palmiter, R.D. (1993)

Analysis of the mouse *protamine 1* promoter in transgenic mice

Proc. Natl. Acad. Sci. **90**: 5071-5075

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000)

RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals.

Cell, **101**: 25-33

Zhang, D., Penttila, T.L., Morris, P.L., Teichmann, M., and Roeder, G. (2001)

Spermiogenesis deficiency in mice lacking the *Trf2* gene.

Science **292**: 1153-1155

Zuker, M., Mathews, D.H., Turner, D.H. (1999)

Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. In: Barciszewski, J., Clark, B.F.C. (Eds.). RNA Biochemistry and Biotechnology, NATO ASI Series, Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 11-43

Abkürzungen

A. dest.	Aqua bidestillata
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
dNTP	Desoxyribonukleotid
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
cDNA	komplementäre DNA
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberserum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
Min	Minuten
OD	optische Dichte
mRNA	messenger-RNA, Boten-RNA
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerasekettenreaktion
U	Unit (Enzymaktivität)
w/v	weight per volume
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
TritonX-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region ("leader")
UV	Ultraviolettes Licht
VT	Volumenteil

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl für ihre freundliche Betreuung und Unterstützung während des Verlaufs der gesamten Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Reinhard Fischer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ruth Hyland und Dominik Helmecke danke ich für die Injektion der Transformationskonstrukte, sowie für die tatkräftige Unterstützung bei der besonders arbeitsintensiven EMS-Mutagenese.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Christina Rathke sei besonders gedankt für die ausgezeichnete „Teamarbeit“.

Sunil Jayaramaiah Raja danke ich für die freundliche Mitarbeit.

Dörthe Kesper und Roxane Schröter möchte ich für hilfreiche Tipps bezüglich dieser Arbeit danken.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung ganz herzlich danken.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

“Kurze Promotoren und Translationskontrollelemente steuern die Expression von Don Juan, Don Juan Like und Min, wobei Don Juan und Don Juan-Like vermutlich funktionell redundant in der Spermiogenese von *Drosophila melanogaster* sind”

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

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

Publikationen

Blümer N, Schreiter K, **Hempel L.**, Santel A, Hollmann M, Schäfer MA, Renkawitz-Pohl R. Mech Dev. 2002 Jan; 110 (1-2): 97-112. A new translational repression element and unusual transcriptional control regulate expression of *don juan* during *Drosophila* spermatogenesis.

Renkawitz-Pohl R., Hollmann M., **Hempel L.** and Schäfer M.A. (2004) Spermatogenesis. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology, Editors: Lawrence I. Gilbert, Kostas Iatrou, Sarjeet Gill
Invited review, in press.

Hempel L., Rathke C. and Renkawitz-Pohl. R. (in Vorbereitung)
Distinct transcriptional and translational regulation of *don juan* and *don juan like* in male germ cell differentiation.

Hempel L., Rathke C., Jayaramaiah Raja S. and Renkawitz-Pohl. R. (in Vorbereitung)
Don Juan and Don Juan-Like encode basic proteins which are localized to sperm heads and mitochondria.

Präsentationen

Juni 2001 „8th regional *Drosophila* meeting“, Universität Würzburg.
„*don juan*: transcriptional and translational control of a testis specifically expressed gene“ (mündliche Präsentation).

Februar 2002 „1st Meeting of the European Graduiertenkolleg: Transcriptional control in developmental processes (Marburg, Giessen, Rotterdam), Universität Marburg.

„Transcriptional and translational control of the *don juan* gene during *Drosophila* spermatogenesis“(mündliche Präsentation).

Oktober 2002

Germ Cells, Cold Spring Harbor, New York.

„A new translational repression element and unusual transcriptional control regulate expression of the *don juan* gene during *Drosophila* spermatogenesis“ (Poster Präsentation).