

**Untersuchungen zu den molekularen Grundlagen der  
nicht-mendelschen Vererbung in der Maus**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Nathalie Véron**  
aus Karlsruhe

Dezember, 2008



Diese Arbeit wurde in der Zeit vom September 2004 bis November 2008 unter der Leitung von Professor Dr. Bernhard G. Herrmann am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin angefertigt.

**Gutachter:**

1. Gutachter: Professor Dr. Constance Scharff
2. Gutachter: PD Dr. Bodo Lange

**Disputation am: 21.04.2009**



**Mein besonderer Dank geht an:**

- Herrn Professor Bernhard G. Herrmann für die wunderbare wissenschaftliche Betreuung und seine immerwährende Diskussionsbereitschaft.

- Dr. Hermann Bauer für all die vielen Dinge, die ich durch seine Betreuung gelernt habe. Vor allem danke ich ihm dafür, dass er meine Ideen in geordnete Bahnen gelenkt hat.

- Frau Professor Dr. Constance Scharff und Dr. Bodo Lange für ihre Bereitschaft, die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen.

- Dr. Phillip Grote für die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen, seine Geduld mit mir und hervorragenden Ideen und Ratschläge in jeder Lebenslage, und natürlich für die kulinarischen Erlebnisse.

- Gerhild Lüder für ihren unermüdlichen Einsatz bei den elektronenmikroskopischen Versuchen und für die nette gemeinsame Zeit, die wir hatten. Dr. Rudi Lurz für viel Kaffee und Kuchen und die gesamte Unterstützung und Betreuung am Elektronenmikroskop.

- Dr. Martin Werber für seine Auswertungen aller statistischen Fragestellungen dieser Arbeit.

- Ingo Voigt für die vielen Transgen-Injektionen und Caro Wilke für die unendlich aufwendige Tierpflege.

- Sabrina Schindler für den Beitrag zu dieser Arbeit im Rahmen ihres Praxissemesters und für eine lustige Zeit gemeinsam im Labor.

- Dr. Markus Morkel, der immer ein offenes Ohr für meine wissenschaftlichen Fragen und eine Lösung für meine Probleme hatte.

- die Abteilung Herrmann, insbesondere Jürgen Willert, Dr. Yves Charron, Dr. Sigrid Schaper für die gute Zusammenarbeit.

- Arnold Schröder, Holger Klein, Dr. Philipp Messer, Dr. Utz Pape, Dr. Martin Lange, Dr. Markus Bauer und Andrea Weiße dafür, dass der Alltag am Institut um einiges schöner und lustiger war, als er ohne sie gewesen wäre.

- Oliver Look dafür, dass ich einen anderen Focus auf das Bild der Forschung bekommen habe.

- die gesamte Abteilung Herrmann für ein nettes, angenehmes Umfeld und viel Spaß bei der Arbeit.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Entdeckung des <i>t</i> -Komplexes: ein egoistisches Chromosom . . . . .	1
1.2	Genetische Eigenschaften des <i>t</i> -Haplotyps . . . . .	2
1.3	Auswirkungen des <i>t</i> -Haplotyps auf die Flagellenfunktion von Spermien	3
1.4	Deregulation von Signalmechanismen als Funktionsprinzip . . . . .	4
1.5	Spermienentwicklung in der Maus . . . . .	8
1.6	Translationelle Kontrolle von mRNAs in der Spermatogenese . . . . .	16
1.7	Intra- und interzellulärer Transport von Genprodukten im Hoden . .	19
1.8	Zielsetzung . . . . .	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	24
2.2	Zellbiologische Arbeiten . . . . .	34
2.3	Sonstige Methoden . . . . .	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse (1)- Molekulare Eigenschaften von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> und <i>Smok</i></b>	<b>53</b>
3.1	Lokalisation des <i>Tg9</i> -Transkripts im Hoden von <i>Tg9/0</i> -Männchen . .	54
3.2	Lokalisation von Myc- <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> im Hoden von <i>Tg9/0</i> -Männchen . . .	60
3.3	Lokalisation des Wildtyp- <i>Smok1</i> -Transkripts im Hoden von transge- nen Männchen . . . . .	62
3.4	Lokalisation von Wildtyp- <i>Smok1</i> -Protein im Hoden von <i>TgMyc-Smok1/0</i> - Männchen . . . . .	63
3.5	Lokalisation von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> in Spermatozoen . . . . .	64
3.6	Statistische Untersuchung der Verteilung von Myc- <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> in Spermien	66
3.7	Eigenschaften des <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> -Proteins . . . . .	69
3.8	Untersuchung auf die Stabilität des <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> -Transkripts bei der Sper- matogenese . . . . .	72

<b>4</b>	<b>Ergebnisse (2)- Eigenschaften der 5'UTR von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i></b>	<b>77</b>
4.1	Eigenschaften der UTR von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> <i>in vitro</i> . . . . .	77
4.2	Einfluss der UTR von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> auf die subzelluläre Lokalisation der Transkripte <i>in vitro</i> . . . . .	78
4.3	Translationelle Repression von Transkripten durch die 5' UTR von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> . . . . .	82
4.4	Experimentelle Untersuchung potenziell regulatorischer Elemente der 5'UTR . . . . .	84
4.5	Die Rolle der 5'UTR von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> <i>in vivo</i> . . . . .	94
<b>5</b>	<b>Ergebnisse (3)- Charakterisierung der Funktion der 3'UTR von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> <i>in vivo</i></b>	<b>99</b>
5.1	Transkriptlokalisierung der <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> -kodierenden Transgene <i>Tg10</i> und <i>Tg11</i> im Hoden . . . . .	99
5.2	Lokalisation des Myc- <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> -Proteins im Hoden von <i>Tg10/0</i> - und <i>Tg11/0</i> -Tieren . . . . .	104
5.3	Untersuchung der Rolle der kodierenden Region für die zelluläre Restriktion von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> . . . . .	107
5.4	Funktionstests der Transgenen <i>Tg9</i> , <i>Tg10</i> und <i>Tg11</i> als <i>Responder</i> .	111
5.5	Einfluss der 3'UTR auf die Translation von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> . . . . .	113
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>119</b>
6.1	<i>t/+</i> -Männchen bilden zwei molekular unterschiedliche Spermienpopulationen . . . . .	120
6.2	Mechanismen der zellulären Restriktion von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> . . . . .	124
6.3	<i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> -Transgene mit modifizierten 3'UTR-Sequenzen wirken ebenfalls als <i>Responder</i> . . . . .	128
6.4	<i>Modifier</i> beeinflussen die Vererbungsrate von <i>Smok1<sup>Tcr</sup></i> . . . . .	129
6.5	Die 3'UTR von Wildtyp- <i>Smok</i> beeinflusst die Translationseffizienz der mRNA <i>in vivo</i> . . . . .	130
6.6	Vermutlich wirken alle <i>Smok</i> -Gene <i>in cis</i> . . . . .	130
6.7	Hypothesen zur Entstehung des <i>t</i> -Haplotyps . . . . .	131
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>133</b>

7.1	Deutsch . . . . .	133
7.2	Englisch . . . . .	135
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>137</b>
	<b>Verzeichnis der erfolgten Publikationen</b>	<b>147</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Die Entdeckung des *t*-Komplexes: ein egoistisches Chromosom

Die meisten Zellen eines Säugetierorganismus tragen einen doppelten Chromosomensatz, sie sind diploid. Bei der Bildung der Gameten, das heisst der Eizellen und Spermienzellen, erfolgt die Reduktionsteilung dieses Chromosomensatzes. Erst bei der Befruchtung der Eizelle durch ein Spermium wird die Diploidität des Organismus wiederhergestellt.

Im männlichen Organismus werden jeweils die beiden Geschwisterchromosomen in verschiedene Spermien verpackt. Welche Chromosomenkombinationen letztendlich bei der Befruchtung der Eizelle vererbt werden, bestimmt normalerweise der Zufall. Folglich trägt von den Nachkommen im Durchschnitt die Hälfte das eine und die andere Hälfte das andere der Geschwisterchromosomen.

Dieses Wissen verdanken wir Gregor Mendel, der die Gesetzmäßigkeiten der Vererbung erforscht hat, die, von wenigen Ausnahmen abgesehen, für alle Organismen, ob Pflanze oder Tier, gelten. Eine Ausnahme dieser Regel ist die nicht-mendelsche Vererbung des *t*-Komplexes der Maus, die auf einer varianten Form des proximalen Teils von Chromosom 17, dem sogenannten *t*-Haplotyp beruht.

1936 beobachteten die Gruppen um Dunn und Kobozeff unabhängig voneinander bei bestimmten Mauspopulationen die nicht-mendelsche Vererbung eines Merkmals, das die Schwanzlänge von Mäusen beeinflusst [10][12]. Diese Beobachtungen beruhen auf der Interaktion zwischen dem Gen *Brachyury* (*T*) und dem *t*-Haplotyp. Mäuse, die *T* heterozygot tragen (*T/+*), weisen eine Verkürzung des Schwanzes auf, während *T/t*-Tiere schwanzlos sind, da der durch *T* verursachte Phänotyp durch die Anwesenheit des *t*-Haplotyps verstärkt wird. Mäuse, die den *t*-Haplotyp heterozygot

tragen ( $t/+$ ), weisen dagegen eine normale Schwanzlänge auf. Sowohl Dunn als auch Koboziëff kreuzten  $T/t$ -Mausmännchen mit  $+/+$ -Weibchen und analysierten deren Nachkommen auf ihre Schwanzlänge. Dabei stellten beide fest, dass mehr als 85 % dieser Nachkommen eine normale Schwanzlänge aufwiesen, was darauf hindeutete, dass diese den  $t$ -Haplotyp heterozygot trugen ( $t/+$ ). Lediglich 15 % der Nachkommen besaßen einen kurzen Schwanz, durch den sich Mäuse des Genotyps  $T/+$  auszeichnen. Wurden dagegen  $T/t$ -Weibchen mit  $+/+$ -Männchen gekreuzt, zeigten 50 % der Nachkommen eine normale ( $t/+$ ), und 50 % eine verkürzte Schwanzlänge ( $T/+$ ). Folglich vererbten die Weibchen  $T$  und den  $t$ -Haplotyp nach den mendelschen Regeln weiter, die Männchen dagegen nicht. Durch den Einfluss des  $t$ -Haplotyps auf die Schwanzlänge wurde dieser anfänglich fälschlicherweise als Allel von  $T$  beschrieben. Erst später wurde klar, dass eine Region von 30 - 40 Mb, die auf dem Chromosom 17 liegt, diese nicht-mendelsche Vererbung verursacht.

## 1.2 Genetische Eigenschaften des $t$ -Haplotyps

Der  $t$ -Haplotyp weist trotz seiner Größe von 12 - 15 cM, die etwa einem Drittel des Chromosoms 17 entspricht, eine geringe Rekombinationsrate auf, da diese zwischen dem Wildtyp-Chromosom 17 und dem  $t$ -Haplotyp durch vier Inversionen, aus denen nahezu der gesamte  $t$ -Haplotyp besteht, stark reduziert wird [26][82]. Dennoch wird in seltenen Fällen Rekombination beobachtet, wobei sogenannte partielle  $t$ -Haplotypen entstehen. Diese besitzen im Vergleich zum kompletten  $t$ -Haplotyp veränderte Eigenschaften, die für dessen Charakterisierung genutzt worden sind: Je nach dem, welche der einzelnen Regionen des  $t$ -Haplotyps in den jeweiligen partiellen  $t$ -Haplotypen vorhanden sind, variiert dessen Vererbungsrate [62][63][64][83]. Ein kompletter  $t$ -Haplotyp weist dabei die höchste Vererbungsrate auf, die bis zu 99 % erreichen kann.

In detaillierten Studien, die Mary Lyon zur Charakterisierung der funktionellen Einheiten des  $t$ -Haplotyps durchführte, beobachtete sie, dass mehrere *Distorter* ( $Tcds$ ) additiv auf einen *Responder* ( $Tcr$ ) wirkten und so zur nicht-mendelschen Vererbung des  $t$ -Haplotyps führten. Dabei wurde deutlich, dass der *Responder* immer in *cis* wirkt und auf diese Weise die Vererbung des Chromosoms, auf dem der *Responder* liegt, begünstigt.  $Tcds$  dagegen üben ihre Funktion in *trans* aus [62]. Liegt der *Responder* dagegen in einem Männchen ohne *Distorter* vor, so wird dieser zu nur etwa 20 % Prozent an die Nachkommen vererbt, ein Phänomen, das als *t-low*-Effekt bezeichnet

wird. Aktuell sind fünf starke *Distorter*-Loci beschrieben: *Tcd 1a* und *b*, sowie *Tcd 2*, *3* und *4* [62][19][83][66]. Zur Erklärung dieses Phänomens entwarf Mary Lyon auf Basis der genetischen Untersuchungen ein Modell für die Wirkung des *t*-Haplotyps in *t/+*-Männchen: *Tcds* setzen durch ihre Wirkung in *trans* die Befruchtungsfähigkeit der Wildtyp-Spermien herab, während die *t*-Spermien, die den *Tcr*-Locus tragen, selektiv vor dem spermenschädigenden Einfluss der *Tcds* geschützt sind. Die Befruchtungsfähigkeit der *t*-Spermien bleibt im Vergleich zu den durch *Tcds* geschädigten Wildtyp-Spermien erhalten. Die schützende Wirkung des *Responders* entfaltet sich immer selektiv in *cis* auf das *Responder*-tragende Spermium und führt zu dessen bevorzugter Vererbung [62][63][65].

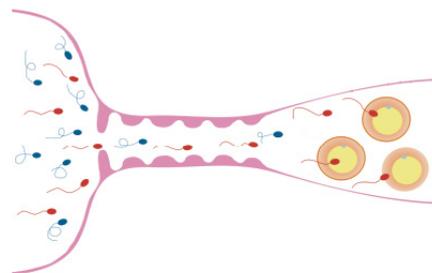


**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der genetischen Organisation des *t*-Haplotyps. a: schematische Darstellung eines heterozygoten kompletten *t*-Haplotyps; oben: Wildtyp-Chromosom 17, unten: *t*-Haplotyp. Der *t*-Haplotyp besteht aus 4 Inversionen, auf denen *Tcd1-4* und *Tcr* lokalisiert sind. Ein heterozygot kodierter *t*-Haplotyp wird an bis zu 99 % der Nachkommen vererbt. b: oben: partieller *Tcr*-tragender *t*-Haplotyp, unten: partieller *Tcd*-tragender *t*-Haplotyp. Die Kombination partieller *t*-Haplotypen in einem Männchen führt zur erhöhten Vererbung (ca. 80 %) des *Tcr*-tragenden Chromosoms. *Tcr* wirkt dabei in *cis*, *Tcds* dagegen in *trans* [62].

### 1.3 Auswirkungen des *t*-Haplotyps auf die Flagellenfunktion von Spermien

Die Bildung von zwei unterschiedlichen Spermienpopulationen in *t/+*-Männchen wurde von Katz 1979 entdeckt und durch Studien von Patricia-Olds Clarke unterstützt

[36][85]. DNA-Analysen von Spermien, die von heterozygoten *t*-Haplotyp-Männchen stammen und aus dem Uterus von Weibchen gewonnen wurden, zeigen gleiche Mengen Wildtyp- wie *t*-DNA [86]. Daraus wurde geschlossen, dass die Spermatogenese in heterozygoten Tieren durch den *t*-Haplotyp nicht beeinträchtigt wird und die bevorzugte Vererbung durch die unterschiedliche Motilität der Spermatozoen zustande kommt. Spermien dieser Männchen lassen sich aufgrund ihrer Beweglichkeit in zwei Gruppen trennen: der eine Teil zeigt normale Flagellenfunktion, während ein anderer Teil Motilitätsdefekte aufweist. Welcher Genotyp welchem Phänotyp zugrunde liegt, konnte bisher experimentell nicht zugeordnet werden. Allerdings liegt in Anbetracht der hohen Vererbung des *t*-Haplotyps die Vermutung nahe, dass die *t*-Spermien normale, die *+*-Spermien dagegen reduzierte Motilität aufweisen. Bei *in vitro* Fertilisationsversuchen mit Spermien eines *t/+*-Männchens weisen die *t*-Spermien keinen Vorteil bei der Befruchtung auf [21]. Offensichtlich kommen die Unterschiede zwischen *t*- und *+*-Spermien erst während des Schwimmvorgangs bei der natürlichen Befruchtung im weiblichen Eileiter zum Tragen.



**Abbildung 1.2:** Modell zur Befruchtung der Eizellen durch Wildtyp- und *t*-Spermien im Eileiter. Rot: *t*-Spermien, blau: Wildtyp-Spermien. Da die durch *Tcds* geschädigten Wildtyp-Spermien langsamer schwimmen als *t*-Spermien eines *t/+*-Männchens, besitzen *t*-Spermien den Vorteil der schnelleren Fortbewegung und erreichen die Eizelle mit größerer Wahrscheinlichkeit als die Wildtyp-Spermien. Dadurch vererbt sich der *t*-Haplotyp bevorzugt weiter.

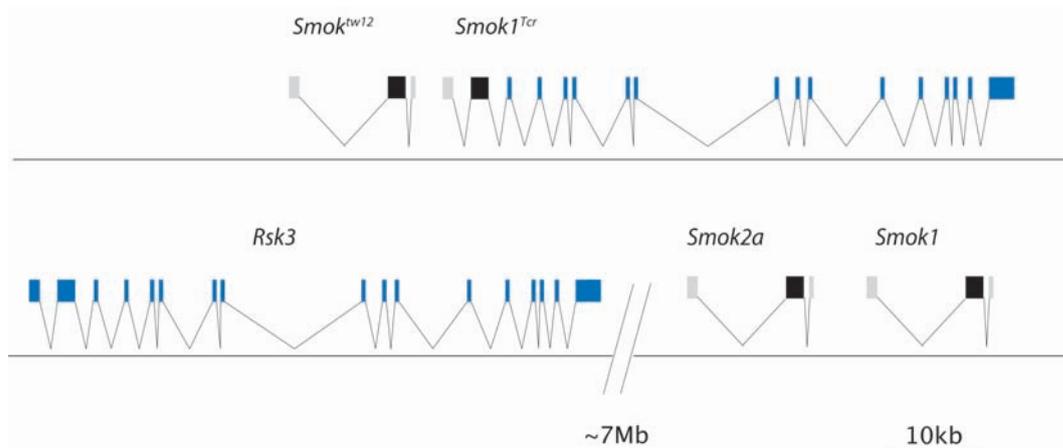
## 1.4 Deregulation von Signalmechanismen als Funktionsprinzip

### 1.4.1 Die Klonierung des *Responders*

Der erste Schritt zum molekularen Verständnis der Wirkung des *t*-Haplotyps stellte die Klonierung des *t*-Komplex Responders *Smok1<sup>Tcr</sup>* im Jahre 1999 durch Bernhard G. Herrmann dar [29]. Diese Entdeckung zeigte erstmals, dass Mechanismen der Signaltransduktion für die hohe Vererbungsrate des *t*-Haplotyps eine zentrale Rolle spielen. *Smok1<sup>Tcr</sup>* kodiert eine mutante Kinase einer bis dahin unbekanntem Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen, den Spermienmotilitätskinasen, kurz *Smok* ge-

nannt. *Smoks* stellen eine mausspezifische Genfamilie dar, deren Loci mehrheitlich auf Chromosom 17 lokalisiert sind. Die Struktur der *Smok*-Gene umfasst, soweit bekannt, 3 Exons und 2 Introns. Das *Responder*-Gen *Tcr*, das als *Smok1<sup>Tcr</sup>* identifiziert wurde und zur Familie der *Smoks* gehört, weist dagegen eine abweichende Struktur auf. Es stellt ein Fusionsgen aus *Smok* und der *Ribosom S6 kinase*, *Rps6ka2* oder *Rsk3* dar, das durch genetische Reorganisation beider Loci entstanden ist. Bei der Transkription dieses *t*-Haplotyp-spezifischen Fusionsgens wird ein langes Transkript gebildet, das 2 Exons von *Smok* und 15 Exons von *Rsk3* umfasst. Während der *Rsk3*-Teil des Transkripts als etwa 5 kb langer untranslatierter Bereich vorliegt, enthält nur Exon 2 von *Smok1<sup>Tcr</sup>* die kodierende Region für das *Responder*-Protein Smok1<sup>Tcr</sup> [46]. Es stellt eine mutante Kinase mit einem Molekulargewicht von etwa 55 kD bzw. von 484 Aminosäuren dar, die mehrere Aminosäureaustausche im Vergleich zu anderen Wildtyp-*Smoks* aufweist. Von diesen sind wahrscheinlich die Mutationen K129T in der Kinase-Domäne und T164I in einer der beiden Autophosphorylierungs-Domänen für die reduzierte Kinaseaktivität verantwortlich. Diese beträgt lediglich etwa ein Zehntel der Aktivität der Wildtyp-Kinasen.

Am nächsten verwandt zur Familie der *Smok*-Gene ist die der *MAP/microtubule-affinity regulating kinase*-Gene (*Mark*). Diese kodieren Serin/Threonin-Proteinkinasen, die Mikrotubuli-assoziierte Proteine phosphorylieren und dadurch die Dissoziation von Mikrotubuli fördern. In der N-terminalen katalytischen Kinasedomäne beträgt die Homologie zwischen Smok1<sup>Tcr</sup> und Mark2 38 % (95 identische aus 249 Aminosäuren). Die einzelnen Wildtyp-*Smok*-Allele in unterschiedlichen Subspezies von *Mus musculus* weisen untereinander Unterschiede von etwa 10 % ihrer Basenabfolge auf. Die Funktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>* als *t*-Komplex *Responder* wurde anhand von Transgen-Experimenten nachgewiesen [29]. Bei diesen Versuchen wurden Nachkommen von Tieren analysiert, die auf dem Y-Chromosom ein *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transgen integriert hatten und zusätzlich partielle *t*-Haplotypen mit mehreren *Distorter*-Loci trugen. Von den Nachkommen waren etwa zwei Drittel männlich und nur ein Drittel weiblich. In Abwesenheit der *Distorter* sank die Vererbungsrate von männlichen Nachkommen auf unter 50 % [29].



**Abbildung 1.3:** Genetische Organisation von *Smok*-Allelen im *t*-Haplotyp, sowie der *Rsk3*- und *Smok*-Allele auf Wildtyp-Chromosom 17. Oben: *t*-Haplotyp; grau: Exons von *Smok*-Genen, die untranslatierte Regionen enthalten, schwarz: Exons von *Smok*-Genen, die die kodierenden Regionen enthalten, blau: Exons von *Rsk3*. *Smok*<sup>tw12</sup> kodiert die *t*-Haplotyp-spezifische Form einer *Smok* mit Wildtyp-Kinasefunktion, während das Fusionsgen *Smok1*<sup>Tcr</sup> für *Smok1*<sup>Tcr</sup> kodiert, die aufgrund mehrerer Mutationen in der kodierenden Region eine Form der *Smok1* mit stark reduzierter Kinaseaktivität darstellt. Unten: Wildtyp-Chromosom 17; blau: *Rsk3*-Gen. *Rsk3* liegt etwa 7 Mb proximal von *Smok2a* und *Smok1*. Erstellt anhand von *Ensembl Genome Browser*; [29].

#### 1.4.2 Rho-regulierende Proteine als Elemente der *Smok*-Signalkaskade

Da Proteinkinasen Signalüberträger sind, lag die Idee nahe, dass *Distorter* Signalmoleküle kodieren könnten. Diese Vermutung bestätigte sich mit der Klonierung des ersten *Distorter*-Gens durch Bauer und Herrmann im Jahre 2005 [4].

Dabei zeigte sich, dass ein Gen, *Tagap1* (*T-cell activation Rho GTPase-activating protein*) als *Distorter* funktionell war. Dieses Gen kodiert ein G-Protein aktivierendes Protein (*RhoGAP*), das eine Komponente eines Rho-Signalwegs darstellt. Anhand von *Tagap1*-transgenen Männchen wurde gezeigt, dass die Überexpression von Wildtyp-*Tagap1* die Funktion eines *Distorters* im *t*-Haplotyp phänokopiert. Demzufolge vererben *Tagap1*-überexprimierende Männchen einen *Smok1*<sup>Tcr</sup>-tragenden partiellen *t*-Haplotyp bevorzugt an die Nachkommen weiter. Daraus schloss man, dass *Tagap1* im *t*-Haplotyp wahrscheinlich als Hypermorph vorliegt. Die Region *Tcd1a* enthält vier *Tagap1*-Loci, deren Expression zu einer überhöhten Aktivität von *Tagap1* führen könnte. Ein Funktionsverlust, d.h. der *Knock-out* von *Tagap1* reduziert hingegen die Vererbungsrate des *t*-Haplotyps.

Die *t*-Form des *Fgd2*-Gens, das für einen sogenannten *Rho guanine nucleotide ex-*

*change factor* (*RhoGEF*) kodiert, konnte in der Region von *Tcd2* als weiterer *Distorter* identifiziert werden [3]. Im Hoden von heterozygoten *t*-Haplotyp-Männchen wird eine verringerte Expression der kurzen Transkriptvariante und verstärkte Expression der langen Transkriptvariante von *Fgd2* beobachtet. Der *Knock-out* von Wildtyp-*Fgd2* führt zu einer Reduktion der Vererbung eines partiellen *t*-Haplotyps, der den *Responder* enthält, und phänokopiert die Wirkung der *t*-Haplotyp-kodierten Form von *Fgd2*. Die molekulare Klonierung von *Tcd1a* und *Tcd2* zeigte die zentrale Rolle von Rho-Signalwegen bei der durch den *t*-Haplotyp verursachten nicht-mendelschen Vererbung auf.

### 1.4.3 Ein molekulares Modell für die nicht-mendelsche Vererbung

Die Identifizierung des *Responders* und zweier *Distorter*-Gene bildete die Basis für ein molekulares Modell der nicht-mendelschen Vererbung in der Maus (Abb. 1.4) [3]: Die *t*-Haplotyp-kodierten Formen der Rho-Regulatoren *Tagap1* und *Fgd2* wirken auf zwei entgegengesetzte Rho-Signalwege, die beide gemeinsam die Wildtyp-Smok hyperaktivieren. Dies führt zu abnormaler Flagellenbewegung der Wildtyp-Spermien. *Tagap1* und *Fgd2* wirken auch in *t*-Spermien auf die Wildtyp-Smok, doch dort wird die Hyperaktivierung durch die dominant negative Kinase  $Smok1^{Tcr}$  verringert. *t*-Spermien weisen daher eine Normalisierung der Spermienbewegung auf.

Nach diesem Modell werden die *Distorter*-Genprodukte bei der Spermatogenese auf alle Tochterzellen verteilt, während  $Smok1^{Tcr}$  als Gegenspieler der *Distorter* auf *t*-Spermien beschränkt bleibt. Diese Ungleichverteilung der *Responder*-Genprodukte auf die Gameten führt zu zwei phänotypisch verschiedenen Spermienpopulationen, von denen die *t*-Spermien eine stark erhöhte Befruchtungswahrscheinlichkeit besitzen.

Um die Bildung dieser beiden unterschiedlichen Populationen zu erklären, wurde ein Modell zur Beschreibung der Verteilungsvorgänge der Genprodukte der funktionellen Einheiten des *t*-Haplotyps bei der Spermatogenese aufgestellt (Abb. 1.5.):

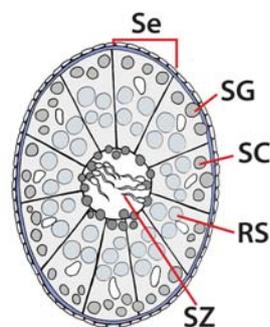
Die Charakterisierung der *Distorter* *Tagap1* und *Fgd2* zeigte, dass deren Transkripte bereits prämeiotisch exprimiert sind. Aus diesem Grund werden sie im Zuge der Meiose auf alle Tochterzellen verteilt. Daher erhalten alle Spermien, auch die Wildtyp-Spermien, die Produkte der *Distorter*-Gene. Die Transkriptexpression von  $Smok1^{Tcr}$  findet dagegen erst postmeiotisch in haploiden Zellen statt. Obwohl Spermatiden während der Differenzierung zu Spermatozoen über zytoplasmatische Brücken mit-

einander verbunden bleiben, unterliegen die Genprodukte zellulärer Restriktion, das heißt, dass das Transkript und das Protein auf die haploiden Zellen beschränkt bleiben, die das Gen dafür tragen. Um Hypothesen aufzustellen, welche Mechanismen bei der Spermatogenese zur Wirkung von *Smok1<sup>Tcr</sup>* in *cis* führen könnten, wird dieser Differenzierungsprozess erläutert.

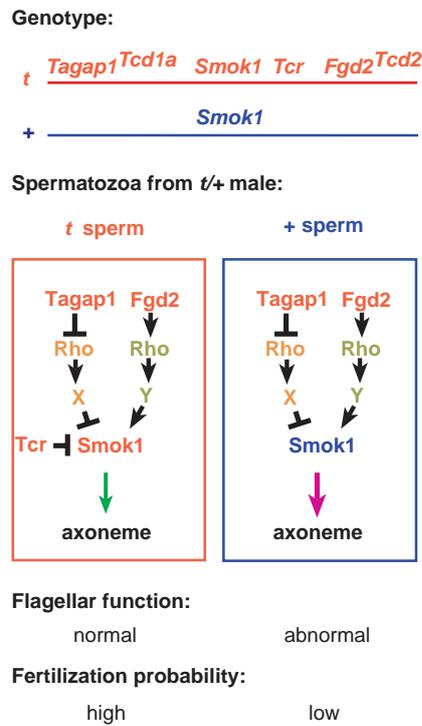
## 1.5 Spermienentwicklung in der Maus

In Mäusen beginnt die Spermatogenese postnatal und dauert 35 Tage. In dieser Zeit werden aus diploiden Spermatogonien haploide Spermatozoen gebildet [76]. Zunächst findet die Differenzierung von Spermatogonien zu diploiden Spermatozyten statt. Diese durchlaufen eine Reduktionsteilung (Meiose) und bilden haploide Zellen, die runde Spermatiden genannt werden. [70][84].

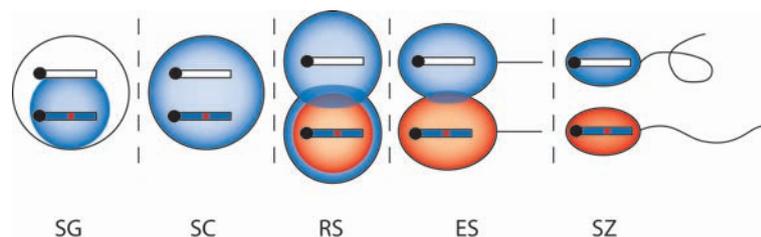
Im weiteren Differenzierungsprozess werden elongierte Spermatiden, in denen sich der Spermienkopf und das Flagellum formt, und schließlich Spermatozoen gebildet [80]. Die Spermienentwicklung, die im Hoden in den Hodenkanälchen statt findet, gliedert sich in 3 Teile: dem proliferativen Teil, der meiotischen Phase und der Differenzierungsphase. Einzelne Reifungsstadien ordnen sich vom Epithel der Hodenkanälchen zur Mitte (*Lumen*) hin an, wobei am äußeren Rand die frühesten und in der Mitte die am weitesten entwickelten Reifestadien liegen. Spermatozoen wandern durch das *Lumen* zunächst in den Ausflusstrakt (*Rete Testis*) und von dort aus zum Nebenhoden (*Epididymis*) ab, in dem die Spermatozoen weiter reifen und schließlich gespeichert werden. Der Entwicklungsprozess findet eingebettet in Nährzellen, sogenannten *Sertoli-Zellen*, statt. Da die differenzierenden Zellen sich mitotisch und meiotisch unvollständig teilen, bleiben Spermatogonien, Spermatozyten und Spermatiden in einem Synzytium über interzelluläre Brücken miteinander verbunden. Schätzungen der Größe



**Abbildung 1.6:** Schema eines Querschnitts durch ein Hodenkanälchen. Se: Sertoli-Zellen; SG: Spermatogonien; SC: Spermatozyten; RS: runde Spermatiden; SZ: Spermatozoen. Undifferenzierte Spermatogonien liegen am äußeren Rand der Hodenkanälchen. In der Mitte (*Lumen*) liegen Spermatozoen, die in das *Lumen* abgegeben werden. Intermediär differenzierte Entwicklungsstadien werden in den mittleren Bereichen lokalisiert.



**Abbildung 1.4:** Modell der Signalwege in  $t$ - und Wildtyp-Spermien. Rote Box: Signalwege in  $t$ -Spermien, blau: Signalwege in Wildtyp-Spermien. Im  $t$ -Haplotyp liegen sowohl *Fgd2*, als auch *Tagap1* als hypermorphe Allele vor. In  $t$ - sowie in  $+$ -Spermien wirken die  $t$ -Haplotyp-kodierten Formen der Proteine Tagap1 und Fgd2 über Rho-GTPasen auf Effektor-Moleküle, welche die Wildtyp-Kinase Smok hyperaktivieren und damit die Beweglichkeit des Spermiums beeinträchtigen. Nur in  $t$ -Spermien wird die schädliche Wirkung auf Smok durch direkte Bindung der mutanten Kinase Smok1<sup>Tcr</sup> an Wildtyp-Smok aufgehoben und eine normale Beweglichkeit des Spermiums wiederhergestellt. Dadurch erhalten  $t$ -Spermien einen Befruchtungsvorteil [3].

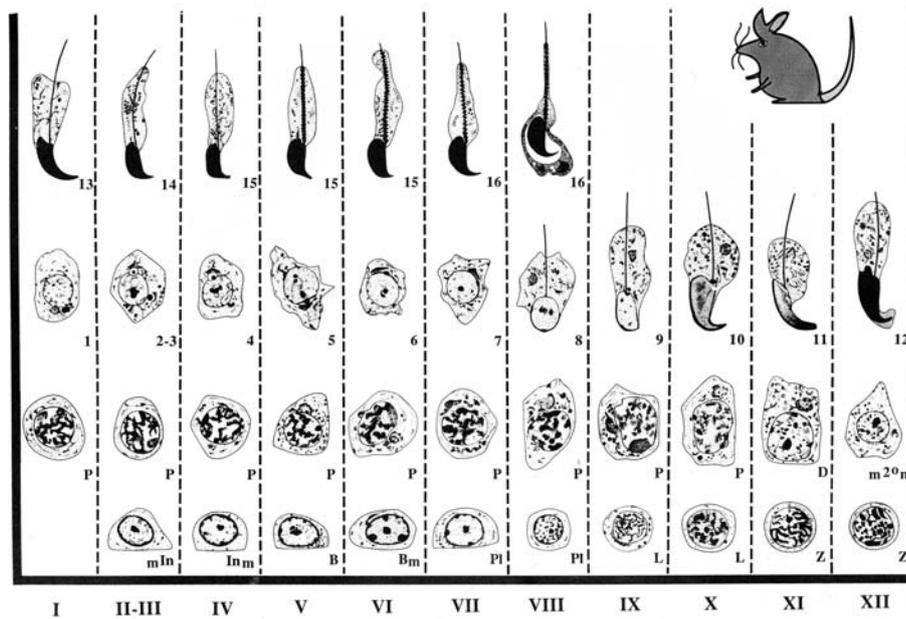


**Abbildung 1.5:** Modell für die Verteilung der *Distorter*- und *Responder*-Genprodukte des *t*-Haplotyps auf haploide Spermatiden in *t/+*-Männchen bei der Spermatogenese. SG: Spermatogonien; SC: Spermatozyten; RS: runde Spermatiden; ES: elongierte Spermatiden; SZ: Spermatozoen. Blau: *Distorter*, rot: *Responder*. Die Expression der *Distorter*-Gene beginnt bereits in diploiden Zellen vor der Reduktionsteilung. Deren Genprodukte werden daher auf alle haploiden Zellen verteilt [3]. Die Expression des *Responder*-Gens dagegen beginnt nach der Meiose in haploiden Zellen [29]. Diese werden nicht zwischen den Tochterzellen ausgetauscht, obwohl interzelluläre Brücken im Synzytium vorhanden sind, um Transkripte und Proteine in die Nachbarzelle zu transportieren. Der Austausch von Genprodukten zwischen haploiden Zellen bei der Spermiogenese ist die Regel, um genotypisch haploide, aber phänotypisch diploide Spermien zu erhalten, damit deren gleichwertige Befruchtungsfähigkeit gewährleistet ist [8]. Die gleichmäßige Verteilung der Genprodukte von X- und Y-Chromosomen, die wichtige Spermatogenese-Regulatoren kodieren, ist für die Entwicklung der Spermatozoen essenziell [28][72].

des Synzytiums gehen von etwa bis zu 100 miteinander verbundenen Zellen aus [70]. Erst kurz vor Ende der Spermatogenese, wenn Spermatozoen entstehen, werden diese Brücken geschlossen. Dies führt dazu, dass während etwa 33 Tagen der Spermatogenese ein Austausch von Genprodukten zwischen den Tochterzellen möglich ist.

### 1.5.1 Proliferative Phase

Im Hoden existieren drei unterschiedliche Arten Spermatogonien: Stammzell- Spermatogonien, proliferative und differenzierende Spermatogonien [32]. Die ersten beiden stellen undifferenzierte Spermatogonien dar, wobei sich die Stammzell-Spermatogonien nur selten teilen. Die proliferativen Spermatogonien teilen sich dagegen schnell und bilden eine große Population undifferenzierter Zellen, die unvollständige Mitosen durchlaufen und daher miteinander in einem Synzytium verbunden bleiben. Auf diese Weise wird die synchrone Entwicklung der Spermatogonien und auch, später in der Spermatogenese, der reifenden Spermatiden gewährleistet. In differenzierenden Spermatogonien wiederum beginnt der Differenzierungsprozess, indem diese in die meiotische Phase übergehen und frühe primäre Spermatozyten bilden.



**Abbildung 1.7:** Schematische Darstellung der Spermienentwicklung in der Maus. Die Spermatogenese dauert etwa 35 Tage. Ein Zyklus (I-XII) entspricht etwa 10 Tagen. Unterste Reihe: Differenzierung der Spermatogonien zu Spermatozyten; zweite Reihe von unten: diploide meiotische Spermatozyten; dritte Reihe von unten: haploide postmeiotische runde Spermatozyten, die ab Stadium VIII elongierte Spermatozyten bilden; oberste Reihe: Differenzierung elongierter Spermatozyten zu Spermatozoen. Pl: Präleptotäne Spermatozyten; L: Leptotäne Spermatozyten; Z: Zygotäne Spermatozyten; P: Pachytäne Spermatozyten; D: Diplotäne Spermatozyten; 1-16: Differenzierungsstadien der Spermatozyten. Nach etwa 20 Tagen werden durch die Meiose haploide runde Spermatozyten gebildet. Die Differenzierung von runden über elongierte Spermatozyten bis zu Spermatozoen dauert etwa weitere 15 Tage [80].

### 1.5.2 Meiose

Die Prophase der ersten meiotischen Teilung dauert in der Maus fast zwei Wochen. In dieser Zeit durchlaufen Spermatozyten nacheinander preleptotäne, leptotäne, zygotäne, pachytäne und diplotäne Phasen. Diese unterscheiden sich morphologisch in der Form und Größe ihres jeweiligen Zellkerns. Spermatozyten, die sich im Übergang von Präleptotän zu Leptotän befinden, rücken ein Stück vom äußeren Epithel ab und bilden ein intermediäres Kompartiment. In zygotänen Spermatozyten beginnt die Paarung von Geschwisterchromosomen im synaptonemalen Komplex, die in der pachytänen Phase zum Crossing-over führt. Das Pachytän dauert bei der Spermienentwicklung etwa eine Woche und ist somit die längste meiotische Phase. Im Diplotän löst sich der synaptonemale Komplex auf. In dieser Phase wird der diploide Chromosomensatz getrennt, und es entstehen sekundäre Spermatozyten. Bei der Meiose II, die kurz darauf beginnt, werden die Chromatiden getrennt. Diese verteilen sich dabei auf die bei der Zytokinese gebildeten haploiden runden Spermatiden.

### 1.5.3 Postmeiotische Spermiogenese

Die Differenzierung von frühen haploiden Spermatiden zu Spermatozoen nimmt in der Maus etwa 15 Tage in Anspruch, in denen wesentliche morphologische Veränderungen innerhalb der Zelle statt finden. In dieser Zeit bildet sich das Flagellum und das Akrosom aus. Außerdem wird der haploide Zellkern von seiner runden Form in eine deutlich kleinere, kondensierte, hakenförmige Struktur gebracht.

Bei der Spermiogenese können Spermatozyten, runde Spermatiden, elongierte Spermatiden und Spermatozoen anhand morphologischer Merkmale voneinander unterschieden werden (Abb. 1.7).

### 1.5.4 Struktur und Bildung des Flagellums

Spermatozoen bestehen aus dem Spermienkopf und dem Flagellum, die über die sogenannte Basalplatte miteinander verbunden sind. Das Flagellum besteht aus drei Teilen, die sich anhand ihrer Ultrastruktur unterscheiden: der Mittelteil, der Hauptteil und das Endstück (Abb. 1.8).

Das Flagellum enthält das Axonem, das eine Mikrotubulstruktur darstellt, die neun äußere und zwei innere Mikrotubuli (9+2) ausbildet. Dieses ist im Mittelteil von Mitochondrien umgeben, der mit einer ringförmigen Struktur, dem sogenannten *Annulus*

abschließt und dort in den Hauptteil übergeht, der sich durch das Fehlen der Mitochondrien auszeichnet.

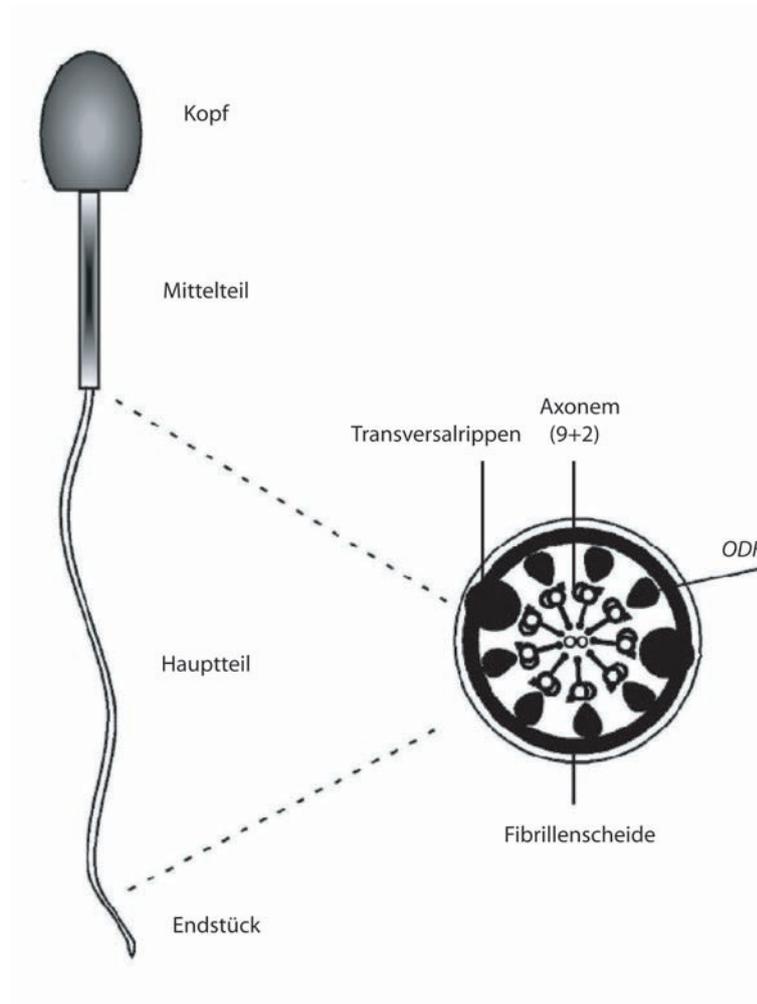
In diesem Teil des Flagellums, unterhalb der Membran, befindet sich die Fibrillenscheide, die zum großen Teil aus Strukturproteinen besteht [14]. Transversalrippen, die einen Teil der Fibrillenscheide darstellen, stabilisieren die Bewegung des Flagellums, indem sie eine rechts-links Symmetrie herstellen und somit eine propellerartige Bewegung des aktivierten Spermiums verhindern [13][17].

Zum Axonem hin liegen die sogenannten *Outer Dense Fibers*, die wahrscheinlich eine strukturgebende Funktion besitzen. Dyneine, die an den Mikrotubuli lokalisiert sind, verursachen durch ihre ATPase-Funktion eine Gegeneinanderverschiebung der Mikrotubuli, die schließlich zur Bewegung des Flagellums führt.

Die Biogenese des Flagellums beginnt in frühen runden Spermatiden. Das Zentriolenpaar wandert dazu an den äußersten Rand der Zelle und haftet sich dort an die Zellmembran. Eine der beiden Zentriolen beginnt, das Axonem auszubilden. Dadurch beult die Zellmembran ein wenig aus. Das Zentriolenpaar wandert anschließend zum Zellkern zurück, um an die Kernmembran zu binden. Dabei faltet sich die anhaftende äußere Zellmembran nach innen. Das Flagellum wächst während des gesamten Differenzierungsprozesses durch Anknüpfen weiterer Tubulin-Untereinheiten, bis seine volle Länge erreicht ist.

### 1.5.5 Bildung des Akrosoms

Das Akrosom ist ein Spermien-spezifisches Kompartiment, das den kompaktierten Spermienkern im Spermienkopf zum großen Teil umgibt. In diesem Vesikel befinden sich unter anderem Enzyme, die bei der Akrosomenreaktion exozytotisch freigesetzt werden und für die Befruchtung der Eizelle notwendig sind. Die Entstehung des Akrosoms beginnt in frühen haploiden Spermatiden an der Kernhülle durch die Fusion von proakrosomalen Vesikeln, den sogenannten *proakrosomalen Granules*, die vom perinuklären Golgiapparat produziert werden [44]. Die Vesikel haften sich an eine zytoskelettale Platte, dem Akroplaxom, das aus Aktin und Keratin besteht und direkt an der Kernhülle liegt [40]. Das Akrosom wächst durch dessen Fusion mit weiteren Vesikeln, die vom Golgiapparat gebildet und abgesondert werden. Nach und nach flacht das am Akroplaxom haftende Akrosom ab, wobei es sich mützenartig über den Kern legt. Der Winkel mit dem das Akrosom den runden Zellkern umgibt, von der Mitte des Zellkerns aus gemessen, dient zur Bestimmung der Reifungsstadien runder



**Abbildung 1.8:** Schematische Darstellung eines Säugetier-Spermiums. Links: schematische Darstellung des gesamten Spermatozoons, rechts: vergrößerter Querschnitt durch den Hauptteil des Flagellums. *ODF*: *Outer Dense Fibers*. Das Axonem besteht aus 9 Mikrotubuliparen, die ein zentrales Paar umgeben [87]

Spermatiden. Der Winkel von  $40^\circ$  entspricht dem beginnend abflachenden akrosomalen Vesikel in runden Spermatiden des Stadiums 4. Ein Winkel zwischen  $40 - 95^\circ$  entspricht einer Zelle des Stadiums 5,  $95 - 120^\circ$  des Stadiums 6,  $120 - 150^\circ$  des Stadiums 7 (Abb. 1.7). Gegen Ende der Bildung des Akrosoms beginnt der Golgiapparat, am Kern entlang zum caudalen Ende der Zelle zu wandern. Das Akrosom bleibt am Kern haften und verändert sich während der Umgestaltung der Kernform mit.

### 1.5.6 Umstrukturierung von Chromatin und Zellkern

Während der Spermio-genese verkleinert sich das Volumen des haploiden Zellkerns auf einen Bruchteil seiner ursprünglichen Größe. Dieser Vorgang erfordert insbesondere eine starke Kompaktierung der DNA und daher DNA-Bindeproteine, die diesen Prozess ermöglichen.

In runden Spermatiden wird die Chromatinstruktur des Zellkerns nach und nach aufgelöst und Histone vorübergehend durch Transitionsproteine und schließlich durch Protamine ersetzt. Beide sind stark basische Proteine, die DNA anstelle der Histone binden und deren Ladung neutralisieren.

Neben der molekularen Umstrukturierung des Kerns, deren Mechanismen noch nicht genau geklärt sind, finden morphologische Veränderungen von einer großen runden zu einer kompakten, hakenförmigen Struktur statt.

Dennoch existiert ein Modell, durch das dieser Prozess erklärt werden kann: Die Verformung des Zellkerns wird durch die Manschette veranlaßt, die eine Organelle aus schlauchartig angeordneten Mikrotubuli und F-Aktinfasern darstellt, die den Kern umgeben. Ein perinukleärer Ring verbindet die Manschette mit der Kernmembran [43]. Apikal befindet sich der marginale Ring des Akroplaxoms, das demosomenartig ebenfalls mit der Kernmembran verbunden ist und das Akrosom mit dem Kern verbindet. Beide Ringe wandern bei der Reifung der Spermatiden caudal und ziehen den Zellkern mechanisch in die Länge. Die hakenförmige Verformung des elongierten Spermienkopfes wird dabei durch Verbindungen zwischen dem Kern der Spermatiden und den Sertoli-Zellen ausgelöst. Diese bestehen zum großen Teil aus F-Aktin und bilden Adhäsionskomplexe, die dazu führen, dass eine seitliche Zugkraft auf den Spermienkopf ausgeübt wird.

## 1.6 Translationelle Kontrolle von mRNAs in der Spermatogenese

Durch den strukturellen Umbau des Zellkerns wird hochkondensiertes Chromatin gebildet, das für den Transkriptionsapparat unzugänglich ist. Daher erfolgt nach und nach ein globaler Transkriptionsstop, der in späteren Stadien elongierter Spermatiden vollständig ist. Aus diesem Grund werden Gene in prä- und postmeiotischen Stadien der Spermiogenese exprimiert, auch wenn die durch die Transkripte kodierten Proteine erst später im Laufe der Differenzierung benötigt werden [42]. Daher unterliegen Hoden-spezifische Transkripte zumeist translationeller Kontrolle, die unter anderem über *cis*-regulatorische Elemente und *trans*-regulatorische Faktoren gesteuert wird [47][34]. Auch strukturelle Eigenschaften der Transkripte, wie zum Beispiel stark verzweigte Sekundärstruktur der mRNA, beeinflussen deren translationellen Eigenschaften [50][67].

### 1.6.1 *cis*-regulatorische Elemente und *trans*-regulatorische Faktoren

Die meisten posttranskriptionell regulierten Transkripte enthalten *cis*-regulatorische Motive in ihren 5' und/oder 3' untranslatierten Regionen (UTRs), die sequenz- oder strukturspezifisch durch Ausbildung bestimmter Sekundär- und Tertiärstrukturen von *trans*-regulatorischen Faktoren erkannt werden können. Ein Beispiel für die Interaktion *cis*-regulatorischer Elemente mit *trans*-regulatorischen Faktoren ist die translationelle Kontrolle des *Protamin*-Transkripts durch die Bindung des RNA-Bindeproteins *Testis-Brain-RNA Binding Protein* (TB-RBP), dem Mausehomolog des humanen *Translin*, an dessen 3'UTR [54][16][58]. *Protamin* wird bei der Spermatogenese bereits in haploiden runden Spermatiden exprimiert, aber erst in elongierten Spermatiden translatiert.

Die Kontrolle des Zeitpunkts der Translation kann dabei über die posttranslationelle Modifikation von RNA-Bindeproteinen, z.B. durch Phosphorylierung, reguliert werden. Dies führt dazu, dass dieses die Affinität zum Transkript verliert, das daraufhin translatiert werden kann [33].

Ein weiteres Beispiel für *trans*-regulatorische Faktoren ist die translationelle Kontrolle von *oskar*-mRNA durch das RNA-Bindeprotein Bruno. Oskar-Protein ist bei der Embryogenese der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* für die Ausbildung des Abdomens und der Keimbahn verantwortlich. Die korrekte Lokalisation von Oskar

und die Kontrolle des Zeitpunkts der Translation wird dabei durch Bruno reguliert [45]. Bruno bindet an die 3' untranslatierte Region der *oskar*-mRNA an einer spezifischen, konservierten Sequenz, dem sogenannten *Bruno Response Element* (BRE), und reprimiert dadurch dessen Translation. RNA-Bindeproteine der Bruno-Familie werden auch im Maus-Hoden exprimiert [11]. Der Funktionsverlust, also der *Knock-out* des *Cugbp1*-Gens, das zur Familie der *Bruno*-Gene zählt, führt in der Maus zu Sterilität von Männchen und Weibchen und spielt daher eine essenzielle Rolle bei der Spermatogenese [53].

### 1.6.2 MicroRNA-abhängige Regulation der Translation im Hoden

Posttranskriptionelle Regulation von mRNA kann ebenfalls durch die Bindung von kurzen, einzelsträngigen RNAs (microRNAs) von 21-23 Nukleotiden Länge erfolgen [57][55][88]. MicroRNAs werden aus langen Vorläufertranskripten prozessiert und anschließend in den *RNA-induced Silencing Complex* (RISC) integriert, der die microRNA-Zieltranskripte erkennt und bindet [6]. Dieser Prozess findet im Zytoplasma somatischer Zellen vor allem in distinkten Foci, den sogenannten *P-Bodies*, statt [61]. Diese enthalten wichtige Faktoren für die Regulation des RNA-Metabolismus. In Abhängigkeit weiterer regulatorischer Elemente, die im Zieltranskript vorhanden sind, wird dieses durch die Bindung der microRNA entweder translationell reprimiert und/oder degradiert [5][35][89].

Einige microRNAs werden im Hoden in großen Mengen exprimiert [79]. Obwohl deren Bedeutung im Hoden noch nicht genau geklärt ist, wird vermutet, dass sie dort durch ihren Einfluss auf die Translation und Degradation von mRNA Hoden-spezifische Prozesse regulieren. Versuche, bei denen die microRNA-Biogenese in Spermatogonien der Maus unterbunden wurde, wiesen darauf hin, dass dadurch deren Proliferation beeinträchtigt wird. Möglicherweise wird dies erreicht, indem microRNAs auf Zellzyklusgen-Transkripte wirken [27].

Darüber hinaus wurde die Interaktion einer microRNA, *Mirn122a*, die im Hoden exprimiert wird, mit dem Transkript von *Tnp2*, das für das Hoden-spezifische Transitionsprotein 2 kodiert, identifiziert [96]. *Mirn122a* bindet an die 3'UTR des Transkripts und verursacht dessen Degradation *in vitro*. Möglicherweise reguliert dieser Prozess auch *in vivo* den Metabolismus der *Tnp2*-mRNA.

### 1.6.3 Inhibition der Translation durch stark verzweigte RNA-Sekundär- und Tertiärstrukturen

Für die Translation von stark verzweigten Transkripten wird die RNA-Helikase eIF4A benötigt. Diese dient als Kofaktor für die Initiation der Translation und kann durch die Bindung von BC1-RNA inhibiert werden [59]. BC1 ist eine kleine nicht-kodierende RNA, die in großen Mengen im Gehirn und im Hoden exprimiert wird [73]. Die Bindung von BC1 an eIF4A begrenzt die Konzentration an verfügbarer Helikase und kann dadurch die Initiation der Translation von Zieltranskripten beeinflussen [91]. Auch die Bindung von stark verzweigten Strukturen der 5'UTR der Transkripte an Ribosomen kann die Translation hemmen, indem diese in einer Stand-by Position am Transkript gehalten werden, bis die mRNA aufgewunden wird [68]

### 1.6.4 Translationelle Kontrolle durch Inhibition des *Scanning*-Mechanismus durch AUGs in 5' untranslatierten Regionen

Normalerweise binden Ribosomen an die 5' Methy-Cap Struktur des Transkripts und beginnen an der mRNA entlang zu wandern, bis sie das erste AUG erreichen, und starten dort die Translation [51]. Dieser Vorgang wird als *Scanning* bezeichnet. Ein AUG, das in seiner Umgebung eine sogenannte optimale Kozak-Sequenz besitzt, wird vom größten Teil der Ribosomen als Translationsstart erkannt. Eine optimale Kozak-Sequenz ist durch die Basenfolge -3 (A/G)XXAUGG +1 definiert [52]. Wenn das AUG dagegen nicht in einem optimalen Kozak-Kontext vorliegt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Ribosomen ein AUG überspringen und die Translation an einem strangabwärts liegendem AUG beginnen, was als so genanntes *Leaky-Scanning* bezeichnet wird [60][9]. Jene AUGs, die vor dem eigentlichen Translationsstart der kodierenden Region liegen, werden Strangaufwärts-AUGs genannt (*upstream AUG* oder uAUG) und bilden häufig kurze Peptide (*upstream open-reading frame* oder uORF) [25]. Liegen mehrere uAUGs in der untranslatierten Region des Transkripts vor, erreichen nur wenige Ribosomen die kodierende Region des Transkripts, was dessen translationelle Repression verursacht [78][93]. uAUGs, die zu ineffizienter Translation der kodierenden Region führen, werden häufig im 5'UTR von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen, Signalmolekülen und Kinasen beobachtet, zu denen auch die *Smok*-Familie zählt [50].

### 1.6.5 Cap-unabhängige Translation von mRNA durch *Interne Ribosomen Bindestellen (IRES)*

Eine *IRES* stellt eine direkte Bindestelle für Ribosomen dar, die dadurch den Cap-abhängigen *Scanning*-Mechanismus zur Translation von mRNA umgehen. Dieses Element wird bisweilen in Transkripten beobachtet, die translatiert werden, wenn die Bedingungen innerhalb der Zelle keine Cap-abhängige Translation zulassen. Dies kann zum Beispiel unter zellulärem Stress geschehen.

Ob eine *IRES* in einem Transkript vorliegt, kann nicht über die Basensequenz vorhergesagt werden. Sie zeichnet sich lediglich durch ihre Eigenschaft aus, Ribosomen zu binden und am nächstgelegenen AUG die Translation zu starten. Die Gemeinsamkeit der bisher identifizierten *IRES*-Elemente beschränkt sich auf die Ausbildung einer stark verzweigten mRNA-Struktur. Jedoch kann diese *in silico* nur eingeschränkt berechnet und vorhergesagt werden. Aus diesem Grund kann dieses Element bislang lediglich experimentell auf Funktionalität überprüft werden.

### 1.6.6 In Spermatozoen kann atypische Translation statt finden

Der haploide Zellkern von Spermien wird im Laufe der Spermiogenese transkriptionell stillgelegt, da durch seine Umstrukturierung hochkondensiertes Chromatin entsteht [42]. Allerdings wurde von Gur und Breitbart beschrieben, dass Spermatozoen Transkripte enthalten, die bei der Kapazitierung durch mitochondriale Ribosomen im Spermienkern atypisch translatiert werden [24]. Dies bedeutet, dass Transkripte, wie das in dieser Publikation beschriebene *CatSper1*-Transkript, das einen Calcium-Kanal im Flagellum kodiert, über mehrere Wochen stabil sein können. Welche Mechanismen die Stabilität der Transkripte verursachen, ist jedoch unbekannt.

## 1.7 Intra- und interzellulärer Transport von Genprodukten im Hoden

Während der Reifung bleiben die meiotischen Partner über interzelluläre Zytoplasmabrücken im Synzytium verbunden. Hierdurch werden die Zellen in ihrem Zellzyklus synchronisiert. Außerdem wird dadurch ein gleichmäßiger Austausch von essenziellen Genprodukten gewährleistet. Gezeigt wurde dies von Robert Braun anhand der Verteilung der Genprodukte von *mP1*, einem Gen, das Protamin1 kodiert, das für die Kernkompaktierung in Spermien benötigt wird [8]. Obwohl ein *mP1*-

Reportertranskript von einem hemizygoten Transgen postmeiotisch exprimiert wird, verteilen sich die Genprodukte gleichmäßig auf alle Spermatiden. Dabei wird das Transkript posttranskriptionell kontrolliert, indem ein RNA-Bindeprotein an dessen 3'UTR bindet.

Auch Genprodukte von X- und Y-Chromosomen werden auf die haploiden Tochterzellen gleichmäßig verteilt, wodurch die gleichwertige Entwicklung der Spermien erreicht wird [72][28].

Der Austausch zwischen den Spermatiden findet durch einen aktiven Transport der Genprodukte über Mikrotubuli statt [90]. Studien zu diesem Prozess zeigen, dass unter anderem Transkripte, gebunden an RNA-Bindeproteine, über interzelluläre, zytoplasmatische Brücken transportiert werden. Diese ungefähr  $0,5 \mu\text{m}$  großen Komplexe werden *Ribonukleoproteinpartikel (RNPs)* genannt. Sie interagieren intrazellulär mit dem sogenannten *Chromatoid Body*, einer Hoden-spezifischen Organelle, die nukleär assoziiert ist und in seiner Zusammensetzung den sogenannten *P-Bodies* somatischer Zellen ähnelt [7][49]. Der *Chromatoid Body* bewegt sich dynamisch an der Kernhülle entlang und kann ebenfalls über die zytoplasmatischen Brücken zwischen Tochterzellen im Synzytium ausgetauscht werden [90]. Nach welchen Kriterien der *Chromatoid Body*, beziehungsweise *RNPs*, intra- oder interzellulär transportiert werden, ist nicht geklärt.

Dennoch ist bekannt, dass der Transport der *RNPs* intrazellulär über die Manschette erfolgt, die nicht nur die Funktion für die morphologische Gestaltung des Kerns übernimmt [38]. Auch Vesikel, die vom Golgiapparat abgeschnürt werden, können diesen Mechanismus nutzen. Dieser Prozess wird als *Intramanschetten-Transport (IMT)* bezeichnet und wird über Dyneine und Kinesin, sowie über Myosin als Motorproteine reguliert. Diese Motoren sind in der Lage, den Transport von Vesikeln und Partikeln über Aktin- und Mikrotubuli-abhängigen Transport zu steuern [41]. Auf diese Weise können Proteine und Transkripte transportiert werden, die für die Ausbildung distaler Strukturen, vor allem des Flagellums, benötigt werden. Der Transport entlang der Mikrotubuli des Axonems wird dann als *intraflagellärer Transport (IFT)* bezeichnet.

## 1.8 Zielsetzung

Der *t*-Haplotyp, eine variante Form von Chromosom 17, wird von heterozygoten Männchen bevorzugt an ihre Nachkommen vererbt. Mehrere *Distorter*-Loci, die im *t*-Haplotyp vorhanden sind, beeinträchtigen in *trans* die Wildtyp-Spermien, während die *t*-Spermien durch den *Responder*, der ausschließlich in *cis* wirkt, geschützt sind [62]. Dadurch kommt es zur bevorzugten Vererbung des *t*-Haplotyps.

Bei der Analyse der Spermien von heterozygoten *t*-Haplotyp-Männchen (*t/+*) wurde eine bimodale Verteilung der Flagellenbewegung nachgewiesen, die auf die Bildung von zwei Spermienpopulationen hinwies [36][85]. Diese Beobachtung war die Grundlage für die Hypothese, dass das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein auf die *t*-Spermien beschränkt bleibt und die Funktion als *Responder* ausübt [29]. Diese Annahme widerspricht jedoch der Regel, dass alle Prozesse der Spermatogenese dazu ausgelegt sind, genetisch unterschiedliche, aber phänotypisch identische Spermatozoen zu bilden [8]. Ziel der Arbeit war es daher zu untersuchen, wie die Beschränkung der *Responder*-Wirkung auf die *t*-Spermien molekular zustande kommt.

Zu diesem Zweck sollten *Smok1<sup>Tcr</sup>*-transgene Tiere generiert werden, anhand derer analysiert werden sollte, wie sich das Transkript und das Protein des *Responder*-Gens im Hoden und in den Spermatozoen verhalten. Dadurch sollte der außergewöhnliche Mechanismus geklärt werden, der die Wirkung von *Smok1<sup>Tcr</sup>* auf *t*-Spermien beschränkt. Zusätzlich sollten die Elemente des Gens, insbesondere die untranslatierten Regionen *in vitro* und *in vivo* auf Funktionalität überprüft werden.

Außerdem sollte die Analyse eines Mausmodells Aufschluss darüber geben, ob die Wirkung des *Responder*-Gens *Smok1<sup>Tcr</sup>* in *cis* eine spezifische Eigenschaft des mutierten Gens ist, oder auch auf das Wildtyp-Gen *Smok1* zutrifft.



# Kapitel 2

## Material und Methoden

**Tabelle 2.1:** Erläuterungen häufig benutzter Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS mit 0,2 %Tween 20
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
SSC	Standard Salz-Citrat-Lösung (standard saline citrate)
MAB/T	Äpfelsäure-Puffer (maleic acid buffer) T=Tween20
NTMT	NaCl, Tris, MgCl, Tween20
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindol
NGS	Normales Ziegenserum
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
DIG	Digoxigenin
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
kb	Kilobasen
bp	Basenpaare
min	Minuten
h	Stunden
E.coli	Escherichia coli

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei Sigma Aldrich oder Roth erworben.

## 2.1 Molekularbiologische Methoden

### 2.1.1 Allgemeine Methoden zur Klonierung

**Tabelle 2.2:** Bakterienstämme

Art	Kompetenz
Elektromaxx Stable 4 (Invitrogen)	elektrokompetent
DH5alpha	elektrokompetent
TOP 10 (Invitrogen)	chemisch kompetent

**Tabelle 2.3:** Verwendete Antikörper

Antikörper, Art, Spezies	Firma
Anti-Myc (Klon 9E10), monoklonal, Maus	Sigma
Anti-Myc (Klon 4A6), monoklonal, Maus	Upstate
Anti-Myc, polyklonal, Hase	Sigma
Anti-Myc, polyklonal, Ziege	Novus Biologicals
Anti- $\beta$ -Galaktosidase, polyklonal, Hase	Invitrogen

**Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Größenauftrennung** Für die Agarosegelelektrophorese wurde Agarose (Invitrogen) in jeweils erforderter Konzentration zwischen 0,6 bis 4 % in TAE bei Raumtemperatur suspendiert und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht, um die Agarose zu lösen. Die Agaroselösung wurde mit Ethidiumbromidlösung (Invitrogen) versetzt und in Elektrophoresekammern gegossen. Nach Polymerisation des Gels erfolgte die Elektrophorese in 1xTAE-Lösung für die je nach Größe der DNA-Fragmente erforderter Laufzeit.

**Restriktionsenzyme** Soweit nicht anders erwähnt, stammen alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme von Promega.

**Konzentrationsmessungen von RNA- und DNA-Proben** Konzentrationsmessungen von RNA- und DNA-Proben wurden im NanoPhotometer (Implen) durchgeführt.

**Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)** Für alle Polymerase-Kettenreaktionen wurde der Mastercycler (Eppendorff) verwendet. Falls nichts anderes erwähnt, wurde die initiale Dissoziation doppelsträngiger DNA bei 94°C für 3 min durchgeführt. Jeder Zyklus beginnt mit 15 sec 94°C, gefolgt von 15 sec Anlagerungszeit bei von den Primerpaaren abhängigen individuellen Temperaturen, in der Regel 55 °C. Anschließend erfolgte die Elongation der DNA bei 72°C je nach verwendeter Polymerase und Länge des DNA-Fragments. Die Zyklenzahl betrug zwischen 30 und 40 Zyklen und wurde in den jeweiligen Kapiteln genauer beschrieben. Abschließend wurden die Proben 2 min lang bei 72°C gehalten.

**Gelextraktionen und Aufreinigung von PCR Ansätzen** Zur Extraktion von DNA wurde das SV Gelextraktions- und PCR Wizard Kit (Promega) nach Herstellerprotokoll verwendet. Elution der DNA erfolgte in 50µl destilliertem, nukleasefreiem Wasser.

**Sequenzierungen** Alle Sequenzierungen erfolgten bei MWG Biotech Sequencing Service, Martinsried.

**Dephosphorylierung von Vektoren** Alle verwendeten Vektoren wurden vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, CIP, Roche) nach Herstellerprotokoll behandelt. Lediglich Vektoren, die zum Blau-Weiss Screening herangezogen wurden, wurden nicht dephosphoryliert.

**Auffüllen einzelsträngiger DNA Fragmente mit 5' Überhang** Zum Reaktionsansatz wurden 0,2 mM dNTPs und 1 µl T4-Polymerase Klenow Fragment (Promega) zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von EDTA-haltigem DNA-Ladepuffer oder sofortiges Aufreinigen über das Promega SV Gelextraktions und PCR Wizard Kit nach Herstellerprotokoll.

**Auffüllen einzelsträngiger DNA Fragmente mit 3' Überhang** Zum Ansatz wurde 1 µl T4 Polymerase Klenow Fragment (Promega) zugegeben und 10 min inkubiert. Danach wurden 0,2 mM dNTPs zugefügt. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch

Zugabe von EDTA-haltigem DNA Ladepuffer oder sofortiges Aufreinigen über Promega SV Gelextraktions- und PCR Wizard Kit.

**Ligationen und Transformation** Zur Ligation wurde die T4-Ligase (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Für eine Ligation wurden etwa 25 ng des entsprechenden Vektors sowie etwa die dreifache molare Menge Insert in einen Ligationsansatz von 20  $\mu\text{l}$  gegeben. Die Ligation wurde in einem mit Eis gefüllten Behälter angesetzt, das sich nach dem Schmelzen langsam bis zum Erreichen der Raumtemperatur aufwärmte. So erhielt man ein langsam ansteigenden Temperaturgradienten. Diese Prozedur wurde für mindestens 4 h oder über Nacht angesetzt. Für chemische Transformation wurden 10  $\mu\text{l}$ , für elektrische Transformation mittels Elektroporator Gene Pulser (BioRad) 1 - 2  $\mu\text{l}$  des Ansatzes eingesetzt und nach Herstellerprotokoll in *E.coli*-Zellen transformiert.

**Blau-Weiss Screening von Plasmiden in *E.coli*** Ein Teil des Ligationsansatzes wurde in *E.coli* transformiert. Die Zellen wurden anschließend in 150  $\mu\text{l}$  2x LB-Medium aufgenommen. Von den insgesamt 250  $\mu\text{l}$  wurden 50  $\mu\text{l}$  abgenommen und in ein neues Eppendorff-Gefäß überführt. Zu den restlichen 200  $\mu\text{l}$  wurden 10  $\mu\text{l}$  1mM IPTG und 40  $\mu\text{l}$  2 % X-Gal Lösung in DMF zugefügt. Auf den 50  $\mu\text{l}$  Ansatz wurden gleiche Mengen IPTG und X-Gal pipettiert, sowie weitere 200  $\mu\text{l}$  Medium. Beide Ansätze wurden auf LB Platten mit Ampicillin plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.1.2 Klonierung von Konstrukten zur Generierung transgener Mauslinien mittels Vorkerninjektion

**Die Transgen-Konstrukte *Tg9*, *Tg10*, *Tg11*** Die Transgen-Konstrukte *Tg9*, *Tg10* und *Tg11* wurden von Bernhard G. Herrmann zur Generierung transgener Mauslinien zur Verfügung gestellt (Abb. 2.1, unveröffentlicht). Diese Konstrukte dienen außerdem als Ausgangsmaterial für die Klonierung weiterer modifizierter Transgen-Konstrukte, die im Folgenden beschrieben werden.

**Klonierung des *Delta 5' Tg9*-Transgens** Das Konstrukt *Tg9* im pBlueskript-Vektor pBS-KS (*Tg9* in pBS) diente als Basis für dieses Transgen-Konstrukt, dem die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* fehlt. Dazu wurde der Promotor mitsamt der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* durch EcoRV- und BamHI-Verdau entfernt. Der Promotor wurde mittels

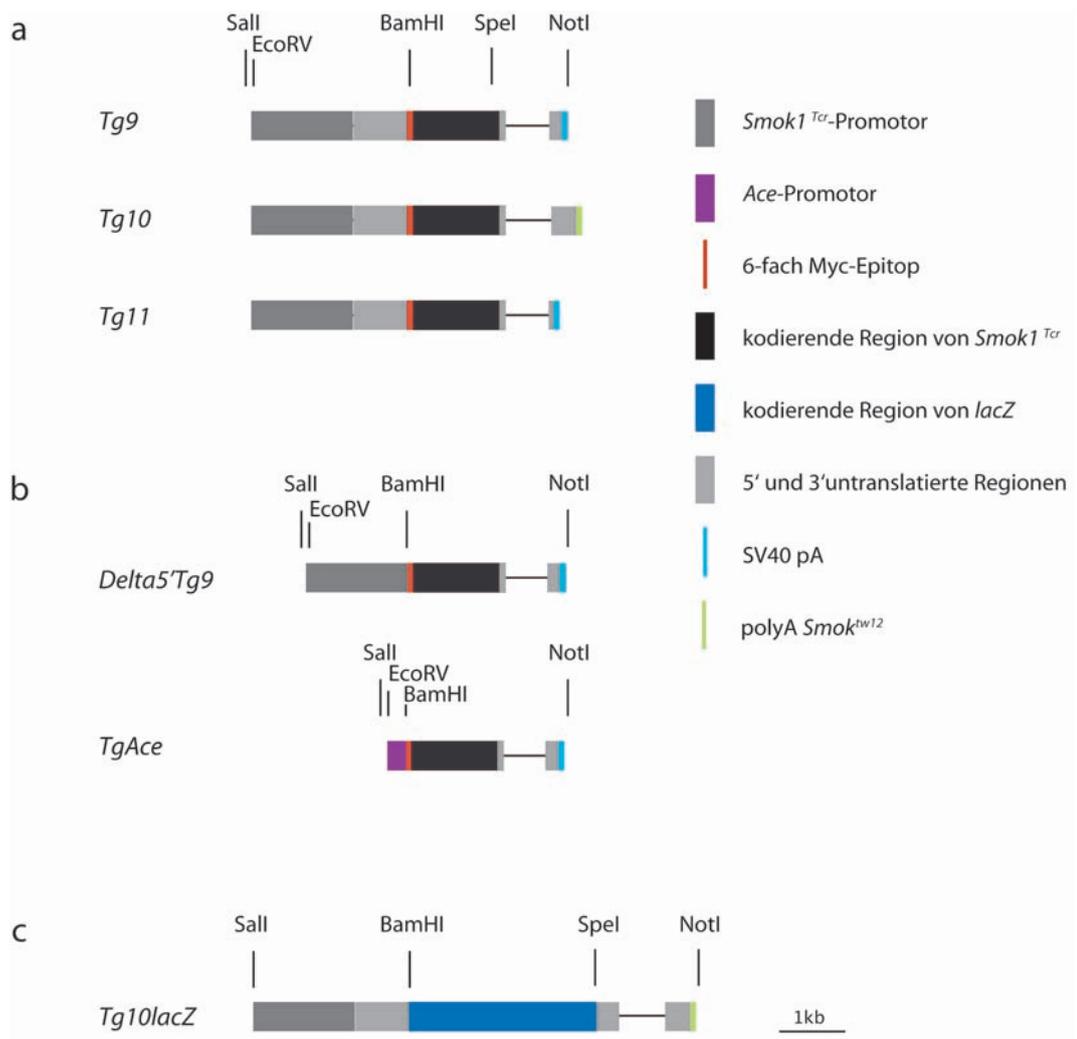


Abbildung 2.1: Darstellung der Transgen-Konstrukte mit Restriktions-Schnittstellen

Prime Star Polymerase (Takara) vom Plasmid *Tg9* in pBS mit dem Primerpaar NV122/123 amplifiziert, in EcoRV-geöffneten gereinigten pBS-KS Vektor subkloniert und blau-weiss selektioniert. Aus dem Plasmid wurde der Promotor über EcoRV und BamHI isoliert und in den geöffneten *Tg9*-Vektor umkloniert.

**Tabelle 2.4:** Oligonukleotidsequenzen verwendeter Primer für die Klonierung

Primer	Sequenz
NV122	gatatcGAATTCCTGCAGATGTGGCAT
NV123	GGATCCCATGGCTAAGGTCTACTCATTAAGAC

**Klonierung des Transgens *TgAce*** Zur Klonierung von *TgAce* diente *Tg9* als Grundlage. Von *Tg9* in pBS wurde über EcoRV und BamHI der Promotor und der gesamte 5'UTR entfernt und durch den Hoden-spezifischen Ace-Promotor von ca 91 bp Länge ersetzt [30]. Der Ace-Promotor wurde mit dem Primerpaar AcePs/AceNcoBamHI aus einem Plasmid mittels Taq-Polymerase amplifiziert und in Topo pCRII TA subkloniert, über EcoRV- und BamHI-Restriktionsverdau isoliert und in den EcoRV- und BamHI-geöffneten Vektor von *Tg9* in pBS integriert .

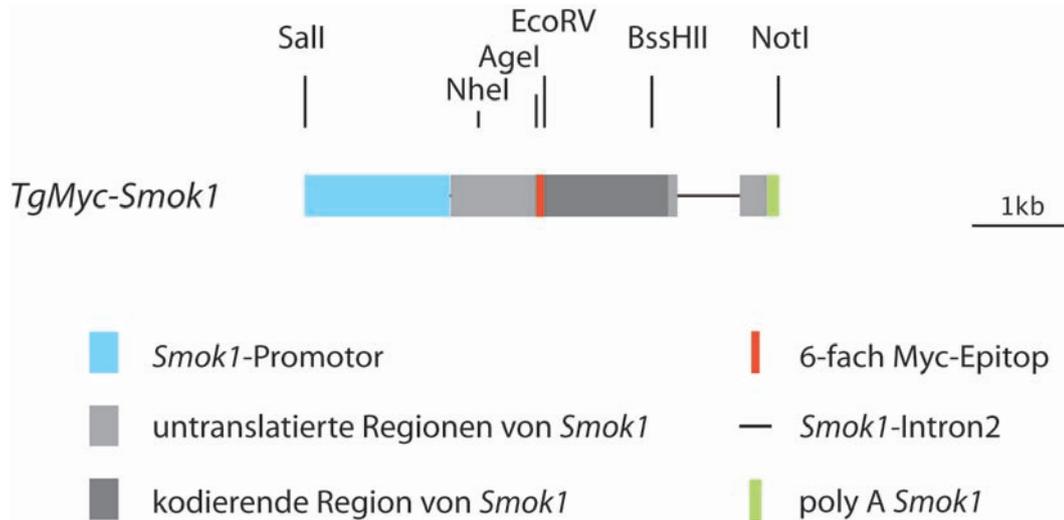
**Tabelle 2.5:** Oligonukleotidsequenzen verwendeter Primer für die Klonierung

Primerbezeichnung	Sequenz
AcePs	aggcccttggggtcagg
AceNcoBamHI	CGGGATCCCATGGCCGCAGGAAAGC

**Klonierung des *TgNV10lacZ*-  $\beta$ -Galaktosidase Reportertransgens** Zur Klonierung des *LacZ*-Reportertransgens diente *Tg10* als Grundlage. Die Sequenz der kodierenden Region von in *Tg10* im Plasmid pBS-KS wurde über Restriktionsverdau mit BamHI- und SpeI-Enzym entfernt und durch die kodierende Region des *LacZ*-Gens aus *E.coli* ersetzt. Diese war zu vor über BamHI- und SpeI-Restriktionsverdau aus einem Plasmid isoliert worden (persönliche Mitteilung Bernhard G. Herrmann).

**Klonierung des *TgMyc-Smok1*-Transgens** Das *TgMyc-Smok1*-Transgen wurde durch 5 Fragmente, die aus Testis-cDNA bzw. aus genomischer DNA aus einer C57Bl/6

Schwanzbiopsie amplifiziert wurden, kloniert (Abb. 2.2). Die DNA wurde aus der Schwanzbiopsie, wie unter dem Abschnitt Genotypisierungen beschrieben, aufgeschlossen.



**Abbildung 2.2:** Schema des Transgen-Konstrukts *TgMyc-Smok1*

Da die 5'UTR sich nicht im Gesamten aus cDNA amplifizieren ließ, wurde der Promotor und 150 bp der 5'UTR von Exon 1 von genomischer DNA amplifiziert. Zur Amplifikation des 2237 bp großen Fragments wurden die Primer NV92Sal und NV93Nhe und die Takara Prime Star Polymerase benutzt. Das Fragment wurde anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt, geextrahiert und in Topo pCRII blunt Vektor (Invitrogen) kloniert. Der übrige Teil der 5'UTR von etwa 600 bp Länge wurde mit NV93aNhe und NV85 mit Herculase enhanced Polymerase (Stratagene) aus cDNA des Hodens von C57BL/6 Männchen amplifiziert. Das 6-fach Myc-Epitop von etwa 330bp Länge wurde mit den Primerpaaren NV86 Age und NV 87EcoRV aus dem Transgen-Konstrukt *Tg9* im pBS-KS-Vektor (Stratagene) unter Verwendung der Prime Star Polymerase (Takara) amplifiziert. Die kodierende Region von *Smok1* und Teile der 3'UTR, sowie das Intron 2 wurden mit den Primern NV98 EcoRV und NV96 Bl6BssHII aus genomischer DNA amplifiziert. Die übrige Sequenz der 3'UTR wurde mit den Primern NV97 Bl6BssHII und NV 89 von genomischer DNA amplifiziert. Die Einzelteile wurden in pCR4-TOPO blunt Vektor (Invitrogen) kloniert. Aus den subklonierten Plasmiden wurden mittels Restriktionsverdau nacheinander die DNA-Fragmente in einen pBS-KS Vektor ligiert. Dessen Multiple Klonierungs-Sequenz war zuvor mit KpnI und SacII entfernt und durch die Oligos MCS rev und MCS fw ersetzt

worden. Die neue Multiple Klonierungs-Sequenz enthielt Schnittstellen, in denen die subklonierten DNA-Fragmente eingefügt wurden.

**Tabelle 2.6:** Übersicht der Primer

Primername	Sequenz
NV92 Sal	gtcgacCCTGAAGTGGGGGAATGTAGAAGC
NV93 Nhe	gctagcGCTGGGCCGCATCATAGTCA
NV93a Nhe	gctagcCAGCAGGTTTAAGCTGTGGCCA
NV85 Age	accggtGTCAGAGATAGCGGGCTTGGAT
NV86 Age	accggtgccatggGATCCCATCGATTTA
NV87 EcoRV	gatatcGTCAGAAAAAGGGGCTTGGAAG
NV98 Bl6EcoRV	GAtAtcATGGAGAACTTTCATGCTCAATATGAG
NV96 Bl6BssHII	gcgcgcatctgggatttcacatttgetTTCT
NV97 Bl6BssHII	gcgcgcgtctccgggatcaccattccga
NV89	gcggccgcagcttggcccttcaaaggcac
MCS fw	CTAGGTCGACTCGGCTAGCAACCGGTAGATATCGGCGG CCGCAGAGCT
MCS rev	CTGCGGCCCGCCGATATCTACCGGTTGCTAGCCGAGTCG ACCTAGGTAC

### 2.1.3 Klonierung der GFP- und Luziferase-Reporterkonstrukte

**Klonierung der GFP-Reporter mit der 5' und 3' UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>*** Als Basis für die GFP-Reporterkonstrukte diente der eGFP-C2 Vektor (Clontech). Die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* wurde mit den Primerpaaren NV51/52 vom Plasmid *Tg9* in pBS mit der Prime Star Polymerase (Takara) amplifiziert und in den Topo pCR4 blunt-Vektor subkloniert. Die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* wurde anschließend daraus isoliert und über NheI und AgeI Restriktionsstellen in den Vektor eGFP-C2 integriert. Die 3'UTR *Tg9* wurde mit den Primerpaaren NV59/60 mittels Prime Star Polymerase (Takara) aus dem Transgen-Konstrukt *Tg9* in pBS amplifiziert und in den Topo pCR4 blunt-Vektor subkloniert. Das Fragment wurde über EcoRI- und BamHI-Restriktionsverdau isoliert und in die Multiple Klonierungsstelle des Vektors eGFP-C2 kloniert.

**Klonierung des GFP-Reporters, die die kodierende Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>* mi enthalten** Zur Amplifikation kodierenden Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>* und der 3'UTR des *Tg9*-Transkripts wurde das Primerpaar NV60/68 verwendet. Als Vorlage für die PCR mit Prime Star Polymerase (Takara) diente das Transgen-Konstrukt *Tg9* im Vektor pBS-KS. Das Fragment wurde in TOPO pCR4 blunt subkloniert und mittels EcoRI- und BamHI-Restriktionsverdau isoliert. Für das Konstrukt wurde der eGFP-C2-Vektor mit denselben Enzymen geöffnet. An diese Stelle wurde das Fragment kloniert, so dass ein GFP-*Smok1<sup>Tcr</sup>*-Fusionsprotein translatiert wird.

**Tabelle 2.7:** Übersicht der Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
NV51Nhe	gctagcGGTTTAAGTGGTGGCATC
NV52Age	accggtGGCAGAAAAGGGGGTTG
NV59	gaattctagtaaCCAAAAATTTAAGACACAGGAA
NV60	ggatccGCGGCCGCGAATTA AAAAAC
NV68	gaattcATGGAGAAATTTTCATGCT

**Tabelle 2.8:** Übersicht der Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
NV59	gaattctagtaaCCAAAAATTTAAGACACAGGAA
NV60	ggatccGCGGCCGCGAATTA AAAAAC
NV69	ccatggGGCAGAAAAGGGGGTTG
NV70	aagcttACCGGTTTAAGTG

**Klonierung der Luziferase-Reporter mit 5' und 3' UTRs von *Smok1<sup>Tcr</sup>*** Als Grundlage für die Klonierung der Luziferase-Reporterkonstrukte diente der pGL3-Promoter-Vektor (Promega). Die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* wurde mit den Primerpaaren NV69/70 vom Plasmid *Tg9* in pBS als Vorlage mit der Prime Star Polymerase (Takara) amplifiziert und in Topo pCR4 blunt subkloniert. Diese wurde anschließend aus dem Topo pCR4-Vektor isoliert und über HindIII- und NcoI-Restriktionsstellen in den Vektor pGL3-Promoter integriert. Die 3'UTR wurde aus dem transgenen Konstrukt *Tg9* in pBS-KS mit den Primerpaaren NV59/60 mittels Prime Star Polymerase

(Takara) amplifiziert und in den TOPO pCR4 blunt-Vektor integriert. Die Isolation des Fragments erfolgte mittels EcoRI- und BamHI-Restriktionsverdau. Anschließend wurde eine Reaktion zum Auffüllen der DNA an den Schnittstellen durchgeführt. Der pGL3-Promoter-Vektor wurde über XbaI-Restriktionsverdau geöffnet und die dadurch entstandenen einzelsträngigen DNA-Enden ebenfalls aufgefüllt. Danach erfolgte die Ligation beider Fragmente.

**Tabelle 2.9:** Übersicht der Primer

Name	Sequenz
NV129	ccatGGCAGAAAAAGGGGGTTG
NV130	aagcttCAGCAGGTTTAAGCTGTGGCCA
NV131	aagcttAGCAGCCACCTACGTCTTAA
NV132	ccatgGCTGGGCCCGCATCATAGTCA
NV133	GCTAGCACCCAAAGGTACTCACAC
NV134	gctagcATAACTGTGGGTGACTGT

### Klonierung von modifizierten 5'UTR-Fragmenten in den pGL-Luziferase-Reporter

Die 300 bp- und 570 bp-Fragmente wurden einzeln aus den 5'UTR Volle-Länge-Luziferase-Reportern amplifiziert. Das 300 bp-Fragment wurde mit dem Primerpaar NV130/131, und das 570 bp mit NV129/130 amplifiziert und in einen EcoRV-geöffneten dephosphorylierten pBS-KS Vektor gebracht. Die Fragmente wurden mittels HindIII- und NcoI-Verdau isoliert und in den HindIII/NcoI-geöffneten dephosphorylierten pGL3-Promoter-Vektor kloniert.

Das 570 bp Fragment ohne *Bruno Response Element* (BRE) wurde über die Amplifikation zweier Fragmente der 570 bp langen 5'UTR Sequenz generiert, indem das BRE durch eine NheI-Restriktionsstelle ersetzt wurde. Für die beiden Fragmente wurden die Primerpaare NV130/133 und NV129/134 verwendet und in einen EcoRV-geöffneten dephosphorylierten pBS-KS Vektor subkloniert. Die Fragmente wurden durch HindIII/NheI- beziehungsweise NheI/NcoI-Verdau isoliert und in einer Drei-Fragment-Ligation in den HindIII/NcoI-geöffneten, dephosphorylierten pGL3-Promoter-Vektor gebracht.

**Tabelle 2.10:** Übersicht der Oligos für die Mutagenese

Name	Sequenz
mir342- mut1	GGATTTTGTGTcTGATTGGTTCGTcTGTGgGC
mir342- mut2	GTGTTTGGGAGGAGCTTGTGTcTGTGgGTTGTG
mir342- mut3	TGTAGGTGCACGTGTTGTAGcTGTGgGAACACC
NV135- 2uORFkozak	TAAGGACATCAGCAcGGCCTAGAGGTTTTGATTT
500bp- mut300- ATG2	CTAAAAGCCTAcTGTCAGTCTCCATAGCCCCTTAAGCCAGAGCC
5'UTR300- mutagATGrich	GGTCCTGATcTGACCACcTGAGGAGTGACTcTGgTGCGGCCAGC
NV142- ATG-mut3	GCCACCTACGTCTTAgTGAGTAGGACCTTACCGG
NV143- mut4	GGACCCATCAGTTGGAgTGCAAAGGTGACACACAG
NV144- ATG-mut5	CACACAGAGTGTAGACgTGAGGACTTTAAAGC

**Mutagenese der mir342-Bindestellen und der AUG-Sequenzen in der 5'UTR von *Smok1*<sup>Tcr</sup>** Für die Mutagenese-Reaktionen wurden Oligos verwendet, die die gewünschte Modifikation der Sequenz enthalten. Diese wurde über PCR unter Verwendung des Multi-Site-Directed-Mutagenesis Kit (Stratagene) eingebracht. Die so generierten, modifizierten Plasmide wurden in Top10-Zellen transformiert. Nach DNA-Isolation aus den Bakterien wurden die Plasmide zur Überprüfung der korrekten Sequenz sequenziert. Für die Mutagenese der mir342-Bindestellen wurden die Oligos mir342-mut1, mir342-mut2 und mir342-mut3 und das Konstrukt 5'-570-FLuc verwendet (5'-570-mmir-FLuc). Für die Mutagenese des uAUG wurde das Oligo NV135-2uORFkozak und das Konstrukt 5'-300-FLuc verwendet (5'-300-m1AUG-FLuc). Für das Konstrukt 5'-300-m6AUG-FLuc wurde 5'-300-m1AUG-Fluc mit den Oligos 500bp-mut300-ATG2 und 5'UTR300-mutagATGrich mutagenisiert. Für das Konstrukt 5'-300-m9AUG-FLuc wurde 5'-300-m6AUG-FLuc mit den Oligos NV142-ATG-mut3, NV143-mut4 und NV144-ATG-mut5 mutagenisiert.

## 2.2 Zellbiologische Arbeiten

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank ausgeführt. Für diese Arbeiten wurden sterile Einmalpipetten und Kulturschalen verwendet. Materialien, wie Medien und andere für die Versuche benötigten Lösungen wurden steril geliefert oder über Sterilfilter mit der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore) sterilisiert. Zur Kontrolle des Wachstums wurde ein Inversmikroskop (Leica) verwendet. Zum Zentrifugieren der Zellen wurde eine Tischzentrifuge (Eppendorf) verwendet.

### 2.2.1 Zellkultur

Für die Zellkulturarbeiten wurden folgende Zelllinien verwendet:

Die Zelllinien wurden in DMEM-Medium (Lonza) 10% FCS (Foetales Kälberserum, Gibco) mit Penicillin/Streptomycin (Lonza) und 1% GlutaMax (Cambrex) bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 7,5% Kohlendioxidanteil kultiviert. Bei Erreichen eines konfluenten Monolayers auf einer 10 cm Schale wurden sie 2 mal mit etwa 10 ml PBS gewaschen und in 1 ml Trypsin-EDTA (Gibco) 5 min bei 37°C inkubiert und die abgelösten Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in ein 15 ml Plastikröhrchen (Greiner) überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden mit einer Pasteurpipette wenige Mikroliter Zellsuspension abgenommen, auf eine Neubauer-

**Tabelle 2.11:** Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
Hek293T	humane embryonale Nierenzelllinie, die mit fragmentierter DNA eines Adenovirus Typ5 transformiert wurde, Überexpression des SV40T Antigens, adhären
NIH3T3	Fibroblasten-Zelllinie aus Embryonalgewebe der Maus, Zellen sind spontan immortalisiert , adhären

Zählkammer aufgetragen und die Zellen mit Hilfe des Inversmikroskops ausgezählt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1000 g 5 min pelletiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette mittels einer Absaugvorrichtung entfernt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf frische Zellkulturschalen verteilt.

### 2.2.2 Transfektion von Reporterkonstrukten auf Kulturzellen

Hek 293T-Zellen, beziehungsweise NIH3T3-Fibroblasten wurden in der Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro ml Medium ausgesät und kultiviert bis eine Konfluenz von etwa 80-90% erreicht wurde. Etwa 24 h später wurden die Reporterkonstrukte mittels jet-PEI-Lipofektionsreagenz (Polyplus) in die Zellen transfiziert. Für die Transfektion der GFP-Reporterkonstrukte wurden pro Ansatz in einer 6-Loch-Zellkulturschale 2  $\mu\text{g}$  Plasmid und 6  $\mu\text{l}$  jetPEI verwendet.

Zur Transfektion der pGL3-Promoter-Luziferase-Reporterkonstrukte wurden von den jeweiligen Plasmiden 1,8  $\mu\text{g}$  pro Ansatz, der pRL-CMV Renilla Vektor (1 ng pro Ansatz) und eGFP-C2 Vektor in 150 mM NaCl verdünnt. Vor jeder Transfektion wurde die jet-PEI-Verdünnung in 150 mM NaCl frisch angesetzt. Dazu wurden 600  $\mu\text{l}$  150 mM NaCl mit 33,6  $\mu\text{l}$  jet-PEI in einem Falcon-Röhrchen kurz gemischt. Für 6 Transfektionen wurden 200  $\mu\text{l}$  NaCl/jet-PEI Mix auf 200  $\mu\text{l}$  vorbereiteten in NaCl verdünnten DNA-Mix pipettiert, für 5 sec gemischt und bei Raumtemperatur 20 min lang inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden von 1 ml Zellkulturüberstand 600  $\mu\text{l}$  abgenommen, so dass ca. 400  $\mu\text{l}$  Medium auf den Zellen übrigblieben. Von den insgesamt 400  $\mu\text{l}$  (8-fach Ansatz) wurden pro Loch einer 24-Loch-Schale 50  $\mu\text{l}$  DNA-jet-PEI Mix pipettiert und weitere 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach etwa 20 - 24 h wurde die Transfektionseffizienz mittels Verwendung eines GFP-Filters eines Fluoreszenz-Inversmikroskops (Zeiss, Axiovert) überprüft.

### 2.2.3 Luziferase-Biolumineszenz-Messung von transfizierten Hek 293T-Zellen

Für die Messung der Luziferase-Aktivität von Reporterkonstrukten wurden modifizierte pGL3-Plasmide mit pRL-CMV Renilla-Luziferase-Vektor in Hek293T-Zellen kotransfiziert (siehe Abschnitt Transfektion). 20 - 24 h später erfolgte die Auswertung des Versuchs unter Verwendung des Dual-Assay-Kits (Promega) nach Herstellerangabe. Dazu wurde jede Schale einer 24-Well-Zellkulturschale nach Absaugen des Zellkulturmediums und Waschens mit 1 ml PBS mit 100  $\mu$ l Lysispuffer (1x PLB) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler lysiert. Die Firefly- und Renilla-Luziferase-Aktivität der Lysate wurden anschließend im Luminometer gemessen. Dabei diente die Renilla-Luziferase-Aktivität zur Normalisierung der Transfektionseffizienz, indem die Werte der Firefly- und der Renilla-Luziferase ins Verhältnis gesetzt wurden. Bei den Messungen wurde die Luziferase-Aktivität der Kontrollzellen, die mit dem unmodifizierten pGL3-Promoter-Plasmid und pRL-CMV transfiziert wurden, als 100 %-Wert definiert.

Bei den Versuchen, bei denen eine Quantifizierung der Transkripte erfolgte, wurde eGFP-C2 Plasmid kotransfiziert und die Transkriptmengen über quantitative RealTime PCR gemessen. Dabei diente das GFP-Transkript zur Normalisierung der Firefly-Luziferase-Transkripte.

### 2.2.4 Proteinextrakte von Kulturzellen und Gewebe

Zellen wurden in Gewebe-Lysis-Puffer (100 mM Tris, pH7,6, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0,1% Natriumdesoxycholat) mit Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Complete, Boehringer Mannheim) durch einfaches Auf-und Abpipettieren lysiert. Gewebe wurde im selben Puffer durch Zerkleinern in einem 1,5ml Eppendorffröhrchen mit einem Plastikstäbchen auf Eis aufgeschlossen und kurz gemischt. Die Gewebelysate wurden für 10 min bei 4°C und 1000g zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Die Proteinextrakte wurden auf Eis gekühlt und bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.5 Messung der Protein-Konzentration von Zell- und Gewebelysaten

Zur Messung der Proteinkonzentration der Zell-Lysate mittels BCA-Proteinbestimmungskit (Pierce, Perbio) wurden je 1  $\mu$ l des Proteinlysats mit 200  $\mu$ l BCA Reagenz versetzt

und 30 min bei 37°C inkubiert. Parallel dazu wurde eine BSA-Verdünnungsreihe angesetzt und als Standard in einem Photometer bei 562 nm vermessen.

### 2.2.6 Analyse von Proteinen über SDS-PAGE

Zur Gelelektrophorese von Proteinen wurden NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gele (Invitrogen) mit NuPAGE Laufpuffer (Invitrogen) benutzt. Die Proteinlysate wurden mit 4-fach NuPage Ladepuffer bei 70 °C 10 Minuten denaturiert und danach auf Eis gekühlt, kurz zentrifugiert und zwischen 15 und 30 µg Protein in die Geltaschen geladen. Als Proteingrößenmarker diente der gefärbte SeeBlue Plus 2 Proteinmarker (Invitrogen). Die Proteine wurde bei 200V etwa 45 min nach Größe getrennt.

### 2.2.7 Western Blot

Zum Blotten diente die Semi-Dry Blot-Apparatur von BioRad. Dazu wurde das Gel und die verwendete Nitrozellulosemembran (BioRad, 0,45 µm Porengröße) ca. 5 bis 10 min in Transferbuffer auf einem Schüttler equilibriert. 1L Transferpuffer enthält 20% Methanol, 5,82 g Tris-Base, 2,93 g Glycin, 1,875 ml SDS 20%. Zum Blotten wurden zunächst zwei Lagen in Transferpuffer getränkte Whatman-Papierstücke von etwa 9x10cm auf die Unterseite der Blot-Apparatur, gefolgt von der äquilibrierten Membran und des Gels, sowie zwei weiteren Lagen in Transferpuffer getränkte Whatman-Papierstücke luftblasenfrei geschichtet. Geblottet wurde bei 14 V, 330 mA etwa 35 - 45 min. Nach dem Blotten wurde auf der Membran mit Bleistift die Konturen und Taschen des Gels markiert. Mit PonceauS-Farbstoff wurde die Qualität des Proteintransfers überprüft. Das Blockieren der Membran erfolgte mittels 2 % Milchpulver (Sigma) gelöst in TBST (10 mM Tris pH 8 , 150 mM NaCl, 0,2 % Tween 20) für etwa 30 bis 60 min. Nach dem Blockieren wurde die Membran zerschnitten, damit die Proteinproben mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert werden konnten. Die Teile der Membran wurden je nach Größe in 15 oder 50 ml verschliessbare Zellkulturröhrchen aus Plastik (Greiner) gebracht und auf einem Roller mit den jeweiligen Inkubations- und Waschlösungen gleichmäßig gerollt. Darin erfolgte die Antikörperinkubation mit 2 bzw. 5 ml Antikörperlösung für 1 h Raumtemperatur oder 4 °C über Nacht. Die jeweiligen Antikörper wurden je nach Herstellerangaben in 2 % Milchpulver gelöst in TBST (2 % Milchpulver/TBST) verdünnt. Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurde 3 Mal 5 min lang mit etwa 7 ml TBST gewaschen. Danach erfolgte für etwa 30 bis 60 min die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der mit

Merrettichperoxidase gekoppelt und in 2 % Milchpulver/TBST verdünnt ist. Nach dem letzten Antikörperinkubationsschritt wurde nochmals 3 Mal 5 min lang mit etwa 7 ml TBST gewaschen. Zur Entwicklung der Antikörper-spezifischen Signale wurden pro Membran von ca. 9 x 10 cm Größe etwa 1 ml fertiges Substrat (ECL Detektion Kit, GE Healthcare) verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Belichtung von Biolumineszenz-sensibler Filme (Amersham Pharmacia) in einer Dunkelkammer. Die Entwicklung der Filme wurde in einer Entwicklermaschine vorgenommen.

### 2.2.8 Gewebeentnahme

Hoden und Nebenhoden wurden einzeln präpariert und auf einem Gemisch von Trockeneis und Isopropanol bei etwa -80°C eingefroren. Dazu wurden aus Aluminiumfolie unter Zuhilfenahme von 15 ml Röhrchen Förmchen von etwa 2 cm Durchmesser geformt und auf Trockeneis-gekühltes Isopropanol gelegt. Bei der Präparation wurden die Gewebeteile einzeln hineingelegt und in etwa 30 sec tiefgefroren, ohne dass ein Kontakt von Gewebe mit dem Alkohol erfolgte. Nach dem Durchfrieren des Gewebes wurden die Teile in saubere Szintillationsgefäße aus Plastik überführt, auf Trockeneis zwischengelagert und bei -80°C eingefroren. Die Gewebe wurden für die Herstellung von Gefrierschnitten für die Gewinnung von RNA- oder Proteinextrakten verwendet.

### 2.2.9 Gefrierschnitte von Maushoden und Vorbehandlung der Gefrierschnitte für *in situ* Hybridisierungen und Immunfluoreszenzfärbungen

Die entnommenen Organe wurden bei -80°C gelagert und zur Herstellung von Gefrierschnitten benutzt. Zum Schneiden des Gewebes diente ein Kryostat (Microm), wobei ein Hoden mit Tissue-Tek (O.C.T Compound, Sakura) auf die Halterung befestigt wurde und bei einer Temperatur von -12 °C 10 µm dick longitudinal geschnitten wurde. Jeweils drei Schnitte wurden nacheinander auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel und Gläser) aufgezogen und in einem Schnittkasten von 9 x 13 cm (VWR), der mit einem Päckchen, gefüllt mit Silica Gel Orange (Roth), bei -20°C maximal zwei Wochen gelagert. Zur Fixierung und Acetylierung dieser Gefrierschnitte wurde ein Fixierroboter (Microm) benutzt. Die Schnitte wurden darin 20 min lang in 4% Paraformaldehydlösung in PBS (4%PFA/PBS) fixiert, dann 2 x in 0,9 % NaCl Lösung 2 min gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte per Hand acetyliert. Die Acetylierung erfolgte in 0,1 M TEA (Triethylenamin-Lösung, pH 8 ), das kurz zuvor frisch hergestellt und mit 1,1 ml Acetanhydrid auf 480 ml versetzt wurde. Die Schnitte wur-

den 5 min auf einem Magnetrührer mit Rührfisch zur Durchmischung acetyliert. Nach 5 min wurde nochmals frisches Acetanhydrid zugefügt und nochmals 5 min acetyliert. Die Schnitte wurden zurück in den Fixierroboter gebracht und durchliefen nach 5 min Waschen in PBS und 2 min in 0,9 % NaCl Lösung mehrere Dehydrierungsschritte: 2 min in 30 % EtOH, 2 min in 50 % EtOH, 2 min in 70 % EtOH, 2 min in 80 % EtOH, 2 min in 95 % EtOH und 2x 2 min in 100 % EtOH. Danach wurden die Objektträger an der Luft getrocknet, in Schnittkästen mit Silica Gel-Päckchen zur Minimierung von lokaler Luftfeuchtigkeit verpackt und bei -80°C gelagert. Die Schnitte wurden für *in situ* Hybridisierungen oder Immunfluoreszenzfärbungen verwendet, wobei sie geschlossen bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Die Schnitte dürfen maximal 1 mal getaut und wieder eingefroren werden, da sonst keine ausreichende Signalstärke beim Nachweis von RNA und Protein erreicht werden.

### 2.2.10 Herstellung von RNA-Sonden

**GFP-Sonde** Die kodierende Region von GFP wurde mittels BamHI- Restriktionsverdau aus einem Plasmid isoliert und in den pBS-KS-Vektor umkloniert. Als Vorlage für die *in vitro* Transkription diente das PCR-Produkt einer Amplifikation des Inserts des Plasmids mit M13 uni und M13 reverse Standardprimern. Die PCR erfolgte mit Taq-Polymerase für 35 Zyklen mit Annealingtemperatur von 55 °C und einer Elongationszeit von 40 Sekunden je Zyklus. 10 µl des PCR-Ansatzes wurden zur *in vitro* Transkription verwendet. Mit der T7-Polymerase wurde durch *in vitro* Transkription des PCR-Produkts eine Gegenstrang-RNA-Sonde über die gesamte Länge der kodierenden Region von GFP erzeugt.

**Smok1-Sonde für die Detektion von Wildtyp-Smok-Transkripten** Die RNA-Sonde für die *in situ* Detektion von Wildtyp-*Smok1*-Transkripten wurde durch Amplifikation der kodierenden Region von *Smok1* (129Sv) aus einem Plasmid gewonnen, das ein genomisches EcoRI-Fragment von 2,2 kb in pBS-KS enthielt. Zur Amplifikation der Sequenz für die RNA-Sonde diente das Primerpaar BGH170/NV19. Dadurch wurde ein Fragment von 1,272 kb Länge gewonnen, das einen großen Teil der kodierenden Region der Smok1 aus dem Mausstamm SV129 umfaßt.

**Myc-Sonde für die spezifische Detektion von Tg9-, 10-, 11-, Ace-, Delta5'Tg9- und TgMyc-Smok1-Transkripten** Die Myc-RNA-Sonde wurde durch die Amplifi-

kation des 6-fach Myc-Epitops, das in *Tg9* vorhanden ist, über PCR gewonnen. Dazu wurden die Primer NV33 und NV34 verwendet. Die amplifizierte Sequenz von 465 bp Länge umfasst 110 bp des 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>*, 320 bp des 6-fach Myc-Epitops und 35 bp der kodierenden Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>*. Dieses Stück wurde mittels TOPO-TA Klonierungs Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben kloniert und das Insert auf Sequenz und Klonierungsrichtung geprüft. Das Plasmid wurde durch Restriktionsverdau mit NotI geöffnet, um mittels T3-Polymerase in einer *in vitro* Transkription die Gegenstrang-RNA-Sonde zur Detektion transgener Transkripte zu erhalten.

**Sonde zur Detektion des *Tg10lacZ*-Transkripts** Zur Herstellung dieser Sonde wurde das Plasmid pSK-LacZ1 verwendet (persönliche Mitteilung von Heinrich Schrewe). Dieses enthielt ein durch PCR amplifiziertes Fragment des *LacZ*-Gens, das einen Teil (Position 1679-2673) der kodierenden Region für die  $\beta$ -Galactosidase umfasste. Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym linearisiert, aufgereingt und zur *in vitro* Transkription mit der T7-Polymerase eingesetzt, um eine Gegenstrang-RNA-Sonde zur kodierenden Region des *LacZ*-Transkripts zu generieren.

**Tabelle 2.12:** Übersicht der Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
NV33	AGCTTGGTCATTGTTTCT
NV34	CCTCCCTGGCCAATAGTCT
BGH170	CTAGTCCAGCCCTTGATG
NV19	AGGCTCCCATGTGGCTGTCAA

***In vitro* Transkription** (30  $\mu$ l Ansatz) 1  $\mu$ g isoliertes Plasmid oder 10  $\mu$ l eines PCR-Ansatzes wurden mit sterilem Wasser auf 18,25  $\mu$ l aufgefüllt. Dazu wurde 3  $\mu$ l 10x Puffer (Roche) und 3  $\mu$ l dATP, dCTP, dGTP Mix (10 mM pro NTP, Roche) und 0,75  $\mu$ l DIG-UTP-Mix (Roche), sowie 1,5  $\mu$ l DTT pipettiert. 1,5  $\mu$ l RNase Inhibitor (Roche) und entsprechend T3, T7 oder Sp6 Polymerase zugefügt und 2h bei 37°C inkubiert. 2  $\mu$ l RNase-freie DNase (Roche) wurden nach der Transkription zugefügt und nochmals 15 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit STE-Puffer (RNase-frei, 8 mM Tris pH8, 0,8 mM EDTA, 150 mM NaCl) auf 50  $\mu$ l aufgefüllt und mit ProbeQuant G-50 Micro Columns (Amersham Pharmacia) gereinigt. Dieser Ansatz

wurde auf intakte RNA überprüft, indem wenige  $\mu\text{l}$  der Probe auf ein 1% Agarosegel in RNase-freiem TAE aufgetragen wurden.

### 2.2.11 Fluoreszierende *in situ* Hybridisierung auf Kulturzellen

Für diese Versuche wurde eine DIG-UTP-RNA Sonde gegen GFP verwendet. Kulturzellen wurden auf gelatinierten Deckgläschen kultiviert und transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte nach Absaugen des Mediums und einmal Waschen in PBS die Fixierung der Zellen in 4 %PFA und 10 % Essigsäure gelöst in PBS für 10 min bei Raumtemperatur. Danach wurde zweimal in PBS gewaschen. Permeabilisiert wurden die Zellen in 70 % RNase-freiem EtOH bei 4°C über Nacht. Dann wurden die Zellen mit 2xSSC und 50 % Formamid für 5 min rehydriert. Die Hybridisierung erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37°C mit 40  $\mu\text{l}$  Hybridisierlösung (10 % Dextranulfat, 2mM Vanadyl-ribonucleosid Komplex, 0,02 % RNase freies BSA, 40  $\mu\text{g}$  *E.coli* tRNA, 2xSSC und 50 % Formamid) und der darin gelösten RNA Sonde (Verdünnung 1:100), wobei die mit Zellen bedeckten Deckgläschen mit einem Stück Parafilm vor dem Austrocknen geschützt wurden. Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläschen zweimal mit 0,1xSSC, 50 % Formamid 30 min lang bei 50°C gewaschen. Anschließend erfolgte die Antikörperinkubation mit einem Biotin-gekoppelten Anti-DIG-Antikörper (Jackson Immunoresearch) in 2xSSC, 8 % Formamid, 2 mM Vanadyl-ribonucleosid Komplex, 0,2 % RNase freies BSA für 1 h bei 37°C. Danach wurde der Antikörper durch zweimaliges Waschen in 2xSSC, 8 % Formamid für je 15 min bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend wurde Cy3-gekoppeltes Streptavidin für 1 h inkubiert und erneut gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde eine DAPI-Kernfärbung vorgenommen, indem DAPI, 1:1000 in PBS verdünnt, für 5 min auf die Zellen gegeben wurde. Dieses wurde anschließend kurz in Wasser abgewaschen. Die auf den Deckgläschen haftenden Zellen wurden auf Objektträger in Einbett-Medium (Vectashield, Vectorlabs).

### 2.2.12 *In situ* Hybridisierung auf Gewebe

Gefrierschnitte wurden bei Raumtemperatur im geschlossenen Schnittkasten getaut. Anschließend wurden die Objektträger mit je 100  $\mu\text{l}$  Hybridisierlösung und einem Stück Parafilm, der in etwa der Größe des Objektträgers entspricht, bedeckt und in einem Schnittkasten, der mit einem Zellstoff getränkt mit 50 % Formamid und 5x SSC feucht gehalten wurde, für 1-3 h bei 65°C im Hybridisierofen präinkubiert. Nach

der Präinkubation wurde der Parafilm mit Hilfe einer Pinzette einzeln von den Objektträgern entfernt, die Hybridisierlösung abgeschüttelt und mit 100  $\mu\text{l}$  Lösung, die die DIG-markierte RNA-Sonde in einer Verdünnung von 1:100 enthielt (Konzentration der Probe etwa 20 ng/100  $\mu\text{l}$ ), und einem frischen Stück Parafilm bedeckt. Die Objektträger wurden wie bei der Prähybridisierung im feuchten Schnittkasten für etwa 15 - 18 h bei 65 °C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur kurz in 5xSSC getaucht, um den Parafilm abzulösen und sie in Glasküvetten (Copeland Jars) einzusortieren. Alle darauf folgenden Waschschriffe erfolgten bei 65°C. Dazu wurden auf 65 °C vorgewärmte Lösungen und Copeland Jars verwendet. Der erste Waschschriff erfolgte mit 50 % Formamid und 1x SSC für 30 min. Danach wurde einmal 20 min in 2xSSC und zweimal in 0,2xSSC gewaschen. In MABT wurden die Schnitte zwei mal 5 min äquibriert und danach für 1 - 4 h mit 20 % inaktiviertem Lammserum in MABT in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur blockiert. Die Lösung wurde abgeschüttelt und mit dem Alkalische Phosphatase (AP)- oder Peroxidase-(POD) gekoppelten Anti-Dig oder Anti-Fluorescein-Antikörper (Anti-DIG-AP Antikörper, Roche; Anti-DIG-POD Antikörper, Roche; Anti-Fluorescein-AP Antikörper, Roche) in 5 % Lammserum/MABT über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde anschließend mit drei Waschschriffen von je mindestens 5 min in MABT entfernt.

**Entwicklung der Färbung mit NBT/BCIP als Substrat der alkalischen Phosphatase** Zur Entwicklung des Signals mittels alkalischer Phosphatase wurden die hybridisierten Schnitte für 10 min in NTMT äquibriert und danach in einer feuchten Kammer mit etwa 400  $\mu\text{l}$  NBT/BCIP verdünnt in NTMT für mehrere Tage bei 4°C oder Raumtemperatur entwickelt. Dabei wurde etwa einmal täglich die Färbelösung gewechselt und die Färbung unter einem Binokular (Leica) beobachtet. Zum Stoppen der Färbung wurden die Objektträger kurz in NTMT und dann in PBS gewaschen. Es erfolgte eine Fixierung des Farbstoffes mit 4 % PFA/PBS für 20 - 30 min und drei Waschschriffe in PBS. Die Objektträger wurden zum Schluss in Kaisers Glycerolgelatine eingedeckelt.

**Entwicklung der Fluoreszenzfärbung mit Fast Red als Substrat der alkalischen Phosphatase** Zur Entwicklung des Signals mittels Fast Red Substrat (DAKO) wurden die hybridisierten Schnitte für 10 min in NTMT äquibriert und danach in einer feuchten Kammer mit Fast Red-Substrat für mehrere Tage bei 4°C entwickelt. Als

Anhaltspunkt für die Inkubationszeit diente die parallel dazu angesetzte Färbung der Proben mit NBT/BCIP-Färbelösung. Zum Stoppen der Färbung wurden die Objektträger kurz in NTMT und dann in PBS gewaschen. Es erfolgte eine Fixierung des Farbstoffes mit 4 % PFA/PBS für 20 - 30 min und drei Waschschrte in PBS. Für eine zusätzliche Kernfärbung mit DAPI wurde zwischen dem zweiten und dritten Waschschrte mit PBS das DAPI 1:10.000 in PBS verdünnt und für 5 min auf den Objektträgern belassen. Zum Eindeckeln der Schnitte für die Fluoreszenzmikroskopie wurden ca. 30  $\mu$ l Vecta Shield (Vectorlabs) benutzt.

### 2.2.13 Northern Blot transfizierter Fibroblasten mit Digoxigenin-UTP-RNA Sonde

Für die Northern Blot-Analyse transfizierter Zellen wurden GFP-Reporterkonstrukte in NIH3T3-Fibroblasten transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde aus den Kulturzellen RNA gewonnen. Dies erfolgte wie unter dem Abschnitt RNA-Präparationen beschrieben. 10  $\mu$ g RNA, versetzt mit Ladepuffer wurde auf ein denaturierendes, Ethidiumbromid-haltiges 1 % Agarose-Gel mit 18,5 % Formaldehyd geladen und mittels Elektrophorese nach ihrer Größe in MOPS-Puffer aufgetrennt. Nach der Auftrennung der RNA-Proben im Gel für 18 h bei 20 V wurde im UV-Licht ein Gelfoto zur Dokumentation aufgenommen. Gleichmäßige Beladung der Proben auf das denaturierende Gel wurde aufgrund der Intensitäten der ribosomalen 18 S und 28 S RNA-Banden beurteilt. Danach wurden die RNA-Proben alkalisch hydrolysiert, indem das Gel für 30 min in 50 mM NaOH inkubiert wurde. Anschließend wurde neutralisiert, indem es für weitere 30 min in 0,2 M Tris-HCL pH 7,0 geschüttelt wurde. Das Gel wurde für 5 min in 10xSSC äquilibriert. Der Transfer der aufgetrennten RNA-Banden auf eine kationische Membran (HYBOND N, Amersham) erfolgte durch Kapillarkräfte in einer Gelkammer, in der 2 Lagen saugfähiges Papier (Whatman) mit 10xSSC getränkt ausgelegt waren. Darauf wurde das Gel gebracht, das mit der Hybridisierungsmembran bedeckt wurde. Darauf wurden 6 Lagen saugfähiges Papier (Whatman), das in der Größe des Gels zurechtgeschnitten war, getränkt in 10xSSC gelegt. Darauf wurden etwa 10 cm zurechtgeschnittene Einweg-Handtücher gebracht, die mit einem Gewicht von etwa 200 g beschwert wurden, um die Kapillarkwirkung zu erzeugen. Das Blotting erfolgte über Nacht. Nach dem Blotabbau wurde die an der Membran haftende RNA mittels UV-Licht vernetzt. Die Membran wurde mit 2xSSC befeuchtet. Dann wurde die Membran in Hybridisierungspuffer (50

% Formamid, 5xSSC, 2 % Blocking Reagenz (Roche), 0,02 % SDS und 0,1 % N-Lauroylsarcosin) für 1 - 3 Stunden in einem Glaszylinder unter Rotation bei 68°C prähybridisiert. Anschließend wurden 40 ng/ml einer Digoxigenin (DIG)-UTP-RNA Sonde gegen die kodierende Region des GFP in die Hybridisierlösung zugegeben und über Nacht bei 68°C hybridisiert. Die Synthese der RNA-Sonde erfolgte wie unter dem Abschnitt Herstellung von RNA-Sonden beschrieben. Die Membran wurde anschließend für 5 min dreimal in 2xSSC+0,1 % SDS bei Raumtemperatur und anschließend dreimal für 30 min mit 0,1xSSC + 0,1 % SDS gewaschen. Anschließend wurde einmal 5 min in 2xSSC + 0,1% SDS gewaschen und danach 5 min in MAB-Puffer äquilibriert. Dann wurde die Membran mit einem Alkalische Phosphatase-gekoppelten Anti-DIG-Antikörper (Roche) in der Verdünnung 1:10000 in MAB-Puffer mit 1 % Blocking Reagenz (Roche) 45 min lang inkubiert. Nach dreimaligem Waschen von 20 min in MAB-Puffer + 0,3 % Tween, erfolgte die Äquilibrierung der Membran in Puffer bei pH 9,5 (0,1 M Tris-Base pH 9,5, 0,1M NaCl, 5 mM MgCl). Die Membran wurde mit dem CSPD Substrat (Roche), das durch Alkalische Phosphatase Chemolumineszenz entwickelt, benetzt. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Belichtung von Biolumineszenz-sensibler Filme (Amersham Pharmacia) in einer Dunkelkammer. Die Filme wurden in einer Entwicklermaschine entwickelt.

#### **2.2.14 Isolation von Spermatozoen für die Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Gewinnung isolierter Spermien wurde der distale Teil des Nebenhodens (Cauda Epididymis) isoliert und sofort in 1 ml EKRB-Medium gelegt (Enriched Krebs Ringer-Lösung). Das EKRB-Medium diente zur Kapazitierung der Spermien. Es enthielt 119,4 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,0 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM Glucose, 21 mM Natriumlaktat, 0,25 mM Natriumpyruvat und 25 mM NaHCO<sub>3</sub>. In dieser Lösung wurde das Gewebe mit Schere und Pinzette kleingeschnitten bis die Lösung milchig wurde. Die gesamte Gewebesuspension wurde in ein 2 ml Eppendorff-Gefäß überführt, mit 1 ml EKRB Medium überschichtet und bei 30°C 30 min im Heizblock inkubiert. Dabei trennten sich die Spermien vom Gewebe des Nebenhodens. Nach der Inkubationszeit wurde 1 ml der Spermiesuspension mit einer Pipette mit abgeschnittener Spitze abgenommen, um die Spermien mechanisch zu schonen. Die Spermien wurden 5 min bei Raumtemperatur bei 1000 g pelletiert und der Überstand sofort abgenommen. Anschließend wurde das Pellet einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Die Spermien wurden in 100 bis 200  $\mu\text{l}$  PBS vorsichtig resuspendiert. Von der Suspension wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze 10  $\mu\text{l}$  auf Objektträger (Superfrost, Menzel&Gläser) ausgestrichen. Die Fixierung der Spermien auf dem Objektträger erfolgte mit 0,5 ml 4 % PFA in PBS für 20 min bei Raumtemperatur. In Glasküvetten für Objektträger (Copeland Jars, VWR) wurden die Präparate 2 mal 5 min in PBS ohne Bewegung der Behälter gewaschen.

### **2.2.15 Immunfluoreszenzfärbungen auf Kryoschnitten des Hodens und auf Spermatozoen**

Die Gefrierschnitte des Hodens wurden zum Ausschluss von Luftfeuchtigkeit bei Raumtemperatur im geschlossenen Schnittkasten getaut. Für Immunfluoreszenzfärbungen von Spermatozoen wurden diese wie oben beschrieben vorbereitet. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer mit 0,5 ml 5 % Normalem Ziegen Serum (Normal Goat Serum, NGS, Vectorlabs) in PBST bei 37°C 30 min blockiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper, der in PBST mit 5 % NGS verdünnt wurde, erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 h. Der Antikörper wurde durch 2 mal Waschen in PBST in Glasbehältern (Copeland Jars) entfernt. Der fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper wurde 1:1000 in PBST mit 5 % NGS für 30 min 37°C oder für 1 h bei Raumtemperatur in einer dunklen feuchten Kammer inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde durch 2 mal Waschen mit PBST entfernt. Dann wurden 0,5 ml DAPI (1:1000) in PBS zugegeben und für 5 min dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein letzter Waschschrift in PBST. Auf die Objektträger wurde ein Tropfen Vectashield (Vectorlabs) aufgebracht und die gefärbten Präparate mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Ecken der Deckgläschen wurden mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert, um das Verrutschen des Deckgläschens beim Mikroskopieren zu vermeiden. Die Analyse der Immunfluoreszenz der Präparate erfolgte mit dem Zeiss Axioimager Z1 oder mit dem Zeiss Observer. Konfokale Aufnahmen von Zellen wurden mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM510 gewonnen.

### **2.2.16 Genotypisierungen**

Die Lyse der Schwanzbiopsie in etwa 200  $\mu\text{l}$  Laird's Puffer (200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS) versetzt mit Proteinase K (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) erfolgte bei 56°C über Nacht. Nach der Lyse wurden die Lysate bei 4°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. 5  $\mu\text{l}$  des DNA-haltigen Lysats wurden in 100  $\mu\text{l}$  0,1M Tris

pH 8 verdünnt und bei 80°C, 20 min inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren. Von dieser Verdünnung wurden pro 25 µl PCR Ansatz 2 µl eingesetzt. Die PCR wurde unter Verwendung des Taq-Polymerase Kits (Invitrogen) durchgeführt. Die Genotypisierungen erfolgen, soweit nicht anders vermerkt für 38 Zyklen bei einer initialen Dissoziation doppelsträngiger DNA bei 94°C für 15 sec pro Zyklus, gefolgt von 15 sec Anlagerungszeit bei 52,8°C und von anschließender Elongation der DNA bei 72°C für 45 sec.

**Tabelle 2.13:** Übersicht der Primer

Genotypisierung der Lini- en	Name	Sequenz
<i>Tg9, Tg10, Tg11</i>	BGH453	GTGCCCTTTGCGATTTC
	BGH454	GCCCCTTGAGGTAACA
<i>TgAce</i>	AcePs	agggcccttggggtcagg
	BGH193	CTCGCACA ACTCCATAAT
<i>Tg9lacZ, Tg10lacZ</i>	BGH161	gtttgggaggagcttg
	lacZrev	TTAAGTTGGGTAACGCCAGGG
<i>Delta5'Tg9</i>	NV55	GGATCCCATCGATT TAAAGC
	NV72	CCTCCCTGGCCAATAGTCT
<i>TgMyc-Smok1</i>	NV55	GGATCCCATCGATT TAAAGC
	NV129	

### 2.2.17 RNA-Präparationen aus Zellen und Geweben

Zur Präparation von RNA aus Kulturzellen, Hoden, Nebenhoden und isolierten Spermien wurde das RNeasy Micro bzw. MiniKit (Qiagen) benutzt, je nach erwarteter RNA-Menge der Proben. Zellen wurden direkt in mit  $\beta$ -Mercaptoethanol haltigem Puffer RLT versetzt und nach Herstellerprotokoll verarbeitet. Für alle RNA-Präparationen, die für eine cDNA Synthese herangezogen wurden, wurde nach Herstellerangaben auf der Säule mit RNase-freier DNase I verdaut (Qiagen). Zur Minimierung von Kontaminationsrisiken wurden alle Arbeiten unter einer reinen Werkbank mit laminarem Luftstrom unter Verwendung von DNA-Away und RNaseZap zur Entfernung von Nukleotidkontaminationen aller Flächen und Pipettierhilfen durchgeführt.

**RNA-Qualitätskontrolle** Die Qualität und Reinheit der RNA der Zell- und Gewebeeextrakte für RNA-Analysen wurde mittels Analyse im Bioanalyzer (Agilent Technologies) auf einem Nanochip (Eukaryote Total RNA Nano Series II) nach Herstellerangabe überprüft.

### 2.2.18 cDNA Einzelstrangsynthese mit Reverser Transkriptase

Zur Herstellung von cDNA wurde das Superscript-II-Kit von Invitrogen verwendet. Zum Primen der cDNA Reaktion wurde eine zufällige Mischung von Primern (random primer) benutzt. Alle Pipettierarbeiten wurden an einer reinen Werkbank mit laminarem Luftstrom unter Verwendung von DNA-Away und RNaseZap zur Entfernung von Nukleotidkontaminationen aller Flächen und Pipettierhilfen durchgeführt. Zur Einzelstrangsynthese wurden 500 ng bis 1  $\mu\text{g}$  RNA aus Zellextrakten eingesetzt. Bei Nebenhoden- oder Spermien-RNA-Präparationen wurden aufgrund des geringen RNA-Gehalts 10  $\mu\text{l}$  zur Synthese eingesetzt. Zur Kontrolle der Reinheit der RNA-Präparationen wurde jede RNA einmal mit und einmal ohne Reverse Transkriptase im cDNA-Ansatz pipettiert. Von den 20  $\mu\text{l}$  cDNA wurden direkt 0,4 bis 2  $\mu\text{l}$  des Ansatzes für PCR oder quantitative Real-Time-PCR verwendet. Bei der Detektion der niedrig konzentrierten Spermien cDNA-Präparationen wurden die cDNA-Ansätze mit dem PCR purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

### 2.2.19 Quantitative RealTime PCR

**Quantitative RealTime PCR-Messung der Luziferase-Transkripte in Hek293T-Zellen** Die Ermittlung der Transkript-Mengen in Hek293T-Zellen, die mit eGFP-C2 Vektor und pRL-CMV sowie den Luziferase-Reporterkonstrukten transfiziert wurden, erfolgte mittels SYBR Green im Cyler AbiPrism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Die RNA-Menge der Luziferase Reporter wurden mit dem Primerpaar NV116/117 ermittelt. Zur Standardisierung der einzelnen Ansätze wurde GFP-Transkript durch das Primerpaar AS55/313 gemessen und zur Normalisierung herangezogen. Der SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) wurde mit den entsprechenden Primerpaaren (10mM) versetzt. Jeder 20  $\mu\text{l}$  Ansatz enthielt 1-2  $\mu\text{l}$  unaufgereinigte cDNA (siehe Abschnitt cDNA-Synthese). Es wurden technische Triplikate pipettiert. Zur Standardisierung der RNA-Mengen wurde eine Standardreihe verdünnter GFP- bzw. Luziferase-Reporter-Plasmide mit Konzentrationen von 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng pro  $\mu\text{l}$  eingesetzt.

**Tabelle 2.14:** Oligonukleotidsequenzen verwendeter Primer für die RealTime-PCR

Primer	Sequenz
NV137	AGCTTGGGCGACCTCACC
NV72	CCTCCCTGGCCAATAGTCT
AS249	GCTTTCCTGGTTAAGCAGTACA
AS250	GAGAGGTCCTTTTCACCAGCAA

### Quantitative RealTime-PCR-Quantifizierung von *Tg9-,10- und 11-*Transkripten im Hoden transgener Tiere

Zur Quantifizierung der Transkripte im Hoden wurde das OneStepKit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben verwendet. Der Cycler AbiPrism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) diente zur Detektion der Transkriptmengen. Die Quantifizierung erfolgte mittels einer Standardkurve mit den jeweils verwendeten Primerpaaren. Das Transkript wurde mit dem Primerpaar NV137/72 gemessen. HPRT-Transkript diente zur Normalisierung und wurde mit den Primerpaaren AS249/250 quantifiziert. Es wurden technische Triplikate pipettiert. Zur Standardisierung der RNA-Mengen wurde eine Standardreihe verdünnter RNA aus dem Hoden von *Tg9-987*-Männchen eingesetzt.

**Tabelle 2.15:** Oligonukleotidsequenzen verwendeter Primer für die RealTime-PCR

Primer	Sequenz
NV116	CAGGAAGGATGTCAGGAGAATG
NV117	TTATAACTGTTGAATCGTAGC
AS249	GCTTTCCTGGTTAAGCAGTACA
AS250	GAGAGGTCCTTTTCACCAGCAA

### 2.2.20 RT-PCR Analyse auf Transkripte im Hoden, Nebenhoden und in isolierten Spermatozoen

Nach der Synthese der cDNA (siehe Abschnitt cDNA-Synthese) wurde der PCR-Ansatz (25  $\mu$ l) an einer Laminar-Flow-Werkbank pipettiert. Für die RT-PCR wurde die Prime Star Polymerase (Takara) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Darstellung des endogenen *Tcr*-Transkripts wurden die Primerpaare NV116 und BGH144,

oder NV11 und BGH144 verwendet. Für die Darstellung des *Tg9*-Transkripts wurden die Primerpaare NV116 zusammen mit NV117, beziehungsweise NV118 zusammen mit NV119 verwendet. Für die Detektion von *CatSper1* mittels RT-PCR wurden die Primer NV114CatSperdn und NV115CatSperup verwendet [24]. Für die Darstellung der  $\beta$ -*Aktin* mRNA wurden die Primer b-Actin s und b-Actin as verwendet. Die Bedingungen dieser PCR-Reaktionen waren wie folgt: Die initiale Dissoziation doppelsträngiger DNA wurde bei 94°C für 3 min durchgeführt. Jeder Zyklus begann mit 15 sec 94°C, gefolgt von 15 sec Anlagerungszeit bei 55 °C. Anschließend erfolgte die Elongation der DNA bei 72°C für 20 sec. Es wurden 40 Zyklen verwendet, um die DNA zu amplifizieren.

**Tabelle 2.16:** Oligonukleotidsequenzen verwendeter Primer für die RT-PCR

Primer	Sequenz
NV116	CAGGAAGGATGTCAGGAGAATG
NV117	TTATAACTGTTGAATCGTAGC
NV118	GAAGAGTCTGCCCAAAAA
NV119	AACATGATGCCTTTCCACAA
b-Actin s	tggaatcctgtggcatccatgaaa
b-Actin as	taaaacgcagctcagtaacagtccg
NV114CatSperdn	tgggcctggagtatTTTTatg
NV115CatSperup	caacgccatctggaagttat
BGH144	tgctcaagccaaaatctgtg
NV11	agcaggccgattaacacaacacc

### 2.2.21 Immunogoldmarkierung für die Elektronenmikroskopie

Der Nebenhoden wurde isoliert und unter dem Binokular im Fixiermedium zerkleinert. Die Gewebeteile wurden über Nacht in Glutaraldehyd fixiert, schrittweise dehydriert und in LR-White Harz eingebettet. Nach Aushärtung des Harzes unter UV-Bestrahlung bei 4 °C wurden die Gewebestücke in etwa 50 - 80 nm dicke Schnitte geschnitten und auf beschichtete Nickelgitter aufgezogen. Diese wurden mit entsprechenden Erst- und Zweit-Antikörperverdünnungen für jeweils eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte eine Nachkontrastierung mit Bleiacetat und Osmiumtetroxid für we-

nige Sekunden. Die markierten Ultradünnschnitte wurden mittels Phillips- Elektronenmikroskop analysiert und per Digitalfotographie dokumentiert.

## 2.3 Sonstige Methoden

### 2.3.1 Vererbungstests zur Überprüfung transgener Linien auf Responderfunktion

Für die Vererbungstests wurden alle transgenen Linien *Tg9*, *10* und *11* über vier Generationen auf den BTBR/TF-Mausstamm gekreuzt, da auf diesem Hintergrund der stärkste Effekt der *Distorter-Responder*-Interaktionen auf die nicht-mendelsche Vererbung beobachtet wurde. Die das Protein am stärksten exprimierende Linie des jeweiligen transgenen Konstrukts wurde für die Verpaarung mit der partiellen *t*-Haplotyp-Linie *th18th51* verwendet. Heterozygot transgene Tiere dieser Linien wurden mit partiellen *t*-Haplotypen *th51th18/+*, die auf BTBR/TF Hintergrund gezüchtet wurden, verpaart. Im Versuchsansatz wurden jeweils 3 - 4 Tester des Genotyps *Tg/th51th18* auf ihre Vererbungsrate des Transgens überprüft, indem sie mit NMRI-Weibchen verpaart wurden. Die Nachkommen dieser Verpaarungen wurden durch PCR genotypisiert. Dazu wurden aus 9,5 bis 15,5 Tage alten Embryonen Gewebebiopsien entnommen und die DNA gewonnen, indem die Gewebe, wie unter dem Abschnitt Genotypisierung beschrieben, aufgeschlossen wurden. Die PCR erfolgte ebenfalls wie unter diesem Abschnitt beschrieben.

### 2.3.2 Flächenberechnung zur statistischen Auswertung immunogoldmarkierter Ultradünnschnitte

Die Digitalbilder wurden im 8-bit Format als .TIFF gespeichert. Die Bilder wurden mit der *Image J*-Software (NIH; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) einzeln geöffnet, mit einer grauwertabhängigen Binärmaske überlagert und die Binärmaske an die Fläche der Spermienköpfe manuell angepasst. Das Bild wurde artifiziell auf 10,24 x 10,24 cm skaliert und per Flächenanalyse die Fläche des jeweiligen Spermienkopfes berechnet. Die Werte wurden tabellarisch dokumentiert und dem jeweiligen Dateinamen zugeordnet. Die so ausgewerteten Bilder wurden erneut geöffnet und jede korrelierende Goldpartikelzahl zur entsprechenden Fläche notiert. Die statistische Auswertung der Zahl der Goldpartikel zur entsprechenden Größe wurde auf die Fläche normalisiert. Die so normalisierten markierten Köpfe wurden als Histogramm aufgetragen

(Normalisierung der Werte und statistische Auswertung: Martin Werber).

### 2.3.3 Intensitätsmessung der Immunfluoreszenzsignale transgener Linien in Testis

Dazu wurden die Immunfluoreszenzfärbungen auf *Tg9*, *10* und *11*-Gefrierschnitten mit identischer Vorbehandlung des Gewebes gleichzeitig durchgeführt (siehe Abschnitt Immunfluoreszenzfärbung). Digitale Bilder dieser Versuche wurden bei derselben Belichtungszeit im Mikroskop aufgenommen. Pro Linie wurden 10 Fotos von Hodenkanälchen im gefärbten Hodengewebe aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels *Image J*-Software (NIH) durch Messung der durchschnittlichen Signalintensität einzelner Fluoreszenzpunkte, die einzelnen Flagellen von elongierten Spermatiden entsprachen, innerhalb des *Lumens* der Hodenkanälchen. In allen Bildern wurde zunächst eine Hintergrundkorrektur durchgeführt, um die einzelnen Werte der Fluoreszenz messen zu können. Dazu wurde manuell ein Schwellenwert von 30 Grauwerten (in einer Skala von 256 Grauwerten) bestimmt, der für die Quantifizierung aller Bilder verwendet wurde. Durch diese Korrektur wurde es möglich, die durchschnittlichen Fluoreszenzwerte der Flagellen als einzelne Messpunkte zu quantifizieren. Diese Werte dienen als Maß für die Proteinmenge innerhalb der einzelnen Flagellen und wurden graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung unter Verwendung des Wilcoxon-Tests wurde von Martin Werber durchgeführt [95].

### 2.3.4 Datenbank-Vorhersage der Elemente der 5'UTR

In die Suchmasken der jeweiligen Datenbanken wurden die 870 bp der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* eingegeben. Anhand folgender Datenbanken wurde diese Sequenz auf regulatorische Elemente untersucht:

Reg-RNA: (<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/php/prediction.php> )

UTR-Scan: (<http://www.ba.itb.cnr.it/BIG/UTRScan/>)

Bildung möglicher RNA-Sekundärstrukturen auf Basis energetischer Wahrscheinlichkeit dieses Fragments wurde analysiert mittels:

Mfold: (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>)



## Kapitel 3

### Ergebnisse (1)- Molekulare Eigenschaften von *Smok1<sup>Tcr</sup>* und *Smok*

In der Regel werden bei der Spermatogenese genotypisch unterschiedliche, jedoch phänotypisch identische Spermien gebildet, indem ein gegenseitiger Austausch von Genprodukten zwischen den haploiden Zellen statt findet. Die besondere Eigenschaft des *Responders*, phänotypische Ungleichheit von Spermatozoen zu bewirken, legt jedoch die Vermutung nahe, dass die Genprodukte von *Smok1<sup>Tcr</sup>* bei der Spermatogenese möglicherweise nicht zwischen den meiotischen Partnern ausgetauscht werden. Daher sollte hier molekular untersucht werden, ob tatsächlich eine Restriktion der *Responder*-Genprodukte besteht und durch welchen Mechanismus diese Besonderheit zustande kommt.

Der Nachweis von *Smok1<sup>Tcr</sup>* in *t/+*-Männchen kann aufgrund der Expression weiterer homologer Wildtyp-*Smok*-Gene im Hoden mit konventioneller *in situ* Hybridisierung nicht spezifisch erfolgen. Aus diesem Grund sollte für die Untersuchungen das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transgen *Tg9* verwendet werden, das ein 6-fach Myc-Epitop für den spezifischen Nachweis der Genprodukte enthält und als *Responder* wirkt (persönliche Mitteilung Herrmann). Mittels hemizygoter *Tg9/0*-Männchen sollte die Expression und die Verteilung des Transkripts und des Proteins zwischen den meiotischen Partnern analysiert werden.

Zusätzlich sollte im transgenen Mausmodell analysiert werden, ob die Eigenschaften von *Smok1<sup>Tcr</sup>* Besonderheiten eines mutierten Gens darstellen, oder auch auf das Wildtyp-Gen *Smok1* zutreffen.

### 3.1 Lokalisation des *Tg9*-Transkripts im Hoden von *Tg9/0*-Männchen

#### 3.1.1 Das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transgen *Tg9* als Modell für den *Responder*

Mausmännchen, die das Transgen *Tg9* hemizygot trugen, vererbten dieses in Anwesenheit von *Distortern* bevorzugt (persönliche Mitteilung Bernhard G. Herrmann). Daraus wurde geschlossen, dass *Tg9* alle essenziellen Elemente, die für die *Responder*-Funktion notwendig sind, enthält (Abb. 3.1).

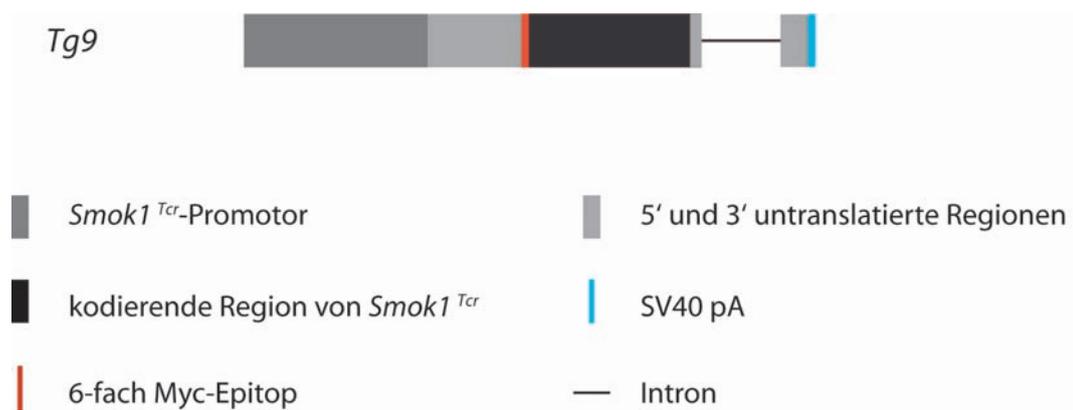
Aus diesem Grund diente *Tg9* als Modell zur Untersuchung der Eigenschaften von *Smok1<sup>Tcr</sup>*. *Tg9* kodiert die Kinase Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>. Die *t*-Haplotyp-kodierte Kinase Smok1<sup>Tcr</sup> weist im Vergleich zu Wildtyp-Smok-Kinasen lediglich ein Zehntel der Aktivität auf. Durch eine zusätzliche Punktmutation in Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> wurde diese weiter gesenkt.

Das 6-fach Myc-Epitop wurde verwendet, um das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript und das entsprechende Protein im Hoden und den Spermatozoen spezifisch darzustellen, da *Smok*-Gene zueinander stark homolog sind und in diesen Geweben ebenfalls exprimiert werden.

Das Konstrukt *Tg9* besteht aus dem Promotor, sowie Exon 1 und Exon 2 von *Smok1<sup>Tcr</sup>*. Das Intron, das in *Tg9* vorhanden ist, besteht aus Intron 2 von *Smok1<sup>Tcr</sup>* und Intron 2 des *t*-Haplotyp-spezifischen *Smok<sup>tw12</sup>*-Gens. Ein Teil der 3'UTR von 141 bp Länge, der in Exon 3 von *Smok<sup>tw12</sup>* liegt, ist in *Tg9* ebenfalls vorhanden. Als Polyadenylierungssignal wurde ein Simian-Virus-Polyadenylierungs-Signal (SV40pA) verwendet. Die 5' untranslatierte Region (UTR) von 870 Basen Länge liegt zum großen Teil in Exon 1 von *Smok1<sup>Tcr</sup>*. Nur 86 Basen davon sind in dessen Exon 2 enthalten, das außerdem die Kinase Smok1<sup>Tcr</sup> kodiert. In Exon 2 sind ebenfalls 47 Basen der 3'UTR und die Spleiß-Donor-Sequenz für das Intron 2 enthalten.

#### 3.1.2 Lokalisation der *Tg9*- und endogenen *Smok*-Transkripte im Hoden von *Tg9/0*- und Wildtyp-Männchen

Die Expression der *Tg9*-Transkripte wurde im Hoden zweier *Tg9/0*-Männchen von verschiedenen transgenen Linien, Linie *Tg9-6* und *Tg9-987* analysiert, die unabhängige genomische Integrationen des Transgens besitzen (Abb. 3.2). Die Analyse mehrerer Linien sollte verhindern, dass eine ektopische Transkriptexpression, die durch die Position des Transgens im Genom verursacht werden könnte, zu falschen Informationen



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung des Transgen-Konstrukts *Tg9*. Der etwa 1,5 kb lange Promotor von *Tg9*, sowie die 5'UTR, die kodierende Region und 46 Basen der 3'UTR stammen aus *Smok1*<sup>Tcr</sup>. Ein 6-fach Myc-Epitop, fusioniert an die kodierenden Sequenz für *Smok1*<sup>Tcr</sup> diente zur spezifischen Darstellung von Transkript und Protein. *Tg9* kodiert daher ein Myc-Fusionsprotein Myc-*Smok1*<sup>Tcr</sup>. Die *t*-Haplotyp-kodierte Kinase *Smok1*<sup>Tcr</sup> besitzt im Vergleich zur Wildtyp-*Smok* lediglich ein Zehntel der Aktivität. In *Tg9* wurde diese Aktivität durch eine weitere Punktmutation in einer konservierten Kinase-Domäne weiter verringert.

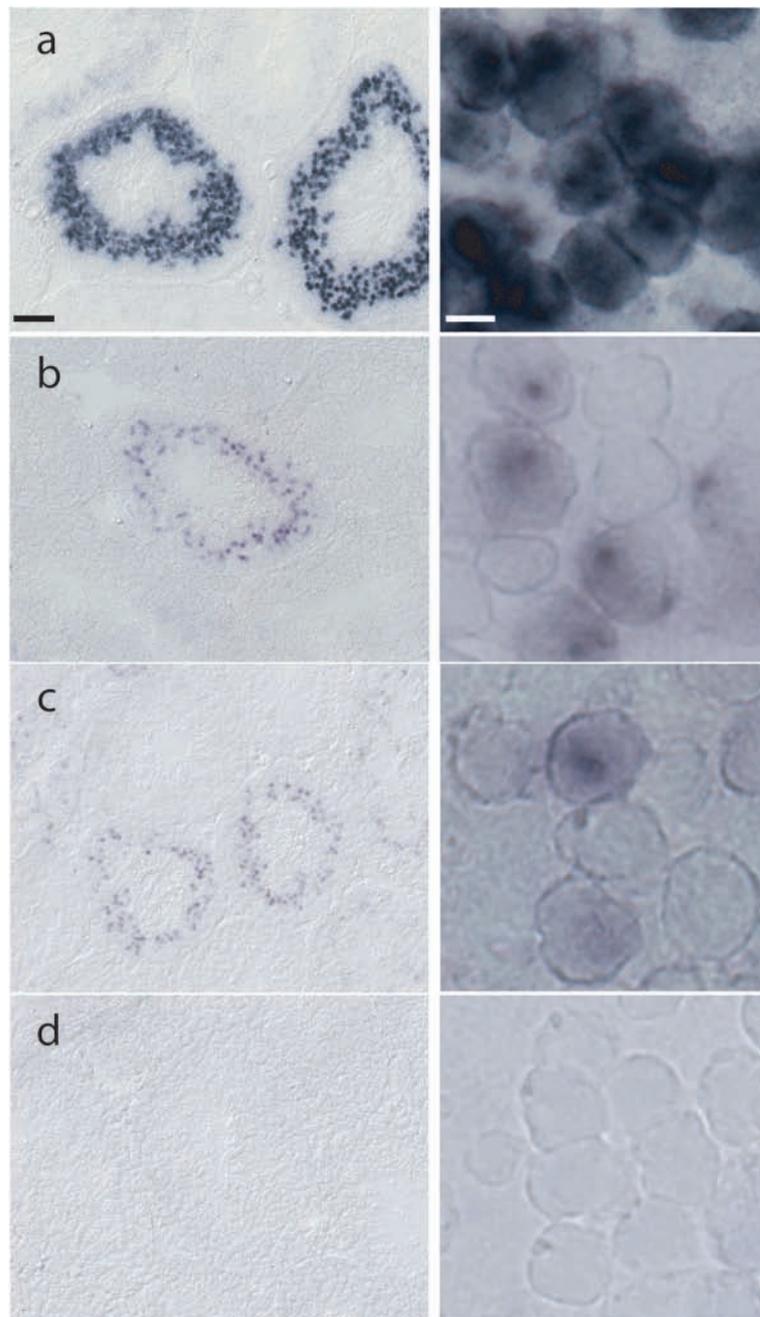
über die Eigenschaften des *Responders* führt. *In situ* Hybridisierung mit einer Sonde gegen die Sequenz des Myc-Epitops diente zur Darstellung von *Tg9*-Transkript im Hoden der *Tg9/0*-Männchen. Bei diesem Experiment zeigten die äußeren Bereiche der Hodenkanälchen, in dem diploide Spermatogonien und Spermatozyten lokalisiert sind, keine *Tg9*-spezifische Färbung. Diese wurde in runden Spermatischen detektiert, die ringförmig im mittleren Bereich der Hodenkanälchen angeordnet sind (Abb. 3.2.b/c). *Tg9*-Transkript wird demnach erst in haploiden runden Spermatischen exprimiert. Ausserdem wird bei diesem Experiment deutlich, dass nur etwa die Hälfte dieser Zellen gefärbt war. Dies legt die Vermutung nahe, dass nicht alle haploiden Zellen, sondern lediglich die, welche das Transgen *Tg9* tragen, das Transkript enthalten.

*In situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen die kodierende Region von *Smok1* im Hoden von Wildtyp-Männchen zur Darstellung endogener *Smok*-Transkripte wiesen dagegen Färbung in allen runden Spermatischen auf (Abb. 3.2.a).

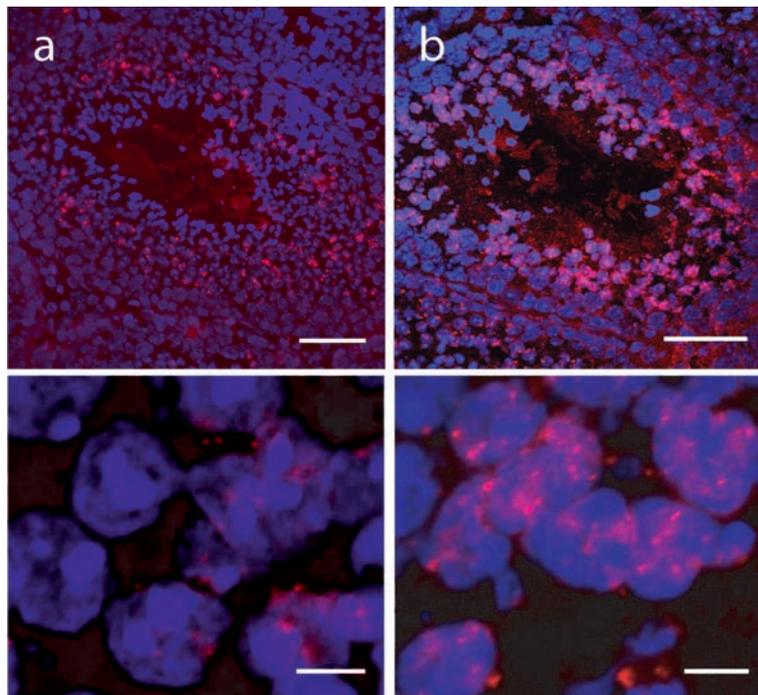
Diese Versuche zeigen, dass die Restriktion der *Tg9*-Genprodukte bei der Spermio-genese bereits auf Transkriptebene erreicht wird. Über die zelluläre Restriktion der Wildtyp-*Smok*-Transkripte ließ sich durch diese Experimente allerdings keine Aussage treffen, da *Smok* in Wildtyp-Tieren homozygot vorliegt und in allen haploiden Zellen exprimiert wird. Darüber hinaus liegen im Genom mehrere *Smok*-Loci vor. Höchstwahrscheinlich werden die Transkripte dieser Gene aufgrund ihrer Homologie

bei diesem Versuch mit der Sonde gegen die kodierende Region von *Smok1* ebenfalls nachgewiesen. Dies könnte die starke Färbung erklären, die in den Zellen beobachtet wurde. *Tg9*- sowie *Smok*-Transkripte wurden in distinkten Foci im Zytoplasma und im Zellkern runder Spermatozoen lokalisiert (Abb. 3.3). Die dreidimensionale, mikroskopische Analyse der fluoreszierenden *in situ* Hybridisierung zeigt, dass *Tg9*- und *Smok*-Transkripte teilweise mit dem Zellkern runder Spermatozoen kolokalisieren (Abb. 3.4). Konfokalmikroskopie-Analyse bestätigte die zum Teil nukleäre Lokalisation der *Tg9*- und *Smok*-Transkripte (ohne Abbildung). Außerdem wurde bei der fluoreszierenden *in situ* Hybridisierung zur Darstellung der *Tg9*-Transkripte im Hoden von *Tg9/0*-Tieren, wie bei der nicht-fluoreszierenden *in situ* Hybridisierung, die Beschränkung des Transkripts auf etwa die Hälfte der Population runder Spermatozoen deutlich.

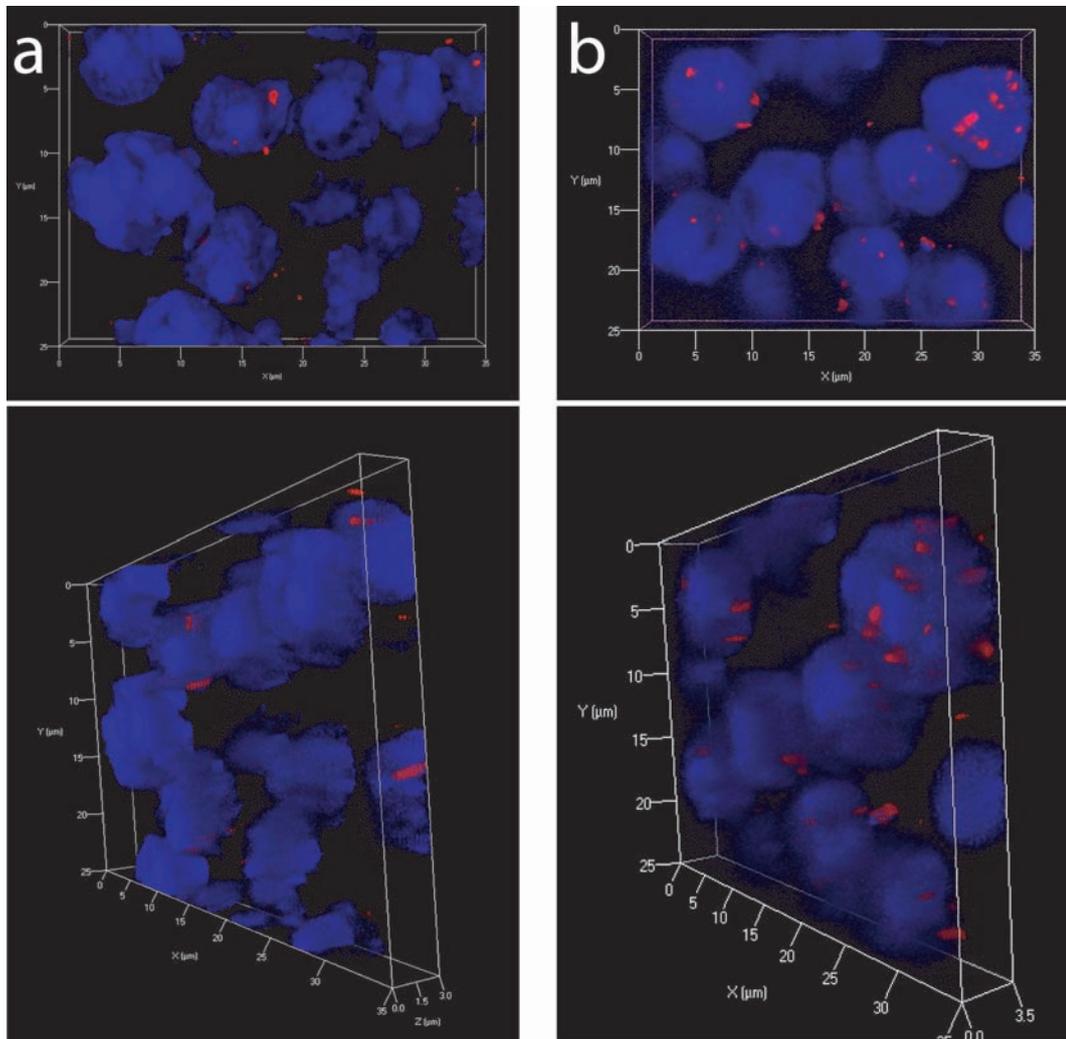
Darüber hinaus konnten durch die *in situ* Hybridisierung weder *Smok*-, noch *Tg9*-Transkripte in elongierten Spermatozoen dargestellt werden.



**Abbildung 3.2:** Expression endogener *Smok*-Transkripte auf Wildtyp-Hoden und Lokalisation der *Tg9*-Transkripte in *Tg9/0*-Hoden. Links: Querschnitte durch Hodenkanälchen; Vergrößerung aller Fotos links sind identisch, Balken 50  $\mu\text{m}$ ; rechts: Gruppe runder Spermatozyten; Balken 5  $\mu\text{m}$ ; a: Wildtyp-*Smok*-Transkript im Wildtyp-Hoden; b: *Tg9*-Transkript im Hoden der Linie *Tg9-6*, c: *Tg9*-Transkript im Hoden der Linie *Tg9-987*, d: Kontrolle der Spezifität der *Tg9*-Sonde auf Wildtyp-Hoden. *In situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen *Smok1* auf Wildtyp-Hoden zeigte *Smok*-Transkripte in allen runden Spermatozyten, da diese endogen in allen runden Spermatozyten exprimiert wird. Bei der *in situ* Hybridisierung zur Darstellung von *Tg9*-Transkript im *Tg9/0*-Hoden waren lediglich etwa die Hälfte der runden Spermatozyten gefärbt. Die äußeren Bereiche der Kanälchen, in denen frühe prämeiotische Entwicklungsstadien der Spermatogonien und Spermatozyten lokalisiert sind, sowie die inneren Bereiche, in denen sich elongierte Spermatozyten befinden, zeigten keine Expression von *Smok*- oder *Tg9*-Transkripten.



**Abbildung 3.3:** Subzelluläre Lokalisation von Wildtyp-*Smok*- und *Tg9*-Transkripten, die mittels fluoreszierender *in situ* Hybridisierung mit RNA-Sonden gegen die Sequenz der kodierenden Region von *Smok1*, bzw. des Myc-Epitops, dargestellt wurden. a: *Tg9*-Transkript im Hoden von *Tg9/0*-Männchen; b: Wildtyp-*Smok*-Transkript im Hoden von Wildtyp-Männchen; oben: Querschnitte durch Hodenkanälchen; Balken 50  $\mu\text{m}$ ; a und b unten: Gruppe von runden Spermatiden, Balken 5  $\mu\text{m}$ ; a: *Tg9/0* blau: Kernfärbung (DAPI), rot: *Tg9*-Transkript; b: Wildtyp, blau: Kernfärbung (DAPI), rot: *Smok*-Transkript. *Tg9*- und *Smok*-Transkripte sind ungleichmäßig zytoplasmatisch und in nukleären und perinukleären Aggregaten runder Spermatiden lokalisiert. Im Hoden der *Tg9/0*-Tiere beschränkt sich die Expression von *Tg9*-Transkript auf etwa die Hälfte der runden Spermatiden. Wildtyp-Männchen sind für Wildtyp-*Smok*-Gene homozygot und exprimieren das Transkript daher in allen runden Spermatiden.



**Abbildung 3.4:** Dreidimensionale Darstellung der Lokalisation von Wildtyp-*Smok*- und *Tg9*-Transkripten in runden Spermatisden im Hoden von Wildtyp- bzw. *Tg9/0*-Männchen mittels fluoreszierender *in situ* Hybridisierung. a: *Tg9/0*, blau: Kernfärbung (DAPI), rot: *Tg9*-Transkript; b: Wildtyp, blau: Kernfärbung (DAPI), rot: *Smok*-Transkript. Oben: Aufsicht, unten: seitliche Ansicht der dreidimensionalen Projektion optischer Schnitte. Die dreidimensionale Ansicht der *Smok*- und *Tg9*-Transkript-Signale in runden Spermatisden verdeutlicht die nukleäre und perinukleäre Lokalisation von Transkripten der *Smok*-Familie.

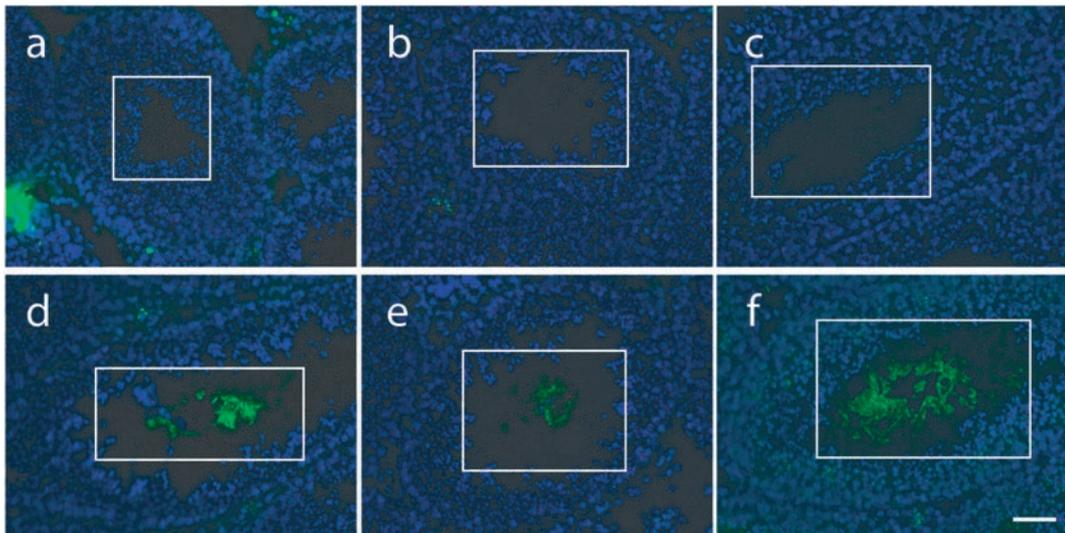
## 3.2 Lokalisation von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> im Hoden von *Tg9/0*-Männchen

### 3.2.1 Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> wurde in den Flagellen elongierter Spermatozoen detektiert

Im Hoden von *Tg9/0*-Männchen wurde untersucht, in welchen Zellen das entsprechende Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein nachgewiesen werden kann.

Zur Darstellung von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit drei unterschiedlichen kommerziellen Anti-Myc Antikörpern durchgeführt. Diese zeigt übereinstimmende Muster der Fluoreszenzsignale im Hoden von *Tg9/0*-Tieren (Abb. 3.5). Im Hoden von Wildtyp-Männchen wurde dagegen keine Fluoreszenz im Lumen der Hodenkanälchen beobachtet.

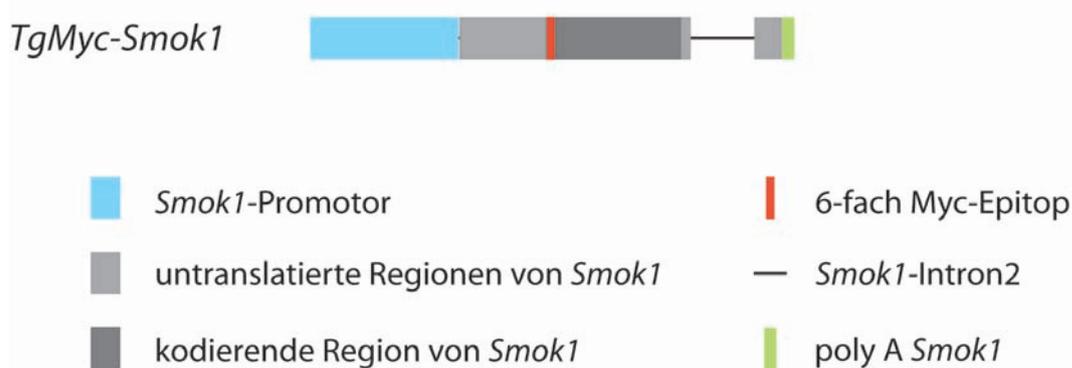
Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> ist demnach in den Flagellen elongierter Spermatozoen lokalisiert, obwohl die Transkription von *Tg9* bereits in runden Spermatozoen statt findet. Dies deutet auf posttranskriptionelle Regulations des Transkripts hin, die häufig mit mRNA-Lokalisation einher geht [33][45]. Wahrscheinlich führt translationelle Kontrolle und gleichzeitige Lokalisation des Transkripts zur Beschränkung von *Smok1<sup>Tcr</sup>* auf einen Teil der Spermien. Die Detektion von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> in elongierten Spermatozoen weist ebenfalls darauf hin, dass die Kinase vermutlich erst nach der Schließung der interzellulären Brücken translatiert wird. Dies hätte zur Folge, dass der Austausch des Proteins zwischen haploiden Zellen nicht mehr möglich ist. Auf diese Weise könnte folglich die zelluläre Restriktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>* erreicht werden. Dennoch konnte anhand dieser Methode das Differenzierungsstadium der elongierten Spermatozoen nicht exakt bestimmt werden. Daher wurde nicht eindeutig bestätigt, dass die Zellen bei der Translation des Proteins bereits isoliert vorliegen.



**Abbildung 3.5:** Lokalisation von *Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>* im Hoden von *Tg9/0*-Männchen über Immunfluoreszenzfärbung. a-c: Wildtyp-Hoden, d-f: *Tg9/0*-Hoden; a und d: Anti-Myc Antikörper 9E10 (Sigma) b und e: Anti-Myc-Antikörper 4A6 (Upstate), c und f: polyklonaler Anti-Myc Antikörper (Sigma), Balken 50µm. Alle drei Antikörper gegen Myc zeigten übereinstimmend Fluoreszenzsignale in den Flagellen elongierter Spermatozoen im Hoden von *Tg9/0*-Tieren. Bis auf diese war kein weiteres Signal innerhalb der Hodenkanälchen detektierbar (d-f). Auf Schnitten des Hodens von Wildtyp-Männchen war in den Flagellen im *Lumen* dagegen keine Färbung sichtbar (a-c). Die Fluoreszenz in a liegt außerhalb des Hodenkanälchens und wurde vermutlich durch die Autofluoreszenz von Blut aus den Blutgefäßen verursacht, die den Hoden durchziehen. *Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>* wurde folglich erst in den Flagellen elongierter Spermatozoen nachgewiesen, obwohl das Transkript bereits in runden Spermatozoen exprimiert wird. Dies weist auf posttranskriptionelle Regulation des Transkripts hin.

### 3.3 Lokalisation des Wildtyp-*Smok1*-Transkripts im Hoden von transgenen Männchen

#### 3.3.1 Das Transgen *TgMyc-Smok1* als Modell für Wildtyp-*Smok1*



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung des Transgen-Konstrukts *TgMyc-Smok1*. *TgMyc-Smok1* enthielt Sequenzen der Wildtyp-*Smok1*, die durch den *Smok1*-Locus in C57Bl/6 Mausstämmen kodiert werden. Die 5'UTR und die kodierende Region von *Smok1* sind in Exon 1 und 2 des *Smok1*-Locus enthalten, während die 3'UTR des Transkripts in Exon 2 und 3 liegt. Ein 6-fach Myc-Epitop wurde zur Darstellung der Genprodukte vor die kodierende Region der *Smok1* kloniert.

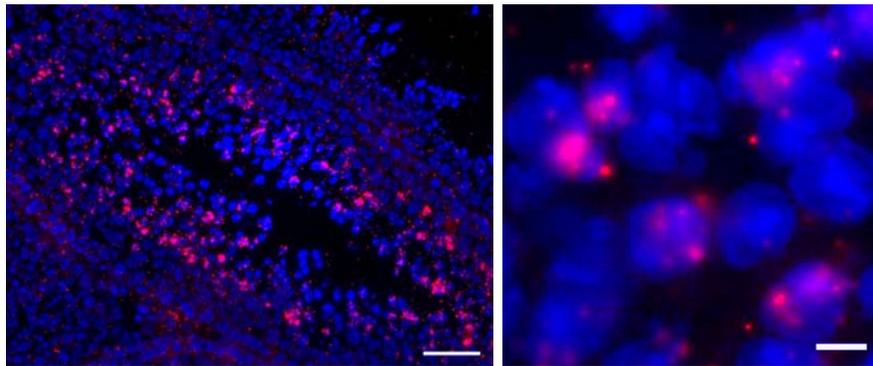
Wildtyp-Männchen sind für *Smok*-Gene homozygot. Aus diesem Grund werden im Hoden in allen haploiden Zellen *Smok*-Transkripte exprimiert, die sich aufgrund dessen nicht auf ihre Restriktion analysieren lassen. Um zu untersuchen, ob auch die Produkte anderer *Smok*-Gene, wie *Smok1<sup>Tcr</sup>*, zellulärer Restriktion unterliegen, sollten hemizygot *Smok1*-transgene Männchen generiert werden.

Für diesen Zweck wurde das Transgen-Konstrukt *TgMyc-Smok1* kloniert, das die Sequenz der *Smok1* aus dem C57Bl/6-Mausstamm enthält (Abb. 3.6). Wie im Transgen *Tg9*, dient ein 6-fach Myc-Epitop zur Darstellung der Genprodukte. *TgMyc-Smok1* wurde in den Pronukleus der Zygote injiziert, um transgene Linien zu generieren. Anschließend wurde im Hoden von *TgMyc-Smok1/0*-Männchen untersucht, wie *Smok1*-Transkripte und die Kinase dort lokalisiert werden.

#### 3.3.2 Transkriptlokalisierung in *TgMyc-Smok1/0*-Hoden

Durch fluoreszierende *in situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen die Sequenz des Myc-Epitops wurden *TgMyc-Smok1*-Transkripte im Hoden von *TgMyc-*

*Smok1/0*-Männchen nachgewiesen (Abb. 3.7). Dabei wurden Fluoreszenzsignale in runden Spermatiden detektiert, die sich auf etwa die Hälfte der Population runder Spermatiden beschränkten. Die äußeren Bereiche der Hodenkanälchen waren dagegen ungefärbt. Dies bedeutet, dass die Transkription von *Smok1*, ebenso wie die von *Smok1<sup>Tcr</sup>* (Abb. 3.2 und 3.3), in runden Spermatiden beginnt. Vor allem jedoch weist dieses Experiment darauf hin, dass auch das *Smok1*-Transkript wahrscheinlich zellulärer Restriktion unterliegt.

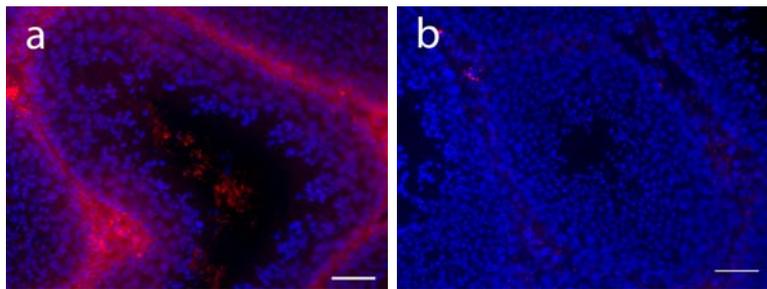


**Abbildung 3.7:** Expression des *Smok1*-Transkripts im Hoden von *TgMyc-Smok1/0*-Männchen. Dazu wurde eine *In situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen die Sequenz des Myc-Epitops durchgeführt. Rot: *TgMyc-Smok1*-Transkript, blau: Kernfärbung (DAPI); links: Querschnitt durch ein Hodenkanälchen; Balken 50µm; rechts: runde Spermatiden; Balken 5µm. *TgMyc-Smok1*-Transkript war in haploiden runden Spermatiden, nicht aber in diploiden Spermatozyten oder elongierten Spermatiden detektierbar. Etwa die Hälfte aller runden Spermatiden exprimieren *TgMyc-Smok1*-Transkripte, die in nukleären und perinukleären Aggregaten beobachtet wurden. Dies weist darauf hin, dass *Smok1* ebenfalls zelluläre Restriktion zeigt.

## 3.4 Lokalisation von Wildtyp-Smok1-Protein im Hoden von *TgMyc-Smok1/0*-Männchen

### 3.4.1 Myc-Smok1-Protein ist in elongierten Spermatiden lokalisiert

Um zu untersuchen, ob die Wildtyp-Kinase Smok1, ebenso wie Smok1<sup>Tcr</sup>, translationeller Kontrolle im Hoden unterliegt, wurde im Hoden von *TgMyc-Smok1/0*-Männchen Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung eines kommerziellen Anti-Myc Antikörpers durchgeführt (Abb. 3.8.a). Als Kontrolle für die Spezifität der Färbung dienten Schnitte des Hodens von Wildtyp-Männchen, die kein Fluoreszenzsignal



**Abbildung 3.8:** Lokalisation des Smok1-Proteins im Hoden von *TgMyc-Smok1/0*-Männchen. Dieses wurde durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem Anti-Myc-Antikörper dargestellt. Balken 50µm; a: *TgMyc-Smok1/0* b: Wildtyp; rot: Myc-Smok1-Protein; blau: Kernfärbung (DAPI)-Kernfärbung. Die Fluoreszenzfärbung in a, die in den Bereichen zwischen den Hodenkanälchen beobachtet wurde, konnte keinen spermiogenen Zellen zugeordnet werden. Daher wurde diese als Hintergrundfärbung bewertet. Dagegen waren im Lumen der Hodenkanälchen von *TgMyc-Smok1/0*-Männchen Fluoreszenzsignale zu sehen (a), die im Wildtyp-Männchen nicht detektiert wurden. Smok1-Protein ist folglich in den Flagellen elongierter Spermatozoen lokalisiert. Das Transkript unterliegt offensichtlich posttranskriptioneller Regulation.

innerhalb des Lumens der Hodenkanälchen aufwies (Abb. 3.8.b). Myc-Smok1 wurde, wie Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>, in den Flagellen elongierter Spermatozoen im *Lumen* der Hodenkanälchen nachgewiesen. Dies zeigt, dass Wildtyp-Smok1 wahrscheinlich in diesen Zellen translatiert wird. *Smok1* und *Smok1<sup>Tcr</sup>* scheinen daher denselben Mechanismen posttranskriptioneller Kontrolle zu unterliegen. Dies deutet darauf hin, dass *Smok1*, wie *Smok1<sup>Tcr</sup>*, in *cis* wirken könnte.

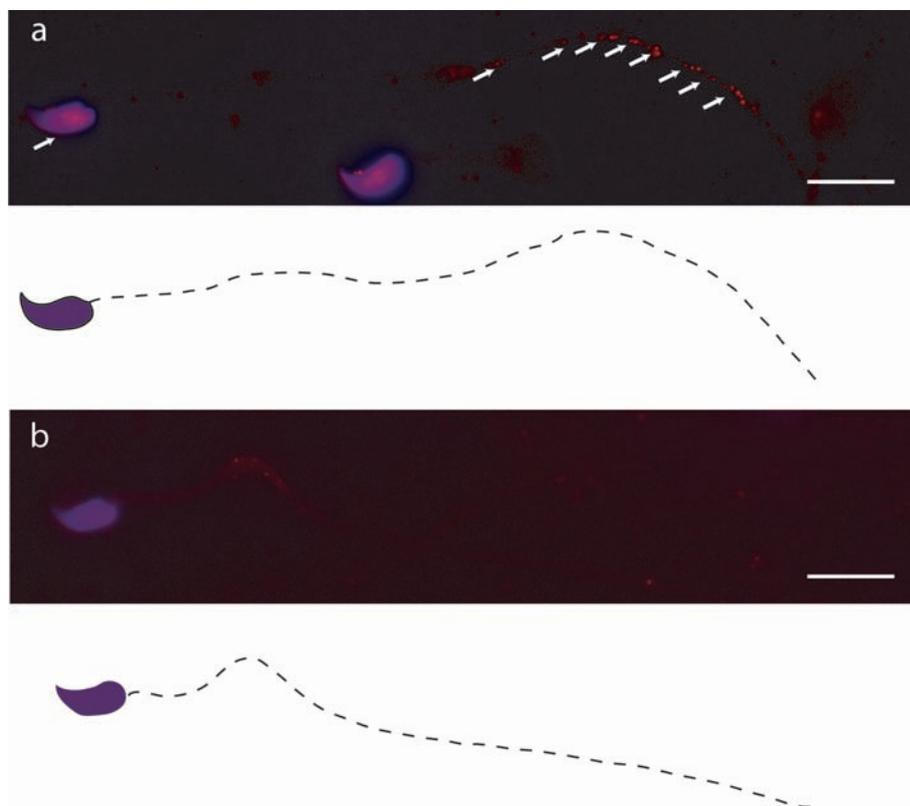
### 3.5 Lokalisation von Smok1<sup>Tcr</sup> in Spermatozoen

#### 3.5.1 Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> ist im Flagellum und im Kopf von Spermatozoen lokalisiert

In heterozygoten *t*-Haplotyp-Männchen werden zwei Populationen von Spermien mit unterschiedlicher Motilität gebildet. Da der *Responder* in *cis* wirkt und bevorzugt vererbt wird, wurde für das *Responder*-Protein Smok1<sup>Tcr</sup> eine Funktion bei der Kontrolle der Flagellenbewegung postuliert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Lokalisation der Kinase in Spermatozoen untersucht. Zu diesem Zweck wurden isolierte Spermien aus dem Nebenhoden von *Tg9/0*- und Wildtyp-Tieren verwendet. Anschließend wurde Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> in diesen Zellen über Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop dargestellt (Abb. 3.9).

In den Spermatozoen eines *Tg9/0*-Männchens wurde der Hauptteil des Flagellums, sowie der Spermienkopf gefärbt. Die Spermatozoen der Wildtyp-Männchen wiesen dagegen keine Färbung auf. *Smok1<sup>Tcr</sup>* ist folglich im Hauptteil der Flagellen und im Spermienkopf lokalisiert. Das Ergebnis dieses Experiments unterstützt also die Hypothese, dass *Smok1<sup>Tcr</sup>* die Flagellenbewegung kontrolliert.

Die Bedeutung der Lokalisation im Spermienkopf ist dagegen unklar. Denkbar wäre, dass das Protein eine Rolle bei der Befruchtung der Eizelle oder der Entwicklung der Zygote spielt.



**Abbildung 3.9:** Lokalisation des Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Proteins in Spermatozoen von *Tg9/0*-Männchen. a: Spermatozoen von *Tg9/0*-Männchen, b: Spermatozoen von Wildtyp-Männchen; blau: Kernfärbung (DAPI), rot: Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>, Balken: 10µm. Bei der Immunfluoreszenzfärbung von Spermien mit einem Antikörpers gegen das Myc-Epitop von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> wurden in den Spermien von *Tg9/0*-Männchen Signale (siehe Pfeile) im Hauptteil des Flagellums und in den Spermienköpfen beobachtet. Die Spermien von Wildtyp-Männchen wiesen dagegen keine Fluoreszenzsignale auf. Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> ist demnach in Spermienköpfen und Flagellen lokalisiert.

### 3.5.2 Lokalisation von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> an Ultrastrukturen von Spermatozoen in Ultradünnschnitten des Nebenhodens

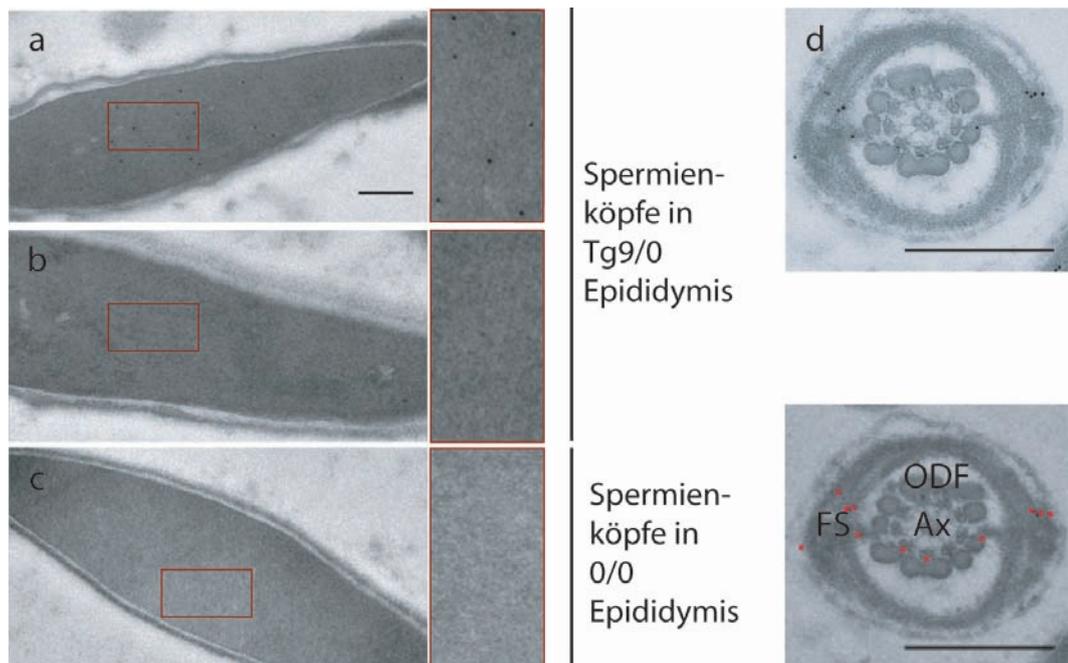
Bei der Immunfluoreszenzfärbung der Spermatozoen von *Tg9/0*-Männchen wurde Smok1<sup>Tcr</sup> im Hauptteil des Flagellums nachgewiesen. Elektronenmikroskopische Untersuchung an Ultradünnschnitten des Nebenhodens, der die Spermien enthält, sollte Aufschluss darüber geben, an welchen Ultrastrukturen die Kinase zu finden ist, um ihre Funktion bei der Flagellenbewegung einzugrenzen.

Die subzelluläre Lokalisation von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> in Spermatozoen wurde durch Immunogoldfärbung mittels kommerzieller Anti-Myc Antikörper untersucht (Abb. 3.10). Bei dieser Analyse wurden im Hauptteil der Flagellen Goldpartikel detektiert (Abb. 3.10.d), während Spermien von Wildtyp-Männchen als Negativkontrolle kaum Markierung aufwiesen. In den Flagellen der Spermien von *Tg9/0*-Männchen ist Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> vor allem an der Fibrillenscheide, aber auch an den *Outer Dense Fibers* und an den Transversalrippen des Hauptteils lokalisiert. Da an der Fibrillenscheide vor allem Komponenten von Rho-Signalwegen gebunden werden, weist dieses Ergebnis darauf hin, dass Smok1<sup>Tcr</sup> eine Rolle bei der Signaltransduktion zur Kontrolle der Flagellenbewegung spielen könnte [20][74][14].

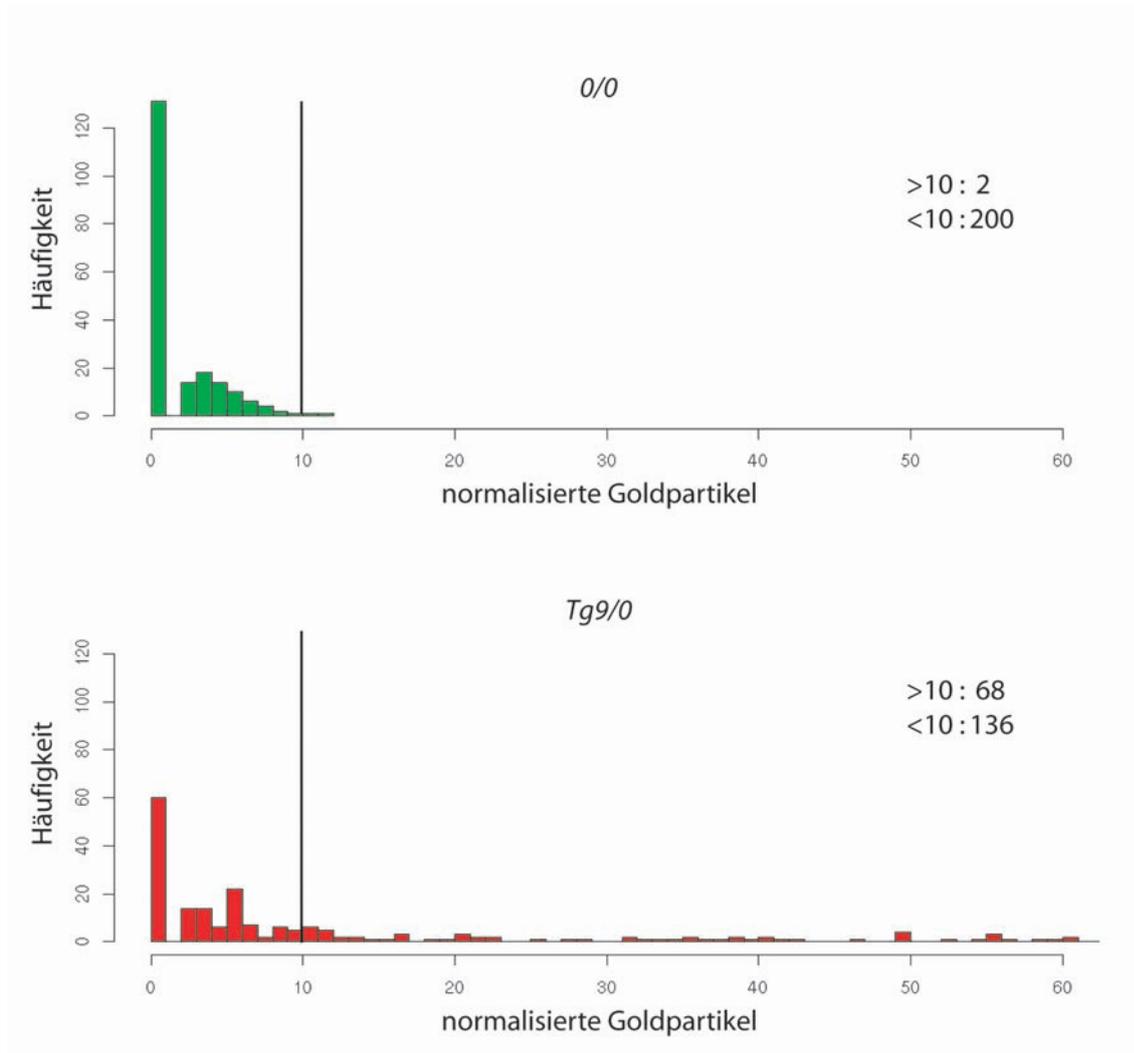
Eine besonders hohe Konzentration des Immunogoldsignals wurde in den Spermienköpfen innerhalb des elektronendichten Kerns, aber kaum im Akrosom, das den Kern umgibt, beobachtet (Abb. 3.10.a/b). Dabei war die biphasische Verteilung der Markierung auf die Spermienpopulation im Nebenhoden der *Tg9/0*-Männchen auffällig, die in mehreren Analysen reproduzierbar war. Dies zeigt, dass Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> nicht in allen Spermien eines *Tg9/0*-Männchens vorhanden ist. Um zu untersuchen, ob diese spezifisch markierte Population etwa die Hälfte der Spermien in einem *Tg9/0*-Männchen darstellt, wurde die Immunogoldmarkierung in diesen Spermienköpfen statistisch ausgewertet.

## 3.6 Statistische Untersuchung der Verteilung von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> in Spermien

Die Lokalisation des *Tg9*-Transkripts in etwa der Hälfte der haploiden Zellen im Hoden von *Tg9/0*-Männchen weist darauf hin, dass *Smok1<sup>Tcr</sup>* zellulärer Restriktion unterliegt. Jedoch wurde bei diesem Experiment nicht deutlich, ob dieser Unterschied zwischen den haploiden Zellen bis zum Ende der Spermatogenese beibehalten wird.



**Abbildung 3.10:** *Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>*-Lokalisation auf Ultradünnschnitten von Spermatozoen im Nebenhoden von *Tg9/0*-Männchen. a und b: Querschnitte durch Spermienköpfe von Spermatozoen eines *Tg9/0*-Männchens; c: Querschnitt durch einen Spermienkopf von Spermatozoen eines Wildtyp-Männchens; Balken 280 nm; roter Rahmen: vergrößerter Ausschnitt aus den Aufnahmen; d: Querschnitt durch den Hauptteil eines Flagellums (*Tg9/0*-Männchen); rot: Immunogoldmarkierung durch Anti-Myc-Antikörper, Balken 500 nm; Ax: Axonem; FS: Fibrillenscheide; ODF: *Outer Dense Fibers*. a-c: Bei der Immunogoldmarkierung von *Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>* war nur ein Teil der Population der Spermien in *Tg9/0*-Männchen markiert, während die Spermien der Wildtyp-Männchen keine bis eine geringe Markierung aufwiesen. In den Flagellen wurde *Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>* an der Fibrillenscheide und an den *Outer Dense Fibers* im Hauptteil detektiert.



**Abbildung 3.11:** Normalisierte statistische Verteilung des Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Immunogoldsignals auf Spermienköpfe in *Tg9/0*- und Wildtyp-Tieren. Die Anzahl der Goldpartikel wurde auf die Fläche der Spermienköpfe normalisiert. x-Achse: normalisierte Goldpartikel, y-Achse: absolute Anzahl der Köpfe. Wildtyp-Spermien zeigen Goldpartikelzahlen unter 10 Stück pro normalisierte Spermienkopffläche. Das *Tg9/0*-Männchen weist zwei Populationen von Spermien auf: diejenigen mit Goldpartikelzahlen unter und diejenigen über 10 Stück pro normalisierte Spermienkopf-Fläche, die prozentual 33,3 % der Gesamt-Spermienpopulation darstellen. Dies zeigt, dass Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> auf eine Spermienpopulation beschränkt ist. Somit konnte die Hypothese, dass *Smok1<sup>Tcr</sup>* zelluläre Restriktion seiner Genprodukte zeigt, bestätigt werden.

Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob in diesen Tieren zwei Spermienpopulationen gebildet werden, von denen nur eine der beiden das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein enthält. Dies könnte den Unterschied in ihrer Motilität und damit die bevorzugte Vererbung der *Responder*-tragenden Spermien molekular erklären.

Für die Analyse der Verteilung von Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>* auf die Population der Spermien eines *Tg9/0*-Männchens wurden die Immunogoldsignale in den Querschnitten der Spermienköpfe statistisch ausgewertet (Abb. 3.10 und 3.11). Die Quantifizierung erfolgte anhand von jeweils 202 Bildern, die Querschnitte der Spermienköpfe eines Wildtyp- und eines *Tg9/0*-Männchens zeigten.

99 % der Spermienköpfe des Wildtyp-Männchens zeigten eine Goldpartikelzahl von maximal bis zu 10 Partikeln pro normalisierter Fläche. Dagegen war im Nebenhoden von *Tg9/0*-Männchen eine Immunogold-markierte Spermienpopulation zu finden, deren Goldpartikelzahlen deutlich über 10 pro normalisierte Fläche betrug. Diese stellt statistisch 33 % der analysierten Gesamt-Spermienpopulation dar. Ein Teil der Gesamtpopulation mit 5 - 10 Goldpartikeln pro normalisierte Fläche konnten weder eindeutig der spezifisch markierten, noch der unspezifisch markierten Population zugeordnet werden. Dennoch ist bei der statistischen Analyse klar erkennbar, dass in *Tg9/0*-Männchen eine *Tg9*-spezifische Spermienpopulation gebildet wird, die Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>* trägt. Damit wurde gezeigt, dass die Beschränkung der Genprodukte von *Smok1<sup>Tcr</sup>*, die bereits bei der Transkriptexpression in runden Spermatozoen zu sehen ist, auf etwa die Hälfte der haploiden Zellen bis zum Ende der Spermatogenese beibehalten wird. Damit wurde die Hypothese, dass heterozygote *t*-Haplotyp-Männchen aufgrund der Restriktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>* zwei unterschiedliche Spermienpopulationen bilden, experimentell bestätigt.

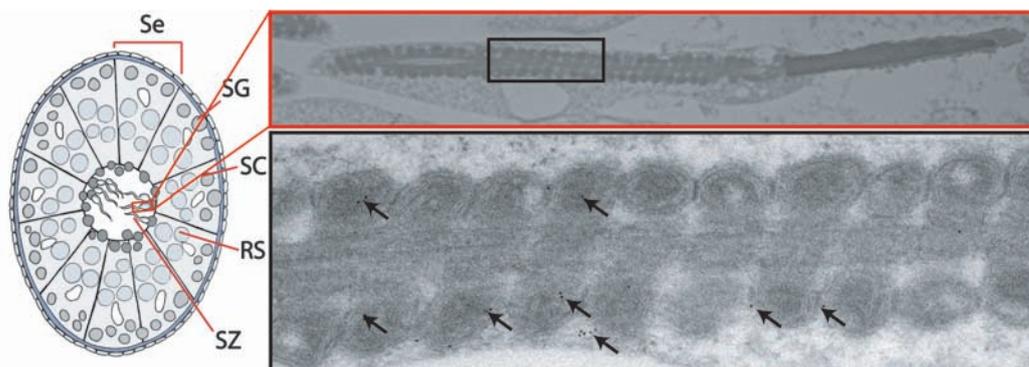
### 3.7 Eigenschaften des *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Proteins

Über Immunfluoreszenzfärbung und Immunogoldmarkierung wurde Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>* im Hauptteil des Flagellums von Spermatozoen der *Tg9/0*-Männchen lokalisiert. Dort ist nur wenig Zytoplasma vorhanden, das Ribosomen für die Translation der Kinase enthält. Daher ist es unwahrscheinlich, dass *Smok1<sup>Tcr</sup>* direkt im Hauptteil des Flagellums translatiert wird. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob der Ort der Translation des Proteins das Ribosomen-reiche Zytoplasma der elongierten Spermatozoen sein könnte, von wo aus *Smok1<sup>Tcr</sup>* in den Hauptteil des Flagellums gelangt, indem das Protein den Mikrotubuli-abhängigen intraflagellären Transport (IFT) nutzt [38].

Hierfür wurde die Lokalisation von *Smok1<sup>Tcr</sup>* in elongierten Spermatischen analysiert. Außerdem wurde *in vitro* überprüft, ob *Smok1<sup>Tcr</sup>* Eigenschaften besitzt, um den IFT als Transportsystem zu nutzen.

### 3.7.1 Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> ist in elongierten Spermatischen auch außerhalb der Flagellen detektierbar

Um zu überprüfen, ob das Zytoplasma in elongierten Spermatischen der Ort der Translation des *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Proteins ist, wurde dieses im Hoden transgener Tiere mittels Immunogoldfärbung mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop dargestellt (Abb. 3.12). Das hier abgebildete Differenzierungsstadium wurde als elongierte Spermatische identifiziert, da die Mitochondrien im Zytoplasma um den Mittelteil des Flagellums angeordnet sind. Immunogoldfärbung wurde hier im Zytoplasma und entlang des Flagellums detektiert. Die Mitochondrien wiesen ebenfalls Immunogoldmarkierung auf, die jedoch auch auf Wildtyp-Hoden detektiert, und daher als Hintergrundmarkierung durch den Anti-Myc-Antikörper bewertet wurde. Die zytoplasmatische und flagelläre Lokalisation der Goldpartikel war jedoch spezifisch für Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> in den transgenen Männchen. Dieses Experiment weist darauf hin, dass die Translation wahrscheinlich nicht im Flagellum statt findet. Möglicherweise wird dieses im Zytoplasma translatiert und anschließend am Axonem entlang transportiert.



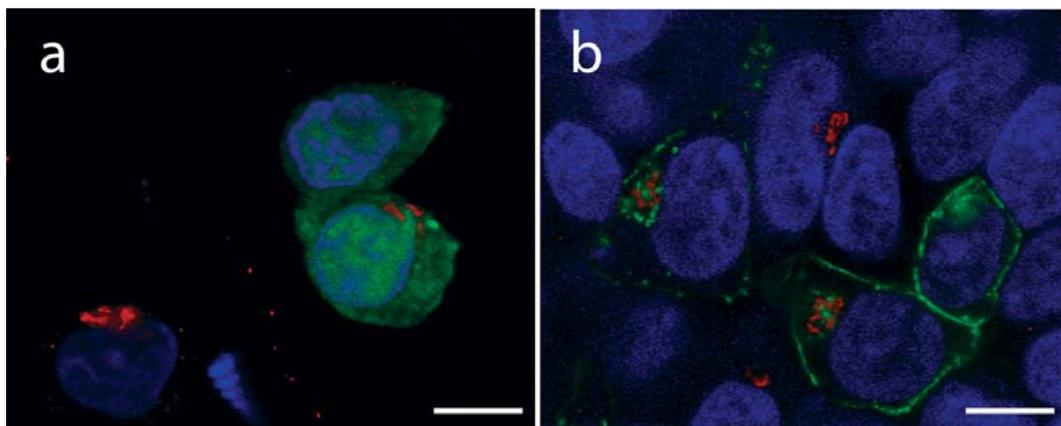
**Abbildung 3.12:** Immunogoldmarkierung von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> auf Hoden-Ultradünnschnitten hemizygot transgener Tiere. Links: schematische Darstellung eines Hodenkanälchens im Querschnitt; Se: Sertoli Zellen; SG: Spermatogonien; SC: Spermatozyten; RS: runde Spermatischen; SZ: Spermatozoen. Roter Kasten: Elongierte Spermatischen zeichnen sich durch die Mitochondrien aus, die um den Mittelteil des Flagellums angeordnet im langgestreckten Zytoplasma der haploiden Zellen liegen. Schwarzer Kasten: Vergrößerung eines Teils des Flagellums; die Pfeile deuten auf Immunogoldmarkierung von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> im Zytoplasma und an den Mitochondrien.

### 3.7.2 GFP-Smok1<sup>Tcr</sup> ist im Membran- und im Golgi-Kompartiment von transfizierten Kulturzellen lokalisiert

Damit ein Protein entlang des Axonems transportiert werden kann, benötigt dieses besondere Eigenschaften. In der Regel werden Genprodukte in Vesikeln, die vom Golgi-Apparat abgeschnürt werden, entlang der Mikrotubuli transportiert, was als intraflagellärer Transport (IFT) bezeichnet wird [41]. Alternativ kann der Transport von Proteinen entlang des Axonems auch über Multiproteinkomplexe, gebunden an Kinesin oder Dynein, stattfinden [39]. Dies bedeutet, dass ein Protein entweder an bestimmte Multiproteinkomplexe oder an durch den Golgi-Apparat produzierte Vesikel gebunden werden muss, um den IFT als Transportsystem innerhalb der Zelle nutzen zu können.

Daher wurde untersucht, ob das Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein die Eigenschaft besitzt, mit Proteinen in Vesikeln des Golgi-Apparats zu interagieren. Zu diesem Zweck wurde ein Smok1<sup>Tcr</sup>-GFP-Fusionsprotein in Hek293T Zellen analysiert (Abb. 3.13./b). Ein GFP-Reporter, der nur GFP-Protein kodiert, wurde als Kontrolle ebenfalls untersucht (Abb. 3.13.a). Grün fluoreszierendes Smok1<sup>Tcr</sup>-GFP wurde auf Kolo-kalisation mit dem Golgi-Apparat überprüft, indem dieser durch Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen das Golgi-Matrix-Protein GM130 dargestellt wurde (Abb. 3.13.a/b rot). Bei diesem Versuch wurde der Zellkern mit DAPI angefärbt (Abb. 3.13.a/b blau).

In den Zellen, die mit dem Smok1<sup>Tcr</sup>-GFP-Reporterkonstrukt transfiziert wurden, wurde das Smok1<sup>Tcr</sup>-GFP-Fusionsprotein am äußeren Membrankompartiment lokalisiert. Außerdem fiel eine lokale Anhäufung von Smok1<sup>Tcr</sup>-GFP in vesikelartigen, zytoplasmatischen Strukturen auf. Diese befanden sich in unmittelbarer Nähe zu Vesikeln des Golgi-Apparats, die über die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper gegen GM130 dargestellt wurden. Die Kontrollen zeigten dagegen gleichmäßige zelluläre Verteilung des GFP-Proteins innerhalb der Zellen. Die Lokalisation im Golgi- und im Membran-Kompartiment der Zellen war daher spezifisch für Smok1<sup>Tcr</sup>. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass Smok1<sup>Tcr</sup> mit Komponenten intrazellulärer Transportsysteme interagieren könnte. Welche Mechanismen und Elemente von Smok1<sup>Tcr</sup> den Transport des Proteins innerhalb der Zelle steuern, ist jedoch unbekannt und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.



**Abbildung 3.13:** *In vitro* Proteinlokalisierung von GFP-Smok1<sup>Tcr</sup> in Hek293T Zellen. a: eGFP-Kontrolle; grün: GFP-Protein; rot: *cis*-Golgi-Marker GM130, blau: Kernfärbung (DAPI); Balken 10 µm; b: GFP-Smok1<sup>Tcr</sup>, rot: *cis*-Golgi-Marker GM130, blau: Kernfärbung (DAPI); Balken 10 µm. GFP-Smok1<sup>Tcr</sup> Fusionsprotein ist in transient transfizierten Hek293T Zellen im Membran- und Golgi-Kompartiment sichtbar.

### 3.8 Untersuchung auf die Stabilität des *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkripts bei der Spermatogenese

Da Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> höchstwahrscheinlich erst in elongierten Spermatiden translatiert wird, sollte untersucht werden, weshalb das *Tg9*-Transkript über *in situ* Hybridisierung in diesen Zellen nicht detektiert werden konnte. Für die Untersuchung auf Transkriptlokalisierung in elongierten Spermatiden wurde die *in situ* Hybridisierung des *CatSper1*-Transkripts als Positivkontrolle verwendet, da dieses in Spermien nachgewiesen wurde und daher auch in späten Stadien der Spermiogenese im Hoden detektierbar sein sollte [24]. Mittels *in situ* Hybridisierung wurde untersucht, ob diese Technik sensitiv genug ist, um *CatSper1*-, bzw. *Tg9*- oder *Smok*-Transkripte darzustellen. Dies diente dazu abzuschätzen, ob für *Tg9*- und *Smok*-Transkripte überhaupt spezifische Signale in elongierten Spermatiden erwartet werden könnten.

#### 3.8.1 Überprüfung der Sensitivität der *in situ* Hybridisierung für die Darstellung von Transkripten in elongierten Spermatiden

*In situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen die Sequenz des *CatSper1*-Transkripts auf Hoden von Wildtyp-Männchen zeigte eine mittelstarke und gleichmäßige Färbung in den äußeren und mittleren Bereichen der Hodenkanälchen (Abb. 3.14.a). Bei der fluoreszierenden *in situ* Hybridisierung wurden dort ebenfalls starke Fluo-



**Abbildung 3.14:** Lokalisation der *CatSper1*-Transkripte auf Hoden von Wildtyp-Männchen. a: *in situ* Hybridisierung mit einer antisense RNA-Sonde für *CatSper1*-Transkripte im Hoden von Wildtyp-Männchen (NBT/BCIP-Detektion), b: *in situ* Hybridisierung mit einer sense RNA-Sonde für *CatSper1*-Transkripte (NBT/BCIP-Detektion); c: fluoreszierende *in situ* Hybridisierung mit einer antisense RNA-Sonde zur Darstellung von *CatSper1*-Transkript; blau: Kernfärbung (DAPI), rot: *CatSper1*-Transkript; Balken 50  $\mu\text{m}$ . Die Signale der *in situ* Hybridisierungen sind in den äußeren und mittleren Bereichen der Hodenkanälchen zu sehen. Die inneren luminalen Bereiche sind ungefärbt. *CatSper1*-Transkripte wurden in Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatisden, nicht aber in elongierten Spermatisden detektiert.

reszenzsignale detektiert (Abb. 3.14.c). In den luminalen Bereichen der Hodenkanälchen dagegen konnte das Transkript weder mittels Fluoreszenzfärbung noch mittels NBT/BCIP-Färbung dargestellt werden, obwohl *CatSper1*-Transkript mittels RT-PCR bereits in Spermatozoen nachgewiesen wurde [24]. Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass *in situ* Hybridisierung als Methode für die sensitive Darstellung von Transkripten bei der Spermiogenese nur bedingt geeignet ist.

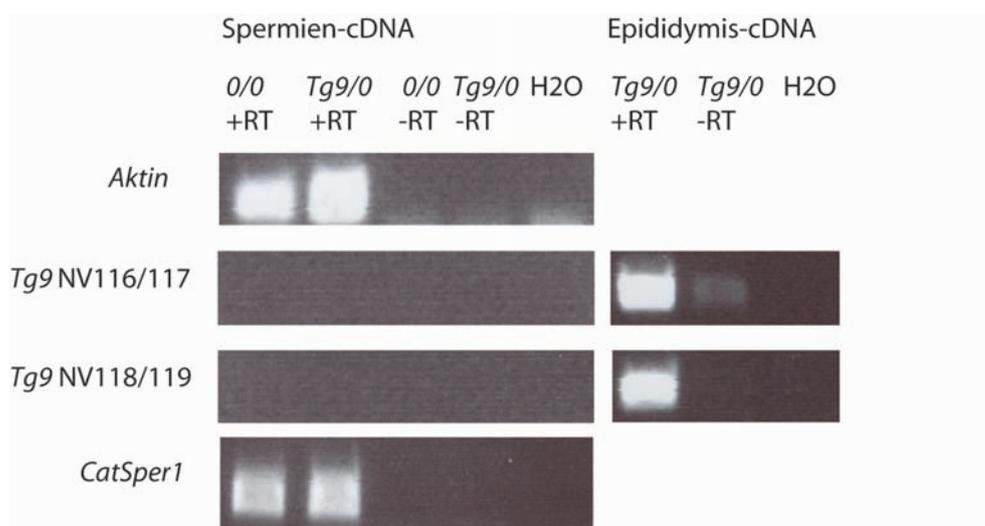
### 3.8.2 Untersuchung der Spermien auf *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript

Isolierte Spermien aus dem Nebenhoden können ohne Kontamination mittels hochsensitiver Methoden auf Transkripte analysiert werden. Daher wurden Spermatozoen aus *Tg9/0*- bzw. *t*-Haplotyp-Männchen verwendet, um zu untersuchen, ob *Smok1<sup>Tcr</sup>*-kodierende Transkripte detektiert werden können. Transkripte in Spermatozoen könnten als Vorlage für eine *de novo* Synthese von Proteinen dienen, was für den Kationenkanal *CatSper1* beschrieben wurde. Für diesen Versuch wurde die Gesamt-RNA aus Hoden, Nebenhoden (Epididymis) und Spermien isoliert und mittels RT-PCR auf die entsprechenden Transkripte untersucht.

*Tg9*-Transkript wurde im Nebenhoden transgener Tiere nachgewiesen. Die Detektion von *Tg9*-Transkript in diesem Organ könnte dadurch erklärt werden, dass dieses entweder in Spermien gespeichert oder von den Zellen des Stützgewebes expri-

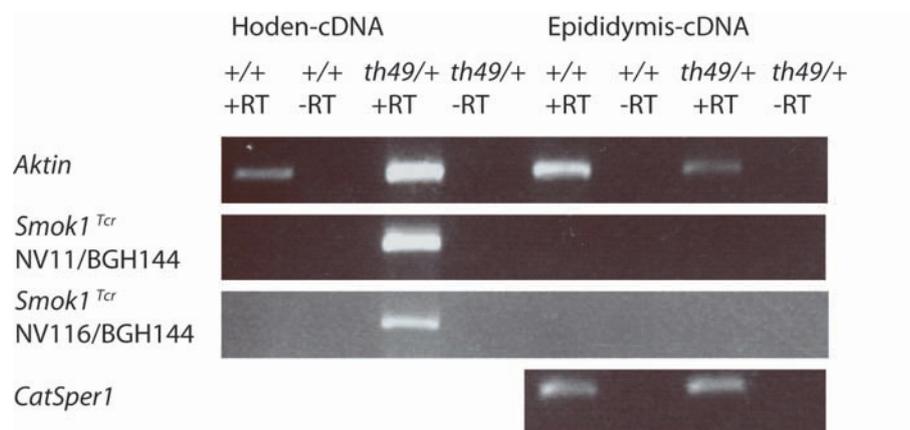
miert wird. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden Spermatozoen aus dem Nebenhoden eines *Tg9/0*-Männchens isoliert. Aus diesen Zellen wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mittels RT-PCR auf das *Tg9*-Transkript untersucht. Als Positivkontrolle diente hier das *CatSper1*-Transkript, das mit spezifischen Primerpaaren [24] dargestellt wurde, ebenso wie *Aktin*. Jedoch konnte mittels RT-PCR kein *Tg9*-Transkript in isolierten Spermien detektiert werden.

Das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript wurde im Hoden eines Männchens detektiert, das den partiellen *t*-Haplotyp *th49* heterozygot trägt (*th49/+*). Sowohl *Aktin* als auch *CatSper1* diente bei dieser Analyse als Positivkontrolle. In der cDNA, die aus Gesamt-RNA des *th49/+* Nebenhodens synthetisiert wurde, konnte *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript über RT-PCR nicht nachgewiesen werden, die *Aktin*- und *CatSper1*-Transkripte dagegen schon. Diese Untersuchungen boten keine Hinweise für *Smok1<sup>Tcr</sup>*-kodierende Transkripte in isolierten Spermien, die zu einer *de novo* Synthese von *Smok1<sup>Tcr</sup>* führen könnten.



**Abbildung 3.15:** RT-PCR Analyse der RNA aus dem Nebenhoden und Spermien der Linie *Tg9-987/0*; +/-RT: mit/ohne reverse Transkriptase bei der cDNA Synthese der RNA-Proben, H2O: Wasserkontrolle Primerpaare NV116/117 und NV118/119 dienen jeweils zur spezifischen Detektion der *Tg9*-Transkripte, *Aktin*- und *CatSper1*-Primer zur spezifischen Detektion der *Aktin*- und *CatSper1*-Transkripte. Die Analyse zeigte, dass in Spermien zwar *CatSper1*- und *Aktin*-, aber nicht *Tg9*-Transkripte darstellbar sind. In Nebenhoden aus *Tg9-987/0* Männchen ist *Tg9*-Transkript dagegen detektierbar.

### 3.8 Untersuchung auf die Stabilität des *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkripts bei der Spermatogenese



**Abbildung 3.16:** RT-PCR Analyse von RNA aus Hoden und Epididymis von *th49*/+/- Tieren, +/-RT: mit/ohne reverse Transkriptase bei der cDNA Synthese der RNA Proben. Die Primerpaare NV11/BGH144 und NV116/BGH144 dienen jeweils zur spezifischen Detektion der *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkripte im *t*-Haplotyp, *Aktin* und *CatSper1*-Primer zur spezifischen Detektion der entsprechenden Transkripte. Während im Hoden *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript spezifisch detektiert werden konnte, war dieses im Nebenhoden der *th49*/+/-Tieren, im Gegensatz zur *CatSper1*- und *Aktin*-Transkripten undetektierbar. Daher wurden die Spermien dieser Tiere nicht weiter auf *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript untersucht.



## Kapitel 4

# Ergebnisse (2)- Eigenschaften der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vitro* und *in vivo*

Anhand der im vorherigen Kapitel beschriebenen Experimente wurde gezeigt, dass das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-kodierende Transkript im Hoden von *Tg9/0*-Männchen auf einen Teil der haploiden Zellen beschränkt bleibt. Außerdem wurde beim Vergleich der Transkriptexpression mit der Proteinlokalisierung deutlich, dass die Translation der mRNA etwa 10 Tage nach der Transkription erfolgt. Dies weist auf translationelle Repression des *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkripts hin, die möglicherweise die Ursache für die Beschränkung der *Responder*-Wirkung auf einen Teil der Spermatozoen darstellt.

Um Hinweise auf die Funktion einzelner Elemente des Transkripts bei der translationellen Repression zu erhalten, sollten Reporterkonstrukte im Zellkulturmodell untersucht werden. Insbesondere sollte damit untersucht werden, wie die 5'UTR die subzelluläre Lokalisation, die Stabilität und die Translation der jeweiligen Transkripte beeinflusst. Darüber hinaus sollte die Funktion der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* für die Beschränkung der *Responder*-Wirkung auf einen Teil der Spermatozoen in hemizygot transgenen Tieren analysiert werden.

### 4.1 Eigenschaften der UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vitro*

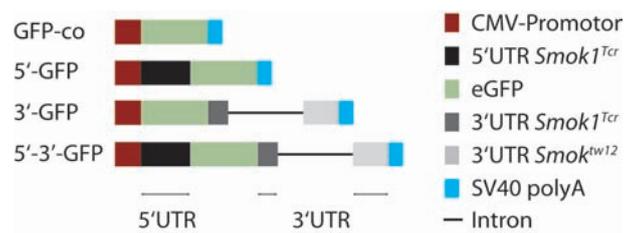
#### 4.1.1 Die untranslatierten Regionen von *Smok1<sup>Tcr</sup>* beeinflussen die Aktivität von GFP-Reportern

Zur Untersuchung der Eigenschaften der untranslatierten Regionen von *Smok1<sup>Tcr</sup>* wurden 5' und 3' untranslatierte Regionen, die auch im *Tg9*-Transkript vorhanden waren, voneinander getrennt in GFP-Reporterkonstrukte kloniert (5'-GFP, 3'-GFP, Abb. 4.1).

Eines der Reporterkonstrukte enthält sowohl die 5'UTR, als auch die 3'UTR des *Tg9*-Transkripts (5'-3'-GFP, Abb. 4.1). Zur Kontrolle der Fluoreszenzintensität diente das unmodifizierte eGFP-C2 Plasmid (GFP-co, Abb. 4.1).

Diese Konstrukte wurden in

NIH3T3-Fibroblastenzellen transfiziert. Diese wurden etwa einen Tag nach der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie auf die Intensität der GFP-Fluoreszenz untersucht. In mit 3'-GFP transfizierten Fibroblasten wurde eine ähnliche Intensität der GFP-Fluoreszenz wie im Kontrollansatz mit GFP-co beobachtet (Abb. 4.2.a/c). Fibroblasten, die mit 5'-GFP oder mit 5'-3'-GFP transfiziert wurden, wiesen dagegen eine sehr schwache GFP-Fluoreszenz auf (Abb. 4.2.b/d). Dies bedeutet, dass nur geringe Mengen an GFP-Protein gebildet werden, wenn die 5'UTR im Transkript vorhanden ist. Diese untranslatierte Region könnte folglich eine Rolle bei der posttranskriptionellen Kontrolle des Transkripts spielen, indem sie die Translation oder die Stabilität der entsprechender Transkripte beeinflusst.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der GFP-Reporterkonstrukte; GFP-co; 5'-GFP; 3'-GFP; 5'-3'-GFP

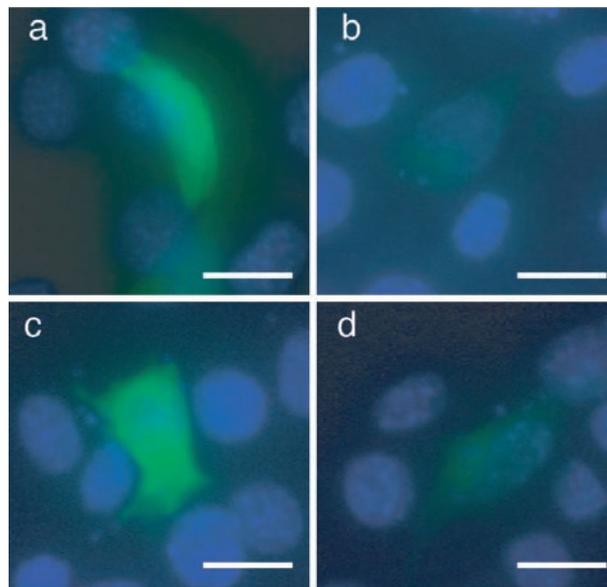
## 4.2 Einfluss der UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* auf die subzelluläre Lokalisation der Transkripte *in vitro*

### 4.2.1 Die 5' und 3' untranslatierten Regionen von *Smok1<sup>Tcr</sup>* verursachen unterschiedliche Lokalisation von Transkripten innerhalb der Zelle

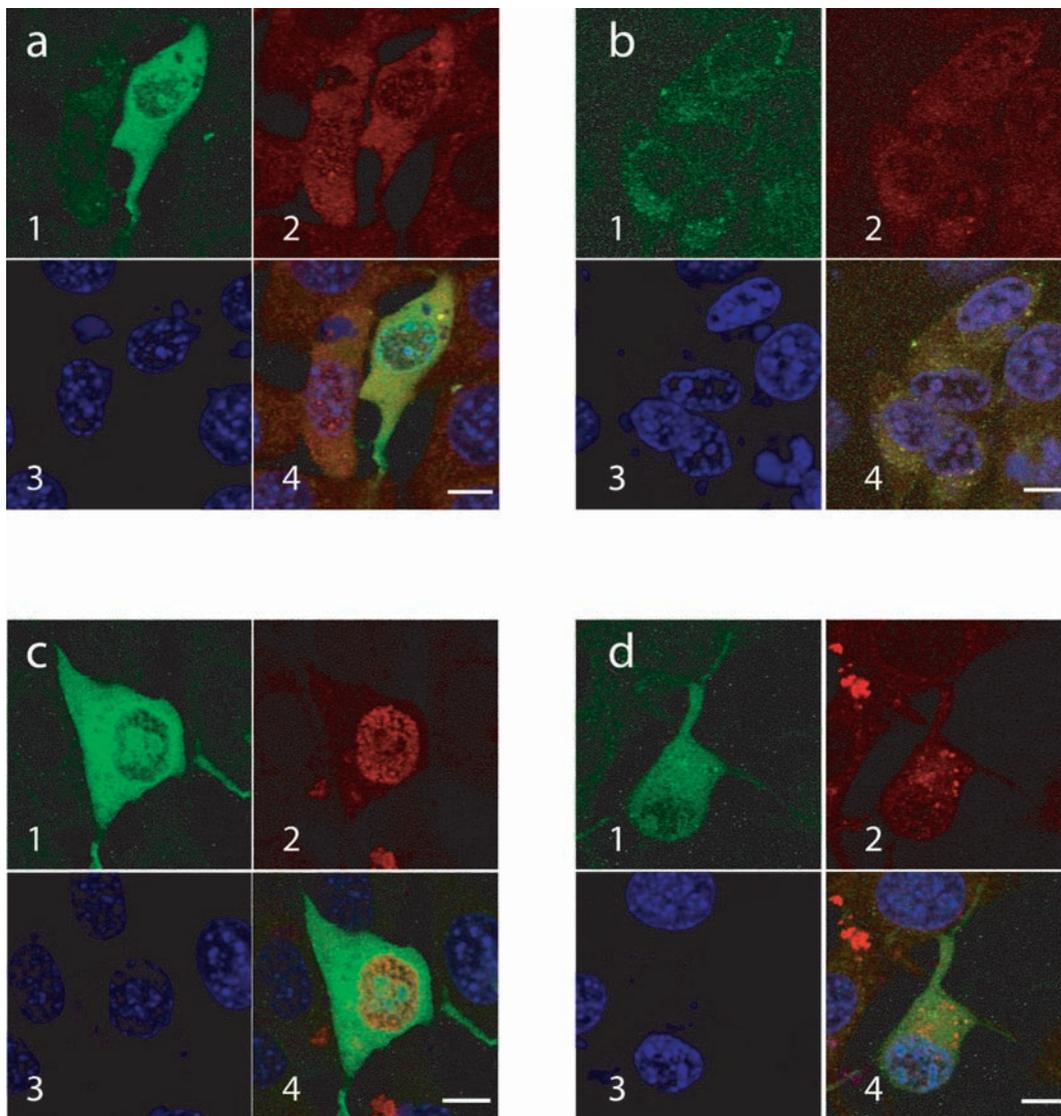
Bei diesen Experimenten wurde untersucht, ob die 5' und 3' untranslatierten Regionen, die im *Tg9*-Transkript vorhanden sind, die subzelluläre Lokalisation eines GFP-Transkripts *in vitro* beeinflussen. Dies könnte Hinweise auf Mechanismen für die zelluläre Restriktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vivo* geben. NIH3T3-Fibroblasten wurden mit GFP-Reporterkonstrukten (Abb. 4.1) transfiziert und anschließend mittels fluoreszierender *in situ* Hybridisierung gegen die kodierende Region von GFP auf die Lokalisation der entsprechenden Transkripte untersucht. Die Zellkerne wurden über DAPI-Färbung dargestellt. Die GFP-Fluoreszenz wurde bei diesem Versuch zur Identifizierung transfizierter Zellen bei der Fluoreszenzmikroskopie verwendet. In Zellen,

#### 4.2 Einfluss der UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* auf die subzelluläre Lokalisation der Transkripte *in vitro*

---



**Abbildung 4.2:** GFP-Fluoreszenz von GFP-Reportern, die untranslatierte Regionen von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthielten; a: GFP-co, b: 5'-GFP, c: 3'-GFP, d: 5'-3'-GFP, blau: Kernfärbung (DAPI), grün: GFP-Protein, Balken 20 $\mu$ m; Die 5'UTR im GFP-Transkript führt zu geringer GFP-Fluoreszenz in den entsprechend transfizierten Zellen (5'-GFP, 5'-3'-GFP; b/d); 3'-GFP transfizierte Zellen zeigen eine ähnliche Intensität der GFP-Fluoreszenz wie Kontrollzellen (a und c).



**Abbildung 4.3:** *In situ* Hybridisierung gegen die kodierende Region von GFP in NIH3T3-Fibroblasten, die mit GFP-Reporterkonstrukten transfiziert wurden; a: GFP-co; b: 5'-GFP; c: 3'-GFP; d: 5'-3'-GFP; 1 (grün): GFP-Protein; 2 (rot): GFP-Transkript; 3 (blau): Kernfärbung (DAPI); 4: Überlagerung der Färbungen; Balken jeweils 10 $\mu$ m; In diesen *in situ* Hybridisierungen wurde deutlich, dass die Lokalisation von GFP-Transkripten innerhalb der Zellen von den 5' und von den 3' untranslatierten Regionen beeinflusst wird. Ist die 5'UTR im Transkript vorhanden, liegt die mRNA in zytoplasmatischen Foci vor. Die 3'UTR führt dagegen zu verstärkter Kernlokalisation des Transkripts, die auf unvollständiges Spleißen der Prä-mRNA hinweist.

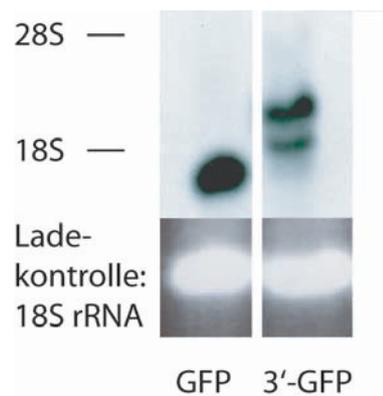
die mit GFP-co transfiziert wurden, wurde eine schwache, relativ gleichmäßige zytoplasmatische Fluoreszenz bei der *in situ* Hybridisierung gegen das GFP-Transkript beobachtet (Abb. 4.3.a2). Die *in situ* Hybridisierung auf Fibroblasten, die mit dem 5'-GFP transfiziert wurden, zeigte lediglich in wenigen zytoplasmatischen Foci schwache Signale (Abb. 4.3.b2).

Im Gegensatz dazu wiesen Fibroblasten, die mit 5'-3'-GFP transfiziert wurden, stärkere Fluoreszenzsignale bei der *in situ* Hybridisierung auf (Abb. 4.3.d2). Das Transkript, das die 5' und die 3'UTR des *Tg9*-Transkripts enthält, wurde dort in einzelnen zytoplasmatischen und nukleären Foci detektiert, die auf RNA-Aggregate im Zytoplasma und im Zellkern hinweisen. Die starke Fluoreszenz, die im oberen linken Bildrand in Abb. 4.3.d2/4 zu sehen ist, konnte keiner Fibroblastenzelle zugeordnet werden und wurde deshalb als fluoreszierende Verunreinigung der Probe gewertet.

Anders als die GFP-Transkripte, die die 5'UTR enthalten, ist das Transkript in 3'-GFP-transfizierten Zellen deutlich im Zellkern und schwach im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 4.3.c2). Dies deutet darauf hin, dass ungespleißtes Transkript als Prä-mRNA im Zellkern zurückgehalten wird, was möglicherweise auf das darin enthaltene, etwa 400 bp lange Intron zurückzuführen sein könnte. Unvollständiges Spleißen des Introns könnte durch die suboptimale Spleißdonor-Sequenz, die in Exon 2 von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthalten ist, verursacht werden (persönliche Mitteilung Bernhard G. Herrmann).

#### 4.2.2 Verzögertes Spleißen von Transkripten, die den Spleißdonor des Exons2 von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthalten

Verzögertes Spleißen des *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkripts könnte möglicherweise zur zellulären Restriktion der *Responder*-Genprodukte *in vivo* beitragen. Um zu untersuchen, ob Mechanismen vorliegen, die das korrekte Spleißen des Introns 2 von *Smok1<sup>Tcr</sup>* verhindern, wurden Zellen transient mit dem 3'-GFP-Reporterkonstrukt transfiziert, das den Spleißdonor des Exons 2 von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthält. Als Kontrolle diente die transiente Transfektion der Zellen mit GFP-co. Die entsprechenden GFP-Transkripte wurden über Northern Blot mit einer Dig-UTP-markierten RNA-Sonde gegen die kodierende Region von GFP nachgewiesen. Die Northern Blot-Analyse der RNA aus den Fibroblasten, die mit dem GFP-co Kontrollkonstrukt transfiziert wurden, zeigt eine einzige Bande für das GFP-Transkript. Bei der Analyse der RNA aus den Fibroblasten, die mit 3'-GFP transfiziert wurden, wurden dagegen zwei Banden unterschiedlicher Größe detektiert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass dieses GFP-Transkript



**Abbildung 4.4:** Northern Blot Analyse auf GFP-Transkripte in mit GFP-co und 3'-GFP-transfizierten NIH3T3-Fibroblasten. Die Transkripte wurden durch die Hybridisierung mit einer Dig-UTP-markierten RNA-Sonde gegen die kodierende Region von GFP dargestellt. Zur Überprüfung auf gleichmäßige Ladung der Proben diente die Intensität der 18S Bande. In GFP-co-transfizierten Zellen wurde eine einzelne Bande detektiert. Zellen, die mit dem 3'-GFP-Reporterkonstrukt transfiziert wurden, zeigen dagegen zwei Banden. Diese entsprechen ihrer Größe nach der ungespleißten Prä-mRNA, beziehungsweise der gespleißten mRNA.

aufgrund des darin enthaltenen Introns nur unvollständig gespleißt wird.

Dieses Ergebnis stellt eine Erklärung dar, weshalb bei der oben beschriebenen *in situ* Hybridisierung der Fibroblasten, die mit 3'-GFP transfiziert wurden, eine prominente Kernlokalisierung des Transkripts beobachtet wurde. Daher könnte der Spleißdonor im Exon 2 von *Smok1<sup>Tcr</sup>* zu unvollständigem Spleißen und Kernlokalisierung der prä-mRNA führen und damit zu dessen zellulärer Restriktion *in vivo* beitragen.

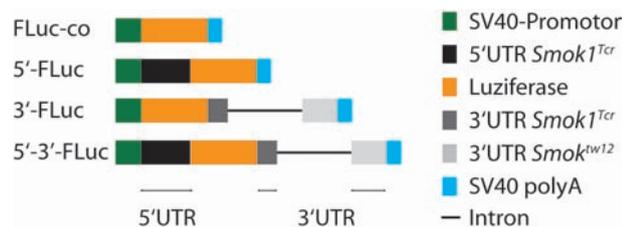
### 4.3 Translationelle Repression von Transkripten durch die 5' UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>*

#### 4.3.1 Die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* verursacht translationelle Repression

Die Analyse der GFP-Fluoreszenz in mit GFP-Reporterkonstrukten transfizierten Zellen weist darauf hin, dass die 5' untranslatierte Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>* Transkripte posttranskriptionell regulieren kann. Um zu unterscheiden, ob die reduzierte Proteinbildung durch Transkriptdestabilisierung oder translationelle Repression des Transkripts verursacht wird, wurde der Effekt der 5'UTR auf die Translation quantifiziert und mit der Menge an vorhandenem Transkript in den entsprechend transfizierten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Da in unserem Labor keine Methode zur Verfügung stand, um die GFP-Fluoreszenzintensität zu quantifizieren, wurde Chemolumineszenzmessung

der Firefly-Luziferase-Aktivität in Zellen durchgeführt, die transient mit modifizierten Firefly-Luziferase-Reporterkonstrukten transfiziert wurden.

Dazu wurden, in Analogie zu den GFP-Reporterkonstrukten (Abb. 4.1), Firefly-Luziferase-Konstrukte kloniert, die die 5' und 3' untranslatierten Regionen des *Tg9*-Transkripts enthalten (FLuc-co, 5'-FLuc, 3'-FLuc, 5'-3'-FLuc, Abb. 4.5). Die Luziferase-Aktivität der Zellen,



**Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung der Luziferase-Reporterkonstrukte; FLuc-co; 5'-FLuc; 3'-FLuc; 5'-3'-FLuc

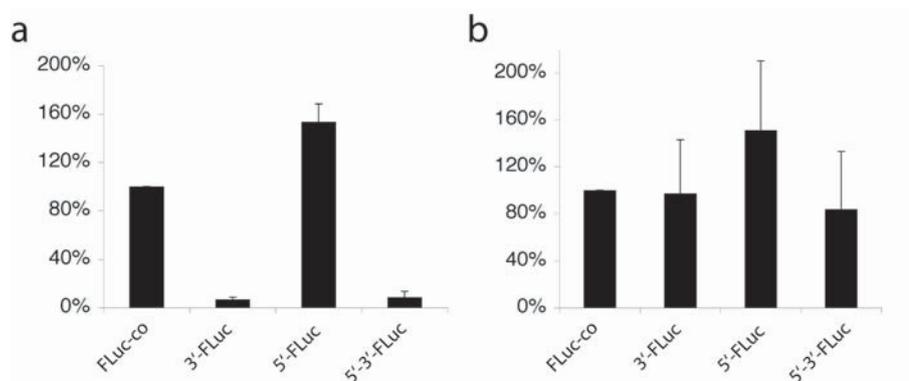
die mit dem unveränderten

Luziferase-Reporter (Fluc-co) transfiziert wurden, wurde als 100 %-Wert definiert. Die Quantifizierung der Firefly-Luziferase-Transkripte in den entsprechend transfizierten Zellen erfolgte durch quantitative RealTime PCR. Für diese Messungen wurde der eGFP-C2 Vektor (GFP-co) kotransfiziert, um Luziferase-Transkriptmengen gegen das GFP-Transkript zu normalisieren und eventuelle Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den verschiedenen Ansätzen auszugleichen.

Die Luziferase-Aktivität in Hek293T-Zellen, die mit 5'-FLuc beziehungsweise 5'-3'-FLuc transfiziert wurden, betrug etwa ein Zehntel der Aktivität, die in mit dem FLuc-co Kontrollvektor transfizierten Zellen beobachtet wurde (Abb. 4.6.a). In Zellen, die mit dem 3'-Fluc-Reporterkonstrukt transfiziert wurden, wurde eine leicht erhöhte Luziferase-Aktivität von rund 150 % gemessen (Abb. 4.6.a).

Die Quantifizierung der Transkripte durch quantitative PCR wies dagegen darauf hin, dass in etwa vergleichbare Firefly-Luziferase-Transkriptmengen in den mit FLuc-co-, 5'-FLuc- und 5'-3'-FLuc-Konstrukten transfizierten Zellen exprimiert werden (Abb. 4.6.b). Lediglich die Zellen, die mit dem 3'-FLuc-Reporterkonstrukt transfiziert wurden, wiesen eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge um etwa 50 % auf (Abb. 4.6.b). Diese Messungen zeigen, dass die 5' untranslatierte Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>* dazu führt, dass Transkripte, die die 5'UTR enthalten, zwar stabil vorliegen, jedoch translationell reprimiert werden. Die Beobachtung, dass Zellen, die mit dem 3'-FLuc Reporterkonstrukt transfiziert wurden, erhöhte Transkriptmengen aufwiesen, könnte dadurch erklärt werden, dass die 3'UTR das Transkript möglicherweise stabilisiert. In

diesen Zellen könnte folglich auch mehr Transkript vorhanden sein, das translatiert wird.



**Abbildung 4.6:** Normalisierte Luciferase-Aktivität (a) und Luciferase-Transkriptmengen (b) in Hek293T-Zellen, die transient mit Luciferase-Reporterkonstrukten (Abb. 4.5) transfiziert wurden. Die Firefly-Luziferase-Transkriptmengen wurden über quantitative RealTime PCR gemessen. Der Vergleich der Luciferase-Aktivität und der Transkriptmengen in den entsprechend transfizierten Zellen zeigt, dass die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* im Transkript geringe Proteinbildung verursacht, gleichzeitig die Stabilität des Transkripts aber nicht vermindert. Dies weist darauf hin, dass die 5'UTR translationelle Repression, aber keine Destabilisierung des Transkripts verursacht.

## 4.4 Experimentelle Untersuchung potenziell regulatorischer Elemente der 5'UTR

### 4.4.1 Identifizierung von regulatorischen Elementen in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* durch Datenbank-gestützte Suche nach konservierten Motiven und Struktureigenschaften

Da die 5' untranslatierte Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>* translationelle Repression verursacht, wurde über eine Datenbank-gestützte Sequenzanalyse ermittelt, welche Elemente in der 5'UTR dazu beitragen könnten. Bei der Suche nach *cis*-regulatorischen Motiven unter Verwendung der Datenbanken RegRNA und UTRscan wurden mehrere Elemente vorhergesagt [31][69].

UTRscan und RegRNA identifizierten in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* ein konserviertes *Bruno Response Element* (BRE), das von RNA-bindenden Proteinen der Bruno-

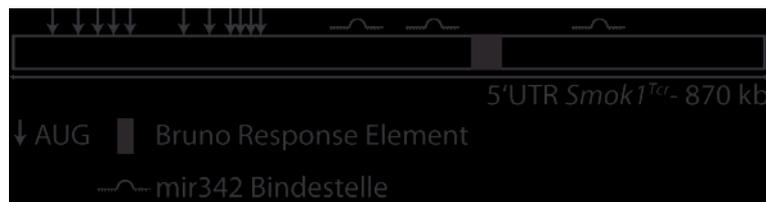
Familie gebunden wird [22]. Dieses Element entspricht der Basenfolge: UUUGUGUGUGUCUGUGUGUU. In murinen und humanen Geweben werden Mitglieder der *Bruno*-Familie exprimiert, einige davon ubiquitär, so dass wahrscheinlich auch Hek293T-Zellen Proteine der Bruno-Familie enthalten [22]. Daher wurde das Hek293T-Zellmodell auch zur Überprüfung der Funktionalität des *Bruno Response Elements* im 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* verwendet.

Translationelle Repression kann auch durch die Bindung von microRNA an Transkripte verursacht werden, was zu subzellulärer Lokalisation der mRNA in zytoplasmatischen Aggregaten, den *P-Bodies*, führt [5]. In der Regel findet microRNA-abhängige translationelle Repression durch konzertierte Bindung der microRNA an mehrere Bindestellen in der Ziel-mRNA statt.

Bei der Datenbankrecherche auf regulatorische Elemente in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* wurden drei potenzielle Bindestellen für die microRNA mir342 vorhergesagt. Diese microRNA ist zwischen Mensch und Maus konserviert und in vielen Geweben exprimiert, unter anderem im Hoden und in der Niere [94]. Da Hek293T-Zellen eine humane Nieren-Zelllinie darstellt, exprimiert diese wahrscheinlich die mir342. Aus diesem Grund wurde dieses Zellmodell zur Überprüfung der Funktion der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* bei der translationellen Repression von Transkripten verwendet.

Das Vorkommen von mehreren AUGs in der 5'UTR von Transkripten, sogenannten *upstream AUGs* (uAUG), führt in der Regel zu ineffizienter Translation der kodierenden Region der mRNA [78][93]. uAUGs in 5' untranslatierten Regionen hemmen den Cap-abhängigen *Scanning*-Mechanismus, indem ein Teil der zur Verfügung stehenden Ribosomen an den uAUGs die Translation beginnen, bevor die kodierende Region des Transkripts erreicht wird [60][9]. Da in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* neun uAUGs vor der eigentlichen kodierenden Region liegen, wurden diese funktionell im Zellkulturmodell überprüft.

Die 5'UTR wurde ebenfalls auf die Ausbildung ausgeprägter Sekundärstrukturen mittels Mfold-Datenbank untersucht, da stark verzweigte Strukturen translationelle Repression verursachen können [97][68][50][67]. Außerdem könnten ausgeprägte Sekundärstrukturen auf interne Ribosomen-Bindestellen (IRES) in der 5'UTR hinweisen, die eine Cap-unabhängige Translation ermöglichen [1][18].



**Abbildung 4.7:** Datenbank-basierte Vorhersage regulatorischer Motive in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>*

#### 4.4.2 Untersuchung des Einflusses von Fragmenten der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* auf die Firefly-Luziferase-Translation

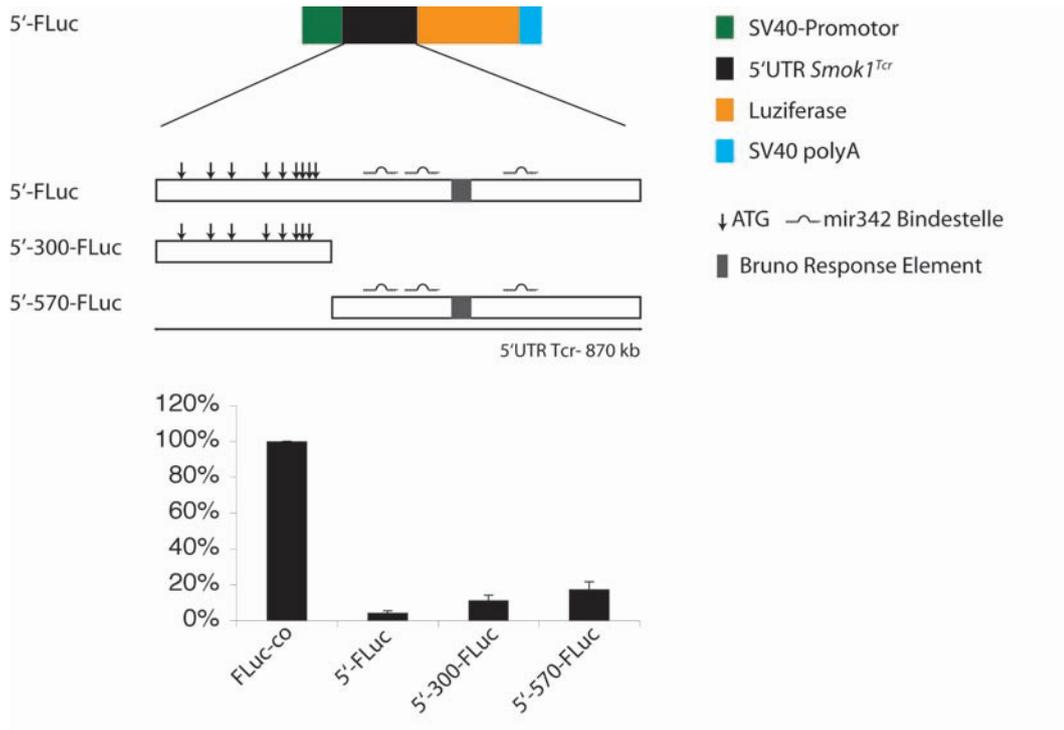
Um zu untersuchen, welche Mechanismen zur translationellen Repression der 5'UTR führen, wurden die ersten (5') 300 bp (5'-300-FLuc) und die letzten (3') 570 bp (5'-570-FLuc) getrennt voneinander in den Luziferasevektor pGL3-Promoter (FLuc-co) kloniert (Abb 4.8). Diese Reporterkonstrukte, sowie 5'-FLuc, wurden in Hek293T-Zellen analysiert. Die normalisierte Luziferase-Aktivität der Zellen, die mit FLuc-co transfiziert wurden, wurde als 100 % Wert definiert.

Sowohl 5'-FLuc- als auch 5'-300-FLuc- und 5'-570-FLuc-transfizierte Zellen weisen eine stark reduzierte Luziferase-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (FLuc-co) auf (Abb. 4.8). Dies zeigt, dass in beiden Teilen der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* Elemente vorhanden sein könnten, die die translationelle Repression verursachen. Allerdings reprimieren weder das 300 bp-Fragment, noch das 570 bp-Fragment einzeln so stark die Translation des Transkripts wie die 5'UTR in voller Länge. Zur Identifizierung der Mechanismen der translationellen Kontrolle wurden potenzielle regulatorische Elemente im 300 bp-bzw. im 570 bp-Fragment der 5'UTR einzeln funktionell untersucht.

#### 4.4.3 Untersuchung der Funktion des *Bruno Response Elements* (BRE) in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* in vitro

Zur Untersuchung, ob ein Mitglied der Bruno-Familie eine Rolle bei der translationellen Kontrolle von *Smok1<sup>Tcr</sup>* spielen könnte, wurde ein Firefly-Luziferase-Reporterkonstrukt kloniert, das das 570 bp-Fragment der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* trägt, dem das BRE aber fehlt (5'-570-B-FLuc). Dieses Reporterkonstrukt wurde in Hek293T-Zellen analysiert (Abb. 4.9). Dabei fiel auf, dass die Luziferase-Aktivität der Zellen, die mit 5'-570-B-FLuc transfiziert wurden, keine signifikanten Unterschiede zur Luziferase-Aktivität in mit 5'-570-FLuc transfizierten Zellen zeigten. Folglich wurde durch das Entfernen

#### 4.4 Experimentelle Untersuchung potenziell regulatorischer Elemente der 5'UTR



**Abbildung 4.8:** Normalisierte Luziferase-Aktivität der Reporter, die einzelne Fragmente der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthalten. Oben: schematische Darstellung der Reporterkonstrukte, die die potenziellen regulatorischen Elemente in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthalten; unten: normalisierte Luziferase-Aktivität. Beide Teile der 5'UTR (5'-300-FLuc und 5'-570-FLuc) führten zu deutlich geringerer Luziferase-Aktivität in den transfizierten Zellen als FLuc-co. Dies weist darauf hin, dass in beiden Teilen der 5'UTR Elemente vorhanden sind, die die translationelle Repression durch die 5'UTR vermitteln.

des BRE aus dem Transkript keine Erhöhung der Translationseffizienz erreicht. Dies bedeutet, dass andere *cis*-regulatorische Elemente für die translationelle Repression durch die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vitro* verantwortlich sind.

#### 4.4.4 Funktionelle Überprüfung der mir342-Bindestellen in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* im Zellkulturmodell

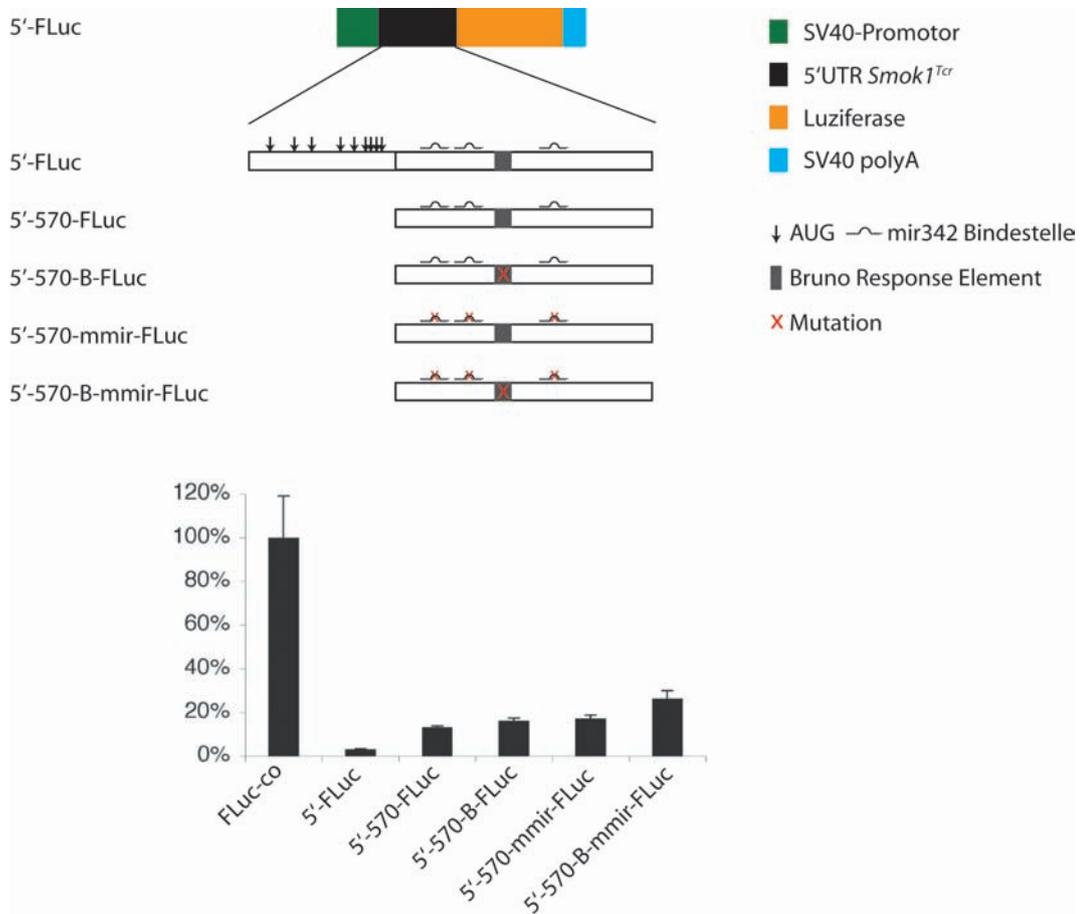
Für die Untersuchung der Funktion der microRNA mir342 bei der translationellen Kontrolle durch die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* wurden die mir342-Bindestellen im 5'-570-FLuc-Reporterkonstrukt mutiert (5'-570-mmir-FLuc). Durch die Einführung von Basen-Fehlpaarungen in der sogenannten *Seed*-Sequenz zwischen der microRNA und ihrer Bindestelle im Transkript wird der translationell reprimierende Effekt geringer oder ganz aufgehoben [75].

Die Transfektion von 5'-570-mmir-FLuc und die anschließende Quantifizierung der Firefly-Luziferase-Aktivität in diesen Zellen zeigt, dass die Mutation der Bindestellen für die mir342 zu keinem signifikanten Anstieg der Firefly-Luziferase-Aktivität führt (Abb. 4.9). Dies bedeutet, dass das Transkript *in vitro* höchstwahrscheinlich nicht durch die Bindung der microRNA mir342 translationell kontrolliert wird.

#### 4.4.5 Untersuchung auf möglichen Synergismus zwischen mir342-Bindestellen und dem BRE

Die Bindung von RNA-Bindeproteinen an untranslatierte Regionen von Transkripten kann dazu führen, dass microRNA-Bindestellen im Transkript für die entsprechende microRNA unzugänglich wird. In Folge dessen wird keine microRNA-induzierte posttranskriptionelle Regulation des entsprechenden Transkripts beobachtet. Dies wurde experimentell anhand der Bindung des RNA-Bindeproteins Dnd1 an seine Zieltranskripte gezeigt [37]. Da eine Wechselwirkung zwischen RNA-Bindeproteinen und microRNA prinzipiell möglich ist, wurde untersucht, ob die translationelle Kontrolle des Transkripts durch die Interaktion zwischen Bruno-Proteinen und mir342 zustande kommt.

Dazu wurde aus einem Firefly-Luziferase-Reporterkonstrukt, welches das 570 bp-Fragment der 5'UTR enthält (5'-570-FLuc), sowohl das BRE entfernt, als auch die mir342-Bindestellen mutiert (5'-570-B-mmir-FLuc). Nach dessen Transfektion in Zellen war ein leichter Anstieg der Firefly-Luziferase-Aktivität zu beobachten, im Vergleich zur Aktivität in mit 5'-570-B-FLuc, 5'-570-mmir-FLuc oder 5'-570-FLuc trans-



**Abbildung 4.9:** Normalisierte Luciferase-Aktivität der Reporter, die modifizierte 570 bp-Fragmente von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthielten. Oben: schematische Darstellung der Luciferase-Reporterkonstrukte; unten: normalisierte Luciferase-Aktivität. Weder das Entfernen der potenziellen Bruno-Bindestelle (5'-570-B-FLuc), noch die Mutation der potenziellen mir342-Bindestellen im 570 bp-Fragment der 5'UTR (5'-570-mmir-FLuc) führten zu signifikanter erhöhter Luciferase-Aktivität. Die Transfektion eines Konstrukts, das weder die Bindestelle für das BRE, noch die für die mir342 enthält (5'-570-B-mmir-FLuc), führte in den entsprechend transfizierten Zellen zu einer Erhöhung der Luciferase-Aktivität, die jedoch im Vergleich zu der in den Kontrollzellen (FLuc-co) immer noch stark erniedrigt war. Möglicherweise liegt der translationellen Repression ein synergistischer Effekt mehrerer *cis*-regulatorischer Elemente in der 5'UTR zugrunde, der sich durch die Bindung der mir342 und Bruno-Proteine nicht erklären lässt.

fizierten Zellen (Abb. 4.9). Dennoch betrug die Repression noch etwa 80 %. Dies weist auf andere Kontrollelemente in dem 570 bp-Teil der 5'UTR hin, die möglicherweise additiv auf die translationelle Repression des Transkripts wirken.

#### 4.4.6 Funktionelle Überprüfung der uAUGs in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>*

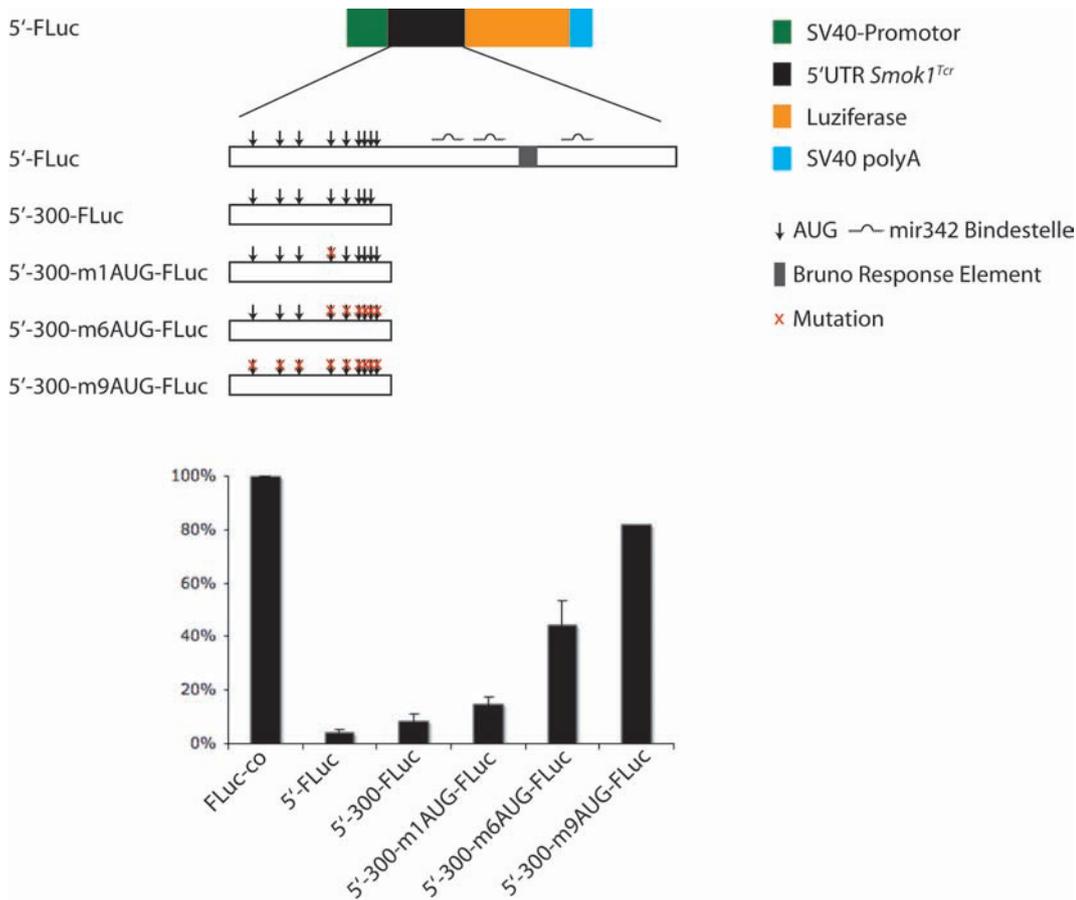
Im 300 bp Fragment der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* wurde eine Anhäufung von 9 uAUGs identifiziert. Darunter befindet sich auch ein uAUG mit einer optimalen Kozak-Sequenz. Diese Konsensus-Sequenz verursacht gewöhnlich den Start der Translation [52]. Daher wurde die Rolle dieser uAUGs bei der translationellen Repression experimentell anhand von Firefly-Luziferase-Reporterkonstrukten untersucht, in denen uAUGs mutiert sind.

Zunächst wurde das uAUG im 300 bp-Element der 5'UTR (5'-300-FLuc) mit einer optimalen Kozak-Sequenz zu einem ACG Kodon mutiert (5'-300-m1AUG-FLuc). Die Einführung dieser Mutation und Transfektion dieses Reporters in Hek293T-Zellen führte zu einer Verdopplung der Firefly-Luziferase-Aktivität im Vergleich zu der in mit 5'-300-FLuc transfizierten Zellen (Abb. 4.10).

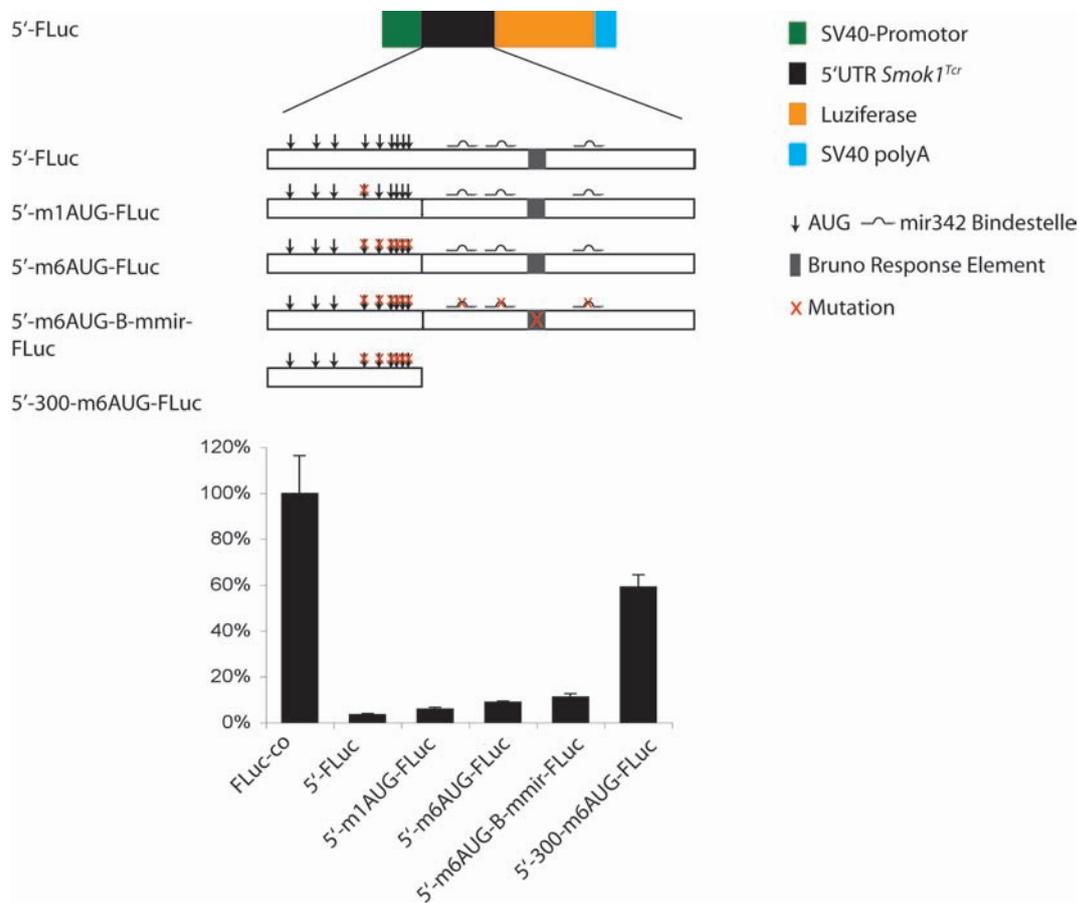
Daraufhin wurden in diesem Reporterkonstrukt 5 weitere der insgesamt 9 uAUGs zu Kodons mutiert, die keinen Translationsstart verursachen (5'-300-m6AUG-FLuc). In den mit 5'-300-m6AUG-FLuc transfizierten Zellen wurde eine etwa 5-fach erhöhte Luziferase-Aktivität im Vergleich zu der in mit 5'-300-m1AUG-FLuc transfizierten Zellen gemessen. Der Effekt der translationellen Repression durch die drei übrigen uAUGs in diesem Teil der 5'UTR betrug folglich nur noch ca. 50 % (Abb. 4.10).

Anschließend wurden aus dem 5'-300-m6AUG-FLuc-Reporterkonstrukt alle übrigen uAUGs entfernt (5'-300-m9AUG-FLuc). Nach der Transfektion dieses Konstrukts in die Hek293T-Zellen wurden in diesen etwa 80 % der Firefly-Luziferase-Aktivität im Vergleich zu der in Kontrollzellen (FLuc-co) gemessen (Abb. 4.10). Der repressive Effekt wurde durch die Mutationen der AUGs im 300 bp-Fragment zum großen Teil aufgehoben. Dies zeigt, dass die uAUGs additiv zur translationellen Repression dieses Teils der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* beitragen.

Um zu untersuchen, ob es für eine effiziente Translation des Transkripts hinreichend ist, uAUGs aus der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* zu entfernen, wurde ein entsprechendes Firefly-Luziferase-Reporterkonstrukt analysiert (5'-m1AUG-FLuc). Dieses enthält die 5'UTR in voller Länge, jedoch nicht das uAUG mit der optimalen Kozak-Sequenz. Das Konstrukt wurde generiert, indem das 570 bp-Fragment der 5'UTR in



**Abbildung 4.10:** Normalisierte Luziferase-Aktivität der Luziferase-Reporter, die 300 bp-Fragmente der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* mit mutierten uAUGs enthalten. Oben: schematische Darstellung der Luziferase-Reporterkonstrukte, unten: normalisierte Luziferase-Aktivität. Die Mutation der uAUGs im 300 bp-Fragment führte zur Erhöhung der Luziferase-Aktivität in den entsprechend transfizierten Zellen. Dies weist auf additive Effekte der uAUGs auf die translationelle Regulation der mRNA hin.



**Abbildung 4.11:** Normalisierte Luziferase-Aktivität der Volle-Länge-5'UTR-Reporter, die mutierte uAUGs enthalten. Oben: schematische Darstellung der Elemente der 5'UTR von *Smok1*<sup>Tcr</sup>, die im Firefly-Luziferase-Reporterkonstrukt modifiziert wurden; unten: normalisierte Luziferase-Aktivität. Die Transfektion eines Luziferase-Reporterkonstrukts, das die 5'UTR in voller Länge, jedoch mit 6 mutierten uAUGs enthält, führte nicht zu signifikant erhöhter Luziferase-Aktivität in den Zellen (5'-m6AUG-FLuc). Die Transfektion von 5'-300-m6AUG-FLuc, dem Luziferase-Reporterkonstrukt, dem der 570 bp-Teil der 5'UTR fehlt, wies dagegen etwa die Hälfte der Aktivität der Kontrollzellen auf (FLuc-co). Auch die zusätzliche Entfernung der potenziellen Bruno- und mir342-Bindestellen aus dem Transkript erhöhten die Luziferase-Aktivität in entsprechenden Zellen nicht deutlich (5'-m6AUG-B-mmir-FLuc).

das Reporterkonstrukt 5'-300-m1AUG-FLuc kloniert wurde. Bei der Quantifizierung der Firefly-Luziferase-Aktivität nach der Transfektion dieses Konstrukts in die Zellen wurde deutlich, dass die translationelle Repression des Transkripts ebenso stark ist wie die, welche durch das intakte Volle-Länge 5'-FLuc-Reporterkonstrukt verursacht wird (Abb. 4.11).

Im Luziferase-Reporterkonstrukt 5'-m1AUG-FLuc wurden durch Mutagenese weitere 5 uAUGs entfernt, so dass lediglich 3 der 9 uAUGs vorhanden sind (5'-m6AUG-FLuc). Zellen, die mit diesem Konstrukt transfiziert wurden, wiesen ebenfalls eine geringe Luziferase-Aktivität auf (Abb. 4.11). Zellen, die mit 5'-300-m6AUG-FLuc transfiziert wurden, zeigten dagegen eine Luziferase-Aktivität, die etwa die Hälfte des Kontrollwert (FLuc-co) betrug (Abb. 4.11).

Offensichtlich sind, zusätzlich zu den uAUGs, weitere *cis*-regulatorische Elemente in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* vorhanden, die die translationelle Repression von Transkripten regulieren.

Um zu überprüfen, ob die Translation von Transkripten, die die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthalten, dadurch reprimiert wird, dass die uAUGs, das BRE und die mir342-Bindestellen synergistisch wirken, wurde ein 5'UTR-Reporterkonstrukt kloniert, in dem 6 der 9 uAUGs, sowie die mir342-Bindestellen mutiert und aus dem das BRE entfernt wurden (5'-m6AUG-B-mmir-FLuc). Zellen, die mit diesem Reporterkonstrukt transfiziert wurden, wiesen ebenfalls nur etwa ein Zehntel der Luziferase-Aktivität der Kontrollzellen (FLuc-co) auf. Dies zeigt, dass andere *cis*-regulatorische Elemente als die uAUGs, das BRE und die mir342-Bindestellen die translationelle Repression von Transkripten verursacht, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

#### 4.4.7 Ein Teil der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* weist eine stark verzweigte Sekundärstruktur auf

Bei der Vorhersage der mRNA-Struktur der 870 Basen der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* mittels Mfold-Datenbank wurden Vorschläge für mögliche mRNA-Strukturen auf Basis der Berechnung der energetisch günstigsten RNA-Faltung erstellt [97].

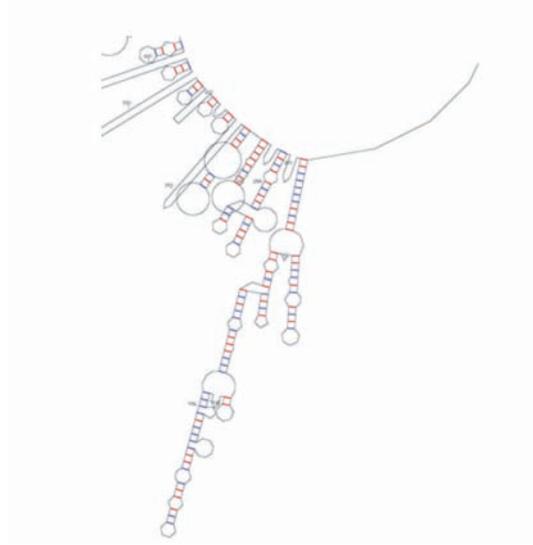
Die Strukturvorschläge bei der *in silico*-Analyse wiesen vor allem in einem Drittel, am 5' Teil der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>*, eine übereinstimmende Struktur in Form einer langen fingerförmigen Verzweigung auf (Abb. 4.12). Möglicherweise könnte diese die Translation beeinflussen, indem sie das *Scanning* des Transkripts durch Ribosomen

erschwert. Dieser Prozeß benötigt die RNA-Helikase eIF4A als Kofaktor, deren Aktivität im Hoden durch BC1-RNA reguliert wird [59][73].

Expression von BC1-RNA führt dabei durch ihre Bindung an die RNA-Helikase zur Inhibition der Enzymfunktion und verhindert das Entwinden der verzweigten Struktur [92], was translationelle Repression des Transkripts verursacht. Experimentell wurde die Rolle der RNA-Helikase eIF4A bei der posttranskriptionellen Regulation von *Smok1<sup>Tcr</sup>* jedoch nicht weiter untersucht.

Die stark verzweigte Struktur könnte allerdings auch auf eine interne Ribosomen Bindestelle

(*Internal Ribosome Entry Site, IRES*) hinweisen, die Ribosomen direkt binden kann und damit eine Cap-unabhängige Translation ermöglicht. Die Vorhersage einer *IRES* über die Sequenz oder die Struktur des Transkripts ist jedoch unpräzise, da die Bindung von Ribosomen an eine *IRES* von der RNA-Struktur abhängig ist, die *in silico* nicht exakt vorhersagbar ist. Eine funktionelle Überprüfung der Struktur der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* auf die *IRES*-Funktion wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

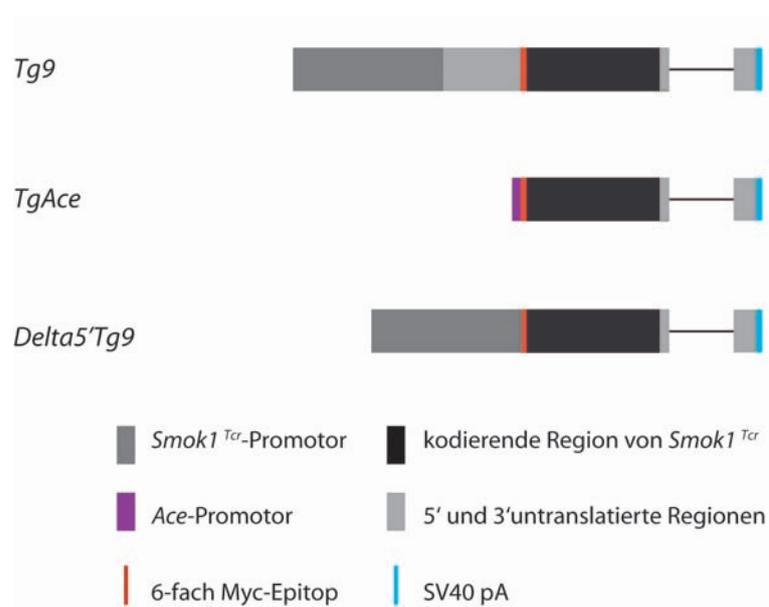


**Abbildung 4.12:** Mögliche Sekundärstruktur im 5'-Teil der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>*

## 4.5 Die Rolle der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* in vivo

### 4.5.1 Charakterisierung *TgAce*-transgener Linien

Zur Charakterisierung der Funktion der 5'UTR bei der posttranskriptionellen Regulation von *Smok1<sup>Tcr</sup>* in vivo, wurde ein Transgen-Konstrukt, *TgAce*, kloniert, in welchem der Promotor und die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* in *Tg9* gegen den 91bp langen Hoden-spezifischen Promotor für das Angiotensin-konvertierende Enzym (Ace)

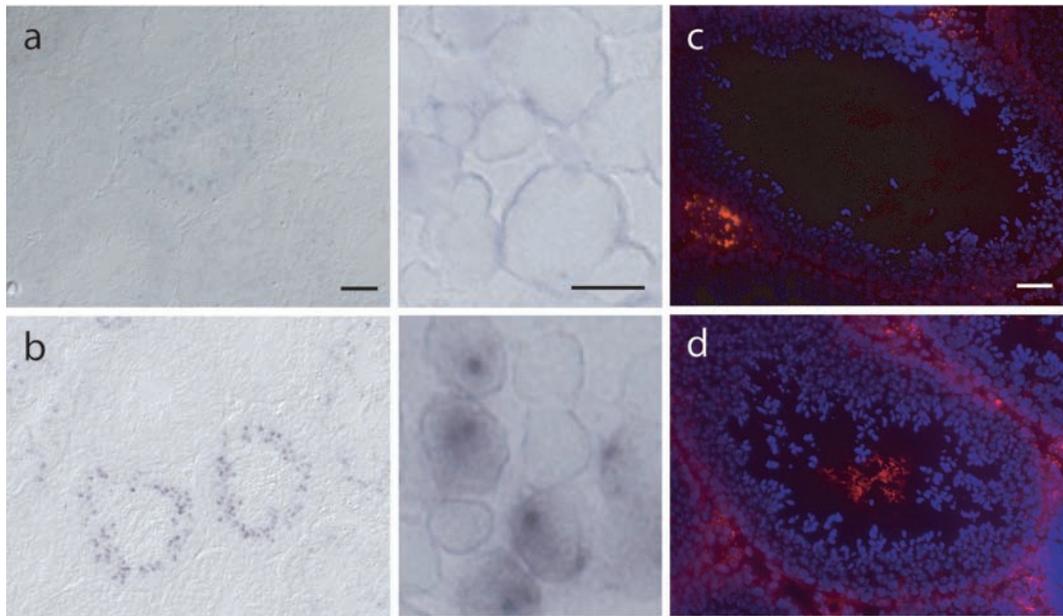


**Abbildung 4.13:** Schematische Darstellung der Transgen-Konstrukte für die Untersuchung der Funktion der 5'UTR von *Smok1*<sup>Tcr</sup> *in vivo*. In *TgAce* wurde der *Smok1*<sup>Tcr</sup>-Promotor und die 5'UTR von *Smok1*<sup>Tcr</sup> in *Tg9* durch den *Ace*-Promotor ersetzt. Im Transgen-Konstrukt *Delta 5'tg9* wurde die 5'UTR, die im *Tg9*-Transkript vorhanden ist, entfernt.

ausgetauscht wurden (Abb. 4.13). Der Promotor wird vor allem in haploiden runden Spermatiden aktiviert und wurde daher zur Expression des Transgens verwendet [30]. Dieses Konstrukt diente zur Generierung von transgenen Linien. Diese wurden auf Lokalisation des Transkripts im Hoden untersucht.

Zu diesem Zweck wurde zunächst auf Schnitten von *TgAce/0*-Hoden eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Dafür wurde eine RNA-Sonde gegen das Myc-Epitop zur Detektion des Transkripts verwendet (Abb. 4.14). Mit dieser Methode konnte das Transkript jedoch nur im Hoden von einer der vier transgenen Linien dargestellt werden (*TgNVAce-1151*). Obwohl dieses Tier hemizygot für das Transgen *TgAce* war, wurde das Transkript, im Gegensatz zum *Tg9*-Transkript, in allen runden Spermatiden detektiert, was wahrscheinlich auf dessen Expression in diploiden Spermatozyten zurückzuführen ist. Auch wenn der *Ace*-Promotor erst in haploiden Zellen aktiviert werden sollte, verursachte dieser hier wahrscheinlich ektopische Transkriptexpression in Spermatozyten [30].

Außerdem wurde das *TgAce*-Transkript unter Aussparung der Zellkerne gleichmäßig auf das Zytoplasma der runden Spermatiden verteilt. Das *Tg9*-Transkript ist dagegen in aggregatförmigen Strukturen im Zytoplasma und im Zellkern von runden



**Abbildung 4.14:** Vergleich der Lokalisation von *TgAce*- und *Tg9*-Transkripten und deren posttranskriptionelle Regulation im Hoden hemizygoter Männchen. *In situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen das Myc-Epitop wurde zur Darstellung des *TgAce*- und des *Tg9*-Transkripts verwendet (links). a: *TgAce/0* Hoden; b: *Tg9/0* Hoden. Balken links: 50 µm; Balken mitte: 5 µm. Die *in situ* Hybridisierung zur Darstellung des *TgAce*-Transkripts zeigte gleichmäßige zytoplasmatische Färbung von Spermatozyten (a: mitte; große Zellen am rechten Bildrand) und runden Spermatiden (a: mitte; kleinere Zellen am linken Bildrand) und keine Transkriptsignale im Kern. *Tg9*-Transkripte wurden dagegen in ungefähr der Hälfte der runden Spermatiden in zytoplasmatischen und nukleären Aggregaten detektiert. C: Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop in *TgAce/0*-Hoden; d: Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop in *Tg9/0*-Hoden; blau: Kernfärbung (DAPI); rot: Myc-*Smok1*<sup>Tcr</sup>. Obwohl beide Transgene Myc-*Smok1*<sup>Tcr</sup> kodierten, wurden nur in *Tg9/0*-Hoden deutliche Fluoreszenzsignale innerhalb der Hodenkanälchen detektiert. Auf *TgAce/0*-Hoden war die Färbung dagegen nur äußerst schwach erkennbar. Die Fluoreszenz in c am unteren linken Bildrand lag außerhalb des Hodenkanälchens und konnte mit einem Blutgefäß kolokalisiert werden, was auf Autofluoreszenz von Blut hinwies und daher nicht als Immunfluoreszenzsignal gewertet wurde. Offenbar wurde in *TgAce/0*-Männchen aufgrund des Fehlens der 5'UTR im Transkript kaum Myc-*Smok1*<sup>Tcr</sup> im Hoden gebildet.

Spermatiden lokalisiert. Das Fehlen der 5'UTR führt folglich zu einer veränderten subzellulären Lokalisation des Transkripts.

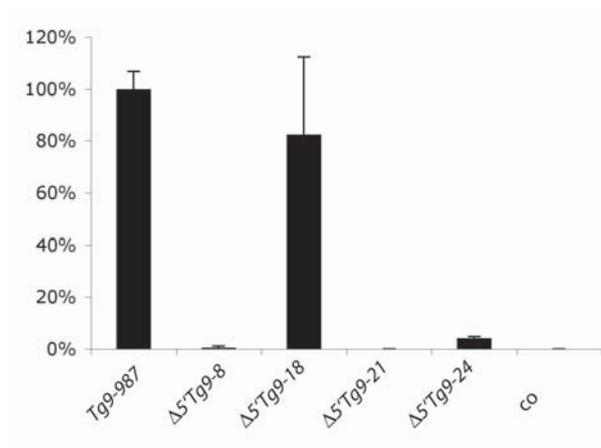
Über die Immunfluoreszenzfärbung, die zum Nachweis von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein etabliert wurde, konnten nur im Hoden von *TgAce/0*-Männchen der Linie *TgNVAce-1151* äußerst schwache Fluoreszenzsignale im Lumen der Hodenkanälchen dargestellt werden. Die anderen drei Linien wiesen dagegen keine Fluoreszenz auf. Das Fehlen der 5'UTR von *Smok1*<sup>Tcr</sup> scheint daher auch die Translation oder die Stabilität des Transkripts zu verringern. Möglicherweise wird der Ace-Promotor aufgrund seiner kurzen Sequenz transkriptionell inaktiviert. Andererseits könnte das Fehlen der 5'UTR *Smok1*<sup>Tcr</sup> im Transkript auch eine Transkript-Instabilität oder verringerte Transkription bewirken.

#### 4.5.2 Charakterisierung der transgenen Linien *delta 5'Tg9*

Um auszuschließen, dass die fehlende Expression des *TgAce*-Transgens in drei der vier Linien durch die transkriptionelle Inaktivierung des kurzen Hoden-spezifischen *Ace*-Promotors verursacht wurde, wurde ein weiteres Transgen-Konstrukt, *delta5'Tg9*, analysiert, das den *Smok1*<sup>Tcr</sup>-Promotor enthält (Abb. 4.13). Dieses Transgen wurde kloniert, indem die 5'UTR von *Smok1*<sup>Tcr</sup> aus dem Transgen-Konstrukt *Tg9* entfernt wurde. Durch Vorkerninjektion wurden vier unterschiedliche transgene *delta5'Tg9*-Linien (*delta5'Tg9-8*, *-18*, *-21*, *-24*) generiert.

Zunächst wurde die Expression des Transkripts im Hoden von *delta5'Tg9/0*-Männchen der vier transgenen Linien über die *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde gegen das Myc-Epitop untersucht (ohne Abbildung). Da sich auf diese Weise kein *delta5'Tg9*-Transkript darstellen ließ, wurde die Expression des Transkripts im Hoden durch eine sensitive Methode, der quantitativen RealTime PCR, überprüft (Abb. 4.15). Von den vier Linien wurde lediglich in einer Linie, *delta5'Tg9-18*, größere Mengen Transkript gemessen. Im Hoden der anderen drei Linien wurde dagegen wenig oder kein Transkript detektiert.

Über die Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein konnte dieses in keiner der vier transgenen Linien dargestellt werden. Obwohl in der Linie *delta 5'Tg9-18* über quantitative RealTime PCR Transkriptexpression im Hoden nachgewiesen wurde, wurde kein Immunfluoreszenzsignal beobachtet. Möglicherweise führt das Fehlen der 5'UTR zur Destabilisierung des Transkripts, das infolge dessen vor Beginn der Translation degradiert wird. Dies könnte erklären, weshalb in kei-



**Abbildung 4.15:** Transkriptexpression im Hoden der *delta5'Tg9*- und *Tg9*- Linien (quantitative RealTime PCR-Analyse).  $\Delta 5'Tg9 = delta5'Tg9$ ; co entspricht der Transkriptmessung im Hoden eines BTBR/TF-Wildtyp-Männchens. Die *Tg9*-Transkriptexpression im Hoden des *Tg9/0*-Männchens der Linie *Tg9-987* wurde als 100 %-Wert definiert. Die Messung von *Tg9*- und von *delta5'Tg9*-Transkript erfolgte unter Verwendung desselben Primerpaars. Die Linie *delta5'Tg9-18* exprimierte als einzige der vier transgenen Linien deutliche Transkriptmengen, die mit der im Hoden der *Tg9-987*-Männchen vergleichbar war.

ner der transgenen Linien Myc-*Smok1*<sup>Tcr</sup> und in nur einer dieser Linien Transkript nachgewiesen werden konnte.

## Kapitel 5

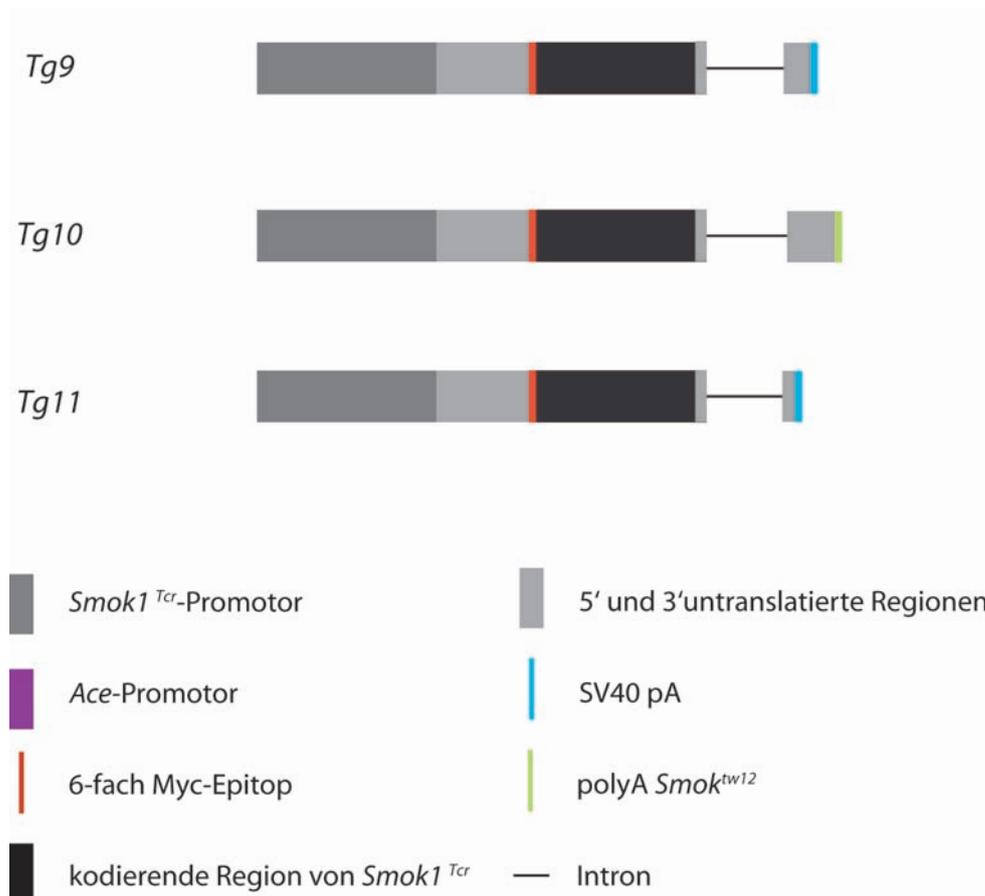
# Ergebnisse (3)- Charakterisierung der Funktion der 3'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vivo*

Betrachtet man die Genstruktur des *Responder*-Gens *Smok1<sup>Tcr</sup>*, so wird deutlich, dass dieses die ersten beiden Exons, nicht aber das dritte Exon besitzt, das die Familie der *Smok*-Gene, soweit bekannt, aufweist. Statt dessen enthält *Smok1<sup>Tcr</sup>* 15 Exons des *Rsk3*-Gens, die im *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript zur 3' untranslatierten Region beitragen. Wildtyp-*Smok*-Transkripte enthalten normalerweise eine 3'UTR, von der 47 Basen in Exon 2 und 290 Basen in Exon 3 der *Smok*-Gene liegen. Im Gegensatz zu diesen wurde das Exon 3 in *Smok1<sup>Tcr</sup>* durch die Exons von *Rsk3* ersetzt. Daher wurde untersucht, welche Bedeutung das Fehlen der *Smok*-spezifischen 3'UTR im *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript für dessen Lokalisation und Translation, und somit für dessen Funktion als *Responder* besitzt.

### 5.1 Transkriptlokalisierung der *Smok1<sup>Tcr</sup>*-kodierenden Transgene *Tg10* und *Tg11* im Hoden

#### 5.1.1 *Tg10* und *Tg11* enthalten unterschiedliche 3'UTR-Sequenzen

Zur Untersuchung, ob Elemente der 3' untranslatierten Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>* Einfluß auf die *Responder*-Funktion haben, wurden die Transgen-Konstrukte, *Tg10* und *Tg11*, verwendet (Abb. 5.1). Wie *Tg9*, enthalten diese die kodierende Region, sowie die 5'UTR, den Promotor von *Smok1<sup>Tcr</sup>* und das 6-fach Myc-Epitop zur spezifischen Darstellung der Genprodukte. Bei der Charakterisierung hemizygot transgener *Tg9*-Männchen wurde bereits gezeigt, dass dieses Epitop die *Responder*-Funktion nicht stört (persönliche Mitteilung Bernhard G. Herrmann). *Tg9*-, *Tg10*- und *Tg11* weisen unterschiedlich lange 3' UTRs auf. *Tg10* enthält die vollständige 3'UTR von 290



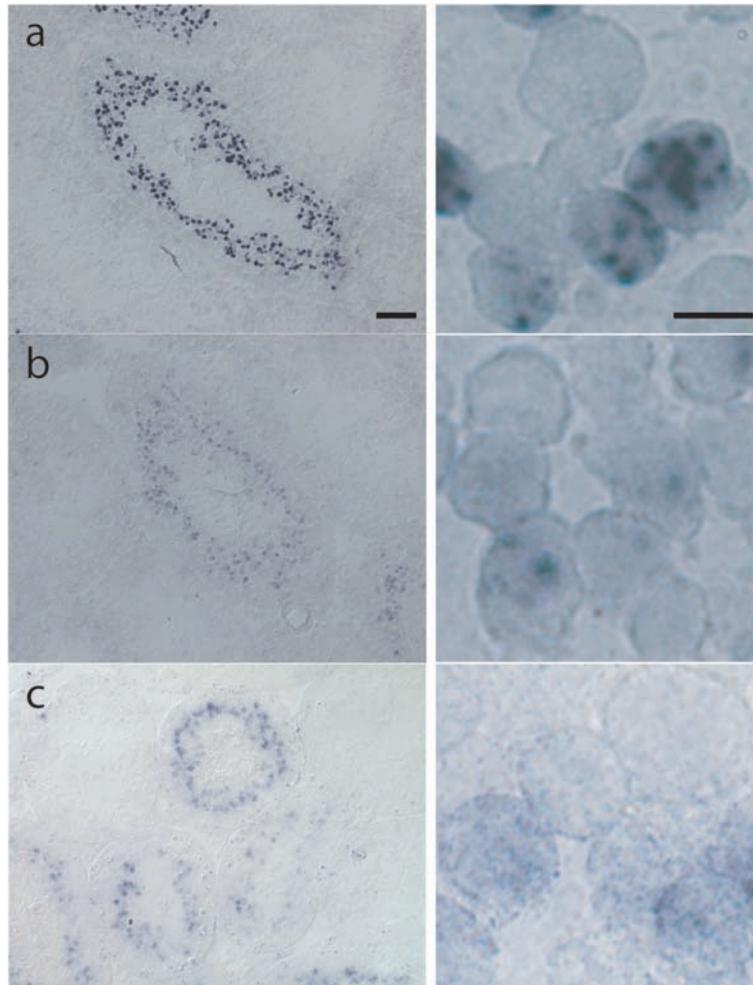
**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung der Transgen-Konstrukte *Tg9*, *Tg10* und *Tg11*, die alle die kodierende Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthalten. Diese unterscheiden sich lediglich in ihren 3' UTR- und Polyadenylierungssequenzen. *Tg9* enthält 141 Basen der 3'UTR des *t*-Haplotyp-spezifischen *Smok<sup>tw12</sup>*-Transkripts. *Tg10* dagegen trägt die vollständige 3'UTR-Sequenz, die in Exon 3 von *Smok<sup>tw12</sup>* enthalten ist, während in *Tg11* bis auf 46 Basen dieser Teil der 3'UTR fehlt. *Tg9* und *Tg11* tragen eine virale SV40-Polyadenylierungssequenz, *Tg10* dagegen die Polyadenylierungssequenz von *Smok<sup>tw12</sup>*, die in dessen Exon 3 ebenfalls enthalten ist. Alle drei Transgen-Konstrukte enthalten ein 6-fach Myc-Epitop zur spezifischen Darstellung von Transkript und des Protein.

Basen Länge, die in Exon 3 der *t*-Haplotyp-spezifischen aktiven Kinase *Smok<sup>tw12</sup>* kodiert ist. Diese entspricht im *t*-Haplotyp funktionell höchstwahrscheinlich *Smok1* in Wildtyp-Tieren. In *Tg11* fehlt dieser Teil der 3'UTR der *Smok<sup>tw12</sup>* bis auf 46 Basen. *Tg9* dagegen trägt etwa die Hälfte dieser 3'UTR-Sequenz. Während *Tg10* die endogene Polyadenylierungssequenz der *Smok<sup>tw12</sup>* besitzt, tragen *Tg9* und *Tg11* virale SV40 Polyadenylierungssequenzen (Abb 5.1). Von *Tg10* und *Tg11* wurden jeweils drei transgene Linien mit unabhängigen genomischen Integrationen des Transgens generiert, die mittels *in situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert wurden (*Tg10-1016*, *-1015*, *-996* beziehungsweise *Tg11-1020*, *-1066*, *-1069*). Von diesen wurde jeweils eine repräsentative Linie mit stabiler Transkript- und Proteinlokalisierung durch Vererbungstests hemizygoter Männchen auf *Responder*-Funktion untersucht. Für *Tg11* war dies die Linie *Tg11-1020* und für *Tg10* die Linie *Tg10-1016*. Deren Effekt auf die Transmissionsrate wurde mit der von *Tg9* in der Linie *Tg9-987* verglichen.

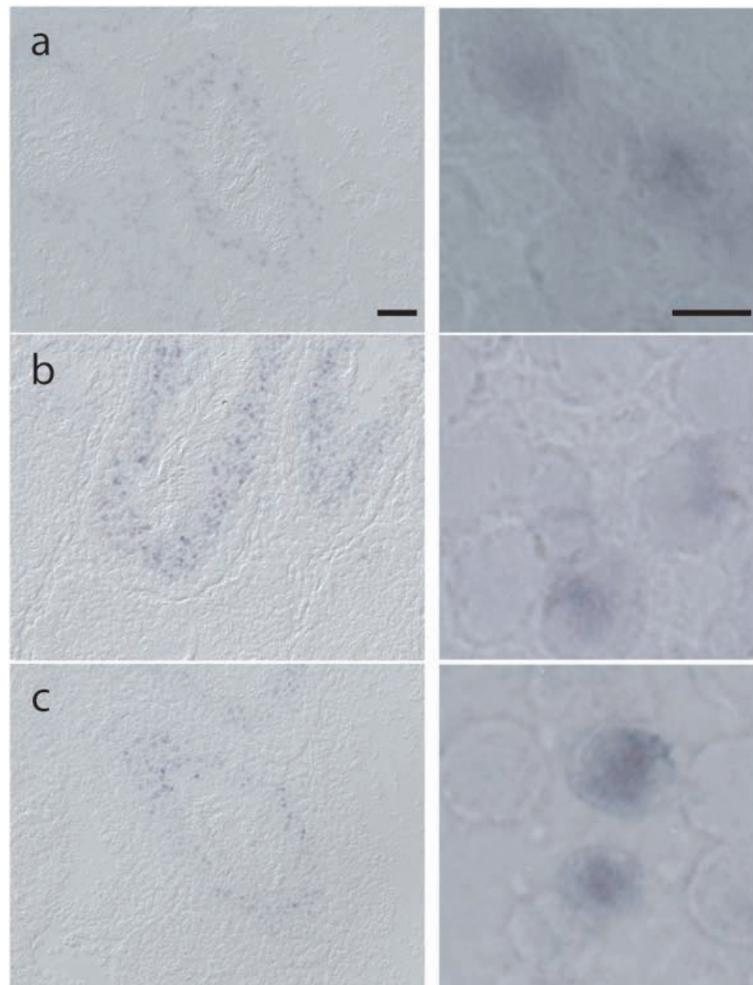
### 5.1.2 Transkriptlokalisierung von *Tg10* und *Tg11* im Hoden

Zunächst wurden die drei *Tg10*- und die drei *Tg11*-Linien mittels *in situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen die Sequenz des Myc-Epitops auf die Expression des Transkripts im Hoden untersucht. Wie in *Tg9/0*-Tieren, wurden dabei Signale in runden Spermatischen detektiert (Abb. 5.2 und 5.3 links). Frühere Entwicklungsstadien der Spermatogenese, die in den äußeren Bereichen der Kanälchen lokalisiert sind, wiesen keine Färbung auf.

Dies zeigt, dass der *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Promotor, der in *Tg10* und *Tg11* enthalten ist, in haploiden runden Spermatischen aktiviert wird. *Tg10* und *Tg11* zeigen, wie *Smok1* und *Smok1<sup>Tcr</sup>*, folglich postmeiotische Expression des Transkripts. Wie im *Tg9/0*-Hoden, wurden die *Tg10*- und *Tg11*-Transkripte in lediglich etwa der Hälfte der Population von haploiden runden Spermatischen in *Tg10/0*- und *Tg11/0*-Männchen nachgewiesen. Dies bedeutet, dass *Tg10*- und *Tg11*-Transkripte in runden Spermatischen zellulärer Restriktion unterliegen. Nukleäre und perinukleäre Aggregate der *Tg10*- und *Tg11*-Transkripte in runden Spermatischen deuten zudem auf die Bildung von Ribonukleoproteinpartikeln hin, die ein Hinweis auf translationelle Kontrolle der *Smok1<sup>Tcr</sup>*-kodierenden Transkripte darstellen könnten (Abb. 5.2 und 5.3 rechts). In elongierten Spermatischen war durch die *in situ* Hybridisierungen jedoch kein spezifisches Transkript detektierbar. Außerdem zeigten nicht alle Hodenkanälchen in den



**Abbildung 5.2:** Lokalisation von *Tg10*-Transkript im Hoden von *Tg10/0*-Männchen. Zum Nachweis von *Tg10* diente *in situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen die Sequenz des Myc-Epitops im Hoden von drei unabhängigen transgenen *Tg10*-Linien. Links: Querschnitte durch Hodenkanälchen; Vergrößerung aller Fotos links sind identisch; Balken 50  $\mu\text{m}$ . Rechts: Gruppe runder Spermatiden; Balken 5  $\mu\text{m}$ ; a: *Tg10-1016*; b: *Tg10-1015*, c: *Tg10-996*. Bei der *in situ* Hybridisierung zur Darstellung des *Tg10*-Transkripts im Hoden von *Tg10/0*-Männchen wurden lediglich etwa die Hälfte aller runden Spermatiden innerhalb eines Hodenkanälchens gefärbt. Die äußeren Bereiche der Hodenkanälchen, in dem frühe prämeiotische Entwicklungsstadien der Spermatogonien und Spermatozyten lokalisiert sind, zeigen keine Expression der *Tg10*-Transkripte.



**Abbildung 5.3:** Lokalisation von *Tg11*-Transkript in *Tg11/0*-Hoden. Zum Nachweis des *Tg11*-Transkripts wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer Sonde gegen die Sequenz des Myc-Epitops durchgeführt. Links: Querschnitte durch Hodenkanälchen; Vergrößerung aller Fotos links sind identisch; Balken 50  $\mu\text{m}$ . Rechts: Gruppe runder Spermatozyten; Balken 5  $\mu\text{m}$ ; a: *Tg11-1066*; b: *Tg11-1069*, c: *Tg11-1020*. Die *in situ* Hybridisierung zeigt, dass etwa die Hälfte aller runden Spermatozyten innerhalb eines Hodenkanälchens *Tg11*-Transkripte enthalten. Die äußeren Bereiche, in denen frühe prämeiotische Entwicklungsstadien der Spermatozyten und Spermatozyten lokalisiert sind, sowie die luminalen Bereiche, die elongierte Spermatozyten enthalten, weisen dagegen keine Expression der *Tg11*-Transkripte auf.

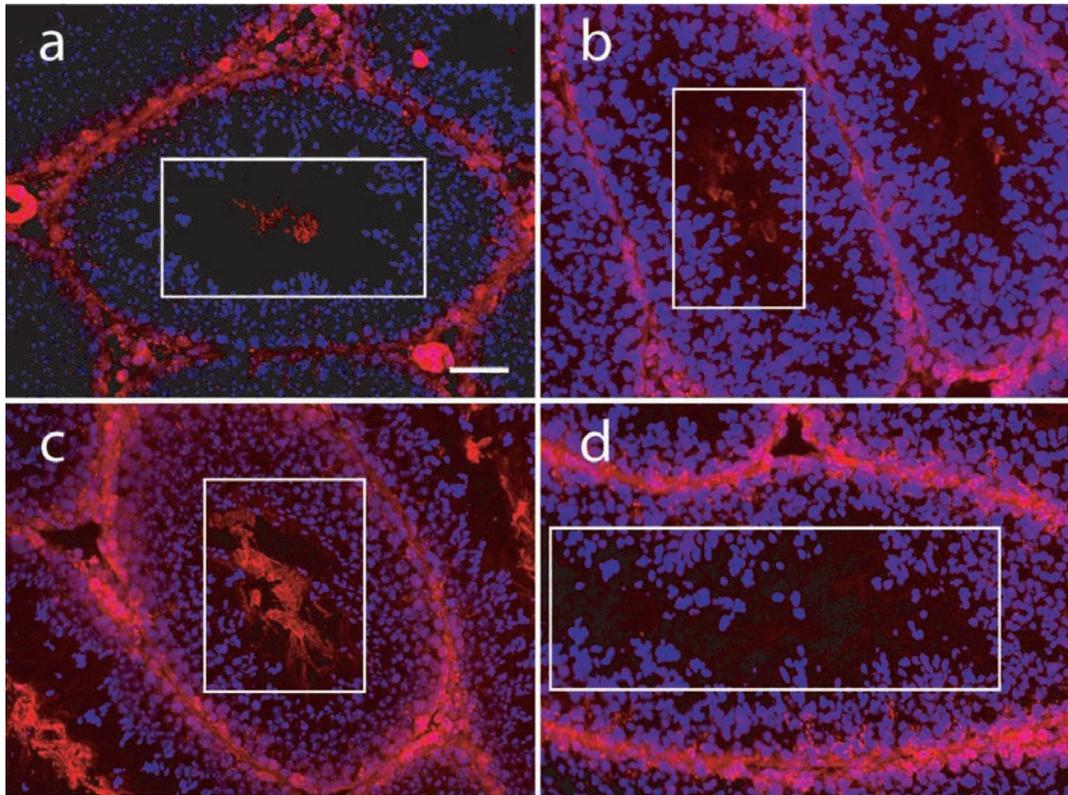
Hoden-Querschnitten Färbung, da verschiedene Querschnitte unterschiedliche Entwicklungsstadien der Spermatozyten und Spermatischen enthalten und lediglich runde Spermatischen *Tg9*, *Tg10* und *Tg11*-Transkripte exprimieren.

Die Lokalisation der Transkripte im Hoden entsprechender hemizgot-transgener Tiere weist darauf hin, dass die Transgene *Tg10* und *Tg11*, trotz ihrer Unterschiede im 3' Teil der Sequenz, als *Responder* wirken könnten.

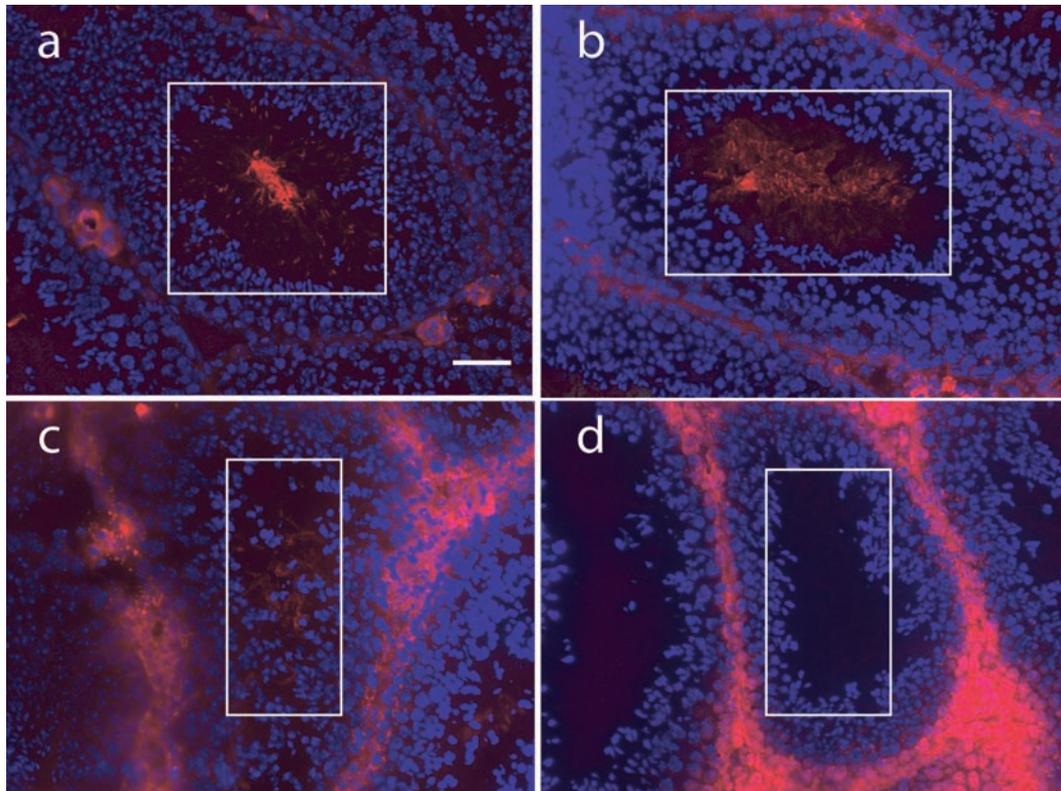
## 5.2 Lokalisation des Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Proteins im Hoden von *Tg10/0*- und *Tg11/0*-Tieren

### 5.2.1 Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein wurde in den Flagellen elongierter Spermatischen im Hoden von *Tg10/0*- und *Tg11/0*-Tieren detektiert

Um den Zeitpunkt der Translation der *Tg10*- und *Tg11*-Transkripte bei der Spermatogenese zu ermitteln, wurde Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>, das durch *Tg10* und *Tg11* kodiert wird, durchgeführt. Dazu wurden Schnitte des Hodens von *Tg10/0*- und *Tg11/0*-Männchen der jeweils drei transgenen Linien verwendet. Dieses Experiment zeigt, dass Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>, wie in *Tg9/0*-Männchen, in Flagellen elongierter Spermatischen im *Lumen* der Hodenkanälchen lokalisiert wird. Die Tatsache, dass das jeweilige Transkript in runden Spermatischen, das entsprechende Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein jedoch erst in elongierten Spermatischen lokalisiert werden konnte, weist darauf hin, dass alle drei Transgene offenbar posttranskriptionell regulatorischen Mechanismen unterliegen. Die Eigenschaften der Transgene *Tg9*, *Tg10* und *Tg11* bei der Spermatogenese unterscheiden sich qualitativ nicht voneinander. Da für *Tg9* bereits gezeigt wurde, dass dieses *Responder*-Funktion besitzt, liegt die Vermutung nahe, dass *Tg10* und *Tg11* ebenfalls als *Responder* wirken.



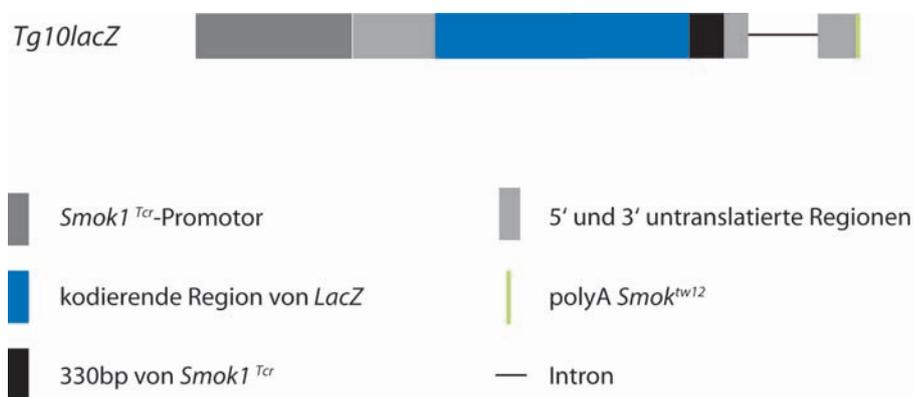
**Abbildung 5.4:** Nachweis des Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Proteins im Hoden von *Tg10/0*-Männchen. Dazu diente die Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop. Alle Aufnahmen sind identisch vergrößert; Balken 50  $\mu\text{m}$ ; a: *Tg10-996*; b: *Tg10-1015*; c: *Tg10-1016*; d: Wildtyp. Im Hoden der drei unterschiedlich transgenen *Tg10/0*-Männchen wurde Fluoreszenz in den Flagellen elongierter Spermatisiden im *Lumen* der Hodenkanälchen detektiert, die im Hoden von Wildtyp-Männchen nicht beobachtet wurde. Diese Fluoreszenz ist folglich spezifisch. Die Fluoreszenz, die die Hodenkanälchen umgibt, ist dagegen sowohl im Wildtyp-, als auch im Hoden der *Tg10/0*-Tiere zu erkennen, weshalb diese Fluoreszenz als Hintergrundfärbung bewertet wurde. Diese wurde auch bei der Negativkontrolle ohne Erstantikörper beobachtet (ohne Abbildung). Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> wird in Flagellen elongierter Spermatisiden lokalisiert, was auf translationelle Repression des *Tg10*-Transkripts hinweist.



**Abbildung 5.5:** Lokalisation von Myc-Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein im Hoden von *Tg11/0*-Männchen. Dazu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen das Myc-Epitop durchgeführt. Alle Aufnahmen sind identisch vergrößert; Balken 50  $\mu\text{m}$ . a: *Tg11-1020*; b: *Tg11-1066*; c: *Tg11-1069*; d: Wildtyp. Im Hoden der *Tg11/0*-Männchen wurden Fluoreszenzsignale jeweils im *Lumen* der Hodenkanälchen detektiert, die im Hoden von Wildtyp-Tieren nicht zu beobachten waren. Die Fluoreszenz, die die Hodenkanälchen umgab, wurde auch auf Schnitten des Hodens von Wildtyp-Männchen detektiert, was als Hintergrundfärbung, verursacht durch den Sekundärantikörper, identifiziert wurde (ohne Abbildung). Folglich wurde Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> in den Flagellen elongierter Spermatozoen lokalisiert. Wie *Tg9*- und *Tg10*-Transkripte, unterliegt *Tg11*-Transkript offenbar translationeller Kontrolle, da die Expression bereits in runden Spermatozoen beobachtet, das Transkript jedoch erst in elongierten Spermatozoen detektiert wurde.

### 5.3 Untersuchung der Rolle der kodierenden Region für die zelluläre Restriktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>*

In diesem experimentellen Ansatz sollte untersucht werden, ob die kodierende Region im *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript dessen Lokalisation oder translationellen Eigenschaften kontrolliert. Dies wurde anhand eines *LacZ*-Reporter-Transgens *in vivo* untersucht, das, anstatt der kodierenden Region für Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>*, die für die bakterielle *Escherichia coli*  $\beta$ -Galactosidase trägt. Dafür wurde das Transgen *Tg10* so modifiziert, dass ein



**Abbildung 5.6:** Schematische Darstellung des Transgens *Tg10lacZ*. Dieses entspricht im Wesentlichen dem Transgen *Tg10*. In diesem Transgen wurde die kodierende Region für Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>* zum großen Teil durch die für die bakterielle  $\beta$ -Galactosidase ersetzt, die durch das *LacZ*-Gen kodiert wird. Das Enzym sollte zur Detektion des Proteins im Hoden und in den Spermien transgener Tiere dienen.

großer Teil der kodierenden Region für Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>* durch die des *LacZ*-Gens ersetzt wurde. Die Transgen-kodierte  $\beta$ -Galactosidase kann mittels enzymatischer Reaktion von präzipitierenden, farbigen Substraten *in situ* lokalisiert werden. Von der kodierenden Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>* von 1,8 kb Länge wurden 1,5 kb durch das *LacZ*-Gen ersetzt (Abb 5.6). Durch Vorkerninjektion wurden transgene Mauslinien generiert, die mittels *in situ* Hybridisierung und Immunfärbungen, beziehungsweise enzymatischen Färbereaktionen, auf Transkriptexpression und Proteinlokalisierung untersucht wurden.

### 5.3.1 LacZ-Transkripte sind in etwa der Hälfte der runden Spermatozoen lokalisiert

Zur Detektion des *Tg10lacZ*-Transkripts im Hoden von *Tg10lacZ/0*-Männchen wurde eine *in situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen einen Teil der kodierenden Region des *LacZ*-Gens durchgeführt. Diese zeigte Färbung runder Spermatozoen in der mittleren Region der Hodenkanälchen, in der sich die runden Spermatozoen befinden. Die äußeren Bereiche waren dagegen ungefärbt. Dies weist auf Transkription in runden Spermatozoen hin.

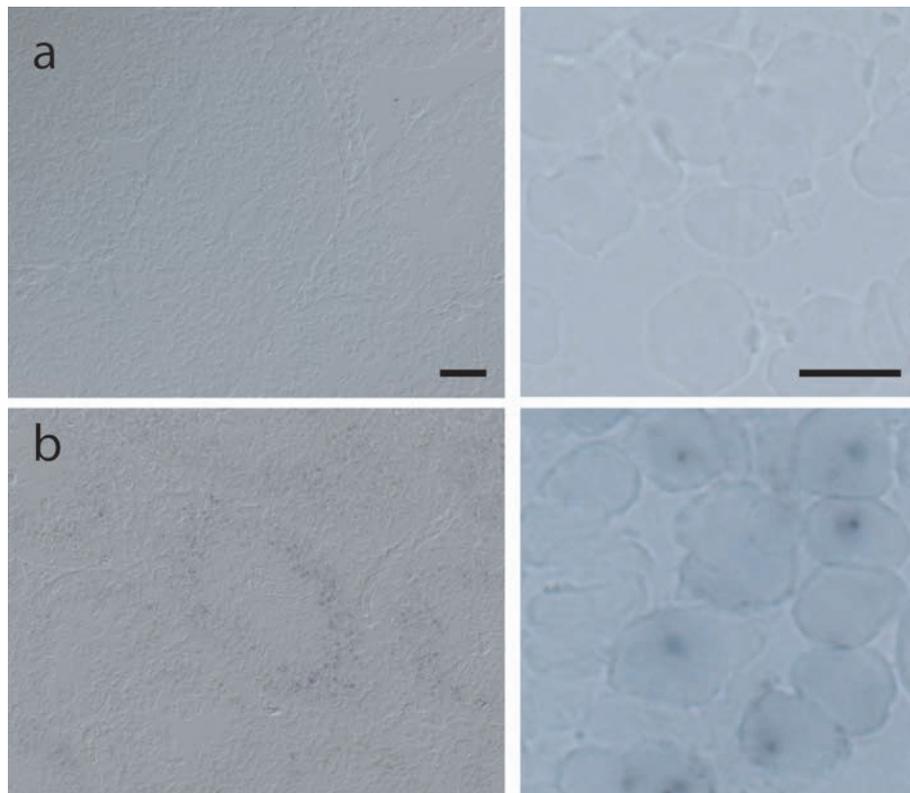
Auffällig war bei der *in situ* Hybridisierung die Färbung etwa jeder zweiten haploiden Zelle im *Tg10lacZ/0*-Hoden. Die Lokalisation der Transkripte in deutlichen Aggregaten glich der, die zuvor bei *Tg9*-, *Tg10*- und *Tg11*-hemizygot-transgenen Männchen beobachtet wurde. Offensichtlich unterliegt auch das *Tg10LacZ*-Transkript zellulärer Restriktion in runden Spermatozoen.

Um die subzelluläre Lokalisation der  $\beta$ -Galactosidase-kodierenden Transkripte in runden Spermatozoen näher zu charakterisieren, wurde fluoreszierende *in situ* Hybridisierung auf *Tg10lacZ/0*-Hoden-Schnitten durchgeführt.

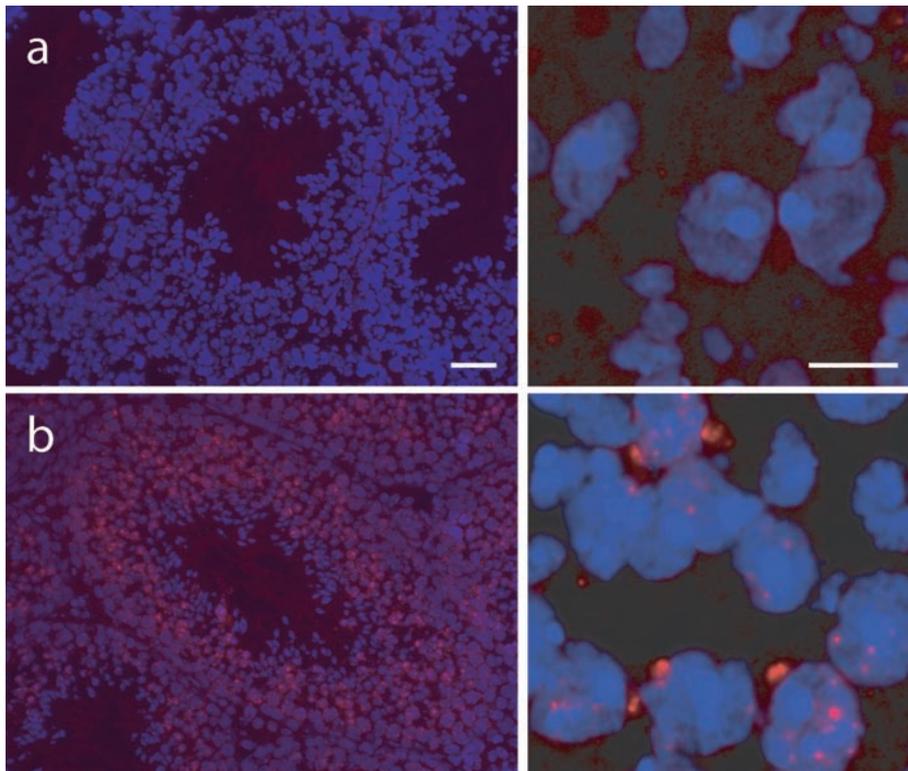
Bei diesen Experimenten wurden Fluoreszenzsignale in perinukleären und nukleären Aggregaten beobachtet, die in runden Spermatozoen auch für Myc-*Smok1<sup>Ter</sup>*-kodierende Transkripte detektiert wurden. Deren Lokalisation ließ sich nicht von der der *Tg10lacZ*-Transkripte im Hoden unterscheiden, was zeigt, dass die zelluläre Restriktion des *Smok1<sup>Ter</sup>*-Transkripts in runden Spermatozoen durch die regulatorischen Elemente, die in *Tg10lacZ* vorhanden sind, verursacht wird.

### 5.3.2 Die in *Tg10lacZ* kodierte $\beta$ -Galactosidase ist im Hoden und in Spermien undetektierbar

Zum Nachweis der  $\beta$ -Galactosidase im Hoden der *Tg10lacZ*-Männchen wurden verschiedene Enzymsubstrate und Antikörper getestet. Weder durch Inkubation mit X-Gal noch mit Fluorescein-Digalaktosid (FDG) gelang die Detektion des Enzyms im Hoden oder in isolierten Spermien. Auch anhand von Immunfärbungen mit kommerziellen  $\beta$ -Galactosidase-Antikörpern konnte das Enzym nicht erfolgreich nachgewiesen werden. Möglicherweise ist das *Tg10lacZ*-Transkript nicht stabil und wird im Laufe der Spermiogenese abgebaut, so dass keine oder nur sehr geringe Mengen an  $\beta$ -Galactosidase gebildet werden, die für eine spezifische Detektion nicht ausreichen.



**Abbildung 5.7:** *In situ* Hybridisierung mit einer Sonde gegen die kodierende Region des *LacZ*-Gens zur Darstellung der *Tg10lacZ*-Transkripte im Hoden von *Tg10lacZ/0*-Männchen. Links: Querschnitte durch Hodenkanälchen; Vergrößerung aller Fotos links sind identisch; Balken 50  $\mu\text{m}$ . Rechts: Gruppe runder Spermatozyten; Balken 5  $\mu\text{m}$ ; a: Wildtyp-Hoden; b: *Tg10lacZ/0*. Die *in situ* Hybridisierung zeigt, dass *Tg10lacZ*-Transkript in runden Spermatozyten schwach exprimiert wird. Die äußeren Bereiche der Hodenkanälchen, in denen frühe prämeiotische Entwicklungsstadien der Spermatozyten und Spermatozyten lokalisiert sind, sowie die luminalen Bereiche, die elongierte Spermatozyten enthalten, weisen keine Expression des *Tg10lacZ*-Transkripts auf. Die Verteilung des Transkripts beschränkt sich auf etwa die Hälfte runder Spermatozyten und ist, wie auch *Smok1*<sup>Tcr</sup>- und *Smok1*-Transkripte, in deutlichen RNA-Aggregaten lokalisiert.



**Abbildung 5.8:** Subzelluläre Lokalisation von *Tg10lacZ*-Transkripten in runden Spermatiden. a: *in situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen die kodierende Region von *LacZ* im Hoden von Wildtyp-Männchen; b: *in situ* Hybridisierung mit einer RNA-Sonde gegen die kodierende Region von *LacZ* im Hoden von *Tg10lacZ/0*-Männchen. Rot: *LacZ*-Transkript, blau: Kernfärbung (DAPI); links: Querschnitt durch ein Hodenkanälchen; Balken 50  $\mu\text{m}$ ; rechts: runde Spermatiden; Balken 5  $\mu\text{m}$ . *LacZ*-Transkript war in haploiden runden Spermatiden, nicht aber in diploiden Spermatozyten oder elongierten Spermatiden detektierbar. Etwa die Hälfte aller runden Spermatiden exprimieren *LacZ*-Transkripte und lokalisieren diese in nukleären und perinukleären Aggregaten.

## 5.4 Funktionstests der Transgenen *Tg9*, *Tg10* und *Tg11* als *Responder*

### 5.4.1 Vererbungstest der hemizygoten *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transgene *Tg9*, *Tg10* und *Tg11* mit *Distortern* im BTBR/TF-Hintergrund

Die Höhe der Transmission des *t*-Haplotyps ist abhängig vom genetischen Hintergrund, wobei im BTBR/TF-Mausstamm die höchsten Vererbungsraten beobachtet wurden [23]. Aus diesem Grund wurden die jeweiligen transgenen Linien, die über Transgen-Injektion in C57Bl/6-Zygoten generiert worden waren, über 4 Generationen mit BTBR/TF-Mäusen gekreuzt. Diese wurden anschließend mit Mäusen verpaart, die den partiellen *t*-Haplotyp  $t^{h51}t^{h18}$  trugen, der die *Distorter* loci 1, 2 und 4 enthält. Männliche Nachkommen dieser Verpaarungen des Genotyps  $Tg/0; t^{h51}t^{h18}/+$ , die hier als Tester-Männchen bezeichnet werden, wurden mit NMRI-Weibchen verpaart und deren Nachkommen auf die Vererbungsrate des jeweiligen Transgens getestet (Tabelle 5.1).

Um einen Anhaltspunkt für die Stärke des *Responder*-Effekts eines *Smok1<sup>Tcr</sup>*-kodierenden Transgens im Zusammenspiel mit dem partiellen *t*-Haplotyp  $t^{h51}t^{h18}$  zu bekommen, wurde das bereits zuvor charakterisierte Transgen *Tg9* (persönliche Mitteilung Bernhard G. Herrmann) anhand einer neu generierten Linie auf *Responder*-Funktion geprüft. Dazu diente die Linie *Tg9-987*, von der nach der Einkreuzung des partiellen *t*-Haplotyps  $t^{h51}t^{h18}$ , drei Männchen des Genotyps  $Tg9/0; t^{h51}t^{h18}/+$  als Tester-Tiere verwendet wurden. Das Transgen wurde an 143 der 182 Nachkommen dieser Tiere weitervererbt, was einer Rate von 76,6 % entspricht. Die *Responder*-Funktion von *Tg9* konnte folglich durch diese Versuche erneut bestätigt werden.

Für das Transgen *Tg10* wurde die Linie *Tg10-1016* für die Tests verwendet, da deren Immunfluoreszenzsignal zum Nachweis von Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein von den drei zur Verfügung stehenden Linien am stärksten war. Drei Männchen des Genotyps  $Tg10/0; t^{h51}t^{h18}/+$  wurden auf bevorzugte Vererbung des Transgens überprüft, indem insgesamt 341 Nachkommen genotypisiert wurden. Von diesen wurden 256 positiv auf *Tg10* getestet (74,8 %), während die anderen das Transgen nicht besaßen. Dies bedeutet, dass *Tg10* in Anwesenheit mehrerer *Distorter*-Loci die nicht-mendelsche Vererbung des Transgens verursacht und als *Responder* funktioniert.

Zur Überprüfung der Funktion von *Tg11* als *Responder* diente die Linie *Tg11-1020*. Männchen des Genotyps  $Tg11/0; t^{h51}t^{h18}/+$  wurden ebenfalls auf bevorzugte Verer-

bung des Transgens getestet. Von den insgesamt 152 Nachkommen dieser Männchen wiesen 109 das Transgen auf. Bei diesen Versuchen wurde eine Vererbungsrate von 71,1 % beobachtet, die die *Responder*-Funktion von *Tg11* belegt. Folglich sind alle drei Transgene *Tg9*, *Tg10* und *Tg11* als *Responder* funktionell, obwohl sich diese in ihrer 3'UTR unterscheiden. Dies bedeutet, dass die Modifikationen in der 3'UTR nicht die zelluläre Restriktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>* bei der Spermatogenese und auch nicht die Funktion der Transgene als *Responder* beeinflussen.

**Tabelle 5.1: Vererbungstest transgener Linien mit *Distortern*.** *Tg*: Transgene Nachkommen, *Wt*: Wildtyp, Gesamt: Gesamtzahl der Nachkommen, *Tg (%)*: Transgene Nachkommen in Prozent, p-Wert: Signifikanz der Abweichung von 50 %

Genotyp	Tester	<i>Tg</i>	<i>Wt</i>	Gesamt	<i>Tg (%)</i>	p-Wert
<i>Tg9/0;</i> <i>th51th18/+</i>	3	143	39	182	76,6 %	1,27e-14
<i>Tg10/0;</i> <i>th51th18/+</i>	4	256	85	341	74,8 %	2,04e-20
<i>Tg11/0;</i> <i>th51th18/+</i>	3	109	43	152	71,1 %	8,64e-08

#### 5.4.2 Vererbungstest der hemizygoten *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transgene *Tg9*, 10 und 11 auf BTBR/TF -Wildtyp-Hintergrund

Um zu testen, zu welcher Rate die jeweiligen transgenen Männchen das Transgen ohne die *Distorter* vererben, wurden *Tg9/0-*, *Tg10/0-* und *Tg11/0-*Männchen mit NMRI-Weibchen verpaart (Tabelle 5.2). 141 von 254 getesteten Nachkommen von *Tg9/0-*Männchen wiesen das Transgen auf. Dies entspricht einer Transmissionsrate von 55,5 %.

Drei Männchen der Linie *Tg10-1016* des Genotyps *Tg10/0* vererbten das Transgen an 137 von 280 getesteten Nachkommen (49,1 %).

Bei den Tests der Linie *Tg11-1020* dagegen wurden 156 von 235 Nachkommen von drei *Tg11/0-*Männchen positiv auf das Transgen getestet. Hierbei war jedoch auffällig, dass zwei Männchen eine Vererbungsrate von 75 %, bzw. 75,3 % eines dagegen nur 53,2 % aufwiesen. Dies bedeutet, dass *Tg11/0* Männchen der Linie *Tg11-1020* das Transgen zu durchschnittlich 66,4 % transmittieren, was eine signifikante Abweichung

von der mendelschen Vererbungsrate von 50 % darstellt. Bei den Vererbungstests hemizygot transgener Männchen der Linien *Tg9-987* und *Tg10-1016* Linien dagegen konnte keine signifikante Abweichung der mendelschen Vererbung nachgewiesen werden.

**Tabelle 5.2: Vererbungstest transgener Linien auf Wildtyp-Hintergrund.** *Tg*: Transgene Nachkommen, *Wt*: Wildtyp, Gesamt: Gesamtzahl der Nachkommen, *Tg (%)*: Transgene Nachkommen in Prozent, p-Wert: Signifikanz der Abweichung von 50 %

Genotyp	Tiere	<i>Tg</i>	<i>Wt</i>	Gesamt	<i>Tg (%)</i>	p-Wert
<i>Tg9/0</i>	3	141	113	254	55,5%	0,0789
<i>Tg10/0</i>	3	137	143	280	49,1%	0,720
<i>Tg11/0</i>	3	156	79	235	66,4%	5,10e-07

## 5.5 Einfluss der 3'UTR auf die Translation von *Smok1<sup>Tcr</sup>*

### 5.5.1 Quantifizierung der Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>*- und *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkriptmengen im Hoden von *Tg9/0*-, *Tg10/0*- und *Tg11/0*-Männchen

Anhand der im Folgenden beschriebenen Experimente wurde untersucht, ob unterschiedliche Mengen des Proteins Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>* im Hoden von Männchen der Linien *Tg9-987*, *Tg10-1016* und *Tg11-1020* gemessen werden können. Da Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>* im Gesamtproteinextrakt des Hodens entsprechender transgener Tiere durch Western Blot nicht nachweisbar war (ohne Abbildung), war es notwendig, eine andere semi-quantitative Methode zur Messung der Proteinmenge im Hoden zu verwenden. Zur Auswertung dienten die Immunfluoreszenzsignale in den Flagellen elongierter Spermatozoonen in den Hodenkanälchen. Dafür war zuvor eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das Myc-Epitop in Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>* auf Gewebeschnitten unter identischen Bedingungen durchgeführt worden, die anschließend im Fluoreszenzmikroskop fotografiert wurde.

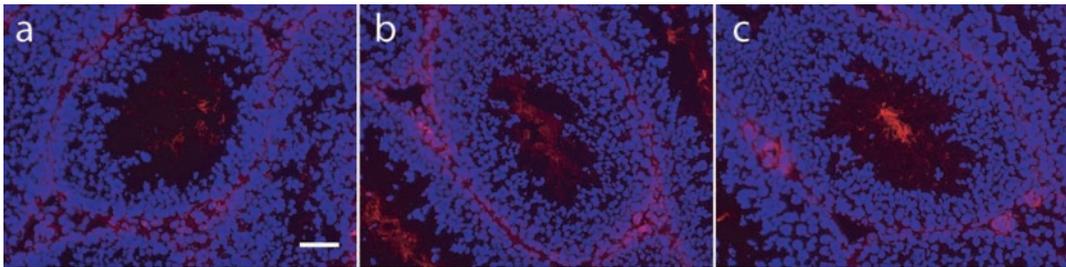
Auf den Fotos wurden einzelne Hodenkanälchen dokumentiert, die im *Lumen* mehrere Fluoreszenzsignale enthielten, die in einzelnen Flagellen elongierter Spermatozoonen lagen. In gefärbten Schnitten der *Tg11/0*-Hoden waren diese einzelnen Fluoreszenzpunkte deutlich stärker als in *Tg9/0* oder in *Tg10/0* Hoden (Abb. 5.9).

Um eine Quantifizierung der Intensität der einzelnen Fluoreszenzsignale in den ein-

zelenen Flagellen durchzuführen, wurden pro Tier 10 Aufnahmen von gefärbten Hodenkanälchen erstellt, die über die Software *ImageJ* ausgewertet wurden.

Für die Messung der Fluoreszenz einzelner Flagellen als Einzelwerte musste eine manuelle Hintergrundkorrektur der Fluoreszenz im *Lumen* durchgeführt werden (gelber Kasten in Abb. 5.10 oben links und rechts). Dies bedeutet, dass im Bild ein Fluoreszenz-Schwellenwert manuell gewählt wurde, ab dem diese Signale als einzelne Messpunkte definiert werden konnten (Abb. 5.10. roter Strich). Pro Bild ergaben sich dadurch, je nach Größe des *Lumens*, bis zu etwa 150 Einzelwerte für die Fluoreszenz innerhalb der Flagellen. Die manuelle Hintergrundkorrektur wurde dabei für alle Aufnahmen bei einem identischen Wert durchgeführt. Bei der Auswertung der Aufnahmen der Fluoreszenzsignale innerhalb der Hodenkanälchen wurden damit für *Tg9* 429, für *Tg10* 809 und für *Tg11* 1419 Messpunkte erhalten, anhand derer eine Tabelle erstellt werden konnte, um die Verteilung der Intensitätswerte zu analysieren (ohne Abbildung). Anschließend wurde die Verteilung der Messwerte in den einzelnen transgenen Linien graphisch dargestellt (Abb 5.10 unten), die als Maß dafür dient, wieviel Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> in den einzelnen Flagellen im Hoden von *Tg9/0-*, *Tg10/0-* und *Tg11/0-*Tieren gebildet wird (Abb. 5.11.a).

Die Linie *Tg11-1020* wies eine höhere Signalintensitäts-Verteilung im Vergleich zu *Tg10-1016* auf (Abb. 5.10 und 5.11.a). Dies wurde anhand eines Wilcoxon-Tests auf Signifikanz überprüft [95]. Dieser Test dient dazu, zu überprüfen, ob die Signale der Flagellen im Hoden der Männchen der Linien *Tg11-1020* und *Tg10-1016* zu einer identischen oder zwei unterschiedlichen Populationen angehören. Der Wert des Tests beim Vergleich der beiden Verteilungen war  $2,2 \times 10^{-16}$ , was zeigte, dass die Werte in *Tg10-1016-* und in *Tg11-1020-*Tieren signifikant unterschiedlich waren. Dies bedeutet, dass in den Flagellen der Spermien von *Tg11-1020-*Männchen mehr Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> vorliegt als in denen der *Tg10-1016-*Männchen. Der Vergleich der Signalverteilung von *Tg11-1020* mit der der Linie *Tg9-987* wurde nicht auf Signifikanz untersucht. Die erhöhte Menge an Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> der Linie *Tg11-1020* innerhalb der Flagellen korreliert mit der bevorzugten Transmission des Transgens *Tg11* in *Tg11/0-*Männchen.



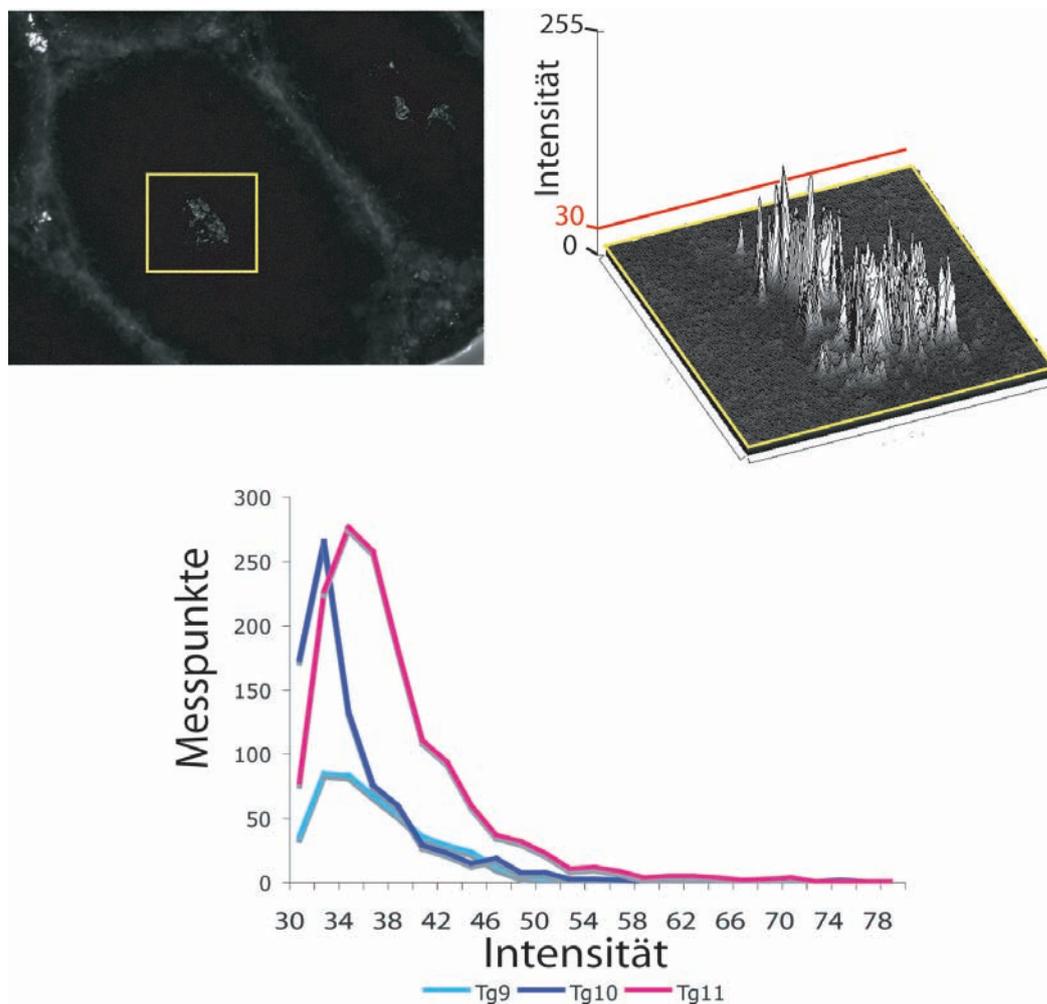
**Abbildung 5.9:** Vergleich der Immunfluoreszenz-Signalintensitäten von *Smok1<sup>Tcr</sup>* im Hoden hemizygot transgener Linien; a: *Tg9-987*; b: *Tg10-1016*; c: *Tg11-1020*; Balken: 50  $\mu\text{m}$ . Alle Aufnahmen sind repräsentative Aufnahmen der jeweiligen Linie und unter identischen Bedingungen fotografiert worden. Die Gewebe wurden identisch behandelt und gleichzeitig mittels Myc-spezifischer Immunfluoreszenz gefärbt. *Tg11-1020* zeigte die stärksten Fluoreszenzsignale innerhalb der Hodenkanälchen.

Um zu untersuchen, ob die höhere Menge an Myc-Smok1<sup>Tcr</sup> im Hoden von *Tg11/0*-Tieren im Vergleich zu *Tg10/0* und *Tg9/0*-Tieren darauf beruht, dass möglicherweise mehr Transkript vorliegt, was durch Integrations- und Positionseffekte des Transgens verursacht werden könnte, wurden die Transkriptmengen in diesen Tieren verglichen. Zu diesem Zweck wurden Gesamt-RNA-Extrakte aus dem Hoden der Männchen der transgenen Linien *Tg9-987*, *Tg10-1016* und *Tg11-1020* mittels quantitativer PCR analysiert (Abb. 5.11.b). Bei diesem Experiment wurden im Hoden der *Tg10-1016*- und *Tg11-1020*-Männchen ungefähr vergleichbare Mengen Transkript gemessen, im Hoden von Männchen der Linie *Tg9-987* dagegen etwas weniger.

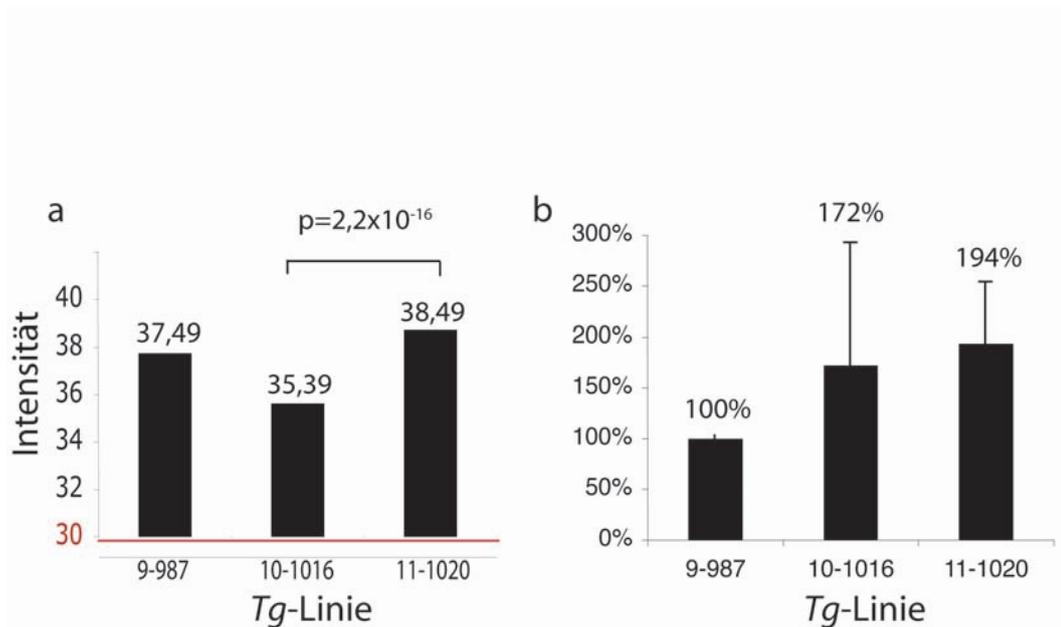
In Bezug gesetzt auf die Ergebnisse der Quantifizierung des Proteins im Hoden der transgenen Tiere bedeutet dies, dass das *Tg11*-Transkript wahrscheinlich effizienter translatiert wird als das *Tg10*-Transkript (Abb. 5.11.a und b), da im Hoden der Linie *Tg11-1020* mehr Protein gebildet wird als in der Linie *Tg10-1016*.

Da im Hoden der Linie *Tg9-987* weniger Transkript vorliegt als in *Tg11-1020* und auch weniger Protein gemessen wurde, kann hier keine Aussage über die Translationseffizienz von *Tg11* im Vergleich zu *Tg9* getroffen werden.

Allerdings wird deutlich, dass im Hoden der Linie *Tg9-987* mehr Protein gebildet wird, als in *Tg10-1016*, obwohl in *Tg9-987*-Männchen weniger Transkript exprimiert wird. Folglich wird *Tg9*-Transkript wahrscheinlich effizienter translatiert als *Tg10*-mRNA.



**Abbildung 5.10:** Verteilung der Immunfluoreszenzsignal-Intensitäten auf die Flagellen elongierter Spermatiden in *Tg9/0-*, *Tg10/0-* und *Tg11/0-* Hoden. oben links: Beispiel für eine Immunfluoreszenzaufnahme, von der die Fluoreszenz im *Lumen* (gelber Kasten) der Hodenkanälchen gemessen wurde; oben rechts: Dreidimensionale Darstellung des Immunfluoreszenzsignals über die Fläche des Lumens verteilt (gelber Kasten links, gelber Rahmen rechts). Zur Korrektur des Hintergrunds und zur Messung der Einzelsignale der Flagellen, wurde bei 30 von 255 Intensitätswerten (Grauwerte) der manuelle Schwellenwert definiert (rote Linie in der Abbildung oben rechts). Oberhalb dieses Wertes wurde die durchschnittliche Intensität (Grauwert) eines Signals als ein Messwert erhalten. Die Intensitätsverteilung der Messwerte wurde anhand eines Diagramms dargestellt (Abb. 5.10. unten) y-Achse: absolute Anzahl an Messpunkten; x-Achse: Intensität (Grauwert) der Signalstärke eines Messpunkts. Hellblau: Verteilung der Signalintensitäten der Linie *Tg9-987*, Mittelwert: 37,49; dunkelblau: Verteilung der Signalintensitäten der Linie *Tg10-1016*, Mittelwert: 35,39; magenta: Verteilung der Signalintensitäten der Linie *Tg11-1020*, Mittelwert: 38,49. Das Maximum der Signalintensitätsverteilung der Messpunkte innerhalb der Hodenkanälchen war bei *Tg11* signifikant zu höheren Helligkeitswerten verschoben als in *Tg9-* und *Tg10-* Linien. Auch die Verteilungen der Fluoreszenzsignale in *Tg9-* und *Tg10-* Hoden unterschieden sich.



**Abbildung 5.11:** Vergleich der Menge an *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein und der Transkriptmengen im Hoden der transgenen Linien *Tg9-987*, *Tg10-1016* und *Tg11-1020*. a: Myc-*Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein im Hoden der transgenen Linien. y-Achse: Intensität (Grauwerte) Rote Linie: Schwellenwert: 30, x-Achse: Name der Linien. b: *Smok1<sup>Tcr</sup>*-kodierende Transkripte im Hoden der transgenen Tiere. y-Achse: relative Transkriptmenge, x-Achse: Name der Linien. Die Quantifizierung der Transkripte weist auf etwa vergleichbare Transkriptmengen in *Tg10-1016*- und *Tg11-1020*-Männchen hin. Obwohl im Vergleich zur Linie *Tg10-1016* in *Tg11-1020* signifikant mehr Protein gemessen wurde (persönliche Mitteilung Martin Werber, verwendeter Test: Wilcoxon-Test) [95], korreliert die Expressionshöhe des *Tg11*-Transkripts im Hoden nicht damit. Daher scheint die Translation des *Tg11*-Transkripts effizienter zu sein als die der *Tg10*-mRNA.



# Kapitel 6

## Diskussion

Der *t*-Haplotyp, eine variante Form des Chromosoms 17 in der Maus, wird von heterozygoten Männchen (*t/+*) bevorzugt an die Nachkommen vererbt. Der *t*-Haplotyp enthält *Distorter*, die die Wildtyp-Spermien dieser Männchen beeinträchtigen. Dagegen sind die Spermien, die den *t*-Haplotyp tragen, durch den *Responder*, der ausschließlich in *cis* wirkt, vor der Wirkung der *Distorter* geschützt [62][63][65].

Die selektive, protektive Wirkung des *Responders* legt die Vermutung nahe, dass die Produkte des *Responder*-Gens *Smok1<sup>Ter</sup>* auf die *t*-Spermien beschränkt bleiben [29]. Dies widerspricht jedoch der bislang gültigen Regel, dass Spermien zwar genotypisch unterschiedlich, jedoch phänotypisch identisch sind [8]. Dies wird bei der Spermatogenese durch den Austausch von Genprodukten zwischen den meiotischen Partnern über interzelluläre Brücken erreicht [90].

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie der außergewöhnliche Mechanismus der spezifischen Wirkung des *Responders* auf die *t*-Spermien molekular zustande kommt. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Eigenschaften des *Responder*-Gens *Smok1<sup>Ter</sup>* anhand von hemizygot transgenen Tieren charakterisiert. Die Untersuchung auf die Lokalisation des Transkripts im Hoden zeigte, dass dieses postmeiotisch in runden Spermatisden exprimiert wird. Überdies wurde seine Restriktion auf ungefähr die Hälfte der haploiden Zellen deutlich. *Smok1<sup>Ter</sup>*-Protein wurde in Flagellen elongierter Spermatisden im Hoden der transgenen Tiere nachgewiesen. Dies bedeutet, dass die Translation ungefähr 10 Tage nach der Transkription stattfindet. Es wird also eine Verzögerung zwischen der Transkriptexpression und der Translation beobachtet, die durch posttranskriptionelle, regulatorische Mechanismen verursacht wird. Zur experimentellen Überprüfung, ob die Genprodukte von *Smok1<sup>Ter</sup>* bis zum Ende der Spermatogenese auf einen Teil der Spermien beschränkt bleiben, wurde mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Techniken die Verteilung des Proteins auf Sperma-

tozoen im Nebenhoden von hemizygot transgenen Tieren untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass ein Teil der Spermienpopulation  $Smok1^{Tcr}$ -Protein enthält, während in den übrigen Spermatozoen keine signifikanten Signale detektierbar waren. Dieser Versuch bestätigt die Hypothese, dass die spezifische Wirkung des *Responders* auf *t*-Spermien, und damit die nicht-mendelsche Vererbung des *t*-Haplotyps, durch die Restriktion von  $Smok1^{Tcr}$  auf eine Spermienpopulation verursacht wird.

Der Mechanismus, der dieser Besonderheit zugrunde liegt, beruht wahrscheinlich auf den Eigenschaften des Transkripts. Dieses wird offenbar translationell reprimiert bis die haploiden Zellen voneinander isoliert vorliegen und ein Austausch des Proteins nicht mehr möglich ist. Daher scheinen *cis*-regulatorische Elemente der mRNA die Restriktion von  $Smok1^{Tcr}$  zu verursachen.

Die Frage, ob dieser Mechanismus nur für das mutierte Gen  $Smok1^{Tcr}$  gilt oder auch für das Wildtyp-Gen  $Smok1$  zutrifft, wurde im transgenen Mausmodell analysiert. Dabei wurde deutlich, dass das  $Smok1$ -Transkript in runden Spermatiden exprimiert wird und auf etwa die Hälfte der haploiden Zellen beschränkt bleibt.  $Smok1$ -mRNA scheint, wie  $Smok1^{Tcr}$ -mRNA, translationeller Repression zu unterliegen. Dies weist darauf hin, dass die Expression und posttranskriptionelle Regulation von  $Smok1$  und  $Smok1^{Tcr}$  im Hoden sich qualitativ nicht voneinander unterscheiden. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Wildtyp-Gen  $Smok1$  in *cis* wirkt.

## 6.1 *t/+*-Männchen bilden zwei molekular unterschiedliche Spermienpopulationen

### 6.1.1 $Smok1^{Tcr}$ -Transkript ist haploidspezifisch exprimiert

Ein Modell zur Erklärung der *Responder*-Wirkung in *cis* postuliert die postmeiotische Transkription und die anschließende zelluläre Restriktion der Genprodukte von  $Smok1^{Tcr}$  innerhalb einer Spermienpopulation. Dies bedeutet, dass das Transkript und das Protein auf die haploiden Zellen beschränkt bleiben, die das Gen dafür tragen [29][4][3].

Da bei der Spermatogenese Produkte zwischen haploiden Tochterzellen in der Regel ausgetauscht werden, muss das Transkript oder das Protein besondere Bedingungen erfüllen, um den interzellulären Transportmechanismen zu entgehen [8]. Mögliche Mechanismen für diese zelluläre Restriktion wurden anhand des  $Smok1^{Tcr}$ -Transgens *Tg9* charakterisiert.

Um die Restriktion der Genprodukte zu untersuchen und den Mechanismus zu charakterisieren, den *Smok1<sup>Tcr</sup>* nutzt, um den Austauschprozessen zu entgehen, wurde die Verteilung des Transkripts im Hoden über *in situ* Hybridisierung dargestellt. Bei diesem Experiment wird deutlich, dass die Transkriptexpression in den Zellen beginnt, die die Meiose bereits vollendet haben. Mit der postmeiotischen Expression des *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkripts wird die erste Voraussetzung für die zelluläre Restriktion erfüllt.

Außerdem wurde der zentrale Aspekt des Modells, die zelluläre Restriktion der Genprodukte auf haploide Zellen, auf Transkriptebene bestätigt: Die *in situ* Hybridisierung zur Detektion des *Tg9*-Transkripts im Hoden der *Tg9/0*-Männchen zeigt, dass der Anteil der *Tg9* exprimierenden Zellen etwa die Hälfte aller Zellen dieses Differenzierungsstadiums darstellt. Die *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkripte beschränken sich folglich auf einen Teil der Population runder Spermatisden. Dies zeigt, dass das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript besondere Eigenschaften besitzt, um dem interzellulären Transport in runden Spermatisden zu entgehen.

Jedoch stellen diese Zellen ein Differenzierungsstadium dar, das noch tiefgreifende morphologische Veränderungen durchläuft bis daraus Spermatozoen entstehen [80]. Dieser Prozess benötigt etwa weitere zwei Wochen, in denen ein andauernder Produktaustausch über zytoplasmatische Verbindungen zwischen den Zellen stattfindet. Damit die zelluläre Restriktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>* im Laufe der Spermiogenese beibehalten wird, müssen entweder das Transkript oder das Protein Eigenschaften besitzen, die ihren Austausch verhindern.

In elongierten Spermatisden wurde kein Transkript detektiert. Aus diesem Grund kann nicht beurteilt werden, ob dieses auf die haploiden Spermatisden beschränkt bleibt, die das Gen tragen.

### 6.1.2 *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkripte unterliegen translationeller Kontrolle

Anhand von Immunfluoreszenzfärbung wurde das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein in den Flagellen elongierter Spermatisden im Hoden *Smok1<sup>Tcr</sup>*-transgener Tiere lokalisiert. Dies verdeutlicht, dass das Transkript erst etwa eineinhalb Wochen nach Beginn der Transkription kurz vor Ende der Spermatogenese translatiert und posttranskriptionell reguliert wird. Translationelle Kontrolle gilt als ein weit verbreitetes Phänomen bei der Spermatogenese, das gewährleistet, dass Transkripte zu einem definierten Zeitpunkt für die Translation bereit stehen [47]. Auf diese Weise wird der Effekt des

globalen Transkriptionsstopps im Laufe der Umstrukturierung und Kompaktierung des Zellkerns in elongierten Spermatiden ausgeglichen [42].

Gewöhnlich wird translationelle Kontrolle bei der Spermatogenese durch die Interaktion von in *trans* wirkenden Faktoren mit *cis*-regulatorischen Elementen der mRNA gesteuert. Ein Beispiel hierfür ist die Bindung von RNA-bindenden Proteinen (*RBP*s), die den Zeitpunkt der Translation und den Metabolismus der mRNA regulieren, an spezifische Erkennungsstellen im Transkript [71][56]. Posttranslationelle Modifikationen der *RBP*s, zum Beispiel die Phosphorylierung der Proteine, verändern deren Affinität zum Transkript und initiieren so die Translation der zuvor gebundenen mRNA [33][54]. Charakteristisch für diesen Mechanismus ist meist die Ausbildung von großen, zytoplasmatischen RNA-Protein-Komplexen, den Ribonukleoproteinpartikeln (*RNP*s).

In somatischen Zellen sind entsprechende Strukturen auch als *Processing-Bodies* (*P-Bodies*) bekannt, die Orte für den zellulären RNA-Metabolismus darstellen [2][81][15]. Je nach dem, in welchem molekularen Kontext das Transkript vorliegt, entscheidet sich in *P-Bodies*, ob mRNA abgebaut oder reprimiert wird [5]. In Keimzellen dagegen kommt neben den *RNP*s eine *P-Body*-ähnliche Struktur in Form des *Chromatoid Body* vor [77]. Dieser enthält, wie die *P-Bodies*, unter anderem Enzyme für den mRNA-Metabolismus [49]. Der *Chromatoid Body* steht im Austausch mit den *RNP*s, die wiederum intra- und interzellulär transportiert werden können [90].

Jedoch sind die Kriterien, nach denen *RNP*s vom Chromatoid Body abgelöst und transportiert werden, unbekannt. Elemente in der RNA könnten die Bindung bestimmter *RBP*s verursachen, die entscheiden, ob ein RNA-Protein-Komplex intra- oder interzellulär transportiert wird.

Das *Tg9*-Transkript, das über die *in situ* Hybridisierung in runden Spermatiden dargestellt wurde, liegt ebenfalls in Aggregaten vor, die *RNP*s darstellen könnten. Möglicherweise binden *RBP*s das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript, lokalisieren dieses in *RNP*s und beeinflussen dadurch seinen intrazellulären Transport. Auf diese Weise könnte das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript den Austauschvorgängen zwischen den Zellen entgehen. Über die Kontrolle des Translationsbeginns in späten elongierten Spermatiden wird wahrscheinlich zusätzlich gewährleistet, dass das Protein erst in bereits isolierten Zellen gebildet wird. Folglich könnten *cis*-regulatorische Elemente von *Smok1<sup>Tcr</sup>* die zelluläre Restriktion und translationelle Kontrolle des Transkripts verursachen.

### 6.1.3 *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein bleibt auf eine Population von Spermatozoen beschränkt

Beim Vergleich der Transkript- und der Proteinlokalisierung im Hoden hemizygot *Smok1<sup>Tcr</sup>*-transgener Tiere wurde deutlich, dass die mRNA in runden Spermatiden exprimiert wird und auf einen Teil dieser Zellen beschränkt bleibt. Das Protein wurde jedoch erst in den Flagellen elongierter Spermatiden nachgewiesen, obwohl in diesen Zellen kein Transkript detektiert werden konnte. Daher bleiben folgende Fragen offen:

- Warum kann das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript in elongierten Spermatiden nicht detektiert werden, obwohl das Protein erst in diesem Differenzierungsstadium translatiert wird?
- Unterliegt das Transkript in elongierten Spermatiden zellulärer Restriktion?

Ersteres lässt sich durch die geringe Sensitivität der verwendeten Methode erklären. Bei der *in situ* Hybridisierung zur Detektion von *CatSper1*-mRNA im Hoden konnte diese nicht in elongierten Spermatiden dargestellt werden, obwohl das Transkript dort vorhanden ist [24]. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass diese Methode eine Detektionsgrenze besitzt, die wahrscheinlich auch bei der *in situ* Hybridisierung zur Darstellung des *Tg9*-Transkripts unterschritten wird. Dennoch war das Transkript in runden Spermatiden deutlich detektierbar. Dies könnte bedeuten, dass das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript im Überschuss exprimiert und anschließend teilweise degradiert wird, da nur eine gewisse Menge der mRNA für die Translation benötigt und daher stabilisiert wird.

Letztere Frage nach der Restriktion des Transkripts in elongierten Spermatiden kann lediglich indirekt beantwortet werden, indem die Verteilung des Proteins in Spermatozoen untersucht wird. Diese wurde anhand der Immunogoldsignale in Spermien auf Ultradünnschnitten des Nebenhodens der *Tg9/0*-Männchen quantifiziert.

Das Experiment bestätigt, dass eine Restriktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein auf einen Teil der Spermien vorliegt. Die Population, die deutlich positive Signale für das Protein zeigt, beläuft sich statistisch auf 33,3 %. Dies bedeutet, dass eine Transgen-spezifische Population vorliegt, die das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein enthält.

Da 50 % der Spermatozoen in *Tg9/0*-Tieren das Transgen *Tg9* tragen, müssten allerdings erwartungsgemäß 50 % der Spermien das Protein enthalten. Die beobachtete Abweichung von 50 % kann dadurch erklärt werden, dass die Signalstärke der Im-

munogoldmarkierung in einigen Fällen nicht deutlich über dem Hintergrund liegt. Dies könnte auf der niedrigen Konzentration des Proteins in Spermatozoen beruhen. Auch die Einbettung des Gewebes in Harz für die Herstellung von Ultradünnschnitten könnte dafür verantwortlich sein, dass die Markierung von  $Smok1^{Tcr}$ -positiven Spermien in einigen Fällen statistisch nicht signifikant über dem Hintergrund liegt. Möglicherweise wurde das Epitop nach dieser Behandlung des Gewebes vom Antikörper mit verringerter Affinität gebunden, was zu einer verringerten Signalstärke führt. Mit den oben diskutierten Versuchen wird die Hypothese bestätigt, dass die Geneprodukte von  $Smok1^{Tcr}$  sich nicht gleichmäßig auf alle Spermien von heterozygoten *t*-Haplotyp-Männchen verteilen. Dadurch könnten phänotypisch ungleiche Spermatozoen gebildet werden, die sich in ihrer Motilität unterscheiden. Höchstwahrscheinlich tragen *t*-Spermien das  $Smok1^{Tcr}$ -Protein, das die durch die *Distorter* verursachte verringerte Beweglichkeit der Flagellen normalisiert und die bevorzugte Vererbung des *t*-Haplotyps bewirkt.

## 6.2 Mechanismen der zellulären Restriktion von $Smok1^{Tcr}$

Anhand der oben diskutierten Experimente wurde gezeigt, dass  $Smok1^{Tcr}$  zellulärer Restriktion unterliegt. Höchstwahrscheinlich wird dies dadurch verursacht, dass das Transkript translationell kontrolliert, lokalisiert und dadurch vor dem Transport in die Nachbarzellen geschützt wird. Um den Mechanismus zu identifizieren, der dazu führt, wurden die 5' und 3' untranslatierten Regionen des  $Smok1^{Tcr}$ -Gens auf *cis*-regulatorische Elemente untersucht.

### 6.2.1 Die 5'UTR von $Smok1^{Tcr}$ verursacht translationelle Repression

Im Hoden wird translationelle Kontrolle normalerweise durch untranslatierte Regionen vermittelt, die in Hoden-spezifischen Transkripten häufig außergewöhnlich lang sind [48]. Das  $Smok1^{Tcr}$ -Transkript besitzt eine 5' untranslatierte Region von 870 Basen Länge, die wahrscheinlich *cis*-regulatorische Elemente enthält. Diese könnten, zum Beispiel über die Bindung von RNA-Bindeproteinen, zur posttranskriptionellen Regulation der mRNA führen.

Anhand von Zellkulturexperimenten wurde die 5'UTR des Transkripts als Region identifiziert, die translationelle Kontrolle und Lokalisation des  $Smok1^{Tcr}$ -Transkripts *in vivo* regulieren kann. Diese Versuche zeigen, dass alle Zellen, die Reportertran-

skripte exprimieren, welche die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthalten, sehr geringe Mengen an entsprechendem Protein bilden. In diesen Zellen sind die Transkripte jedoch stabil, was auf translationelle Repression der mRNA durch die 5'UTR hinweist.

### 6.2.2 *Cis*-regulatorische Elemente in der 5'UTR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Suche nach *cis*-regulatorischen Motiven anhand der Sequenz der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* unter anderem ein *Bruno Response Element* (*BRE*) identifiziert.

Bruno ist ein RNA-Bindeprotein, das ursprünglich in *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde. Es bindet die 3'UTR des *oskar*-Transkripts am *BRE*. Dadurch lokalisiert es die mRNA und kontrolliert den Zeitpunkt seiner Translation, und damit die korrekte Bildung des Abdomens und der Keimbahn in *Drosophila*-Embryonen. Bruno-RNA-Bindeproteine kontrollieren auch in Säugetieren die Translation von Zieltranskripten.

*Cugbp1*, das zur Familie der *Bruno*-Gene gehört, wird in Spermatogonien und runden Spermatiden in Mensch und Maus exprimiert. Der *Knock out*-Phänotyp von *Cugbp1* ist gekennzeichnet durch Sterilität von -/- -Männchen und -Weibchen [53]. In -/- -Männchen ist eine Blockade der Spermienentwicklung im Stadium runder Spermatiden zu beobachten. *Cugbp1* stellt folglich ein essenzielles Gen für die Spermatogenese in der Maus dar.

Die funktionelle Überprüfung des *Bruno Response Elements* (*BRE*) im *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript *in vitro* gibt keine konkreten Hinweise darauf, ob die Bindung von Bruno-Proteinen die Translation des Transkripts kontrolliert. Diese Experimente schließen dennoch nicht aus, dass die Bindung der Bruno-Proteine für die Lokalisation von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vivo* verantwortlich sein könnte, da sich das Zellkulturmodell nur sehr eingeschränkt dazu eignet, um die Vorgänge bei der Spermatogenese, vor allem der Lokalisation von Transkripten, zu untersuchen. So spielen wahrscheinlich zusätzliche Mechanismen oder Bindeproteine an *cis*-regulatorische Elemente im *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkript eine Rolle bei der translationellen Kontrolle.

Die Funktion der 5'UTR wurde anhand von Transgenen, denen diese untranslatierte Region fehlt, *in vivo* analysiert. Die Ergebnisse dieser Versuche werden am Ende dieses Kapitels diskutiert.

Translationelle Repression von *Smok1<sup>Tcr</sup>* könnte auch durch *upstreamAUGs* (uAUGs) verursacht werden, die in der 5'UTR vor dem AUG der kodierenden Region enthalten

sind. uAUGs hemmen den Cap-abhängigen *Scanning*-Mechanismus von Ribosomen [78][93]. Dies bedeutet, dass einige Ribosomen bereits an den uAUGs die Translation beginnen, so dass nur wenige das Start-AUG der kodierenden Region erreichen. Dieser Mechanismus hemmt die Translation von Transkripten, die mehrere uAUGs in ihrer 5'UTR besitzen, sehr effizient. Vor allem mRNAs von Kinasen, Zellzyklusgenen und anderen Signalmolekülen unterliegen dieser Art der translationellen Regulation [50].

Die Hemmung der Translation durch die uAUGs in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* wurde anhand von Experimenten gezeigt, bei denen Zellen mit Luziferase-Reporterkonstrukten transfiziert wurden, die das 300 bp Fragment der 5'UTR enthalten, in dem alle uAUGs mutiert vorliegen. In diesen Zellen ist die translationelle Repression des Transkripts fast vollständig aufgehoben. Offensichtlich liegen in diesem Teil der 5'UTR keine weiteren *cis*-regulatorischen Elemente vor, die translationelle Repression vermitteln. Jedoch führt die Mutation von mehreren uAUGs in einem Luziferase-Transkript, das die gesamten 870 Basen der 5'UTR enthält, nicht zu einem Anstieg der Translations-effizienz in den Zellen. Dies bedeutet, dass weitere, bisher unidentifizierte Elemente in der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>*, wahrscheinlich in deren 3' Teil von 570 Basen Länge, zu translationeller Repression der kodierenden Region von *Smok1<sup>Tcr</sup>* führen.

Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass das durch die uAUGs verursachte ineffiziente, Cap-abhängige *Scanning* bei der Spermiogenese umgangen werden kann, da das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Protein in den Flagellen elongierter Spermatozoen zu einem definierten Zeitpunkt der Spermiogenese detektiert wird. Dies weist auf einen zeitlich gesteuerten Beginn der Translation hin. Dies bedeutet auch, dass wahrscheinlich ein Cap-unabhängiger Translationsmechanismus verwendet wird, der eine effiziente Translation des Transkripts innerhalb kurzer Zeit zu einem bestimmten Zeitpunkt erlaubt. Dies könnte durch eine interne Ribosomen-Bindestelle (IRES) erreicht werden, die in stark verzweigten Strukturen von Transkripten enthalten sein kann [1]. Eine IRES fördert die direkte Bindung von Ribosomen und ermöglicht auf diese Weise die Translation des Transkripts unter Umgehung des Cap-abhängigen *Scannings* [18].

Nach der computergestützten Strukturvorhersage durch die Datenbank Mfold bildet vor allem der 5' Teil der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* eine ausgeprägt verzweigte Sekundärstruktur aus und könnte folglich eine IRES enthalten [97]. Die Möglichkeit der Cap-unabhängigen Translation durch einen IRES-Mechanismus wurde jedoch experimentell nicht näher untersucht und konnte daher nicht bestätigt werden. Diese oben

diskutierten Zellkulturexperimente dienen zur Eingrenzung möglicher regulatorischer Mechanismen, die die zelluläre Restriktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vivo* verursachen. Versuche in Zellkultursystemen geben jedoch nur eine eingeschränkte Information über die Vorgänge *in vivo*, da die Zellen ein stark vereinfachtes Modell darstellen. Der Hoden ist ein hochspezialisiertes Organ, in dem die Zellen eine Reduktionsteilung und komplexe zelluläre Differenzierungsprozesse durchlaufen. Vor allem die morphologische Umgestaltung der Zellen zur spermientypischen Kopf-Schwanz-Struktur kann *in vitro* bislang nicht nachgeahmt werden. Aus diesem Grund können auch Hodenspezifische Transportmechanismen und strukturbildende Prozesse, wie zum Beispiel die Formung des Spermienkerns und die Bildung des Flagellums, *ex vivo* nicht untersucht werden.

Außerdem unterliegen Hoden-spezifische Transkripte aufgrund der Kernkompaktierung und des darauffolgenden Transkriptionsstopps speziellen regulatorischen Prozessen, die nicht im Zellkultursystem untersucht werden können. Dies bedeutet für die Funktionsanalyse der regulatorischen Elemente des *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Transkripts, dass weitere Untersuchungen anhand modifizierter Transgen-Konstrukte zur Entschlüsselung der Mechanismen der *Responder*-Funktion unerlässlich sind.

### 6.2.3 Die 5'UTR scheint für die Funktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vivo* essenziell zu sein

Anhand von Mausmodellen lassen sich einige Rückschlüsse auf die Funktion der 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vivo* ziehen. In *TgAce*-transgenen Tieren, die ein Transgen ohne die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* tragen, wurde bei der *in situ* Hybridisierung nur in einer von vier unterschiedlichen Linien Transkript im Hoden, das Protein allerdings in keinem der Fälle detektiert. Der Versuch zur Lokalisation der mRNA zeigt, dass diese sich im Zytoplasma gleichmäßig verteilt. Im Gegensatz dazu wurde das *Tg9*-Transkript, das die 5'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* enthält, in deutlichen nukleären und perinukleären Aggregaten beobachtet. Das Transgen *TgAce* exprimiert das Transkript unter der Kontrolle des Hoden-spezifischen *Ace*-Promotors für das Angiotensin-konvertierende Enzym von 91 bp Länge [30].

Um auszuschließen, dass die Transkription durch die transkriptionelle Inaktivierung des kurzen Promotors beeinträchtigt wird, wurde dessen Expression mit der eines anderen Transgens, *Delta5'Tg9*, verglichen, das den *Smok1<sup>Tcr</sup>*-Promotor enthält. Hier wurde über quantitative RealTime PCR lediglich im Hoden von einer der vier Linien

Transkript detektiert, das anhand von *in situ* Hybridisierung jedoch nicht darstellbar war. Möglicherweise reicht die Sensitivität dieser Methode nicht aus, um die mRNA im Hoden zu lokalisieren. Auch das Transgen-kodierte Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein kann über Immunfluoreszenz nicht detektiert werden. Die 5'UTR von Smok1<sup>Tcr</sup> könnte folglich zur Transkriptstabilisierung oder zur Lokalisation in definierten subzellulären Strukturen, wie zum Beispiel den RNPs, im Hoden beitragen. Jedoch lässt sich durch diese Experimente nicht genauer eingrenzen, welche dieser Mechanismen die 5'UTR *in vivo* reguliert.

### 6.3 Smok1<sup>Tcr</sup>-Transgene mit modifizierten 3'UTR-Sequenzen wirken ebenfalls als Responder

Die oben diskutierten Ergebnissen legen die Vermutung nahe, dass die 5'UTR von Smok1<sup>Tcr</sup> die translationelle Repression und Lokalisation des Transkripts verursacht. Dazu könnte *in vivo* jedoch auch die 3'UTR beitragen.

Die Rolle der 3'UTR bei der nicht-mendelschen Vererbung des *t*-Haplotyps wird im Mausmodell anhand von Transgenen untersucht, die verschiedene 3'UTR-Elemente besitzen. Das Smok1<sup>Tcr</sup>-kodierende Transgen *Tg10* enthält eine 3'UTR, die aus 46 Basen des Exons 2 von Smok1<sup>Tcr</sup> und aus 290 Basen besteht, die in Exon 3 der Smok<sup>tw12</sup> liegen. Die 3'UTR dieses Transgens entspricht daher, soweit bekannt, der untranslatierten Region, die in Wildtyp-Smok-Transkripten vorliegt [29].

Durch die genomische Reorganisation im *t*-Haplotyp ist der Responder Smok1<sup>Tcr</sup> entstanden, dem das Exon 3 der Smok-Gene fehlt. Daher wurde untersucht, welche Bedeutung das Fehlen der 3'UTR, das in diesem Exon enthalten ist, für die Lokalisation, Stabilität und translationellen Eigenschaften des Transkripts besitzt. Zu diesem Zweck wurde das Transgen *Tg11*, das von diesem Teil lediglich 47 statt der 290 Basen enthält, im Mausmodell charakterisiert.

Die Veränderungen in der 3'UTR-Sequenz des Transgens *Tg11*, beziehungsweise *Tg10*, beeinflussen nicht die zelluläre Restriktion und die Lokalisation der Transkripte, und damit deren prinzipielle Funktion als Responder. Dies wird anhand der *in situ* Hybridisierungen und Immunfluoreszenzfärbungen im Hoden der transgenen Linien *Tg10* und *Tg11*, sowie der funktionellen Responder-Tests in Anwesenheit der Distorter deutlich. *Tg9*-, *Tg10*- und *Tg11*-Transkripte unterliegen daher offensichtlich denselben Mechanismen der Restriktion auf runde und elongierte Spermatozoen, sowie

translationeller Kontrolle, die wesentlich zur Funktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>* als *Responder* beitragen.

## 6.4 *Modifier* beeinflussen die Vererbungsrate von *Smok1<sup>Tcr</sup>*

Normalerweise wird die bevorzugte Vererbung des *Responders Smok1<sup>Tcr</sup>* durch die additive Wirkung der *Distorter* verursacht [62]. Das Modell für die nicht-mendelsche Vererbung erklärt dies dadurch, dass die *Distorter* in allen Spermien von *t/+*-Männchen die Wildtyp-Smok zunächst hyperaktivieren und auf diese Weise die Flagellenbewegung beeinträchtigen [3]. Als dominant negative Kinase normalisiert *Smok1<sup>Tcr</sup>* jedoch die Motilität in den *t*-Spermien und verursacht einen starken Befruchtungsvorteil. Dagegen wird in einem partiellen *t*-Haplotyp ohne *Distorter*-Loci heterozygoten *Smok1<sup>Tcr</sup>* gewöhnlich signifikant an unter 50 % der Nachkommen vererbt, was als *t-low*-Effekt bezeichnet wird.

Offenbar gibt es in Spermien ein Optimum für die *Smok*-Aktivität, die weder zu hoch, noch zu niedrig sein darf. Zu hohe Aktivität, zum Beispiel durch die Hyperaktivierung von Rho-Signalkaskaden durch die *Distorter*, verursacht die Beeinträchtigung der Spermienmotilität in Wildtyp-Spermien und kann dadurch zu Sterilität führen. Auch zu geringe *Smok*-Aktivität, die durch die Interaktion von *Smok* mit dominant negativer *Smok1<sup>Tcr</sup>* in Abwesenheit der *Distorter* verursacht werden kann, führt zu verringerter Motilität der *Smok1<sup>Tcr</sup>*-tragenden Spermien und zu erniedrigter Vererbung von *Smok1<sup>Tcr</sup>* [29]. Aus diesem Grund wird in hemizygot *Smok1<sup>Tcr</sup>*-transgenen Männchen die Vererbung des Transgens zu einer Rate von 50 % oder darunter erwartet. Daher ist es überraschend, dass *Tg11/0*-Männchen das *Smok1<sup>Tcr</sup>*-kodierende Transgen bei den funktionellen Tests ohne zusätzliche *Distorter*-Gene mit durchschnittlich 66,4 % signifikant bevorzugt vererben.

Jedoch wurde bei diesen Experimenten auch deutlich, dass zwei der getesteten *Tg11/0*-Männchen eine Vererbung des Transgens von rund 75 %, ein weiteres dagegen lediglich 53 % aufwies. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise nicht nur die *Distorter*-Gene des *t*-Haplotyps, sondern auch weitere Gene, die natürlicherweise im Genom von Wildtyp-Mäusen vorkommen und nicht im *t*-Komplex liegen, die *Smok*-Aktivität erhöhen können. Diese werden allgemein als *Modifier* bezeichnet. Je nach dem, ob ein *Tg11/0*-Männchen einen starken *Modifier* enthält, könnte dieser die Vererbung des Transgens *Tg11* dadurch erhöhen. Offenbar besitzen *Tg11*-tragende Spermien im Vergleich zu den Wildtyp-Spermien dann einen Befruchtungsvorteil. In *Tg9/0*-

und *Tg10/0*-Männchen wird dagegen keine signifikante Abweichung von der erwarteten Transmissionsrate von 50 % beobachtet, obwohl sowohl *Tg9* als auch *Tg10* in Gegenwart der *Distorter* als *Responder* funktionieren.

## 6.5 Die 3'UTR von Wildtyp-*Smok* beeinflusst die Translationseffizienz der mRNA in vivo

Auf molekularer Ebene wurden Unterschiede der Spermien von *Tg9/0*-, *Tg10/0*- und *Tg11/0*-Männchen deutlich. *Tg11/0*-Männchen weisen größere Mengen Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein in den Flagellen auf als *Tg9/0*- und *Tg10/0*-Männchen, was durch die Quantifizierung der Immunfluoreszenzsignale im Hoden der Tiere gezeigt wurde. Möglicherweise sind *Tg11/0*-Tiere daher besonders sensitiv für eine zusätzliche Wirkung von *Modifiern*, was sich in der erhöhten Vererbung des Transgens äußert.

Die erhöhte Menge der Kinase Smok1<sup>Tcr</sup> im Hoden von *Tg11/0*-Tieren kann allerdings nicht durch vermehrte Transkriptexpression, gemessen durch quantitative RealTime PCR, erklärt werden, die bisweilen durch Positions- und Integrationseffekte eines Transgens verursacht werden. Möglicherweise wird das *Tg11*-Transkript im Hoden effizienter translatiert als das *Tg9*- und *Tg10*-Transkript.

Der Unterschied in der Translationseffizienz könnte auf der Struktur der 3'UTR beruhen, in der sich die drei Transkripte voneinander unterscheiden. Die 3'UTR, die in Exon 3 von Smok<sup>tw12</sup> enthalten ist, fehlt, bis auf 46 Basen, in *Tg11*, während diese in *Tg9* zur Hälfte und in *Tg10* in voller Länge vorhanden ist. Da im Hoden von *Tg11/0*-Tieren am meisten Smok1<sup>Tcr</sup>-Protein gemessen wurde, wäre es möglich, dass die 3'UTR des Exons 3 der *Smok<sup>tw12</sup>* translationell reprimierende Elemente enthält. Dieser Teil umfasst rund 250 Basen, in denen translationell regulatorische Sequenzen liegen könnten. Möglicherweise wird über diesen Teil der 3'UTR, der auch in anderen Wildtyp-*Smok*-Genen zu finden ist, nicht aber im *Responder Smok1<sup>Tcr</sup>*, die Effizienz der Translation der aktiven Kinasen kontrolliert.

## 6.6 Vermutlich wirken alle *Smok*-Gene in *cis*

Zu Beginn der Arbeit war unklar, ob die Beschränkung der Wirkung von *Smok1<sup>Tcr</sup>* auf einen Teil der Spermatozoen eine spezifische Eigenschaft ist, die durch die Reorganisation des *Smok*- und des *Rsk3*-Locus im *t*-Haplotyp entstanden ist. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob andere *Smok*-Gene ebenfalls die besondere Eigenschaft

der zellulären Restriktion ihrer Genprodukte aufweisen. Wildtyp-Männchen sind für *Smok*-Gene homozygot [29]. Daher wird Wildtyp-*Smok*-Transkript im Hoden der Tiere in allen Spermatisden exprimiert. Die Untersuchung der Restriktion von Genprodukten auf einen Teil der haploiden Zellen kann jedoch lediglich in hetero- oder hemizygoten Männchen erfolgen.

Als Modell für die Charakterisierung der Eigenschaften von *Smok1* diente daher ein Wildtyp-*Smok1*-Transgen (*TgMyc-Smok1*). *In situ* Hybridisierung im Hoden von *TgMyc-Smok1/0*-Männchen zeigte, dass das *Smok1*-Transkript bei der Spermiogenese zellulärer Restriktion in runden Spermatisden unterliegen könnte. Außerdem werden *Smok1*-Transkripte translationell reguliert, worauf die Detektion der Kinase Smok1 in Flagellen elongierter Spermatisden hinweist. Dies legt die Vermutung nahe, dass *Smok1*, wie *Smok1<sup>Ter</sup>*, in *cis* wirkt.

Bei der Charakterisierung des *TgMyc-Smok1*-Transgens wurde außerdem deutlich, dass die Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung des Smok1-Proteins im Hoden äußerst schwache Signale zeigt. Dies weist darauf hin, dass nur geringe Mengen Smok1 translatiert werden. Das Wildtyp-*Smok1*-Transgen besitzt, wie *Tg10*, das 3'UTR-Element, das in Exon 3 der *Smok*-Gene vorliegt. In *Tg11* fehlt diese Sequenz dagegen bis auf wenige Basen. Wie bereits oben diskutiert, wird beim Vergleich der Transgene *Tg10* und *Tg11* deutlich, dass *Tg11* höchstwahrscheinlich effizienter translatiert wird als *Tg10*, was sich auf die Unterschiede in der 3'UTR der mRNA zurückführen lässt. Die Beobachtung, dass Smok1 in geringen Mengen detektiert wird, unterstützt die Vermutung, dass dieser Teil der 3'UTR in Exon 3 der *Smok*-Gene ein Element enthalten könnte, das die Translation des Transkripts reprimiert.

## 6.7 Hypothesen zur Entstehung des *t*-Haplotyps

Die Charakterisierung von *Smok1* und *Smok1<sup>Ter</sup>* in dieser Arbeit haben gezeigt, dass *Smok*-Gene Regulatoren der Spermienmotilität darstellen, die in *cis* wirken. Trägt ein Männchen *Smok*-Allele, dessen Genprodukte die Befruchtungsfähigkeit der Spermien gleichwertig regulieren, spielt es keine Rolle, wie hoch die endogene Smok-Aktivität ist, solange diese nicht zu Sterilität des Männchens führt.

Erst wenn, wie im Fall des *Responders*, durch Mutation eines Allels eine Kinase mit veränderten Eigenschaften entsteht, die die Aktivität der *Smok* beeinflussen, können dadurch zwei Spermienpopulationen mit unterschiedlichem Fertilitätspotenzial entstehen. Diese konkurrieren miteinander um die Befruchtung der Eizellen. Verursacht

ein Allel einen Vorteil in der Befruchtung, so setzt sich dieses gegen das andere durch, in dem es bevorzugt auf die Nachkommen vererbt und über die Männchen von Generation zu Generation weitergegeben wird.

*Smok1<sup>Tcr</sup>* benötigt jedoch offensichtlich zusätzliche Faktoren, die die Aktivität der Smok erhöhen, um einen Befruchtungsvorteil zu erzielen. Diese zusätzlichen Faktoren könnten zum einen die *Modifier* darstellen, die im Genom von Wildtyp-Mäusen außerhalb des *t*-Komplexes vorkommen, oder aber die *Distorter*-Gene im *t*-Haplotyp. Möglicherweise war der erste Schritt zur Entstehung des *t*-Haplotyps die Bildung von *Smok1<sup>Tcr</sup>*, das aufgrund seiner besonderen Eigenschaften bereits bevorzugt vererbt wurde. Nach und nach führte wahrscheinlich jeder weitere *Distorter*, der mit dem *Responder* im *t*-Haplotyp eine Einheit bildete, zur stärker bevorzugten Vererbung von *Smok1<sup>Tcr</sup>*.

In sexuell reproduktiven Lebewesen könnten auch andere, bisher unidentifizierte, in *cis* wirkende Regulatoren der Fertilität und Spermienmotilität die nicht-mendelsche Vererbung bestimmter Allele verursachen. Führt eine Mutation eines entsprechenden Allels in *cis* zu verbesserter Befruchtungsfähigkeit der Spermien, setzt sich dieses Allel möglicherweise durch. Im Fall des *t*-Komplexes wurde die nicht-mendelsche Vererbung aufgrund der Interaktion von *T* (*Brachyury*) mit dem *t*-Haplotyp entdeckt, die in Mäusen Schwanzlosigkeit verursacht [12][10]. Auffällig war bei den Verpaarungen dieser schwanzlosen *T/t*-Männchen mit Wildtyp-Weibchen die Verteilung der genetisch determinierten Schwanzlänge auf die Nachkommen, die zugunsten des *t*-Haplotyps verschoben war.

Da die nicht-mendelsche Vererbung bestimmter Gene nicht zwangsläufig mit deutlich erkennbaren Merkmalen einhergeht, bleiben diese Mutationen in der Natur vermutlich zunächst unentdeckt. Dies bietet Spielraum für eine genomweite Untersuchung auf weitere Systeme der nicht-mendelschen Vererbung, die mithilfe von neuen Technologien, wie der genomweiten Analyse der Erbinformationen, zum Beispiel über *Massive Parallel Sequencing* durch die Illumina/Solexa-Plattform, durchgeführt werden könnte.

# Kapitel 7

## Zusammenfassung

### 7.1 Deutsch

Der *t*-Haplotyp, eine variante Form von Chromosom 17, wird von heterozygoten Männchen an bis zu 99 % ihrer Nachkommen vererbt. Das Phänomen beruht auf der Bildung von zwei Spermienpopulationen, die eine unterschiedliche Motilität aufweisen. Diese Unterschiede sind durch die Wirkung des *t*-Haplotyp-spezifischen *Responder* bedingt, der die bevorzugte Vererbung des *t*-Haplotyps in *cis* verursacht. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Produkte des *Responder*-Gens *Smok1<sup>Tcr</sup>* auf einen Teil der Spermatozoen beschränkt bleiben, obwohl in der Regel bei der Spermatogenese genotypisch unterschiedliche, jedoch phänotypisch identische Spermatozoen gebildet werden.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie die selektive Wirkung des *Responders* auf die *t*-Spermien, die zur nicht-mendelschen Vererbung des *t*-Haplotyps führt, molekular zustande kommt.

Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst in hemizygot transgenen Tieren die Verteilung der Produkte des *Responder*-Gens *Smok1<sup>Tcr</sup>* auf die haploiden Zellen im Hoden analysiert. Es wurde gezeigt, dass das Transkript postmeiotisch exprimiert wird und auf einen Teil der Population runder Spermatiden beschränkt bleibt. Das Protein wurde jedoch erst in elongierten Spermatiden nachgewiesen. Folglich unterliegt die mRNA etwa 10 Tage lang translationeller Repression. Dieser Prozess geht häufig mit der Anhaftung der Transkripte an definierte intrazelluläre Strukturen einher, was den Austausch der mRNA im Synzytium unterbinden könnte.

Bei der Analyse der Verteilung des *Responder*-Proteins auf Spermatozoen wurde schließlich nachgewiesen, dass dieses auf einen Teil der Spermien von hemizygot *Smok1<sup>Tcr</sup>*-transgenen Männchen beschränkt bleibt. Dieses Experiment bestätigt so-

mit die Bildung von zwei molekular unterschiedlichen Spermienpopulationen durch die zelluläre Restriktion von *Smok1<sup>Tcr</sup>*, die auf der posttranskriptionellen Kontrolle und intrazellulären Bindung der mRNA beruhen könnte.

Zur Eingrenzung der Elemente, die translationelle Repression bewirken, wurden die 5' und 3'UTR von *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vivo* funktionell charakterisiert. Hierbei wurde deutlich, dass die 3'UTR die Translation des Transkripts moduliert, während die 5'UTR für die korrekte Genexpression und -funktion essenziell zu sein scheint. Die Suche nach *cis*-regulatorischen Elementen *in vitro* führte zu dem Ergebnis, dass die 5'UTR translationelle Repression verursacht.

Das Prinzip, das der Restriktion der *Responder*-Genprodukte auf eine Spermienpopulation zugrunde liegt, scheint darüber hinaus auch für Wildtyp-*Smok*-Gene zu gelten. Dies legt die Vermutung nahe, dass weitere natürliche Systeme der nicht-mendelschen Vererbung existieren, denen ein vergleichbarer Mechanismus zugrunde liegen könnte.

## 7.2 Englisch

Males heterozygous for the *t*-haplotype, a variant form of chromosome 17 in the mouse, transmit the *t*-chromosome to up to 99 % of their offspring. This phenomenon relies on the formation of two sperm populations that exhibit differences in motility. The difference is caused by the *cis*-action of the *t*-haplotype specific *responder* *Smok1<sup>Tcr</sup>* suggesting that the products of the *responder* gene are restricted to one population of spermatozoa.

The aim of the project was to investigate, how the *responder*'s selective action on *t*-sperm causes non-mendelian inheritance of the *t*-haplotype.

For answering this question I first analyzed the distribution of the gene products of *Smok1<sup>Tcr</sup>* to haploid cells in testes of hemizygous transgenic animals. I could show that the transcript is postmeiotically expressed and remains restricted to a subpopulation of round spermatids. The protein was first detected in elongated spermatids. Hence, mRNA is subject to translational repression for approximately 10 days. This regulatory mechanism is often accompanied by transcript tethering to defined subcellular structures.

The analysis of the distribution of *Smok1<sup>Tcr</sup>* protein in spermatozoa showed restriction of the protein to a subset of sperm of hemizygous transgenic males. This experiment strongly suggests that *t/+* heterozygous males form two phenotypically different sperm populations due to cellular restriction of *Smok1<sup>Tcr</sup>* protein.

In summary, the most likely mechanism for *cis*-action of the *responder* is haploid expression of the gene, tethering of the mRNA preventing exchange within the syncytium and translational repression until the haploid cells become isolated.

To identify the elements that might cause translational repression I functionally analyzed the 5' and 3'UTR of *Smok1<sup>Tcr</sup>* *in vivo*. These experiments suggest that the 3'UTR modulates translation of the mRNA, whereas the 5'UTR seems essential for correct gene expression and function. *In vitro* experiments for the characterization of putative *cis*-regulatory elements showed that the 5'UTR mediates translational repression.

The principle mechanism that underlies the restriction of the *responder* gene products to a sperm subpopulation also seems to apply to the wildtype *Smok* genes. This indicates that other yet unidentified systems of non-mendelian inheritance might exist.



## Literaturverzeichnis

- [1] S. D. Baird, S. M. Lewis, M. Turcotte, and M. Holcik. A search for structurally similar cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res*, 35(14):4664–4677, 2007.
- [2] V. I. Bashkirov, H. Scherthan, J. A. Solinger, J. M. Buerstedde, and W. D. Heyer. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mxrn1p) with preference for g4 tetraplex substrates. *J Cell Biol*, 136(4):761–773, 1997.
- [3] H. Bauer, N. Veron, J. Willert, and B. G. Herrmann. The t-complex-encoded guanine nucleotide exchange factor *fgd2* reveals that two opposing signaling pathways promote transmission ratio distortion in the mouse. *Genes Dev*, 21(2):143–147, 2007.
- [4] H. Bauer, J. Willert, B. Koschorz, and B. G. Herrmann. The t complex-encoded gtpase-activating protein *tagap1* acts as a transmission ratio distorter in mice. *Nat Genet*, 37(9):969–973, 2005.
- [5] I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, and E. Izaurralde. Micrnas silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mrna decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 71:523–530, 2006.
- [6] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of rna interference. *Nature*, 409(6818):363–366, 2001.
- [7] M. Biggiogera, S. Fakan, G. Leser, T. E. Martin, and J. Gordon. Immunoelectron microscopical visualization of ribonucleoproteins in the chromatoid body of mouse spermatids. *Mol Reprod Dev*, 26(2):150–158, 1990.
- [8] R. E. Braun, R. R. Behringer, J. J. Peschon, R. L. Brinster, and R. D. Palmiter. Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. *Nature*, 337(6205):373–376, 1989.

- [9] R. Calligaris, S. Bottardi, S. Cogoi, I. Apezteguia, and C. Santoro. Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the gata-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(25):11598–11602, 1995.
- [10] P. Chesley and L. C. Dunn. The inheritance of taillessness (anury) in the house mouse. *Genetics*, 21(5):525–536, 1936.
- [11] A. Dev, K. Nayernia, M. Meins, I. Adham, F. Lacone, and W. Engel. Mice deficient for rna-binding protein brunol1 show reduction of spermatogenesis but are fertile. *Mol Reprod Dev*, 74(11):1456–1464, 2007.
- [12] N. Dobrovolskaia-Zawadskaia and N. Kobozieff. Les souris anoures et la queue filiforme qui se reproduisent entres elles sans disjunction. *C.R. Soc. Biol.*, 110:182–184, 1932.
- [13] E. M. Eddy. The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65:45–62, 2007.
- [14] E. M. Eddy, K. Toshimori, and D. A. O’Brien. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech*, 61(1):103–115, 2003.
- [15] T. Eystathioy, E. K. L. Chan, S. A. Tenenbaum, J. D. Keene, K. Griffith, and M. J. Fritzler. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, gw182, associates with a unique population of human mrnas within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell*, 13(4):1338–1351, 2002.
- [16] M. A. Fajardo, K. A. Butner, K. Lee, and R. E. Braun. Germ cell-specific proteins interact with the 3’ untranslated regions of prm-1 and prm-2 mrna. *Dev Biol*, 166(2):643–653, 1994.
- [17] D. W. Fawcett. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*, 44(2):394–436, 1975.
- [18] O. Fernandez-Miragall, S. Quinto, and E. Martinez-Salas. Relevance of rna structure for the activity of picornavirus ires elements. *Virus Res*, 2008.
- [19] H. S. Fox, G. R. Martin, M. F. Lyon, B. Herrmann, A. M. Frischauf, H. Lehrach, and L. M. Silver. Molecular probes define different regions of the mouse t complex. *Cell*, 40(1):63–69, 1985.

- [20] A. Fujita, K. Nakamura, T. Kato, N. Watanabe, T. Ishizaki, K. Kimura, A. Mizoguchi, and S. Narumiya. Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J Cell Sci*, 113 (Pt 1):103–112, 2000.
- [21] W. Garside and N. Hillman. The transmission ratio distortion of the th2-haplotype in vivo and in vitro. *Genet Res*, 53(1):25–28, 1989.
- [22] P. J. Good, Q. Chen, S. J. Warner, and D. C. Herring. A family of human rna-binding proteins related to the drosophila bruno translational regulator. *J Biol Chem*, 275(37):28583–28592, 2000.
- [23] G. R. Gummere, P. J. McCormick, and D. Bennett. The influence of genetic background and the homologous chromosome 17 on t-haplotype transmission ratio distortion in mice. *Genetics*, 114(1):235–245, 1986.
- [24] Y. Gur and H. Breitbart. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, 20(4):411–416, 2006.
- [25] P. B. Hackett, R. B. Petersen, C. H. Hensel, F. Albericio, S. I. Gunderson, A. C. Palmenberg, and G. Barany. Synthesis in vitro of a seven amino acid peptide encoded in the leader rna of rous sarcoma virus. *J Mol Biol*, 190(1):45–57, 1986.
- [26] M. F. Hammer, J. Schimenti, and L. M. Silver. Evolution of mouse chromosome 17 and the origin of inversions associated with t haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(9):3261–3265, 1989.
- [27] K. Hayashi, S. M. Chuva de Sousa Lopes, M. Kaneda, F. Tang, P. Hajkova, K. Lao, D. O’Carroll, P. P. Das, A. Tarakhovsky, E. A. Miska, and M. A. Surani. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS ONE*, 3(3):e1738, 2008.
- [28] P. J. Hendriksen, J. W. Hoogerbrugge, A. P. Themmen, M. H. Koken, J. H. Hoeijmakers, B. A. Oostra, T. van der Lende, and J. A. Grootegoed. Postmeiotic transcription of x and y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol*, 170(2):730–733, 1995.
- [29] B. G. Herrmann, B. Koschorz, K. Wertz, K. J. McLaughlin, and A. Kispert. A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance. *Nature*, 402(6758):141–146, 1999.

- [30] T. Howard, R. Balogh, P. Overbeek, and K. E. Bernstein. Sperm-specific expression of angiotensin-converting enzyme (ace) is mediated by a 91-base-pair promoter containing a cre-like element. *Mol Cell Biol*, 13(1):18–27, 1993.
- [31] H.-Y. Huang, C.-H. Chien, K.-H. Jen, and H.-D. Huang. Regrna: an integrated web server for identifying regulatory rna motifs and elements. *Nucleic Acids Res*, 34(Web Server issue):W429–34, 2006.
- [32] C. Huckins and E. F. Oakberg. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, i. the normal testes. *Anat Rec*, 192(4):519–528, 1978.
- [33] S. Huttelmaier, D. Zenklusen, M. Lederer, J. Dichtenberg, M. Lorenz, X. Meng, G. J. Bassell, J. Condeelis, and R. H. Singer. Spatial regulation of beta-actin translation by src-dependent phosphorylation of zbp1. *Nature*, 438(7067):512–515, 2005.
- [34] N. Iguchi, J. W. Tobias, and N. B. Hecht. Expression profiling reveals meiotic male germ cell mrnas that are translationally up- and down-regulated. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(20):7712–7717, 2006.
- [35] D. Ingelfinger, D. J. Arndt-Jovin, R. Luhrmann, and T. Achsel. The human lsm1-7 proteins colocalize with the mrna-degrading enzymes dcp1/2 and xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA*, 8(12):1489–1501, 2002.
- [36] D. F. Katz, R. P. Erickson, and M. Nathanson. Beat frequency is bimodally distributed in spermatozoa from t/t12 mice. *J Exp Zool*, 210(3):529–535, 1979.
- [37] M. Kedde, M. J. Strasser, B. Boldajipour, J. A. F. Oude Vrielink, K. Slanchev, C. le Sage, R. Nagel, P. M. Voorhoeve, J. van Duijse, U. A. Orom, A. H. Lund, A. Perrakis, E. Raz, and R. Agami. Rna-binding protein dnd1 inhibits microrna access to target mrna. *Cell*, 131(7):1273–1286, 2007.
- [38] A. L. Kierszenbaum. Intramanchette transport (imt): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev*, 63(1):1–4, 2002.
- [39] A. L. Kierszenbaum, M. Gil, E. Rivkin, and L. L. Tres. Ran, a gtp-binding protein involved in nucleocytoplasmic transport and microtubule nucleation, relocates

- from the manchette to the centrosome region during rat spermiogenesis. *Mol Reprod Dev*, 63(1):131–140, 2002.
- [40] A. L. Kierszenbaum, E. Rivkin, and L. L. Tres. Acroplaxome, an f-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell*, 14(11):4628–4640, 2003.
- [41] A. L. Kierszenbaum, E. Rivkin, and L. L. Tres. The actin-based motor myosin va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet Genome Res*, 103(3-4):337–344, 2003.
- [42] A. L. Kierszenbaum and L. L. Tres. Rna transcription and chromatin structure during meiotic and postmeiotic stages of spermatogenesis. *Fed Proc*, 37(11):2512–2516, 1978.
- [43] A. L. Kierszenbaum and L. L. Tres. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol*, 67(4):271–284, 2004.
- [44] A. L. Kierszenbaum, L. L. Tres, E. Rivkin, N. Kang-Decker, and J. M. A. van Deursen. The acroplaxome is the docking site of golgi-derived myosin va/rab27a/b- containing proacrosomal vesicles in wild-type and hrb mutant mouse spermatids. *Biol Reprod*, 70(5):1400–1410, 2004.
- [45] J. Kim-Ha, K. Kerr, and P. M. Macdonald. Translational regulation of oskar mrna by bruno, an ovarian rna-binding protein, is essential. *Cell*, 81(3):403–412, 1995.
- [46] A. Kispert, R. J. Stoger, M. Caparros, and B. G. Herrmann. The mouse rsk3 gene maps to the leh66 elements carrying the t-complex responder tcr. *Mamm Genome*, 10(8):794–802, 1999.
- [47] K. C. Kleene. Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev*, 43(2):268–281, 1996.
- [48] K. C. Kleene. Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenet Genome Res*, 103(3-4):217–224, 2003.

- [49] N. Kotaja, S. N. Bhattacharyya, L. Jaskiewicz, S. Kimmins, M. Parvinen, W. Filipowicz, and P. Sassone-Corsi. The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of dicer and microrna pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(8):2647–2652, 2006.
- [50] M. Kozak. An analysis of vertebrate mrna sequences: intimations of translational control. *J Cell Biol*, 115(4):887–903, 1991.
- [51] M. Kozak. Adherence to the first-aug rule when a second aug codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7):2662–2666, 1995.
- [52] M. Kozak. Recognition of aug and alternative initiator codons is augmented by g in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J*, 16(9):2482–2492, 1997.
- [53] C. Kress, C. Gautier-Courteille, H. B. Osborne, C. Babinet, and L. Paillard. Inactivation of *cug-bp1/celf1* causes growth, viability, and spermatogenesis defects in mice. *Mol Cell Biol*, 27(3):1146–1157, 2007.
- [54] Y. K. Kwon and N. B. Hecht. Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mrna temporally represses its translation. *Mol Cell Biol*, 13(10):6547–6557, 1993.
- [55] N. C. Lau, L. P. Lim, E. G. Weinstein, and D. P. Bartel. An abundant class of tiny rnas with probable regulatory roles in *caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):858–862, 2001.
- [56] K. Lee, M. A. Fajardo, and R. E. Braun. A testis cytoplasmic rna-binding protein that has the properties of a translational repressor. *Mol Cell Biol*, 16(6):3023–3034, 1996.
- [57] R. C. Lee and V. Ambros. An extensive class of small rnas in *caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):862–864, 2001.
- [58] Z. Li and J. M. Baraban. High affinity binding of the translin/trax complex to rna does not require the presence of y or h elements. *Brain Res Mol Brain Res*, 120(2):123–129, 2004.

- [59] D. Lin, T. V. Pestova, C. U. T. Hellen, and H. Tiedge. Translational control by a small rna: dendritic bc1 rna targets the eukaryotic initiation factor 4a helicase mechanism. *Mol Cell Biol*, 28(9):3008–3019, 2008.
- [60] F. T. Lin, O. A. MacDougald, A. M. Diehl, and M. D. Lane. A 30-kda alternative translation product of the ccaat/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(20):9606–9610, 1993.
- [61] J. Liu, M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon, and R. Parker. Microrna-dependent localization of targeted mrnas to mammalian p-bodies. *Nat Cell Biol*, 7(7):719–723, 2005.
- [62] M. F. Lyon. Transmission ratio distortion in mouse t-haplotypes is due to multiple distorter genes acting on a responder locus. *Cell*, 37(2):621–628, 1984.
- [63] M. F. Lyon. Distorter genes of the mouse t-complex impair male fertility when heterozygous. *Genet Res*, 49(1):57–60, 1987.
- [64] M. F. Lyon. Search for differences among t haplotypes in distorter and responder genes. *Genet Res*, 55(1):13–19, 1990.
- [65] M. F. Lyon. Transmission ratio distortion in mice. *Annu Rev Genet*, 37:393–408, 2003.
- [66] M. F. Lyon, J. C. Schimenti, and E. P. Evans. Narrowing the critical regions for mouse t complex transmission ratio distortion factors by use of deletions. *Genetics*, 155(2):793–801, 2000.
- [67] D. Macleod, R. R. Ali, and A. Bird. An alternative promoter in the mouse major histocompatibility complex class ii i-abeta gene: implications for the origin of cpg islands. *Mol Cell Biol*, 18(8):4433–4443, 1998.
- [68] S. Marzi, A. G. Myasnikov, A. Serganov, C. Ehresmann, P. Romby, M. Yusupov, and B. P. Klaholz. Structured mrnas regulate translation initiation by binding to the platform of the ribosome. *Cell*, 130(6):1019–1031, 2007.
- [69] F. Mignone, G. Grillo, F. Licciulli, M. Iacono, S. Liuni, P. J. Kersey, J. Duarte, C. Saccone, and G. Pesole. Utrdb and utrsite: a collection of sequences and

- regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 33(Database issue):D141–6, 2005.
- [70] P. B. Moens and A. D. Hugenholtz. The arrangement of germ cells in the rat seminiferous tubule: an electron-microscope study. *J Cell Sci*, 19(3):487–507, 1975.
- [71] C. R. Morales, Y. K. Kwon, and N. B. Hecht. Cytoplasmic localization during storage and translation of the mRNAs of transition protein 1 and protamine 1, two translationally regulated transcripts of the mammalian testis. *J Cell Sci*, 100 ( Pt 1):119–131, 1991.
- [72] J. L. Mueller, S. K. Mahadevaiah, P. J. Park, P. E. Warburton, D. C. Page, and J. M. A. Turner. The mouse x chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nat Genet*, 40(6):794–799, 2008.
- [73] I. A. Muslimov, Y. Lin, M. Heller, J. Brosius, Z. Zakeri, and H. Tiedge. A small rna in testis and brain: implications for male germ cell development. *J Cell Sci*, 115(Pt 6):1243–1250, 2002.
- [74] K. Nakamura, A. Fujita, T. Murata, G. Watanabe, C. Mori, J. Fujita, N. Watanabe, T. Ishizaki, O. Yoshida, and S. Narumiya. Rhophilin, a small gtpase rho-binding protein, is abundantly expressed in the mouse testis and localized in the principal piece of the sperm tail. *FEBS Lett*, 445(1):9–13, 1999.
- [75] C. B. Nielsen, N. Shomron, R. Sandberg, E. Hornstein, J. Kitzman, and C. B. Burge. Determinants of targeting by endogenous and exogenous micRNAs and siRNAs. *RNA*, 13(11):1894–1910, 2007.
- [76] E. F. Oakberg. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat*, 99(3):391–413, 1956.
- [77] M. Parvinen. The chromatoid body in spermatogenesis. *Int J Androl*, 28(4):189–201, 2005.
- [78] A. Raney, A. C. Baron, G. J. Mize, G. L. Law, and D. R. Morris. In vitro translation of the upstream open reading frame in the mammalian mRNA encoding s-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem*, 275(32):24444–24450, 2000.

- [79] S. Ro, C. Park, K. M. Sanders, J. R. McCarrey, and W. Yan. Cloning and expression profiling of testis-expressed micrnas. *Dev Biol*, 311(2):592–602, 2007.
- [80] L. Russell, R. Ettlín, A. Hikim, and E. Clegg. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, 1990.
- [81] U. Sheth and R. Parker. Decapping and decay of messenger rna occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300(5620):805–808, 2003.
- [82] L. M. Silver and K. Artzt. Recombination suppression of mouse t-haplotypes due to chromatin mismatching. *Nature*, 290(5801):68–70, 1981.
- [83] L. M. Silver and C. Buck. The mouse t complex distorter-3 (tcd-3) locus and transmission ratio distortion. *Genet Res*, 62(2):133–137, 1993.
- [84] V. Syed and N. B. Hecht. Disruption of germ cell-sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. *Mol Cell Endocrinol*, 186(2):155–157, 2002.
- [85] S. Tessler, J. E. Carey, and P. Olds-Clarke. Mouse sperm motility affected by factors in the t/t complex. *J Exp Zool*, 217(2):277–285, 1981.
- [86] S. Tessler and P. Olds-Clarke. Linear and nonlinear mouse sperm motility patterns. a quantitative classification. *J Androl*, 6(1):35–44, 1985.
- [87] R. M. Turner. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev*, 18(1-2):25–38, 2006.
- [88] M. A. Valencia-Sanchez, J. Liu, G. J. Hannon, and R. Parker. Control of translation and mrna degradation by mirnas and sirnas. *Genes Dev*, 20(5):515–524, 2006.
- [89] E. van Dijk, N. Cougot, S. Meyer, S. Babajko, E. Wahle, and B. Seraphin. Human dcp2: a catalytically active mrna decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J*, 21(24):6915–6924, 2002.
- [90] S. Ventela, J. Toppari, and M. Parvinen. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Mol Biol Cell*, 14(7):2768–2780, 2003.

- [91] H. Wang, A. Iacoangeli, D. Lin, K. Williams, R. B. Denman, C. U. T. Hellen, and H. Tiedge. Dendritic bc1 rna in translational control mechanisms. *J Cell Biol*, 171(5):811–821, 2005.
- [92] H. Wang, A. Iacoangeli, S. Popp, I. A. Muslimov, H. Imataka, N. Sonenberg, I. B. Lomakin, and H. Tiedge. Dendritic bc1 rna: functional role in regulation of translation initiation. *J Neurosci*, 22(23):10232–10241, 2002.
- [93] L. Wang and S. R. Wessler. Role of mrna secondary structure in translational repression of the maize transcriptional activator lc(1,2). *Plant Physiol*, 125(3):1380–1387, 2001.
- [94] M. J. Weber. New human and mouse microRNA genes found by homology search. *FEBS J*, 272(1):59–73, 2005.
- [95] F. Wilcoxon. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*, 1:80–83, 1945.
- [96] Z. Yu, T. Raabe, and N. B. Hecht. MicroRNA mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (tnp2) messenger rna (mrna) by mrna cleavage. *Biol Reprod*, 73(3):427–433, 2005.
- [97] M. Zuker. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3406–3415, 2003.

## Verzeichnis der erfolgten Publikationen

H. Bauer, N. Veron, J. Willert and B. G. Herrmann

The t-complex-encoded guanine nucleotide exchange factor Fgd2 reveals that two opposing signaling pathways promote transmission ratio distortion in the mouse  
*Genes Dev.* 2007 Jan 15;21(2):143-7.