

Aus dem Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin und dem Max-Planck-Institut für molekulare
Genetik

**Untersuchungen zur Haploidspezifität des
t-Komplex Responders bei der nicht-Mendelschen
Vererbung in der Maus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Karina Schöfisch
Tierärztin aus Wernigerode

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3623

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Achim D. Gruber, PhD.
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Bernhard G. Herrmann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

haplotypes; t-complex genome region; heterozygote; sperm motility; gene expression regulation; inheritance patterns/genetics; mice; transgenic; protein kinases/genetics

Tag der Promotion: 16. August 2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-380-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für Ayla

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IX
1 Einleitung	1
1.1 Eine Ausnahme von der Regel bei der Maus	1
1.2 Entdeckung des <i>t</i> -Haplotyps und seine genetischen Eigenschaften . . .	2
1.2.1 Wirkung des <i>t</i> -Haplotyps auf Spermien	4
1.2.2 Molekulare Grundlagen von <i>Transmission Ratio Distortion</i> . .	5
1.3 Genexpression im Hoden während der Spermatogenese	7
1.3.1 Spermatogenese unter Berücksichtigung der Verhältnisse in der Maus	7
1.3.2 Translationelle Regulation in der Spermatogenese	9
1.3.3 Allgemeiner Aufbau von mRNA	9
1.3.4 Regulationsmechanismen in der 5'- und 3'-untranslatierten Re- gion	10
1.3.5 Translationelle Regulation durch die codierende Region	12
1.3.6 Transkriptlokalisation im Hoden	13
1.3.7 Regulationsmechanismen des Respondergens <i>Smok1^{Ter}</i>	14
2 Zielsetzung	17
3 Materialien und Methoden	18
3.1 Materialien, Geräte, Chemikalien	18
3.1.1 Zusammensetzung von verwendeten Lösungen und Puffern . .	18
3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden	20
3.2.1 Agarosegelelektrophorese	20
3.2.2 Polymerase Kettenreaktion	21
3.2.3 Primer	22
3.2.4 DNA-Modifikation	24
3.2.5 Ligation	25
3.2.6 Transformation und Retransformation	25
3.2.7 Subklonierung von Amplifikaten aus einer Polymerase Ketten- reaktion	25
3.2.8 Blau-Weiß Selektion	26
3.2.9 Bakterienflüssigkultur	26
3.2.10 Plasmidpräparation aus Bakterienkulturen	26
3.2.11 Nukleinsäurekonzentrationsmessung und -abschätzung	27
3.2.12 Sequenzierung	27

3.3	Klonierung der transgenen Konstrukte	28
3.3.1	<i>Tcr</i> -Deletionskonstrukte	28
3.3.2	5'-UTR-Deletionskonstrukte	28
3.3.3	<i>Tcr</i> -Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen	29
3.3.4	<i>Tcr</i> -Konstrukt mit <i>Protamin</i> 1-Promoter	30
3.4	Spezielle molekularbiologische Methoden	30
3.4.1	Isolation von RNA aus Gewebeproben	30
3.4.2	DNase-Behandlung	31
3.4.3	cDNA Synthese	31
3.4.4	Dig-markierte RNA-Sonden für <i>in situ</i> Hybridisierungen	31
3.4.5	Sonden für <i>Southern Blot</i> und <i>Dot Blot</i>	32
3.5	Zellkultur	34
3.5.1	Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien	34
3.5.2	Allgemeine zellbiologische Methoden	34
3.5.3	Vorrat an Feederzellen	35
3.5.4	Kultivierung von embryonalen Stammzellen	36
3.5.5	Transfektion von embryonalen Stammzellen	36
3.5.6	Einzelkultivierung von embryonalen Stammzellkolonien	37
3.5.7	<i>Southern Blot</i> Analyse von embryonalen Stammzellklonen	38
3.5.8	Expansion embryonaler Stammzellklone mit gewünschter Transgenintegration	40
3.6	Maushaltung und -zucht	40
3.6.1	Tierversuchsantrag	40
3.6.2	Erzeugung von transgenen Mauslinien	41
3.6.3	Allgemeine Haltung und Zucht	41
3.7	Gewebeentnahme, Verarbeitung und Genotypisierung	42
3.7.1	Entnahme von Geweben	42
3.7.2	Genotypisierung	43
3.8	Histologische Methoden	45
3.8.1	Gewebeschnitte für histologische Untersuchungen	45
3.8.2	Fixierung von Kryoschnitten für die <i>in situ</i> Hybridisierung	45
3.8.3	<i>In situ</i> Hybridisierung auf Gewebeschnitten	45
3.8.4	Immunhistochemie auf Gewebeschnitten	48
3.8.5	Immunfluoreszenzfärbung von Spermien	49
4	Ergebnisse	51
4.1	Gezielte Integration von Transgenen in den <i>ColA1</i> -Locus embryonaler Stammzellen	51
4.2	<i>Tcr</i> -Deletionskonstrukte in der Maus	55
4.2.1	RT-PCR Analyse auf transgene Transkripte im Maushoden	55
4.2.2	Histologische Expressionsanalyse von Tg11 in der Maus	57
4.2.3	Histologische Expressionsanalyse der <i>Tcr</i> -Deletionskonstrukte	63
4.2.4	Zusammenfassung	65
4.3	Mauslinien der 5'-UTR-Deletionen	67
4.3.1	Expressionsanalyse der 5'-UTR-Deletionsmauslinien	68
4.3.2	Zusammenfassung	72

4.4	Mauslinien der <i>Tcr</i> -Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen	74
4.4.1	Expressionsanalyse der <i>Tcr</i> -Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen	74
4.4.2	Zusammenfassung	78
4.5	<i>Tcr</i> -Konstrukt mit <i>Protamin 1</i> -Promoter in der Maus	79
4.5.1	Expressionsanalyse im Maushoden	79
4.6	Vererbungstest mit Mauslinien der <i>Tcr</i> -Deletionen	82
4.6.1	Organisation des Transmissionstests und die <i>Dot Blot</i> -Analyse	82
4.6.2	Ergebnisse des Vererbungstests	84
4.6.3	Fruchtbarkeitsdaten	86
4.6.4	Zusammenfassung	90
5	Diskussion	92
5.1	Translationelle Regulation durch die 5'-UTR von <i>Smok1^{Tcr}</i>	93
5.1.1	Komplexe Translationskontrolle des Respondergens	93
5.1.2	Bruno Response Element-ähnliche Sequenz	96
5.1.3	<i>Upstream</i> AUGs im <i>Smok1^{Tcr}</i> -Transkript	97
5.1.4	Beteiligung von microRNAs an der Expression von <i>Smok1^{Tcr}</i> .	98
5.1.5	Sekundärstrukturen des Respondertranskripts	100
5.2	Einfluss der codierenden Region von <i>Smok1^{Tcr}</i> auf die Responderex- pression	102
5.2.1	Translationelle Regulation durch die codierende Region von <i>Smok1^{Tcr}</i>	104
5.2.2	Transmission der Transgene im Vererbungstest	105
5.2.3	Sterilität beim Transmissionstest	107
5.3	Einflüsse auf die Transgenexpression	109
5.3.1	Einfluss des Integrationslocus <i>ColA1</i>	110
5.3.2	Einfluss von Transgenbestandteilen auf die Expression	111
5.3.3	Bedeutung der embryonalen Stammzellen bei der Generierung von transgenen Mauslinien	112
6	Zusammenfassung	114
7	Summary	116
	Abbildungsverzeichnis	118
	Tabellenverzeichnis	119
	Literatur	121
	Veröffentlichte Ergebnisse	132
	Danksagung	133
	Selbständigkeitserklärung	134

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
<i>blunt</i>	engl. stumpf; bezogen auf DNA-Fragmentenden ohne Basenüberhang
bp	Basenpaar(e)
<i>Brachyury</i>	Genname, griech. kurzer Schwanz
BRE	Bruno Response Element
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
β -ME	β -Mercaptoethanol
cDNA	zu einer mRNA komplementäre DNA (engl. <i>complementary desoxyribonucleid acid</i>)
CDS	codierende DNA-Sequenz
<i>Chromatoid Bodies</i>	engl. für Transkriptakkumulationen im Zytosol
<i>cis</i>	<i>lat.</i> auf der selben Seite wie; bezogen auf DNA, Chromosom oder Zelle
cM	Centimorgan
<i>ColA1</i>	Genname Kollagen Typ 1 alpha 1
CTP	Cytosintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
Dig	Digoxigenin
DMEM	Zellkulturmedium für embryonale Stammzellen (engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

Abkürzungen

<i>downstream</i>	stromabwärts, nach dem 3'-Ende einer spezifischen Nukleinsäuresequenz gelegen
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Dulbecco's phosphate buffered solution</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	embryonale Fibroblasten
EKRB	Kapazitierungspuffer für Spermien (engl. <i>enriched Krebs-Ringer bicarbonate</i>)
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
<i>Fgd2</i>	Gen des faziogenitalen Dysplasieproteins 2 (engl. <i>facio-genital dysplasia 2</i>)
Flp	Rekombinase Flippase
FRT	Erkennungssequenz der Flippase (engl. <i>flippase recognition target</i>)
GEF	GTP-Austauschfaktor (engl. <i>guanin nucleotid exchange factor</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutamin
GTP	Guanintriphosphat
GTPase(n)	GDP- bzw. GTP-bindende Proteinfamilie, G-Protein
hygro	Hyromycin, Antibiotikaresistenzgen
In17(1-4)	Inversion 1-4 auf Mauschromosom 17
<i>Insert</i>	engl. für DNA-Fragment für die Klonierung in einen Vektor
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRE	eisenabhängige Proteinbindungsdomäne in Transkripten (engl. <i>iron response element</i>)
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. <i>internal ribosomal entry site</i>)
<i>in situ</i>	lat. am Ursprungsort
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
<i>in vitro</i>	lat. im Glas
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
<i>knock-out</i>	engl. für Abschalten eines Gens
<i>LacZ</i>	Markergen des Enzyms β -Galactosidase

Abkürzungen

LB-Medium	Luria Bertani-Medium für Bakterien (engl. <i>lysogeny broth</i>)
<i>leaky</i>	engl. lückenhaft
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
<i>Linker</i>	Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym
<i>loop</i>	engl. Spalt oder Schlaufe
LS	Lammserum
MABT	Maleinsäurepuffer mit 0,1 % Tween 20
MARK	Mikrotubulaffinität regulierende Kinase (engl. <i>microtubule affinity regulating kinase</i>)
MCS	multiple Klonierungsstelle in Vektoren (engl. <i>multiple cloning site</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger RNA</i>)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren (engl. <i>non-essential amino acids</i>)
NGS	Ziegen Serum (engl. <i>normal goat serum</i>)
<i>Nme3</i>	Gen der Nukleosidiphosphatkinase 3
NTMT	Puffer für alkalische Phosphatase mit 0,1 % Tween 20
ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
<i>P-bodies</i>	RNA-Proteinkomplexe in Eukaryotischen Zellen (engl. <i>processing bodies</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered solution</i>)
PBST	PBS mit 0,1 % Tween 20
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyceratkinase
Plug	Vaginalpfropf bei der Maus
Poly-(A)	Polyadenylierung am 3'-Ende von Transkripten
RBP	RNA-bindendes Protein
Rho-GTPase	Subfamilie von kleinen GTPasen
RISC	translationsinhibierender RNA-Proteinkomplex (engl. <i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<i>Rsk</i>	Gen der ribosomalen S6 Kinase

Abkürzungen

RT-PCR	Reverse Transkription PCR
<i>Scanning</i>	engl. suchen; Suchmechanismus von Ribosomen nach dem Start-Codon in Transkripten
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
Smok	Spermienmotilitätskinase
<i>Smok1</i>	Gen der Wildtyp-Spermienmotilitätskinase 1
<i>Smok1^{Tcr}</i>	Gen der <i>Tcr</i> -Variante von Smok1
SSC	Natriumcitratpuffer (engl. saline-sodium citrate buffer)
SV40	Simian-Virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Tagap1</i>	Gen des Rho-GTPase aktivierenden Proteins 1 der T-Zellaktivierung (engl. T -cell a ctivation R ho G T P ase- a ctivating p rotein 1)
<i>Tcd</i>	<i>t</i> -Komplex Distorter (engl. <i>t-complex distorter</i>)
<i>Tcr</i>	<i>t</i> -Komplex Responder (engl. <i>t-complex responder</i>)
TE	Tris-EDTA Puffer
TEA	Triethanolaminpuffer
Template	DNA-Amplifikationsvorlage für eine PCR
<i>trans</i>	<i>lat.</i> auf der anderen Seite; bezogen auf DNA, Chromosom oder Zelle
TRD	Abweichung von der Mendelschen Vererbung (engl. <i>transmission ratio distortion</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
TTP	Thymintriphosphat
Tween 20	Handelsname für Emulgator Polysorbat 20
üN	über Nacht, d.h. ca. 16-18 h
<i>upstream</i>	stromaufwärts, vor dem 5'-Ende einer spezifischen Nukleinsäuresequenz gelegen
uAUG	Start-Codon mit der Sequenz AUG <i>upstream</i> des eigentlichen Translationsstarts in einem Transkript
uORF	kleiner, offener Leserahmen <i>upstream</i> der eigentlichen CDS in einem Transkript
UTP	Uraciltriphosphat
UTR	untranslatierte Region am 5' oder 3'- Ende einer mRNA
UV	ultraviolett
Vektor	Plasmid zur Fremd-DNA-Aufnahme
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Eine Ausnahme von der Regel bei der Maus

Johann Gregor Mendel gilt heute als Begründer der Klassischen Genetik und vor fast 150 Jahren zwischen 1856 und 1865 führte er Kreuzungsexperimente mit Erbsen durch (Weiling 1966). Die Ergebnisse fasste er in seinem Werk *Versuche über Pflanzen-Hybriden* in Form der Mendelschen Regeln der Vererbung von Merkmalen zusammen, die auch heute noch Gültigkeit für das Pflanzen- und Tierreich sowie den Menschen haben. Mit der Chromosomentheorie der Vererbung wurde 1904 von Sutton und Boveri postuliert, dass Erbanlagen an Chromosomen gebunden sind und sich in der Meiose beziehungsweise bei der Befruchtung den Mendelschen Regeln entsprechend verhalten (Baltzer 1963).

Säugetierzellen sind in der Regel diploid, das heißt, sie tragen einen doppelten Chromosomensatz (Cremer 1985). Wie Cremer zusammenfasst, wird für die Bildung von Geschlechtszellen, den Gameten, in der Meiose eine Reduktion des Chromosomensatzes durchgeführt. Die Segregation der ursprünglich väterlichen beziehungsweise mütterlichen Chromosomen auf die Gameten erfolgt dabei zufällig. Wenn eine Eizelle durch ein Spermium befruchtet wird, verschmelzen deren haploide Chromosomensätze und es entsteht wieder ein diploider Organismus.

Eine Ausnahme von diesen Gesetzmäßigkeiten findet man für einen großen, als *t*-Komplex bezeichneten Genkomplex auf Chromosom 17 bei der Maus (Lyttle 1993). Seine abweichende Formation, der *t*-Haplotyp, unterliegt der sogenannten *Transmission Ratio Distortion* (TRD), eine Form der nicht-Mendelschen Vererbung. Bei TRD handelt es sich um eine auch als *Meiotic Drive* (Silver 1993) bezeichnete Abweichung von der zweiten Mendelschen Regel der Vererbung, der Spaltungs- oder Segregationsregel (Lyttle 1993). Für gewöhnlich werden homologe Chromosomen beziehungsweise homologe Gene zufällig und in gleicher Häufigkeit auf die Geschlechtszellen verteilt. Manche Gene, Chromosomenabschnitte oder sogar ganze Chromosomen können dagegen, wie Lyttle 1991 feststellt, in den Gameten überproportional repräsentiert sein und infolgedessen werden diese auch überdurchschnittlich an die Nachkommen weitergegeben. Man kann zwischen chromosomalem und genischem *Drive* unterscheiden, je nachdem auf welcher Ebene das Phänomen ansetzt (Lyttle 1991). Lyttles Ausführungen nach tritt der chromosomale *Drive* häufig im weiblichen Organismus auf, wo Chromosomen unter anderem aufgrund ihrer Lokalisation in der Zelle oder aufgrund struktureller Eigenschaften mit Hilfe des Spindelapparates bevorzugt in die Eizelle und nicht in die Polkörperchen gelangen. Dagegen ist der genische *Drive* meist auf das männliche Geschlecht beschränkt, bei dem sich in der Meiose die aus einer Ausgangszelle hervorgehenden Gameten gleichwertig zu befruchtungsfähigen Sper-

mien entwickeln. Durch eine Störung der Entwicklung derjenigen Gameten, die ein bestimmtes Gen nicht aufweisen, kann es zu deren Benachteiligung in der Befruchtung kommen (Lyttle 1991) und diese Grundzüge findet man auch beim *t*-Haplotyp der Maus wieder (Lyttle 1993).

1.2 Entdeckung des *t*-Haplotyps und seine genetischen Eigenschaften

1927 entdeckte Nadine Dobrovoskaia-Zavadskaia in ihren Untersuchungen zur Mutagenese durch Röntgenstrahlen ein mutiertes Gen bei der Maus und nannte es *Brachyury* oder kurz *T*, da es dominant vererbt zu Kurzschwanzigkeit führte (Korzh et al. 2001). Um weitere Allele dieses Gens zu finden, kreuzte sie *Brachyury*-Mäuse mit Wildmäusen und erhielt überraschenderweise auch Nachkommen ohne Schwanz. Schwanzlose Mäuse wiederum waren in der Lage Nachkommen sowohl mit kurzen als auch normalen Schwanzlängen zu erzeugen, woraus die Wissenschaftlerin schlussfolgerte, dass sie eine rezessive Mutationsvariante *t* von *Brachyury* gefunden hatte. Während der Genotyp *T/+* mit kurzem Schwanz und *T/t* mit Schwanzlosigkeit in Erscheinung traten, konnte sie bei heterozygoten *t/+* Mäusen eine normale Schwanzlänge beobachten. Offensichtlich hatte das rezessive Allel *t* allein den Phänotyp nicht ausgelöst, war aber in der Lage, diesen in Kombination mit *T* zu verstärken. Wurden nur schwanzlose *T/t* Mäuse untereinander verpaart, traten lediglich schwanzlose Nachkommen in Erscheinung und es konnte nachgewiesen werden, dass die Embryonen, die homozygot für *t* beziehungsweise *T* waren, bereits im Uterus verstarben (Chesley et al. 1936). In weiteren Kreuzungsexperimenten haben Chesley und Dunn zusätzlich ein Phänomen nicht-Mendelscher Vererbung im Zusammenhang mit *T/t* Männchen aufgedeckt. Wurden von ihnen *T/t* Männchen mit Wildtypweibchen verpaart, fiel bei der Analyse der Nachkommen auf, dass circa 85 % eine normale Schwanzlänge zeigten und nur 15 % einen verkürzten Schwanz aufwiesen, obwohl man entsprechend der Mendelschen Regeln ein ausgeglichenes Verhältnis erwartet hätte. *T/t* Weibchen dagegen vererbten beide Allele zu gleichen Anteilen an ihre Nachkommen (Chesley et al. 1936). Das Phänomen der nicht-Mendelschen Vererbung der heterozygoten Männchen war auf den *t*-Haplotyp zurückzuführen und wurde *Transmission Ratio Distortion* genannt (Bennett 1975). In Populationen von Wildmäusen entdeckte man verschiedene *t*-Allele mit rezessiven Letalitäts- beziehungsweise Sterilitätsmutationen und bei Homozygotie für bestimmte *t*-Haplotypen traten entweder Störungen in der Embryonalentwicklung oder Sterilität bei den Männchen auf (Bennett 1975). Der *t*-Komplex der Maus ist also eine chromosomale Region, die mit seiner Variation in Form des *t*-Haplotyps in verschiedenen Phänomenen wie Schwanzlängenausbildung, Embryonenletalität, Sterilität bei Männchen und nicht-Mendelscher Vererbung involviert ist.

Die *t*-Komplex-Region befindet sich auf dem Chromosom 17 der Maus und es handelt sich um einen nahe dem Zentromer gelegenen, in etwa 20 cM umfassenden Abschnitt, der circa ein Drittel des Chromosoms einnimmt und eine Vielzahl von Genen aufweist (Planchart et al. 2000). Aufgrund von vier großen Inversionen In(17)1-4 innerhalb

des *t*-Haplotyps im Vergleich zum Wildtypchromosom findet in dieser Region unter natürlichen Bedingungen relativ selten Rekombination statt (Artzt et al. 1982; Herrmann et al. 1986; Hammer et al. 1989). In Labormauszuchten konnten diese seltenen Rekombinationen jedoch auftreten, die zur Entstehung der sogenannten partiellen *t*-Haplotypen führten (Silver 1985). Partielle *t*-Haplotypen besitzen Teilbereiche des *t*-Haplotyps und waren bedeutsam in der Aufklärung der Funktion und des Aufbaus des kompletten *t*-Haplotyps. Wies eine Mauslinie den proximalen Teil des *t*-Haplotyps auf, traten weiterhin *T*-assoziierte Effekte bezüglich der Schwanzlänge auf, Phänomene wie Letalität der Embryonen und Sterilität der Männchen waren dagegen nicht mehr nachweisbar (Lyon et al. 1977). Eine Mauslinie mit distalen Anteilen des *t*-Haplotyps verhielt sich phänotypisch genau anders herum. Bei beiden Linien war TRD gänzlich ausgeschaltet, hierbei schien es sich also um ein von mehreren Genen abhängigen Mechanismus zu handeln, die über den gesamten *t*-Haplotyp verteilt sind (Lyon et al. 1964).

Verpaarungsexperimente mit partiellen *t*-Haplotypen veranlassten Lyon schließlich zu der Theorie, dass TRD durch ein Zusammenspiel von funktionellen Untereinheiten, einem Responder und verschiedenen Distortern, in der Spermatogenese verursacht wird und damit dem *Segregation Distortion*-System der Fruchtfliege ähnelt (Lyon 1984). Liegt der Responder des *t*-Haplotyps, der *t-complex responder* (*Tcr*), entsprechend dieser Theorie heterozygot vor, wirken mehrere *t-complex distorter* (*Tcd*) in *trans* auf diesen und führen zu einer erhöhten Verbungsrate des respondertragenden Chromosoms. Bisher konnten vier verschiedene Distorter-Loci *Tcd1-4* identifiziert werden, sie wirken additiv, das heißt, je mehr Distorter vorhanden sind, desto höher ist schließlich die Vererbungsrate für das respondertragende Chromosom in der Nachkommenschaft und erreicht ihr Maximum, wenn der komplette *t*-Haplotyp heterozygot vorliegt (Lyon 1984).

Nach Lyon's Ansicht ist innerhalb eines kompletten *t*-Haplotyps die Responderregion zentral lokalisiert und proximal (*Tcd1/Tcd4*) sowie distal (*Tcd2/Tcd3*) von Distorter-Loci flankiert. Mauslinien mit partiellen *t*-Haplotypen weisen nur Teilbereiche des kompletten *t*-Haplotyps auf und erhielten zur Unterscheidung entsprechende Bezeichnungen (Lyon 1984). Beispielsweise besitzt die Linie mit dem partiellen *t*-Haplotyp $t^{h51}/+$ nur die Distorter-Loci eins und vier, während bei der Linie $t^{h18}/+$ lediglich *Tcd2* und *Tcd3* vorliegen. Eine Kombination aus beiden Linien resultiert im partiellen *t*-Haplotyp $t^{h51}t^{h18}/+$, dem im Vergleich zum kompletten *t*-Haplotyp nur noch die Responderregion fehlt. Das alleinige Vorhandensein von Distortern oder sogar ihre Homozygotie ist dabei in der Regel mit Befruchtungsproblemen oder Sterilität der Männchen assoziiert (Lyon 1984; Lyon 1986). Der Responder allein führt dagegen zu einer Verringerung der Vererbungsrate des respondertragenden Chromosoms auf circa 20% der Nachkommen, ein Phänomen, das bereits 1984 von Lyon als *t-low* Effekt bezeichnet wurde und namensgebend für diesen partiellen *t*-Haplotyp war.

1.2.1 Wirkung des *t*-Haplotyps auf Spermien

Bei den Untersuchungen des *t*-Haplotyps kristallisierte sich immer stärker heraus, dass die Spermien in heterozygoten *t/+* Männchen beeinflusst werden, wobei man anfänglich glaubte, dass *t*-Spermien und *+*-Spermien zu unterschiedlichen Anteilen in einem heterozygoten Männchen gebildet werden (Silver 1985). Eine höhere Zahl an *t*-Spermien würde unweigerlich in einem Vorteil in der Befruchtung resultieren, Silver konnte jedoch zeigen, dass die Spermatogenese in *t/+* Männchen normal verläuft und nur 50 % der Spermien das *t*-Chromosom tragen, das heißt, die Überlegenheit der *t*-Spermien entwickelte sich auf einer anderen Ebene (Silver et al. 1984).

Von Olds-Clarke und Peitz wurden künstliche Befruchtungsexperimente durchgeführt, bei denen Sperma von *t/+* und *+/+* Männchen zu gleichen Teilen gemischt eingesetzt wurde (Olds-Clarke et al. 1985). Anscheinend waren *t*-Spermien den Wildtypspermien von *+/+*-Männchen nicht überlegen, denn in diesen Experimenten sank die Transmission von *t* in der Nachkommenschaft von 95 % auf 22 %. Der Vorteil von *t*-Spermien schien nur auf die *+*-Spermien des *t/+* Männchens beschränkt zu sein, eine Überlegung, die von Mary Lyons Theorie, dass TRD Folge eines Zusammenspiels von Distortern und einem Responder sei, gestützt wurde (Lyon 1984). Demnach wird der negative Einfluss von mehreren Distortern auf die Spermienmotilität aller Spermien vom Responder überwunden, da er allerdings in *cis* wirkt, profitieren nur die *t*-Spermien von diesem Effekt und sind mit höherer Wahrscheinlichkeit in der Befruchtung erfolgreich (Lyon 1986).

Erste Hinweise darauf gab es bereits 1979 durch Katz, der die Motilität von Spermien näher untersuchte und feststellte, dass zwei unterschiedliche Spermienpopulationen in einem für *t* heterozygoten Männchen zu finden sind (Katz et al. 1979). Auch Olds-Clarke und Johnson kamen bei diversen Experimenten über spezifische Fortbewegungsparameter von Spermien zu ähnlichen Erkenntnissen (Olds-Clarke et al. 1993). Zwar konnte von ihnen nicht gezeigt werden, dass definitiv die *+*-Spermien eines *t/+* Männchens gravierende Motilitätsdefizite aufweisen, aufgrund ihrer hohen Vererbungsrate bei der Befruchtung ist aber anzunehmen, dass *t*-Spermien die vergleichsweise bessere Motilität besitzen.

Erst in der Arbeitsgruppe um B.G. Herrmann wurde ein zelluläres Modell zur Expression des *t-complex responders* und der *t-complex distorter* während der Spermatogenese entwickelt (Véron et al. 2005). Demnach werden Distorter bereits relativ früh, nämlich in den diploiden Spermatozyten, exprimiert und im weiteren Verlauf der Meiose auf alle haploiden Zellen verteilt, wo sie einen negativen Einfluss auf deren Spermienmotilität haben. Die Respondergenprodukte sind dem Modell zufolge erst in runden Spermatiden exprimiert und ihre normalisierende Wirkung auf die Spermienmotilität bleibt auf die Zellen beschränkt, die das respondertragende Chromosom besitzen. Das Resultat sind zwei Spermienpopulationen mit unterschiedlicher Motilität, wobei die *t*-Spermien einen erheblichen Vorteil bei der Befruchtung haben und damit bevorzugt an die Nachkommen vererbt werden (Olds-Clarke 1997).

1.2.2 Molekulare Grundlagen von *Transmission Ratio Distortion*

Die ersten Hinweise auf die Beteiligung des Responder und der Distorter am Phänomen TRD in der Maus führten schließlich zu einem gesteigerten Interesse die molekularen Grundlagen des *t*-Haplotyps aufzuklären, um dessen Wirkungsprinzipien besser zu verstehen. Das Wissen sollte die Grundlage dafür bilden, ähnliche Mechanismen bei anderen Genen in der Maus oder in anderen Spezies aufdecken zu können beziehungsweise diese eventuell auch gezielt zur Manipulation von Vererbungsraten einsetzen zu können. In ersten Untersuchungen wurde zunächst dargelegt, dass mehrere Inversionen, die sich über den gesamten *t*-Haplotyp erstreckten, dazu geführt haben, dass Rekombinationsprozesse mit dem Wildtypallel ausblieben und der *t*-Haplotyp immer als Ganzes an seine Nachkommen weitervererbt wird (Artzt et al. 1982; Herrmann et al. 1986; Hammer et al. 1989). Darüber hinaus wurden viele Anstrengungen unternommen, die von Mary Lyon theoretisch postulierten Responder und Distorter zu identifizieren, um ihre Rolle in TRD genauer untersuchen und verstehen zu können.

Durch positionelle Klonierung konnte 1999 schließlich *Smok1^{Tcr}* als der *t*-Komplex Responder identifiziert werden, ein Mitglied der neu entdeckten Genfamilie von Serin-/Threoninkinasen, den sogenannten Spermienmotilitätskinasen *Smok* (Herrmann et al. 1999). Bei dem in der *Tcr*-Region lokalisierten *Smok1^{Tcr}*-Gen handelt sich um ein Fusion aus dem *Smok*- und *Ribosome S6 Kinase (Rsk)*-Gen. Das Respondergen setzt sich demnach aus zwei Exons von *Smok* sowie 15 *Rsk*-Exons zusammen. Als proteincodierende Region dient lediglich das zweite *Smok*-Exon, während die *Rsk*-Exons als 3'-untranslatierte Region vorliegen. Bei näherer Betrachtung fiel Herrmann und seinen Mitarbeitern zudem auf, dass die Aminosäuresequenz sich zum Teil deutlich von anderen *Smok*-Familienmitgliedern unterscheidet und die Kinaseaktivität *in vitro* auf etwa ein Zehntel der Wildtypvariante *Smok1* reduziert ist, sie also vermutlich dominant-negativ wirkt. In Transmissionsexperimenten wurde von Herrmann und anderen schließlich bewiesen, dass es sich bei *Smok1^{Tcr}* tatsächlich um den an TRD beteiligten Responder handelt. Auf *Smok1^{Tcr}* basierende, transgene Konstrukte wurden zu diesem Zweck kloniert und daraus transgene Mauslinien generiert. Diese wurden mit partiellen *t*-Haplotyp-Linien gekreuzt und anschließend in Verpaarungstests die Transmissionsrate des Transgens untersucht. In der Tat war *Smok1^{Tcr}* in der Lage eine Verschiebung der Vererbung deutlich über 50% auszulösen und in einem Fall war das transgene Konstrukt sogar zufällig auf dem Y-Chromosom integriert und verursachte eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses in der Nachkommenschaft zugunsten der Männchen. Durch diese Experimente wurde außerdem gezeigt, dass der Responder nicht zwingend auf dem Chromosom 17 liegen muss, um mit den Distortern zusammen TRD auszulösen. Des Weiteren konnte mit der Entdeckung dieses an TRD beteiligten Faktors bei *in situ* Hybridisierung sowie *Northern Blot* demonstriert werden, dass *Smok1^{Tcr}* ein im Hoden, in den haploiden Spermatischen transkribiertes Gen ist. Herrmann's Modell zufolge sind Wildtyp-*Smok1* und *Smok1^{Tcr}* in einer Zelle coexprimiert. Während *Smok1* wahrscheinlich durch die Distorter überaktiviert wird und dies in abnormaler Spermienmotilität aller Spermien resultiert, kann *Smok1^{Tcr}* diesen Mechanismus

in *t*-Spermien kompensieren und zur Normalisierung ihrer Fortbewegung führen. Die Regulierung der Spermienmotilität erfolgt durch verschiedene Signalkaskaden und es lag nahe anzunehmen, dass auch Distorter darin eine Rolle spielen. Die Identifizierung von Distortern stellte sich allerdings als deutlich schwieriger heraus, da sie im Gegensatz zum Responder auf verhältnismäßig großen, mehrere Megabasen umfassenden Regionen lokalisiert sind. Um die Suche zielorientierter zu gestalten wurden in der Arbeitsgruppe um Bauer 2005 Kriterien erstellt, die ein Distorter-kandidat erfüllen sollte, um in den Fokus von Untersuchungen gelangen zu können (Bauer et al. 2005). Die wichtigste Eigenschaft eines Distorters ist demnach seine Lokalisation auf Chromosom17 in der *t*-Komplex-Region. Darüber hinaus sollte er im Hoden exprimiert sein, wo er in Regulationswegen der Spermienmotilität involviert ist, und außerdem sollten zwischen Wildtyp- und *t*-Allel molekulare Unterschiede bestehen (Bauer et al. 2005).

Als erster Distorter wurde schließlich das Gen *T-cell activation Rho GTPase-activating protein (Tagap1)* identifiziert (Bauer et al. 2005). Es handelt sich dieser Entdeckung nach um ein Gen, das in der Distorterregion *Tcd1* lokalisiert ist, im Hoden exprimiert wird und Unterschiede zum Wildtypallel aufweist. Das *Tagap1*-Gen kodiert ein Rho-GTPase aktivierendes Protein, das ein wichtiger Bestandteil in Rho-Signalwegen darstellt. Der *t*-Haplotyp enthält in der *Tcd1a*-Region vier Kopien für *Tagap1*, während der Wildtyp nur eine aufweist. Bauer und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Überexpression des Wildtypallels von *Tagap1* in transgenen Männchen zur Steigerung der Transmissionsrate eines *Smok1^{Tcr}* aufweisenden, partiellen *t*-Haplotyps ohne *Tcd1*-Region führt, während ein *Knock-out* von *Tagap1* die Transmission des *t*-Chromosoms reduzierte. Auf dem *t*-Haplotyp liegt das *Tagap1*-Gen mit seinen vier Kopien somit hypermorph vor und unterscheidet sich zudem vom Wildtypallel durch zahlreiche Nukleotidabweichungen. Außerdem ist das Gen in diploiden Spermatozyten exprimiert und die Genprodukte werden auf alle Spermien verteilt, während diese sich in der Spermatogenese als Synzytium gemeinsam entwickeln (Bauer et al. 2005).

Mit *Tagap1* war zum ersten mal eine Verbindung zwischen TRD und Rho-Signalwegen hergestellt und dies führte unweigerlich zur Identifizierung eines weiteren Distorters, *Faciogenital dysplasia 2 (Fgd2)*, der sich in der *Tcd2*-Region befindet und einen *Guanin nucleotid exchange Faktor (GEF)* codiert, der auch Rho G-Proteine beeinflusst (Bauer et al. 2007). Die Arbeitsgruppe um Bauer konnte zeigen, dass das Gen sowohl im Wildtyp als auch *t*-Haplotyp exprimiert ist und sich diese nur geringfügig in einer Aminosäure unterscheiden. Auch *Fgd2* ist wie *Tagap1* in diploiden Spermatozyten des Hodens zu finden, mit den entsprechenden Folgen für die Verteilung der Genprodukte in allen Zellen der Spermatogenese. *Fgd2* hat, wie Bauer und seine Mitarbeiter postulieren, zwei Transkriptionsvarianten, eine kurze, inhibierende und eine lange, aktivierende Form. In heterozygoten Männchen *t/+* wurde von ihnen eine erhöhte Expression der aktivierenden Transkriptionsvariante im Vergleich zum Wildtyp verzeichnet, das *t*-Allel von *Fgd2* ist also als hypermorph zu bezeichnen. Analog zu *Tagap1* wurden *Fgd2-Knock-out* Mäuse generiert, mit partiellen *t*-Haplotyp-Mäusen verpaart und die Vererbungsrate des *t*-Chromosoms untersucht (Bauer et al. 2007). Die Transmission des *t*-Chromosoms reduzierte sich in diesem Experiment und man schlussfolgerte, dass der *Knock-Out* des Wildtyp-

allels die Wirkung des *t*-Allels von *Fgd2* phänokopiert, also ein zweiter Distorter gefunden war. Die Entdeckung dieser beiden ersten Distorter zeigte außerdem, dass zwei unterschiedliche Rho-Signalkaskaden die Spermienmotilität beeinflussen. Während *Tagap1* als Inhibitor einer inhibierenden Rho-Signalkaskade wirkt, ist *Fgd2* ein Aktivator einer aktivierenden Rho-Signalkaskade (Bauer et al. 2007). Beide Wege resultieren schließlich in einer gesteigerten Smok1-Aktivität und führen somit in Spermien zu abnormer Flagellenbewegung. Erst die inhibierende Wirkung des Responders in *t*-Spermien auf diese Smok1-Aktivierung führt zu einer Normalisierung der Motilität, allerdings nur in *t*-Spermien (Bauer et al. 2007).

Ein weiterer Distorter der *Tcd2*-Region, der auf G-Protein assoziierte Signalwege Einfluss nimmt, wurde erst vor kurzem publiziert (Bauer et al. 2012). Demnach ist ein Mitglied der Nukleosiddiphosphat-Kinasefamilie, *Nme3*, in frühen Spermatogenesestadien, in den diploiden Spermatozyten, exprimiert. Wildtyp- und *t*-Allel von *Nme3* unterscheiden sich in Nukleotid- und Aminosäuresequenz, ihre Expressionslevel sind zwar vergleichbar, aber es gab Hinweise darauf, dass die *t*-Form eine verringerte Kinaseaktivität besitzt. Im Gegensatz zu den ersten beiden Distortergenen bezeichnet Bauer's Arbeitsgruppe die *t*-Form von *Nme3* als hypomorph. So führte bei ihnen ein Ausschalten der Wildtyp-*Nme3*-Expression in einem Transmissionstest zur Steigerung der Vererbungsrate eines *t*-Haplotyps, während diese durch eine Überexpression der *t*-Variante verringert wird. Das *t*-Allel von *Nme3* wirkte demzufolge als Distorter und beeinflusste ebenfalls Rho-Signalkaskaden, die in der Regulation der Spermienmotilitätskinase Smok1 eine wichtige Rolle spielen, allerdings konnte von Bauer und seinen Mitarbeitern noch nicht genau geklärt werden, ob *Nme3* eher in den aktivierenden oder inhibierenden Regulationsweg eingreift.

1.3 Genexpression im Hoden während der Spermatogenese

1.3.1 Spermatogenese unter Berücksichtigung der Verhältnisse in der Maus

Die Spermatogenese ist ein komplexer, in den Samenkanälchen des Hodens stattfindender Prozess, der sich in eine proliferative, eine meiotische und eine Differenzierungsphase gliedert und bei dem sich aus diploiden Stammzellen die befruchtungsfähigen, männlichen Keimzellen entwickeln (Hess 1999).

Die paarig angelegten, männlichen Gonaden, die Hoden, sind von einer derben Bindegewebshülle (*Tunica albuginea*) umgeben und in ihrem Inneren durch bindegewebige Scheidewände, den Septen, in kleine Hodenläppchen (*Lobuli testis*) unterteilt, in denen sich die vielfach gewundenen Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi contorti*) befinden, welche über ein verzweigtes System von Ausführungsgängen des Hodennetzes (*Rete testis*) in den Nebenhoden (*Epididymis*) münden (Foley 2001). Wie Foley weiterhin ausführt, befindet sich in diesen Hodenkanälchen das Keimepithel, ein Gewebe bestehend aus Keimzellen beziehungsweise deren Vorstufen

und den Sertoli-Stützzellen, während zwischen den Hodenkanälchen die sogenannten Leydig-Zwischenzellen liegen, die durch Produktion von Testosteron an der hormonellen Regulation der Spermatogenese beteiligt sind. Wenn sich die Keimzellvorstufen zu Spermien entwickeln, sind sie entsprechend ihres Entwicklungsstadiums zirkulär um das Tubulushumen in den Sertoli-Stützzellen eingebettet, die wiederum durch dichte Zellkontakte untereinander die Blut-Hoden-Schranke bilden und an der Versorgung der Keimzellen beteiligt sind (Foley 2001; Russell et al. 1993). In einem Tubulusquerschnitt liegt somit die Stammzellpopulation aus Spermatogonien peripher, nahe der Basalmembran und in Richtung Lumen kann man aufeinanderfolgend diploide Spermatozyten, haploide Spermatozyten sowie im Lumen die ausdifferenzierten Spermien (auch Spermatozoen) vorfinden, wobei je nach Zellzyklus histologisch zwölf verschiedene Spermatogenesestadien bei der Maus unterschieden werden können (Hess et al. 2008).

Die Spermatogenese beginnt mit einer Proliferationsphase der diploiden Spermatogonien, wobei ein Teil von ihnen mehrere mitotische Zellteilungen vollzieht und man aufgrund ihrer histologischen Morphologie Spermatogonien Typ A, intermediäre Spermatogonien sowie Typ B-Spermatogonien unterscheiden kann (Hess et al. 2008). Währenddessen verbleiben andere Spermatogonien weiterhin im Stammzellstadium und teilen sich zum Erhalt der Stammzellpopulation bei der Maus nur alle sechs bis acht Tage (Cooke et al. 2002). Nach ungefähr sechs Tagen ist die Spermatogonienproliferation bei der Maus abgeschlossen und unterdessen haben die Zellen sechs Zyklen mitotischer Teilungen durchlaufen und die Spermatogonien des Typs B entwickeln sich zu primären Spermatozyten, die in die Prophase I der ersten meiotischen Teilung eintreten (Clermont 1972). Diese Phase beansprucht bei der Maus fast zwei Wochen und die Zelle ist während dieser Zeit besonders empfindlich gegenüber äußeren, mutagenen Einflüssen (Hess et al. 2008). In der präleptotänen Phase erfolgt die letzte DNA-Replikation der Spermatogenese und in den anschließenden Stadien Leptotän, Zygotän und Pachytän kommt es zur Paarungen der homologen Chromosomen und Rekombination findet statt (Hess 1999). Wie Hess 1999 beschreibt, entstehen in der ersten Reifeteilung aus einem primären Spermatozyt zwei haploide, sekundäre Spermatozyten und nach einer kurzen Interkinese von wenigen Stunden vollziehen diese die zweite Reifeteilung, so dass letztendlich vier haploide Spermatozyten entstehen, die nun in der Nähe des Lumens der Samenkanälchen liegen. Während des gesamten Entwicklungsprozesses sind die Keimzellen aufgrund unvollständiger Zytokinese durch zytoplasmatische Brücken miteinander verbunden und dieses Synzytium ermöglicht dabei den Austausch beispielsweise von Genprodukten untereinander, was die Grundlage für eine synchrone Entwicklung bildet (Fawcett et al. 1959; Braun et al. 1989).

In der letzten Phase der Spermatogenese, der sogenannten Spermiogenese, treten erhebliche morphologische Umgestaltungsprozesse auf, in deren Verlauf aus den runden Spermatozyten hochdifferenzierte Spermien entstehen, die bei der Maus einen charakteristischen, hackförmigen Spermienkopf besitzen (Hess et al. 2008; Hess 1999). Diesen Vorgang gliedern Hess und andere in verschiedene Phasen, die mit einer zunehmenden Kondensation und Verdichtung der DNA, der Reduktion des Zytoplasmas und der Bildung des Akrosoms sowie der Ausdifferenzierung des Flagellums einhergehen. Bei der Maus dauert diese Differenzierung der Spermatozyten laut Adler unge-

fähr neun Tage, dann erfolgt die Semination, das heißt die Abgabe der Spermien ins Lumen des Samenkanälchens und der Transport zum Nebenhoden (Epididymis), in dem sie zu befruchtungsfähigen Spermien heranreifen (Adler 1996). Die Spermatogenese bei der Maus erstreckt sich demzufolge von den Spermatogonienproliferation bis hin zur Reifung der Spermien im Nebenhoden über insgesamt 35 Tage (Adler 1996; Oakberg 1956).

1.3.2 Translationelle Regulation in der Spermatogenese

Aufgrund der besonderen Morphologie von Spermien, die vor allem dem zügigen und erfolgreichen Transport des genetischen Materials im weiblichen Genitaltrakt zur Eizelle dient, liegt in ihnen die DNA als stark kondensiertes Chromatin im Spermienkopf vor (Abu Hassan Abu et al. 2012). Bereits in den runden Spermatiden beginnt dieser Kondensationsprozess, der mit dem Austausch der Histone gegen vorübergehend vorliegende Transitionsproteine und schließlich gegen Protamine einhergeht (Balhorn 2007; Govin et al. 2004). Die DNA ist dann so dicht gepackt, dass sie in den späteren Spermatogenesestadien stetig unzugänglicher für den Transkriptionsapparat wird und in elongierten Spermatiden fast keine Transkription mehr statt findet (Eddy 1998; Sassone-Corsi 1997). Die für eine Differenzierung und Reifung der elongierten Spermien benötigten Proteine werden deshalb bereits in prä- und postmeiotischen Zellstadien der Spermatogenese transkribiert und gespeichert und ihre Translation erfolgt unter Umständen erst mehrere Tage später, wenn die Proteine wirklich gebraucht werden (Kierszenbaum et al. 1978). Deshalb gibt es im Hoden eine Vielzahl von translationellen Regulationsmechanismen, die eine Proteinsynthese bis zu einem definierten Zeitpunkt hinauszögern und obwohl diese ein weit verbreitetes Mittel der Genregulation und -expression in eukaryotischen Zellen sind, nehmen sie im Hoden aufgrund der besonderen Umstände in der Spermatogenese einen hohen Stellenwert ein (Kleene 2003).

Die meisten Untersuchungen bezüglich translationeller Regulationsmechanismen konzentrieren sich dabei auf Gene, die an der Spermatogenese oder Spermiogenese beteiligt sind (Eddy 1998), in zunehmenden Maße wird der Fokus aber auch auf genetische Elemente gelegt, die den Reproduktionserfolg beeinflussen. Man nimmt an, dass bei der Expression egoistischer Gene, die wie der *t*-Haplotyp eine abnorme Vererbungsrate verursachen, ähnliche, translationelle Regulationsmechanismen vorliegen, wie sie bei anderen, im Hoden exprimierten Genen bereits aufgedeckt werden konnten (Kleene 2003; Kleene 2005).

1.3.3 Allgemeiner Aufbau von mRNA

Ein wichtiger Aspekt in translationellen Kontrollmechanismen ist der Aufbau von Transkripten, der mRNA, selbst. Während beziehungsweise direkt nach der Transkription im Zellkern beginnt die Prozessierung der Vorläufertranskripte oder sogenannten prä-mRNA, die als Voraussetzung für eine erfolgreiche Translation im Zytosol gilt (Fasken et al. 2005). Hierzu zählt die Bildung einer Struktur am 5'-

Ende der RNA, das m⁷G-Cap, ein methyliertes Guanin-Nukleotid, welches zunächst zum Schutz vor hydrolytischem Abbau durch die Vielzahl von allgegenwärtigen Ribonukleasen in der Zelle vorhanden ist und somit zur Stabilität von Transkripten beiträgt (Kapp et al. 2004). Außerdem übernimmt diese Kappe eine wichtige Funktion beim Transport aus dem Zellkern sowie in der Translation (Varani 1997). Wie Varani beschreibt, bindet der nukleäre Cap-Binding-Proteinkomplex an die Schutzkappe und vermittelt über die Kernporen den Transport ins Zytosol. Dort wird die m⁷G-Cap von Initiationsproteinen und der 40S Ribosomenuntereinheit erkannt, gebunden und so das cap-abhängige *Scanning*, also die Suche nach dem Start-Codon für die Translation, eingeleitet.

Ein weiterer, wichtiger Prozessierungsschritt von prä-mRNA ist das Spleißen (Sharp 2005). Wie Sharp beschreibt, werden dabei nicht-codierende Abschnitte, die Introns, aus der prä-mRNA entfernt und proteincodierende Exons zusammengefügt. Dieser Prozess kann für ein und dasselbe Transkript unterschiedlich erfolgen, so dass eine prä-mRNA durch dieses sogenannte alternative Spleißen für verschieden Proteine codieren kann, ein Genregulationsprozess der auch im Hoden eine wichtige Rolle spielt (Elliott et al. 2006).

Außerdem wird das 3'-Ende der mRNA von Eukaryoten, wie von Guhaniyogi und Brewer 2001 besprochen, mit einer schützenden Struktur versehen, dem Poly(A)-Schwanz. Dem Transkript werden ausgelöst durch das Polyadenylierungssignal in der DNA-Sequenz bis zu mehrere hundert Adenin-Nukleotide angehängt, deren Hauptfunktion der Schutz vor Degradation durch RNasen darstellt (Guhaniyogi et al. 2001). Darüber hinaus wird der Poly(A)-Schwanz von einem Protein gebunden, welches wiederum dem Transport der mRNA aus dem Zellkern dient und dieses sogenannte Poly(A)-bindende Protein (PABP) vermittelt mit den Initiationsfaktoren zusammen die Bindung der 40S Ribosomenuntereinheit an die 5'-Schutzkappe, das heißt, der Poly(A)-Schwanz ist auch wichtig für den Beginn der Translation (Fabian et al. 2010).

1.3.4 Regulationsmechanismen in der 5'- und 3'-untranslatierten Region

Teilabschnitte einer Transkripts können selbstregulatorisch auf den Zeitpunkt der eigenen Proteinsynthese einwirken, wobei sich diese in der Regel vor dem Start- und hinter dem Stop-Codon in einer mRNA befinden und als 5'- beziehungsweise 3'-untranslatierte Region bezeichnet werden (Mignone et al. 2002). Prinzipiell kann man in diesen Regionen *cis*-regulatorische Elemente, also spezifische Sequenzabschnitte, finden, die mit *trans*-regulatorischen Faktoren, wie Proteinen oder kleinen Nukleinsäuren, agieren und so Einfluss auf die Translationseffizienz, mRNA-Lokalisation und Transkriptstabilität haben (Velden et al. 1999; Jansen 2001; Bashirullah et al. 2001).

RNA-bindende Proteine In den UTRs von Transkripten können verschiedene Sequenzen, insbesondere AU-reiche Abschnitte, als Bindungsstellen für *trans*-regula-

torische Faktoren, die RNA-bindenden Proteine (RBP), dienen (Hieronymus et al. 2004). RBPs sind dabei eine sehr vielfältige Proteinklasse, die mit unterschiedlichsten Mechanismen mehr oder weniger spezifisch an mRNA binden und eine zentrale Rolle in der Translationskontrolle einnehmen (Glisovic et al. 2008). Vor allem im Hoden sind RBPs stark exprimiert und zum Teil sogar testisspezifisch (Paronetto et al. 2010). Beispielsweise ist das *Testis-brain RNA-binding* Protein ein RBP, das an die 3'-UTR von Protamintranskripten in haploiden Spermatisiden bindet und so die Translation etwa eine Woche bis zum Stadium der elongierten Spermien unterbindet (Fajardo et al. 1994). Y-Box Proteine sind dagegen eher unspezifische, aber im hohen Maße auch im Hoden vertretene RBPs, in deren Anwesenheit generell translationelle Repression zu verzeichnen ist (Tafuri et al. 1993). Zur Aktivierung der Translation werden RBPs unter anderem phosphoryliert oder dephosphoryliert, woraufhin sie ihre mRNA-Affinität verlieren und das Transkript für den Translationsapparat zugänglich wird (Kleene 2003).

Ein weiterer, gut untersuchter, *trans*-regulatorischer Faktor ist auch das RBP Bruno. Dieses Protein bindet bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* die 3'-UTR von *oskar*-mRNA in einer spezifischen Sequenz, dem Bruno Response Element (BRE), wodurch die Translation von *oskar*-Transkripten reprimiert wird und somit die Embryonalentwicklung des Abdomens und der Keimbahn dieser Spezies gewährleistet wird (Kim-Ha et al. 1995). Auch in der Maus werden Proteine aus der Brunofamilie exprimiert und sie haben nachgewiesenermaßen eine wichtige Funktion in der Spermatogenese, da ihre Abwesenheit in *Knock-out*-Mäusen zur Reduktion der Spermien führen kann beziehungsweise deren Entwicklung erheblich einschränkt (Dev et al. 2007; Kress et al. 2007).

Sekundär- und Tertiärstrukturen von mRNA Auffällig ist, dass in Transkripten nicht nur die Bindungsstellen von RBPs Sekundär- oder Tertiärstrukturen ausweisen, sondern UTRs generell komplexe räumliche Anordnungen wie Haarnadelschleifen bilden, die eine Bindung des Transkriptionsapparates verhindern beziehungsweise das Ribosom in einer Art Warteposition gebunden halten und so die Suche nach dem Start-Codon deutlich erschweren (Marzi et al. 2007). Das wohl bekannteste *cis*-regulatorische Element mit Haarnadelschleifenstruktur ist das *iron response* Element (IRE) in UTRs, welches in Abhängigkeit von Eisen durch Bindung eines *iron response*-Proteins die Cap-abhängige Translation diverser Transkripte hemmt (Hentze et al. 1996). Eine besonders stark verzweigte RNA-Struktur, die unmittelbar vor dem eigentlichen Translationsstart liegen kann und als interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) bezeichnet wird, findet man vor allem bei viralen aber auch bei eukaryotischen mRNAs und durch sie wird eine direkte Bindung der Ribosomen an das Transkript vermittelt sowie eine sofortige Translation unabhängig von Initiationsfaktoren und der 5'-Cap eingeleitet (Hellen et al. 2001).

Start-Codone in der UTR von Transkripten Vorrangig in der 5'-UTR kann ein gehäuftes Auftreten von kurzen, codierenden Sequenzen (uORFs) oder Start-Codonen (uAUGs) verzeichnet werden, die stromaufwärts, also *upstream*, des eigentlichen Start-Codons liegen und von Ribosomen fälschlicherweise als Translations-

start genutzt werden (Iacono et al. 2005). Wenn nun vor dem eigentlichen Start-Codon mit der Translation begonnen wird, werden Nonsens-Proteine synthetisiert, das Auffinden des richtigen Start-Codons verhindert und das Transkriptionslevel des eigentlichen Proteins niedrig gehalten (Mignone et al. 2002). Der richtige Translationsstart wird nur durch einen unspezifischen Suchvorgang der Ribosomen, dem sogenannten *leaky Scanning* der uAUGs, die nur in selteneren Fällen über die optimale Kozak-Sequenz des richtigen Start-Codons verfügen, oder durch Re-Initiation des *Scannings* stromabwärts der uORFs beziehungsweise uAUGs möglich (Kozak 2002). Die optimale Kozak-Sequenz gcc^accAUGg ist eine von Marilyn Kozak für Eukaryoten ermittelte Sequenzumgebung des Start-Codons (Kozak 1987), die bevorzugt zur Translationsinitiation führt, sie ist allerdings kein Garant dafür, dass die Proteinsynthese ausschließlich am richtigen Start-Codon erfolgt, da diese nur statistisch ermittelt wurde und insbesondere die Lagebeziehung zu 5'-Ende des Transkripts ebenfalls eine Rolle spielt (Kozak 1991). Auch im Hoden sind für diverse Transkripte uAUGs beziehungsweise uORFs als translationelle Regulationsmechanismen identifiziert worden (Steel et al. 1996), ob das Auftreten eines solchen zusätzlichen Translationsstarts in der 5'-UTR einer mRNA auch wirklich repressive Eigenschaften auf die Translation des eigentlichen Proteins hat, muss allerdings für jedes Gen spezifisch untersucht werden (Kleene 2001; Kleene 2003).

Regulation durch microRNAs Die 3'-UTR hat ebenfalls eine Vielzahl für sie spezifische Regulationsmechanismen, die sich auf die Translation hemmend auswirken können, denn neben den Bindungsstellen für RBPs findet man hier recht häufig kurze Sequenzabschnitte, die annähernd komplementär für kleine, circa 21-23 Nukleotide umfassende, Haarnadelstruktur bildende microRNAs sind, die zunächst für *Caenorhabditis elegans* identifiziert wurden, aber auch in vielen anderen Spezies anzutreffen sind (Lee et al. 1993). Werden die entsprechenden microRNAs in der Zelle exprimiert, können sie an die geeigneten mRNA-Sequenzen binden und meist in Kombination mit weiteren Proteinen, wie beispielsweise Argonaut oder GW182, den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) bilden, durch den sie die Translation verzögern (Eulalio et al. 2009; Peters et al. 2007). In Abhängigkeit von weiteren regulatorischen Elementen sowie der Exaktheit der Basenpaarung zwischen der microRNA und der mRNA wird ein Transkript dann entweder degradiert oder zumindest für den Translationsapparat unzugänglich in Ribonukleotidpartikeln aufbewahrt (Bartel et al. 2004; Valencia-Sanchez et al. 2006; Vasudevan 2012).

1.3.5 Translationelle Regulation durch die codierende Region

In der jüngeren Vergangenheit hat sich herausgestellt, dass nicht nur die untranslatierten Bereiche in der mRNA sondern auch die codierende Region eines Gens Einfluss auf die Translation und Transkriptstabilität nehmen kann, wengleich aufgrund der codierten Aminosäurenabfolge die Sequenz meist konserviert ist und weniger Variationen im Hinblick auf Regulationsmechanismen möglich sind (Grzybowska et al. 2001). Die Regulation kann laut Grzybowska und ihren Mitarbeitern auf zwei We-

gen erfolgen, das heißt, entweder interagiert ein *cis*-regulatorisches Element in der codierenden Region der mRNA mit RBPs oder ein Sequenzabschnitt dient als Bindungsstelle für komplementäre microRNAs. Vereinzelt konnten verschiedene Gene auch in Eukaryoten identifiziert werden, bei denen neben den herkömmlichen, durch UTRs vermittelten Regulationsmechanismen überraschender Weise auch Interaktionen mit der codierenden Region des Gens anzutreffen waren, die sich vor allem in einer Hemmung mitunter aber auch einer Förderung der Translationseffizienz äußern oder auf die Transkriptstabilität auszuwirken scheinen (Lee et al. 2011). Insbesondere für microRNAs werden, wie für Pflanzen allgemein schon bekannt (Millar et al. 2005), auch bei Eukaryoten vermehrt Bindungsstellen in der codierenden Region eines Transkripts vorhergesagt, die dort scheinbar auch regulatorische Funktionen übernehmen (Rigoutsos 2009). Mitunter ergibt sich sogar die Situation, dass eine Art Autoregulationsmechanismus vorliegt, also das Protein eines Gens durch Interaktion mit der codierenden Region der mRNA des selben Gens seine eigene Translation reguliert (Tai et al. 2004; Lin et al. 2000). Bei der Untersuchung von translationeller Regulation richtet sich der Fokus also auch auf die codierende Region der Gene, es bleibt allerdings abzuwarten, ob konservierte Mechanismen und Strukturen aufgedeckt werden, die auf der Suche nach weiteren, durch die codierende Region regulierten Genen behilflich sein könnten.

1.3.6 Transkriptlokalisierung im Hoden

Im Hoden liegen die Zellen aufgrund der unvollständigen, meiotischen Teilung als Synzytium vor, so dass sie in der Regel über Zellbrücken Genprodukte austauschen und sich so in ihrer weiteren Differenzierung miteinander synchronisieren (Fawcett et al. 1959; Braun et al. 1989). Dieser Austausch führt dazu, dass alle Spermien eines meiotischen Teilungsprozesses, obwohl sie nicht über das gleiche genetische Material verfügen, durch den Austausch von Transkripten beziehungsweise Proteinen phänotypisch identisch erscheinen (Braun et al. 1989). Neben Protamin, für das Braun bereits 1989 zeigen konnte, dass sich die Genprodukte gleichmäßig auf die Spermatiden verteilen, ist dieser Austausch vor allem für Gene des X- beziehungsweise Y-Chromosoms notwendig, um eine äquivalente Entwicklung aller Spermien zu gewährleisten (Hendriksen et al. 1995).

Transkripte, die der translationellen Regulation im Hoden unterliegen, findet man relativ oft akkumuliert in *Chromatoid Bodies*, die den *P-Bodies* somatischer Zellen ähneln (Kotaja et al. 2006; Nagamori et al. 2008; Kulkarni et al. 2010). *Chromatoid Bodies* sind im Phasenkontrastmikroskop sichtbare, intrazelluläre Partikel, die stark mit dem Zellkern assoziiert sind und bisweilen auch zwischen meiotischen Zellpartnern ausgetauscht werden (Parvinen 2005). Der aktive Austausch erfolgt dabei entlang von Mikrotubulistrukturen über die Zellbrücken (Ventelä et al. 2003). In *Chromatoid Bodies* sind unter anderem viele RBPs oder microRNAs in Form von RISCs vertreten, die selbst eine wichtige Rolle in der translationellen Repression von Transkripten haben (Kotaja et al. 2006), wobei allerdings noch nicht geklärt ist, ob sie auch den Austausch von Transkripten zwischen haploiden Zellen steuern oder gegebenenfalls unterbinden.

Generell erscheint es allerdings sinnvoll bereits das Transkript an einen bestimmten Ort in der Zelle zu lokalisieren, da der Transport der codierten Proteine vermutlich energetisch viel aufwendiger wäre und eine mRNA außerdem für mehrere Proteinsynthesen zur Verfügung stehen kann (St Johnston 1995). Die Lokalisation von Transkripten und damit des codierten Proteins ist dabei ein Mechanismus, der häufig anzutreffen ist, wenn eine Polarisation in sich entwickelnden Zellen stattfinden soll (Kislauskis et al. 1992). Die zu lokalisierende mRNA-Sequenz besitzt deshalb häufig Lokalisierungssignale wie *Zipcodes*, also *cis*-regulatorische Elemente in der 3'-UTR, seltener in der 5'-UTR oder codierenden Region, die von speziellen RBPs erkannt und gebunden werden und so den Transport mehrerer Transkripte in größeren Ribonukleotidpartikeln wie den *P-Bodies* in der Zelle vermitteln, wodurch die subzelluläre Lokalisation des Proteins und damit die polarisierte Entwicklung der Zelle erfolgt (Kislauskis et al. 1992; Martin et al. 2009). Unter Umständen findet auch gar kein aktiver Transport sondern nur die Verankerung des Transkripts an bestimmten Mikrotubulistrukturen statt (Chabanon et al. 2004). Während des Transports oder der Verankerung ist die Repression der Translation entscheidend, was durch weitere *trans*-regulatorische Faktoren oder direkt durch das *Zipcode*-bindende RBP erfolgen kann (Martin et al. 2009). Bisher untersuchte *Zipcodes* unterscheiden sich dabei sehr stark in Sequenz, Struktur, interagierendem Protein sowie vermittelten Lokalisationsmechanismus, was die Aufdeckung neuer Lokalisationssignale in Transkripten erschwert (Chabanon et al. 2004; Jambhekar et al. 2007).

1.3.7 Regulationsmechanismen des Respondergens *Smok1^{Tcr}*

Translationelle Regulation durch UTRs Die 5'-UTR von *Smok1^{Tcr}* ist 850 bp groß und in einer datenbankbasierten Sequenzanalyse durch RegRNA und UTRscan wurden drei verschiedene Elemente vorhergesagt, die regulatorisch auf die Translation wirken könnten (Véron 2008). Zum einen konnte so von Véron im letzten Drittel der 5'-UTR des Responders eine Sequenz mit hoch konservierter Basenabfolge UUUGUGUGUGUCUGUGUGUGUU identifiziert werden, die einem Bruno Response Element (BRE) ähnelt und als Bindungsstelle für RNA-bindende Proteine der Brunofamilie fungieren kann. Auch in der Maus sind einige Bruno-Proteine, wie *Cugbp1*, ubiquitär exprimiert und gebunden an ein BRE können sie zu einer translationellen Repression beitragen (Kress et al. 2007). Durch Bindung von Bruno an das BRE wird die Translation des Gens *oskar* bei der Fruchtfliege reprimiert und erst wenn sich die mRNA an der richtigen Lokalisation am posterioren Pol der Zelle befindet, erfolgt die Translation und damit die Ausbildung der Polarität in der Oozyte dieser Spezies (Kim-Ha et al. 1995).

Des weiteren konnten von Véron mit Hilfe der Datenbankvorhersage in der 5'-untranslatierten Region des Respondertranskripts drei potenzielle Bindungssequenzen für eine microRNA mir342 aufgedeckt werden, von denen zwei vor und eine nach der BRE-ähnlichen Sequenz lokalisiert sind (Véron 2008). Diese microRNA mir342 ist ebenfalls in der Maus in vielen Geweben, unter anderem auch dem Hoden, exprimiert (Yu et al. 2005) und es liegt die Vermutung nahe, dass sie eine translationelle Repression beziehungsweise auch spezifische Lokalisation der mRNA in *Chromatoid*

Bodies verursachen kann (Kim et al. 2004; Weber 2005).

Wie für 5'-UTRs recht typisch, sind vorwiegend in der ersten Hälfte der 5'-untranslatierten Region von *Smok1^{Tcr}* auch mehrere uAUGs identifiziert worden, die bekanntlich zu ineffizienter Translation führen können (Véron 2008). Außerdem ist in einer Mfold-datenbankgestützten Strukturvorhersage ebenfalls durch Véron gezeigt worden, dass die 5'-UTR von *Smok1^{Tcr}* neben den genannten *cis*-regulatorischen Elementen auch eine komplexe Sekundärstruktur ausbilden kann und sich somit die Möglichkeit ergibt, dass ein IRES vorliegt.

Aufgrund dieser Hinweise aus der Sequenzanalysen wurde die 5'-UTR von *Smok1^{Tcr}* Ziel umfangreicher Untersuchungen, um ihren Stellenwert in translationellen Regulationsmechanismen aufdecken zu können. Véron führte verschiedene *in vitro* Experimente durch, in denen Teile der 5'-UTR in Reporterkonstrukten enthalten beziehungsweise durch Deletion oder Mutation ausgeschaltet waren, um deren Einfluss auf das Expressionslevel von Transkript und Protein eines Reportergens zu untersuchen (Véron 2008). Grundsätzlich wurde die 5'-UTR in diesen Untersuchungen als Region identifiziert, die eine translationelle Regulation von *Smok1^{Tcr}* ausüben kann, da bei stabiler Transkriptexpression meist eine verhältnismäßig geringe Proteinsynthese im Vergleich zu Kontrollen in Zellkultur zu verzeichnen war. Die Zellkulturexperimente von Véron waren allerdings häufig keine adäquate Alternative zu den komplexen Verhältnissen in der Spermatogenese im Hoden, so dass einige Experimente *in vitro* nur eingeschränkte Resultate oder Hinweise liefern konnten.

Untersuchungen der 3'-UTR von *Smok1^{Tcr}* mit verschiedenen transgenen Konstrukten in der Maus zeigten bei Véron zunächst keine Hinweise auf Beteiligung an translationeller Regulation des Transkripts und Veränderungen in diesem Bereich hatten *in vivo* keinen Einfluss auf die Lokalisation des Transkripts noch den Zeitpunkt der Proteinsynthese (Véron 2008). In diesem Zusammenhang zeigten auch funktionelle Untersuchungen in einem Vererbungstest, dass scheinbar unabhängig von der 3'-UTR eine zelluläre Restriktion und translationelle Repression, wie sie für den Responder charakteristisch sind, erfolgen und schließlich sogar zu gesteigerter Transmission, also Vererbung des Transgens an die Nachkommen, führen.

Regulationsmechanismen der Kinase *Smok1^{Tcr}* Bei der Entdeckung des *t*-Komplex Responders wurde eine neue Genfamilie von Serin-/Threoninkinasen, die sogenannten Spermienmotilitätskinasen (*Smok*) zu denen auch *Smok1^{Tcr}* gehört, charakterisiert (Herrmann et al. 1999). Demnach ist das Respondergen *Smok1^{Tcr}* ein Fusionsgen für eine Kinase, die strukturelle Gemeinsamkeiten mit der Familie der *Microtubule affinity regulating*-Kinasen (MARK) aufweist. MAR-Kinasen sind an der Aufrechterhaltung des dynamischen Gleichgewichts von Mikrotubulistrukturen und sogar an mikrotubuliabhängigen Transportvorgängen in der Zelle beteiligt (Drewes et al. 1997; Mandelkow et al. 2004). Strukturell ist neben der katalytischen Domäne dieser Kinasen auch eine regulatorische Untereinheit, ein *loop*, von Bedeutung, der, wie die Arbeitsgruppe um Drewes 1997 ausführt, mit seiner phosphorylierungsabhängigen Konformation darüber bestimmt, ob das aktive Zentrum der Kinase für Substrate zugänglich ist und eine Phosphatübertragung auf die Hydroxyl-Gruppe der Seitenkette eines Serins beziehungsweise Threonis vollzogen wird, was zur Regulation des Zielproteins beiträgt.

Die Kinase Smok1^{Tcr} weist nicht nur Ähnlichkeiten im N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz mit MARK auf, man kann sie auch in eine katalytische und regulatorische Domäne gliedern (Herrmann et al. 1999). *In vitro* Experimente von Herrmann haben bereits gezeigt, dass die katalytische Domäne von Smok1^{Tcr} als Kinase funktionstüchtig ist, wenngleich ihre Aktivität deutlich schwächer ist als bei anderen Spermienmotilitätskinasen. Herrmann vermutete, dass dies durch das Fehlen einer wichtigen Autophosphorylierungsstelle, die für eine Aktivierung der Kinase von Bedeutung wäre, herbeigeführt wird. Außerdem zeigt Smok1^{Tcr} in der katalytischen Domäne einen Aminosäureaustausch im Vergleich zur Wildtypkinase, was ebenfalls zu der reduzierten Kinaseaktivität beizutragen scheint (Herrmann et al. 1999; Hanks et al. 1995). Inwiefern das Transkript mit regulatorischen Elementen bedeutsam für die haploidspezifische Lokalisation und translationellen Kontrolle ist, die zur Smok1^{Tcr} typischen Expression führen, wurde allerdings noch nicht geklärt.

2 Zielsetzung

Der *t*-Haplotyp, eine abweichende Form einer Region auf dem Chromosom 17 der Maus, wird von heterozygoten Männchen bevorzugt an die Nachkommen weitervererbt. Dieses auch als *Transmission Ratio Distortion* bekannte Phänomen nicht-Mendelscher Vererbung wird von mehreren Distortergenen und einem Respondergen hervorgerufen. Die in *trans* wirkenden Distorter haben während der Spermatogenese einen negativen Einfluss auf die Motilität aller Spermien, während der *cis*-aktive Responder diesen Effekt kompensiert, allerdings nur in den *t*-Haplotyp tragenden *t*-Spermien (Lyon 1984). Die haploidspezifische Expression des Responders, also die Restriktion seines Genproduktes auf die Hälfte der runden Spermatiden in der Spermatogenese widerspricht dabei dem allgemeinen Prinzip, dass Spermien zwar infolge der Meiose einen unterschiedlichen Genotyp besitzen, durch den regen Austausch an Genprodukten allerdings phänotypisch identisch sind (Fawcett et al. 1959; Braun et al. 1989). Somit bilden *t/+* Männchen zwei unterschiedliche Populationen von Spermien, von denen die *t*-Spermien den entscheidenden Motilitätsvorteil in der Befruchtung der Eizelle besitzen (Olds-Clarke et al. 1993), was in unerwartet hoher Vererbungsrate des *t*-Haplotyps resultiert.

Es wird vermutet, dass die außergewöhnliche Expression des Responders eine Folge posttranskriptioneller Regulation insbesondere der speziellen Transkriptlokalisation, mRNA-Stabilisierung und Translationsrepression ist und deshalb sollen in dieser Arbeit potentielle, regulatorische Elemente im Transkript dieses Gens mit Hilfe transgener Konstrukte im Mausmodell durch gezielte Deletionen identifiziert und durch Expressionsanalysen, das heißt durch *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie, im Hodengewebe charakterisiert werden. Dabei sollen Transgene, die lediglich Teilfragmente der 5'-untranslatierten Region enthalten, untersucht werden, da sich in dieser Region des Respondertranskripts in Datenbanken vorhergesagte, translationell regulatorische Elemente befinden (Véron 2008). Des weiteren sollen dieselben 5'-UTR-Deletionsfragmente in transgenen Konstrukten in Kombination mit der codierenden Region analysiert werden, um eine mögliche Beteiligung der codierenden Sequenz des Responders an seiner translationellen Regulation aufzudecken. Respondertransgene mit Deletionen in der codierenden Region sollen durch Expressionsanalysen sowie einem Transmissionstest ebenfalls dazu beitragen, die Bedeutung dieser Region am Phänomen TRD aufzuklären. Schließlich soll die Auswirkung des Austauschs des *Tcr*-Promoters in einem Respondertransgen in einer Expressionsanalyse charakterisiert werden. Damit für die Expressionsanalysen auf Transkript- und Proteinebene eine vergleichbare Ausgangssituation geschaffen wird, sollen die zu untersuchenden transgenen Mauslinien aus embryonalen Stammzellen generiert werden, die durch einen Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch das jeweilige Transgens spezifisch im *ColA1*-Locus integriert haben sollen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien, Geräte, Chemikalien

Die in dieser Arbeit erwähnten, allgemein verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität pro Analysis (p.a.) eingesetzt. Speziell zusammengesetzte Chemikalien sowie verwendete Lösungen und Puffer sind mit ihrer Zusammensetzung unter 3.1.1 aufgelistet und sofern nicht anders erwähnt, erfolgte die Herstellung mit deionisiertem Wasser. Alle verwendeten Materialien und Chemikalien wurden aus dem Fachhandel bezogen, insbesondere von Fa. Merck KGaA (Darmstadt), Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg), Fa. Life Technologies GmbH (Darmstadt) und Fa. Thermo Fischer Scientific GmbH (Schwerte), bei Abweichungen davon sind im Einzelfall Hersteller oder Vertreiber im Abschnitt Methoden ab Punkt 3.2. genannt. Die in dieser Arbeit erwähnten Geräte sind Eigentum des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik Berlin.

3.1.1 Zusammensetzung von verwendeten Lösungen und Puffern

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Agarplatten mit Ampicillin	LB-Medium, 2% Bactoagar, 100 µg/ml Ampicillin in Platten gegossen
Auftragspuffer 10x	25 ml 100% Glycerol, 5 ml 0,5 M EDTA, 20 ml dH ₂ O, 50 mg Xylencyanol, 75 mg Bromphenolblau
Ampicillin	100 mg in 1 ml 50% Ethanol
Dig-UTP/UTP für IVT 4 mM	157,5 µl DEPC-H ₂ O, 25 µl UTP 10 mM, 5 µl Dig-UTP 100 mM
dNTPs für IVT 4 mM	4400 µl DEPC-H ₂ O, 200 µl ATP 200 mM, 200 µl CTP 200 mM, 200 µl GTP 200 mM
dNTPs für PCR 10 mM	1,6 ml dH ₂ O, 100 µl ATP 200 mM, 100 µl CTP 200 mM, 10 µl GTP 200 mM, 100 µl TTP 200 mM
Größenmarker	10 µl DNA-Marker (1 µg/µl), 20 µl 10x Auftragspuffer, 170 µl dH ₂ O

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
EKRB-Puffer	119,4 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,0 mM CaCl ₂ , 1,2 mM MgSO ₄ , 1,2 mM KH ₂ PO ₄ , 5 mM Glucose, 21 mM Natriumlactat, 0,25 mM Natriumpyruvat, 25 mM NaHCO ₃
Hybridisierungslösung pH 5,5	25 ml Formamid, 12,5 ml 20x SSC (pH 4,5), 5 ml 20 % SDS, 1 g Blocking Reagent, 250 µl tRNA, 100 µl Heparin, 7,5 ml DEPC-H ₂ O
IPTG 0,5 M	1 g IPTG in 8,4 ml dH ₂ O, steril filtriert
IPTG/X-Gal-Gebrauchslösung	30 µl IPTG 0,5 M, 100 µl 2 % X-Gal, 170 µl LB-Medium
Laird's Lysispuffer	100 mM Tris (pH 8,5), 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl, Proteinase K 100 µg/ml.
LB-Medium	10 g Bactrotrypton, 5 g Bacto-Hefe Extrakt, 10 g NaCl, mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt in 1 l dH ₂ O
Lysispuffer P2	200 mM NaOH, 1 % SDS
MABT 1x	100 mM Maleinsäure, 100 mM NaCl, pH 7,5 mit NaOH eingestellt, 0,1 % Tween 20, steril filtriert
NaCl 5 M	292,2 g NaCl in 1 l dH ₂ O
Neutralisationspuffer P3	0,3 M Kaliumacetat
NTMT	100 mM Tris (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 0,1 % Tween 20
PBS 10x	80 g NaCl, 2 g KCl, 2,4 g KH ₂ PO ₄ , 14,4 g Na ₂ HPO ₄ in 1 l dH ₂ O, für ISH mit DEPC-H ₂ O angesetzt
Proteinase K Stammlösung	20 mg in 1 ml dH ₂ O
PFA 4 %	4 g PFA in 100 ml 1xPBS, 1 h bei 60 °C
Resuspendierpuffer P1	50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
SDS 20 %	200 g in 1 l dH ₂ O
Spermidin 100x	250 mg Spermidin in 1 ml dH ₂ O
SSC 20x	88,33 g Nacitrat, 175,32 g NaCl in 1 l dH ₂ O
TAE 50x	242 g Tris, 100 ml 0,5 mM EDTA, 57,1 ml Essigsäure in 1 l dH ₂ O
TE 1x	121 g Tris, 37,2 g EDTA in 1 l dH ₂ O
TEA 1 M, pH 8	149,19 g Triethanolamin, 700 ml DEPC-H ₂ O, 100 ml 18 % HCl
TRIS 1 M	121,0 g Tris in 1 l dH ₂ O
X-Gal 2 %	20 mg in 1 ml Dimethylformamid

3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.2.1 Agarosegelelektrophorese

Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen Zur Auftrennung von DNA oder RNA wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde Agarose (Fa. Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) je nach Verwendungszweck in einer Konzentration von 0,7% bis 4% in 1xTAE Puffer suspendiert und in der Mikrowelle zum Sieden gebracht. Nach Abkühlung auf etwa 50 °C wurde die Agarose mit Ethidiumbromid, mit einer Endkonzentration in Gel von circa 0,5 µg/ml, versetzt und in einen Gelträger mit Taschenkamm gegossen. Die Polymerisation erfolgte für circa 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer überführt, mit 1xTAE-Laufpuffer überschichtet und vorsichtig der Kamm entfernt. Die Proben wurden im Verhältnis von 5:1 mit 10x Auftragspuffer versetzt und in die Taschen aufgetragen. Entsprechend der Gelgröße wurde eine Spannung von 60-120 Volt angelegt und die Laufzeit betrug in der Regel 45-90 min. Die Dokumentation erfolgte in einer UV-Geldokumentation und durch Mitführen eines Größenmarkers, dem 1 kb Plus DNA Ladder (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt), konnten die Bandengrößen abgeschätzt werden.

Präparative Agarosegelelektrophorese Um spezifische Fragmente, die bei einem Restriktionsverdau oder einer PCR gewonnen wurden, zu isolieren, wurden diese in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde ein Agarosegel mit Taschen für große Probenvolumina benutzt. Waren die DNA-Banden gut voneinander getrennt, wurde das Gel unter schwaches UV-Licht gelegt und die gewünschte DNA-Bande mit dem Skalpell als Quader herausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Gelaufreinigung Für die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das WizardSV Gel and PCR Clean-Up System (Fa. Promega GmbH, Mannheim) verwendet. Hierzu wurde das Gewicht des isolierten Gelblocks bestimmt und mit dem entsprechenden Volumen Bindungspuffer zusammen bei 65 °C im Thermomixer aufgelöst. Anschließend wurden 700 µl Gellysat auf die vorbereitete Säule gegeben und nach einer Inkubationszeit von 60 s bei 15.000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt bis die gesamte DNA an die Säulenmatrix gebunden war. Anschließend wurde die Säule zweimal nach Herstellerangaben mit Waschpuffer gewaschen und schließlich trocken zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Säulenmatrix mit 50 µl nukleasefreiem Wasser für 60 s bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation konnte das Fragment von der Säule resuspendiert werden.

3.2.2 Polymerase Kettenreaktion

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente aus *Templates* wurde eine Polymerase Kettenreaktion mit geeigneten Primern durchgeführt.

Genotypisierungen wurden in der Regel mit der *Taq* DNA-Polymerase (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Hierfür wurde entsprechend der Probenanzahl ein Mastermix (Tab. 3.1) vorbereitet und ein Standard-Programm (Tab. 3.2) verwendet, mit dem Amplifikatgrößen zwischen 500 und 1000 bp möglich waren.

Tabelle 3.1: PCR-Mastermix für DNA-Polymerase *Taq*

Komponente	Volumen	Endkonzentration
<i>Taq</i> Polymerase 10x Puffer	2,5 µl	1x
MgCl ₂ 50 mM	0,75 µl	1,5 mM
dNTPs 10 mM	0,5 µl	200 µM
Primer sense 10 µM	1,25 µl	0,5 µM
Primer antisense 10 µM	1,25 µl	0,5 µM
<i>Taq</i> DNA-Polymerase 5 U/µl	0,2 µl	0,04 U/µl
dH ₂ O	16,55 µl	-
<i>Template</i> -DNA	1 µl	-
Endvolumen	25 µl	-

Für die Amplifikation von PCR-Produkten, die für die Klonierung verwendet werden sollten, wurde aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion auf die DNA-Polymerase PrimeSTAR HS (Fa. Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye in Frankreich) mit einem diesem Enzym angepassten Mastermix (Tab. 3.3) und Programm (Tab. 3.2) zurückgegriffen. Die Elongationszeiten richteten sich nach der Größe des zu erwartenden PCR-Produkts. In Abhängigkeit von der Qualität der *Template*-DNA wurden auch Hilfsstoffe, wie beispielsweise bis zu 5 % DMSO im PCR-Mix, zur Unterbindung von DNA-Sekundärstrukturen eingesetzt.

Tabelle 3.2: Standard PCR-Programme

<i>Taq</i> -Polymerase			PrimeSTAR-Polymerase		
Phase	Temp.	Zeit	Phase	Temp.	Zeit
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
Denaturierung	94 °C	30 s	Denaturierung	98 °C	10 s
Anlagerung	55 °C	30 s	Anlagerung	55 °C	5 s
Elongation	72 °C	30 s	Elongation	72 °C	30 s
Finale Elongation	72 °C	3 min	Finale Elongation	72 °C	3 min

Tabelle 3.3: Standard PCR-Mix für DNA-Polymerase PrimeSTAR HS

Komponente	Volumen	Endkonzentration
PrimeSTAR 5x Puffer	2,5 µl	1x
dNTPs 10 mM	4 µl	200 µM
Primer sense 10 µM	2,5 µl	0,5 µM
Primer antisense 10 µM	2,5 µl	0,5 µM
PrimeSTAR HS DNA-Polymerase 2,5 U/µl	0,5 µl	0,025 U/µl
dH ₂ O	29,5 µl	-
<i>Template</i> -DNA	1 µl	-
Endvolumen	50 µl	-

3.2.3 Primer

Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe der Lasergene 8 Software (Fa. DNASTAR Inc, Madison, USA) anhand von Plasmidkarten beziehungsweise Teilstücken von genomischen DNA-Sequenzen. Für die Klonierung erforderliche Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen wurden als *Linker* in die Primersequenz eingefügt. Mitunter wurde auch ein wenige Basen umfassender Überhang an die eigentliche, komplementäre Sequenz angehängt und dieser ist wie eine *Linker*-Sequenz in Tabelle 3.4 durch Kleinschreibung hervorgehoben. Es wurde weitestgehend darauf geachtet, dass PCR-Primer keine Sekundärstrukturen bildeten, die hinderlich für die PCR sein könnten. Die Primersynthese wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon aus Ebersberg in Auftrag gegeben und gelieferte Primer-DNA in einer Konzentration von 100 µM/µl in 10 mM TRIS gelöst bei -20 °C gelagert. Für den Einsatz in der PCR beziehungsweise zum Sequenzieren wurden entsprechend erforderliche Gebrauchsverdünnungen angefertigt, die bei 4 °C gelagert wurden. Die vom Hersteller angegebene, durchschnittliche Schmelztemperatur der Primer diente als Orientierung für die Abschätzung der Anlagerungstemperatur in der PCR.

Tabelle 3.4: Primer mit ihrer Sequenz und ihrem Verwendungszweck
(*Linker*/Basenüberhänge durch Kleinschreibung hervorgehoben)

Name	Sequenz	Verwendung
HB1	GAGTGACCTGCATGCCACAAGCTGTG	Genotypisierung
HB2	GACCTGTGGAGACAGGAAGGGTCAGTG	Genotypisierung
Hygro-s	GGATATGTCCTGCGGGTAAA	Genotypisierung
Hygro-as	ACATTGTTGGAGCCGAAATC	Genotypisierung
KS-3	gaccggtGTTTGGGAGGAGCTTGTG	Klonierung
KS-4	CTCACCATGGATCCCATGGCAGA	Klonierung
KS-5	gaccggtTGTGTGTTTGTACGTGAG	Klonierung
KS-6	CCATGGATCCCATGGTGCACCTTACAGTCA	Klonierung
KS-7	TTGGTTCGTGTGTGAGCTTT	Sequenzierung
KS-8	GCTGAACTTGTGGCCGTTTA	Sequenzierung
KS-13	gacgtcGTCACAGAAGGCTC	Klonierung
KS-14	tctagaCCTAGCTTCCCCATG	Klonierung
KS-15	gacgtcCTCTCTTCCCTTGTT	Klonierung
KS-16	ACCCCTCTCATGCCATATT	Sequenzierung
KS-17	TGCACGTGTTGTAGGTGTGA	Sequenzierung
KS-18	TACCTTCTGGGATGCTGGAT	Sequenzierung
KS-19	CATGTCAGAAAAAGGGGCTTG	Sequenzierung
KS-20	GGAGGAGCTTGTGTGTGTGA	Sequenzierung
KS-21	GAACTTCAGGGTCAGCTTGC	Sequenzierung
KS-22	ggcgtaattaaTCGACAGCCTGGTCT	Klonierung
KS-23	ttatggccggccAAACCACAACACTAG	Klonierung
KS-24	AGGGTTTGAGCAAATCATCG	Sequenzierung
KS-25	CAGCAAACCTCCCCCTTGATA	Sequenzierung
KS-26	TCAGGTTTCAGGGGGAGGT	Sequenzierung
KS-27	ACTCCAGGACGGAGTCAGTG	Sequenzierung
KS-28	TGTGGAATTGTGAGCGGATA	Sequenzierung
KS-29	CACAAGCTCCTCCCAAAC	Sequenzierung
KS-30	GTTTTCCCAGTCACGACGTT	Sequenzierung
KS-31	CCTGTGAGCAGGTGGAATTT	Sequenzierung
KS-35	taccggtGCCATGGGATCCATGGT	Klonierung
KS-36	agTACCGGTGCCATGGGATCCATGGT	Klonierung
KS-37	taccggtGCCATGGGATCCCAT	Klonierung
KS-38	TCCCTGGCCAATAGTCTCTAGCA	Klonierung
NV-65	CTTGTACAGCTCGTCCATGCC	Klonierung
tqm-s	GAAGGATGTCAGGAGAATGAGCAT	RT-PCR
tqm-as	CATCAATGTACTTTATCATGTCTGGATCT	RT-PCR
vil-s	TCATGGACCAACACAAGCTC	Genotypisierung
vil-as	CACAAAACCTGAAATCTCCCTCTC	Genotypisierung

3.2.4 DNA-Modifikation

Restriktionsenzymverdau Zur Gewinnung von Klonierungsfragmenten oder für die Analyse von Plasmiden wurde DNA mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, die von der Firma Promega GmbH aus Mannheim beziehungsweise New England Biolabs GmbH aus Frankfurt am Main bezogen wurden. Eine Standardreaktion für einen Kontrollverdau wurde gemäß der Produktbeschreibung wie in Tabelle 3.5 angesetzt und bei 37 °C für mindestens eine Stunde inkubiert. Zur Gewinnung eines

Tabelle 3.5: Standard-Restriktionsenzymverdau

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x Puffer	5 µl	1x
10x BSA	5 µl	1x
Restriktionsenzym 10 U/µl	1 µl	10 U/1µg DNA
Plasmid-DNA	1 µl	1 µg/µl
dH ₂ O	38 µl	-
Endvolumen	50 µl	-

Fragments für die Klonierung wurden die DNA-Menge und Enzymkonzentration entsprechend erhöht, da in der Regel nach dem enzymatischen Verdau erheblich DNA-Verlust durch anschließende präparative Gelelektrophorese und Aufreinigung zu erwarten waren. Bei einem Doppelverdau wurden vom Hersteller empfohlene, für beide Enzyme kompatible Puffer verwendet. Wenn bei einem Doppelverdau für die verwendeten Enzyme kein kompatibler Puffer vorhanden war, wurde der Verdau nacheinander durchgeführt. Nach dem ersten Restriktionsverdau wurde der Ansatz in der Mikrodialyse entsalzt. Hierfür wurde ein Mikrodialyse-Membranfilter VSWP mit einer Porengröße von 0,0025 µm (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) mit der glänzenden Seite nach oben in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Petrischale gelegt. Anschließend wurde der zu entsalzende Reaktionsansatz auf den Membranfilter aufgetragen und nach 30 min wieder abgenommen. Im Anschluss erfolgte der Verdau mit dem zweiten Enzym im geeigneten Puffer.

DNA-Fragmentenden ohne Basenüberhang Waren die gewählten Restriktionschnittstellen von Vektor und *Insert* für eine Ligation nicht kompatibel, wurden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase (Fa. Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte) oder der DNA Polymerase I Large Klenow-Fragment (Fa. Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben die Fragmentenden aufgefüllt beziehungsweise der Basenüberhang entfernt. Anschließend konnte eine *blunt* zu *blunt* Ligation durchgeführt werden.

Dephosphorylierung von Vektoren Vektoren, die für die Ligation mit einem *Insert* durch Restriktionsverdau geöffnet wurden, sind vor der Ligation an den Plasmidenden dephosphoryliert worden, um eine Religation zu vermeiden. Die verwendete thermosensitive, alkalische Phosphatase FastAP (Fa. Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte) war in den meisten Restriktionsenzymuffern aktiv und wurde am Ende des Restriktionsverdaus mit einer Endkonzentration von circa 1 U pro 1 µg DNA in das Reaktionsgemisch gegeben und für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch eine Inkubation von 5 min bei 75 °C.

3.2.5 Ligation

Eine Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren erfolgte mit der Quick T4 DNA-Ligase (Fa. New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) nach Herstellerangaben. Für einen Ligationsansatz von 20 µl wurden dephosphorylierter Vektor und das *Insert* in einem molaren Verhältnis von 1 zu 3 eingesetzt und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz wurde mit 200 µl Buthanol gefällt, zentrifugiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die ligierte DNA wurde in circa 5-10 µl 10 mM TRIS gelöst und zur Transformation in Bakterien verwendet. Als Religationskontrolle wurde ein Ansatz ohne *Insert* mitgeführt.

3.2.6 Transformation und Retransformation

Die Transformation erfolgte in chemisch kompetenten DH5α-*E.coli*-Bakterien, die durch CaCl₂-Methode gewonnen, bei -80 °C gelagert und zur Transformation auf Eis aufgetaut wurden.

Der Ligationsansatz und 50 µl kompetente Zellen wurden gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend für 1 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert und danach weitere 5 min auf Eis gestellt. Die transformierten Zellen wurden mit 900 µl LB-Medium bei 37 °C für mindestens 30 min für eine optimale Resistenzexpression vorinkubiert und dann auf Selektionsagarplatten ausgestrichen. Diese Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für eine Retransformation wurden in etwa 50 ng eines Plasmids mit chemisch kompetenten DH5α-*E.coli* gemischt und wie beschrieben die Transformation durchgeführt.

3.2.7 Subklonierung von Amplifikaten aus einer Polymerase Kettenreaktion

PCR-Amplifikate für die Klonierung wurden in der Regel nicht direkt mit Restriktionsenzymen verdaut, sondern *blunt* in einen *EcoRV* eröffneten pBluescript II KS-Vektor subkloniert, der über ein Ampicillin-Resistenzgen und ein *LacZ*-Gen verfügte (Short et al. 1988). Nach der Transformation in chemisch kompetente DH5α-*E.coli* konnten positive Kolonien durch Blau-Weiß Selektion relativ schnell identifiziert und

in Flüssigkulturen angeimpft werden. Durch Restriktionsverdau des subklonierten Plasmids konnte zudem das Vorhandensein der richtigen Schnittstellen im Agarosegel einfacher kontrolliert werden als beim Direktverdau des ursprünglichen PCR-Produktes.

3.2.8 Blau-Weiß Selektion

Die Selektion von Bakterienkolonien erfolgte nicht nur mit Hilfe von Antibiotikazusätzen im Agar sondern bei Subklonierungen zusätzlich mit der Blau-Weiß-Selektion. Während der Vorinkubation der transformierten Bakterien aus der Subklonierung wurden die Selektionsagarplatten mit IPTG/X-Gal-Gebrauchslösung vorbereitet. Hierzu wurden 300 µl Gebrauchslösung auf der Agarplatte ausgestrichen und bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Lösung vollständig eingezogen war. Anschließend konnte die vorinkubierte Bakteriensuspension ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden. Positive Kolonien mit erfolgreicher Subklonierung waren am Folgetag durch weiße Farbe einfach von den blauen Kolonien ohne Integration der Fremd-DNA abgrenzbar und wurden in Flüssigkultur angeimpft.

3.2.9 Bakterienflüssigkultur

Mit Hilfe eines Zahnstochers oder einer Pipettenspitze wurden Einzelkolonien von einer Agarplatte aufgenommen und in Reagenzgläsern mit 4 ml LB-Medium, welches mit Selektionsantibiotikum Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml versetzt war, angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Für größere Kulturvolumina wurden Erlenmeyerkolben verwendet.

3.2.10 Plasmidpräparation aus Bakterienkulturen

Mini-Präparation Eine über Nacht inkubierte Bakterienkultur von 4 ml wurde in 2 ml Eppendorfröhrchen bei 15.000 xg abzentrifugiert. Die Plasmidpräparation erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse. Zunächst wurde das Bakterienpellet in 250 µl Resuspensionspuffer P1 resuspendiert. Dieser Ansatz wurde mit 250 µl Lysis-puffer P2 versetzt und mehrfach geschwenkt, um die Zellenwände aufzuschließen. Anschließend wurden 250 µl Neutralisationspuffer P3 hinzugegeben und nach kurzem Schwenken für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und mit circa 500 µl Isopropanol vermennt. Nach mehrfachem Schwenken und kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für 10 min zentrifugiert. Das Plasmidpellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 50 µl 10 mM TRIS resuspendiert und war so für Sequenzierungen oder Klonierungen einsetzbar.

Midi-Präparation Die Plasmidisolierung im größeren Maßstab und für die Zellkultur erfolgte mit dem Gene Elute HP Plasmid Midiprep Kit (Fa. Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg). Ein über Nacht inkubierte Bakterienkultur von etwa 50 ml wurde in Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 4 ml Resuspensionspuffer gelöst. Anschließend wurden durch Zugabe von 4 ml Lysispuffer und mehrmaliges Schwenken die Zellen lysiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Neutralisation durch Hinzufügen von 4 ml Neutralisationspuffer. Nach mehrmaligem Schwenken wurde die Lösung mit 3 ml Bindungspuffer versetzt, geschwenkt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden 3 ml Säulenpuffer auf die Säule gegeben und bei 3.000 x g für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurden nacheinander jeweils 4 ml des Lysats durch eine Filterspritze auf die Säule filtriert und bei 3.000 x g für 2 min zentrifugiert. Es erfolgten zwei Waschschrte mit je 4 ml der Waschlösung 1 und 2, bevor die Säule für die Elution in ein neues Röhrchen überführt wurde. Durch Zugabe von 1 ml Elutionspuffer wurde bei 3.000 x g die Plasmid-DNA von der Säulenmatrix gelöst. Zur Erhöhung der DNA-Konzentration wurde die Lösung mit 100 µl 3 M Natriumacetat versetzt. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 700 µl Isopropanol und Zentrifugation bei 15.000 x g für 30 min bei 4 °C die Fällung. Das DNA-Pellet wurde in 1,5 ml 70 % Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und anschließend in 50 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

3.2.11 Nukleinsäurekonzentrationsmessung und -abschätzung

Die DNA- und RNA-Konzentrationsmessung erfolgte an einen Nanophotometer. Hierfür wurde mit dem entsprechenden Puffer, in dem die Nukleinsäure gelöst war, das Gerät kalibriert und anschließend 1 µl der Probe zur Messung verwendet. Gegebenenfalls wurde bei sehr hoher Nukleinsäurekonzentration eine 1:10 Verdünnung angefertigt beziehungsweise zu gering konzentrierte Proben durch Vakuumzentrifugation aufkonzentriert. Alternativ konnte die Konzentration einer Nukleinsäureprobe auch im Agarosegel abgeschätzt werden. Hierfür wurden in der Regel 2 µl der Probe parallel mit 10 µl des Größenmarkers 1 kb Plus DNA Ladder (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die Bandenintensität der Probe mit der 650 bp-Bande des Markers, die einer Konzentration von 40 ng/µl entsprach, verglichen. Anhand des Verhältnisses konnte die Ausgangskonzentration der Probe ermittelt werden.

3.2.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung der fertigen transgenen Konstrukte beziehungsweise der subklonierten Vektoren erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon aus Ebersberg. Hierfür wurden DNA-Proben in einer Konzentration von 50-100 ng eingesandt und mit Standardprimern beziehungsweise eigenen Sequenzierungsprimern sequenziert. Die Auswertung erfolgte mit der Lasergene 8 Software (Fa. DNASTAR Inc, Madison, USA).

3.3 Klonierung der transgenen Konstrukte

3.3.1 *Tcr*-Deletionskonstrukte

Mit Hilfe von geeigneten Primern wurden mit dem Transgen Tg11 (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) als *Template* die beiden Deletionsfragmente per PCR amplifiziert und subkloniert.

Tabelle 3.6: Spezifikationen für die PCR der *Tcr*-Deletionsfragmente

Deletionsfragment	Größe	Primerpaar
del1	688 bp	KS-13/KS-14
del2	447 bp	KS-15/KS-14

Die Wahl der Primer erfolgte so, dass ein Deletionsfragment del1, in dem nur noch die regulatorische Domäne von *Tcr* und Teile des Introns erhalten waren, und ein Deletionsfragment del2, bestehend aus der partiellen regulatorischen *Tcr*-Domäne und Teilen des Introns, entstanden. Die verwendeten Primer fügten durch eingebaute *Linker* dem jeweiligen Fragment am 5'-Ende eine *AatII*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle hinzu. Das Ausgangskonstrukt Tg11 wurde *AatII* und *XbaI* verdaut und dabei ein Fragment bestehend aus dem vollständigen *Tcr*-ORF und Teilen des auf ihn folgenden Introns herausgeschnitten. Die Deletionsfragmente wurden mit *AatII* und *XbaI* aus den Subklonierungsvektoren herausgelöst und jeweils in den eröffneten Tg11-Vektor ligiert (Abb. 4.4, Seite 55).

Für den Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch in den *ColA1*-Locus von ES-Zellen wurden beide Deletionskonstrukte und das Ausgangskonstrukt Tg11 mit *SalI-NotI*-Verdau aus ihren Vektoren herausgelöst und in den von Prof. Dr. B.G. Herrmann (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) zur Verfügung gestellten Targetingvektor pPGK-2FRT-ins, der mit den selben Enzymen geöffnet wurde, ligiert (Vgl. Abb. 4.2).

3.3.2 5'-UTR-Deletionskonstrukte

Mit den Restriktionsenzymen *BglI* und *SalI* wurde ein 5'-UTR-Fragment aus dem Transgen Tg9 (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) herausgeschnitten, das den *Tcr*-Promoter, die vollständige 5'-UTR von *Tcr*, ein GFP sowie ein sechsfaches Myc-Epitop umfasste. Des Weiteren wurde der Expressionsvektor pSV-Sport-1 (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *SalI* geöffnet und anschließend mit dem 5'-UTR-Fragment aus Tg9 ligiert. Die nicht kompatiblen DNA-Enden wurden vorher von Basenüberhängen befreit. Außerdem wurde der *Tcr*-Promoter gegen einen *Protamin 1*-Promoter über einen *SalI-AgeI*-Doppelverdau ausgetauscht. Hierfür stand

ein Subklonierungsvektor von Dr. Y. Charron (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) zur Verfügung, aus dem die gewünschte *Protamin 1*-Promotersequenz mit den selben Enzymen, also *SalI* und *AgeI*, herausgelöst wurde. Damit war das Transgen Tg5'-UTR als Basiskonstrukt fertiggestellt und diente als Ausgangspunkt für die Klonierung der verschiedenen 5'-UTR-Deletionen (Abb. 4.15, Seite 67). Mit Hilfe von geeigneten Primerpaaren wurden die 5'-UTR-Deletionen A, B und C aus dem Basiskonstrukt heraus in einer PCR amplifiziert. Der sense-Primer enthielt jeweils eine *AgeI*- und der antisense-Primer eine *XcmI*-Schnittstelle.

Tabelle 3.7: Spezifikationen für die PCR der 5'-UTR-Deletionsfragmente

Deletionsfragment	Größe	Primerpaar
5'-UTR-A	350 bp	KS-3/KS-4
5'-UTR-B	226 bp	KS-5/KS-4
5'-UTR-C	135 bp	KS-3/KS-6

Die Deletionsfragmente wurden mit einem *AgeI-XcmI*-Doppelverdau aus ihrem Subklonierungsvektor herausgelöst und gegen die vollständige 5'-UTR des Basiskonstrukt ausgetauscht, so dass die drei Deletionskonstrukte Tg5'-UTR-A, Tg5'-UTR-B und Tg5'-UTR-C entstanden. Bei der Klonierung des Konstruktes TgdeltaU musste zum Erhalt der Kozak-Sequenz um das Start-Codon ein weiterer Klonierungsschritt eingefügt werden (Abb. 4.15 unten). Hierfür wurde mit Hilfe der Primer KS-35 und NV-65 ein Fragment aus dem Basiskonstrukt, bestehend aus der Kozac-Sequenz und GFP, amplifiziert, subkloniert und anschließend mit einem *AgeI-BsrGI*-Doppelverdau das Insert herausgelöst. Mit den Enzymen *AgeI* und *BsrGI* wurden dem Basiskonstrukt die komplette 5'-UTR und das GFP entfernt und durch das *Insert* ohne 5'-UTR ersetzt. Für den Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch in ES-Zellen war es nötig die Konstrukte in ein *ColA1*-Targetingvektor pPGK-2FRT-ins (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) zu überführen. Hierfür wurden alle 5'-UTR-Deletionskonstrukte mit den Primern KS-22 und KS-23 amplifiziert und subkloniert. Nun konnte das jeweilige Transgen durch einen *PacI-FseI*-Doppelverdau herausgelöst und in den ebenfalls mit *PacI* und *FseI* eröffneten Targetingvektor ligiert werden.

3.3.3 *Tcr*-Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen

Als Ausgangspunkt für die Klonierung dienten die 5'-UTR-Deletionskonstrukte. Die 5'-UTR-Deletionsfragmente A, B und C wurden jeweils zusammen mit dem *Protamin 1*-Promoter aus den jeweiligen Transgenen Tg5'-UTR-A, -B und -C mit *SmaI* und *BamHI* herausgelöst und in Tg11 (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) ligiert, aus dem zuvor der *Tcr*-Promoter und die gesamte 5'-UTR durch *EcoRV-BamHI*-Verdau entfernt wurden. Anschließend wurde der *Tcr*-Promoter aus Tg11 mit *SalI-AgeI* herausgelöst und im Austausch gegen den *Protamin 1*-Promoter in die neuen Konstrukte

zurück kloniert, ein Umweg, der aufgrund von fehlenden Schnittstellen erforderlich war (Abb. 4.21, Seite 74). Für die komplette Deletion der 5'-UTR im Konstrukt Tg11 wurde mit Hilfe der Primer KS-37 und KS-38 ein Fragment amplifiziert, das aus dem Myc-Epitop und Teilen der katalytischen Domäne von *Tcr* bestand. Dieses PCR-Produkt wurde subkloniert und das gewünschte *Insert* mit *AgeI-MscI* herausgeschnitten. Das Ausgangskonstrukt Tg11 wurde mit *AgeI* und *MscI* verdaut, dabei wurde die gesamte 5'-UTR, das Myc-Epitop und Teile der katalytischen Domäne entfernt und gegen das *Insert* ohne 5'-UTR ausgetauscht. Die so entstandenen Tg11-5'-UTR-Deletionskonstrukte wurden wie die 5'-UTR-Deletionskonstrukte in den Targetingvektor pPGK-2FRT-ins (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) kloniert und zur Transfektion von ES-Zellen eingesetzt.

3.3.4 *Tcr*-Konstrukt mit *Protamin 1*-Promoter

Für dieses Konstrukt wurde Tg11 (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) mit *SalI* und *AgeI* verdaut, um den *Tcr*-Promoter zu entfernen und mit einem *Protamin 1*-Promoter aus dem 5'-UTR-Basiskonstrukt mit Hilfe von *SalI* und *AgeI* herausgelöst, ligiert (Abb. 4.25, Seite 79). Das fertige Konstrukt Tg11-P1P wurde mit Hilfe von *SalI*- und *NotI*-Verdau in den Targetingvektor pPGK-2FRT-ins (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) kloniert und war somit bereit für den Kassettenaustausch in der Zellkultur.

3.4 Spezielle molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolation von RNA aus Gewebeproben

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus gefrorenen Gewebeproben wurde mit TRIzol Reagent (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Eine Gewebeprobe mit einem Gewicht von circa 100 mg (entspricht in etwa einem halben Mausshoden) wurde mit 1 ml TRIzol Reagent und einer Metallkugel in ein 2 ml Eppendorfröhrchen gegeben und dann in einem Gewebelysierer für mindestens 2 min bei einer Frequenz von 20 Bewegungen pro Sekunde homogenisiert, bis das Gewebe gleichmäßig aufgelöst war. Das Gewebelysate wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 200 µl Chloroform zum Lysat pipettiert und das Röhrchen 15 s geschwenkt bevor eine weitere Inkubation von 2-3 min bei Raumtemperatur erfolgte. Im Anschluss wurde das Gemisch bei 12.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen, wobei die im wässrigen Überstand gelöste RNA in ein neues Gefäß überführt wurde. Schließlich erfolgte die RNA-Prezipitation durch Zugabe von 500 µl Isopropanol. Das Gemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann eine Zentrifugation bei 12.000 x g bei 4 °C für 10 min durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen, das RNA-Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und

bei 7.500 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur für einige Minuten luftgetrocknet und dann in 70-100 µl Wasser, frei von RNasen, resuspendiert. Für eine gute Resuspension wurde die Lösung bei 55 °C für 30 min inkubiert.

Zur Ermittlung der Konzentration wurden die isolierte RNA am Nanophotometer gemessen. Eine gute RNA-Extraktionsausbeute lag vor, wenn der Quotient aus dem 260 nm- und 280 nm-Wert zwischen 1,6 und 1,8 lag. Die Konzentration in µg/ml errechnete sich aus dem Produkt des 260 nm-Wertes, dem Verdünnungsfaktor (sofern vorhanden) und der Konstante 40.

3.4.2 DNase-Behandlung

Für den Einsatz der Gesamt-RNA aus Gewebe in einer RT-PCR war eine DNase-Behandlung erforderlich und diese erfolgte mit dem DNA-free Kit (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt). Hierbei wurde RNA in einer Gesamtmenge von 10 µg, 5 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl DNase I gemischt und mit nukleasefreiem Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde für 30 min im Thermomixer bei 37 °C inkubiert und anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Zugabe von 5 µl DNase-Reagenz. Die Inaktivierung wurde unter ständiger Durchmischung bei Raumtemperatur für 2-3 min durchgeführt und danach bei 10.000 x g für 1,5 min zentrifugiert. Die reine RNA wurde als Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

3.4.3 cDNA Synthese

Die reverse Transkription wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fa. Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte) durchgeführt. Zu 13 µl DNase behandelte RNA wurden 1 µl oligo dT-Primer, 1 µl dNTP-Mix, 4 µl 5x RT-Puffer und 1 µl Enzym-Mix pipettiert. Dieser sogenannte RT⁺ Ansatz wurde im Thermozykler für 30 min bei 50 °C inkubiert und anschließend bei 85 °C für 5 min hitzeinaktiviert. Als Kontrolle der DNase-Behandlung wurde parallel von jeder Probe ein Ansatz RT⁻ ohne Enzym-Mix mitgeführt. Die cDNA konnte nun als *Template* in einer PCR mit transkriptspezifischen Primern eingesetzt werden. Die Lagerung von cDNA erfolgte bei -80 °C.

3.4.4 Dig-markierte RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen

Für die *in situ* Hybridisierung wurde Vektoren mit integrierter Sonden-DNA verwendet (Tab. 3.8). Entsprechend der vorhandenen Promotersequenzen für RNA-Polymerasen im Vektor und der Integrationsorientierung der Sonden-DNA wurde die für eine *in vitro* Transkription geeignete RNA-Polymerase (T3- oder T7-RNA-Polymerase von Fa. Promega GmbH, Mannheim) ermittelt, um eine Antisense-RNA-Sonde synthetisieren.

Tabelle 3.8: Verwendete *in situ*-Sonden

Sonde	Spezifikationen	Herkunft
Smok1	pTOPO-smok mit <i>smok1</i> -cDNA	Véron et al. 2009
Myc	pTOPO-myc mit <i>myc</i> -Epitop-DNA	Véron et al. 2009

Mit einem Restriktionsenzym, das *downstream* des antisense-Stranges schneidet, wurde das Plasmid linearisiert, aus dem Agarosegel isoliert und 1,5 µg in der Sonden-synthese verwendet.

Die *in vitro* Transkription wurde wie in Tabelle 3.9 angesetzt und bei 37 °C für circa zwei bis drei Stunden in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 3 µl RNase-freier DNase I (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen) versetzt und weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Aufreinigung über illustra ProbeQuant G-50 Micro-Säulen (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) wurde der Ansatz mit 20 µl Puffer Typ 1 aufgefüllt und nach Herstellerangaben über die Gelmatrix aufgereinigt. Für die Kontrolle im Gel wurden dem Transkriptionsansatz je 2 µl vor und nach DNase-Verdau, sowie nach Säulenaufreinigung entnommen. Außerdem konnte anhand der Agarosegelkontrolle die Abschätzung der Sondenkonzentration erfolgen und daran die Verdünnung in der *in situ* Hybridisierung orientiert werden. Die fertige RNA-Sonde wurde aliquotiert und weitestgehend auf Trockeneis beziehungsweise bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3.9: RNA-Sondensynthese durch *in vitro* Transkription

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Template-DNA 1,5 µg	x µl	0,05 µg/µl
5x RNA-Polymerase Puffer	6 µl	1x
DTT 100 mM	3 µl	10 mM/µl
RNase-Inhibitor 30 U/µl	1,5 µl	1,5 U/µl
dNTPs 4 mM	3 µl	0,5 mM/µl
Dig-UTP/UTP 4 mM	0,75 µl	0,1 mM/µl
RNA-Polymerase 20 U/µl	1,5 µl	1 U/µl
dH ₂ O	4,25 µl	-
Endvolumen	30 µl	-

3.4.5 Sonden für *Southern Blot* und *Dot Blot*

Für den *Southern Blot*, der zur Überprüfung der richtigen Transgenintegration in ES-Zellen diente, beziehungsweise für die Dot-Blot-Genotypisierung, wurden Hybridisierungssonden genutzt, die im 5'- beziehungsweise 3'-Bereich des Integrationsortes

binden (Tab. 3.10). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonden ColA1 und Col3' probeBSKS wurden als externe *Southern Blot*-Sonden zur Überprüfung der korrekten Transgenintegration eingesetzt. Für die *Dot Blot*-Analyse kam neben der ColA1-Sonde als Ladekontrolle noch eine transgenspezifische Sonde gegen das Gen Hygromycin zum Einsatz. Eine circa 500 bp große Sequenz wurde hierfür mit den Primern Hygro-s/ Hygro-as direkt aus dem Targetingvektor pPGK-2FRT-ins (Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) amplifiziert und subkloniert. Generell wurde die Sonden-DNA mit geeigneten Enzymen aus dem jeweiligen Plasmid herausgelöst und in einer präparativen Gelelektrophorese isoliert. Nach Konzentrationsbestimmung war die DNA für die Markierung mit radioaktiven Nukleotiden bereit (siehe 3.5.7).

Tabelle 3.10: verwendete Sonden für *Southern- und Dot Blot*

Sonde	Spezifikationen	Herkunft
ColA1	5'-Sonde für <i>ColA1</i> -Integration	Prof. Dr. B.G. Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin
Col3' probeBSKS	3'-Sonde für <i>ColA1</i> -Integration	open Biosystems, Fa. Thermo Fischer Scientific GmbH (Schwerte) (Beard et al. 2006)
Hygro	aus dem pPGK-2FRT-ins-Vektor amplifiziert und subkloniert für den <i>Dot Blot</i>	eigene Herstellung

3.5 Zellkultur

3.5.1 Zusammensetzung verwendeter Zellkulturmedien

Tabelle 3.11: Zusammensetzung von Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Bicarbonat free DMEM	Puder in 1 l Wasser gelöst, 10 ml Hepes 1 M, steril filtriert
Einfriermedium für EF	90 ml Feedermedium, 10 ml DMSO
Einfriermedium für ES	90 ml ES-Zell-Medium, 10 ml DMSO
Einfriermedium für Platten	60 ml Bicarbonat free DMEM mit 10 mM Hepes, 20 ml FCS für ES-Zellen, 20 ml DMSO
ES-Zell-Medium	400 ml Knock-Out TM DMEM, 75 ml FCS für ES-Zellen, 5 ml Pen/Strep, 5 ml NEAA, 5 ml frisches 10 mM β -ME, 5 ml Nukleoside, 5 ml Glu, 50 μ l LIF
Feedermedium	500 ml DMEM, 55 ml FCS für EF, 5,5 ml Glu, 5,5 ml Pen/Strep
Gelatine 0,1 %	20 ml 2 % Gelatine, 380 ml Wasser, steril filtriert
Resuspendiermedium für Platten	80 ml Bicarbonate free DMEM 10 mM Hepes, 20 ml FCS für ES-Zellen
Selektionsmedium	ES-Zell-Medium, 140 μ g/ml Hygromycin

3.5.2 Allgemeine zellbiologische Methoden

Arbeitsbedingungen Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank ausgeführt. Es wurden sterile Einmalpipetten und Kulturschalen verwendet und vor jedem Arbeitsbeginn Hände, Werkbank und Absaugvorrichtung mit 70 % Ethanol gereinigt, um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden auch alle verwendeten Materialien, Medien und Lösungen steril im Handel bezogen oder über Sterilfilter sterilisiert. Die Lagerung von Medien und Zusätzen erfolgte bei -20 °C beziehungsweise 4 °C. Vor dem Einsatz eines Kulturmediums wurde dieses im Wasserbad bei 37 °C angewärmt. Die Kultivierung der Zellen in Kulturschalen erfolgte in Brutschränken bei 37 °C, 7,5 % CO₂ Atmosphäre und konstanter Luftfeuchtigkeit. Zur Kontrolle des Wachstums von Zellen wurde ein Inversmikroskop verwendet. Je nach Wachstum wurde regelmäßig das Medium gewechselt, die Zellen passagiert beziehungsweise eingefroren, dabei kamen den verwendeten Kulturschalen angemessene Volumina des jeweiligen Mediums zum Einsatz. Zellsuspensionen wurden in der Regel in 15 ml oder 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 1.000 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert.

Auftauen Die im Gefrierrohrchen eingefrorenen Zellen wurden kurz im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die Zellsuspension rasch in circa 5 ml Medium überführt. Die verdünnte Zellsuspension wurde für 5 min zentrifugiert, überstehendes Medium mit enthaltenem DMSO abgesaugt und das Zellpellet in Medium resuspendiert und auf Zellkulturschalen ausgesät.

Passagieren Zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin auf die Zellen gegeben und gut verteilt. Nach einer Inkubation von mindestens 5 min im Brutschrank wurde die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium mit FCS beendet und die Zellsuspension mit einer Pipette in eine Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in geeignetem Volumen Kulturmedium resuspendiert und auf neue Kulturschalen ausgesät. Die möglichst homogene Zellsuspension war die Voraussetzung für die gleichmäßige Zellverteilung in der Kulturschale.

Einfrieren und Lagerung Zum Einfrieren von Zellen wurden diese, wie beschrieben, mit Trypsin von der Kulturschale gelöst und nach dem Abzentrifugieren in Einfriermedium, welches dem Zelltyp entsprechend zusammengesetzt war, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zügig in Gefrierrohrchen überführt und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -80 °C schonend eingefroren. Nach einem Tag bei -80 °C wurden die Röhrchen zur dauerhaften Lagerung in einen Stickstofftank überführt.

3.5.3 Vorrat an Feederzellen

Der Vorrat an embryonalen Fibroblasten, den sogenannten Feederzellen, wurde mit möglichst frühen Passagen (Passage 0-2) auf 150 mm-Kulturschalen angefertigt. Die Zellen wurden aufgetaut, in etwa 40 ml Medium resuspendiert und auf einer 150 mm-Schale kultiviert. Bei ausreichender Zellkonfluenz wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst und zur Expansion auf fünf neue 150 mm Kulturschalen ausgesät. So wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen weiter verfahren bis schließlich mindestens 15 Kulturschalen möglichst dicht bewachsen waren. Nun konnte eine vierstündige Mitomycinbehandlung durchgeführt werden, um die Teilungsfähigkeit der Zellen dauerhaft zu unterbinden. Hierfür wurde Feedermedium mit einer Konzentration von 0,01 mg/ml Mitomycin C auf die Zellen gegeben. Nach der Inkubation im Brutschrank wurden alle Kulturschalen dreimal gründlich mit DPBS gewaschen und mit Trypsin von der Kulturschale gelöst. Die Zellsuspension von allen 15 Schalen wurde gesammelt, eine 1:10 Verdünnung hergestellt und in einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Anhand des Gesamtvolumens konnte schließlich die Gesamtzellzahl in der Zellsuspension ermittelt werden. Die Suspension wurde zentrifugiert und das Zellpellet entsprechend der ermittelten Gesamtzellzahl in einem definierten Volumen Einfriermedium gelöst. In der Regel wurden Feederzellen

zu je 2,5 Millionen (ausreichend für drei 60 mm-Schalen), 5 Millionen (ausreichend für sechs 60 mm-Schalen) und 10 Millionen (für zwölf 60 mm-Schalen) eingefroren.

Tabelle 3.12: Verwendete, embryonale Fibroblasten und Stammzellen

Zellen	Spezifikationen
NMRI-Feeder	embryonale Fibroblasten von der NMRI-Inzuchtmauslinie
DR4-Feeder	embryonale Fibroblasten gewonnen aus Verpaarung von homozygoten DR4-Mäusen mit NMRI-Mäusen, heterozygot für ein Hygromycin-Resistenzgen (Tucker et al. 1997)
Embryonale Stammzellen C2	F1 ES-Zelllinie aus einer Verpaarung der Mauslinien C57BL/6 und 129/SV; heterozygot für modifizierten <i>ColA1</i> -Locus mit Neomycinresistenzkassette flankiert von FRT-Erkennungsstellen sowie einer Hygromycinresistenzkassette ohne Promoter und ohne Start-Codon (Fa. Thermo Fischer Scientific GmbH (Schwerte), Beard et al. 2006)

3.5.4 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Embryonale Stammzellen wurden gemeinsam mit Feederzellen in Zellkulturschalen unter Verwendung von ES-Zell-Medium kultiviert. Hierfür wurden am Vortag die gewünschte Anzahl an Zellkulturschalen gelatiniert, das heißt 0,1 % Gelatinelösung aufgetragen, circa 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, überschüssige Gelatine abgesaugt und die Schalen bei Raumtemperatur bis zur Aussaat von Zellen getrocknet. Die Feederzellen wurden aufgetaut, in geeignetem Volumen Feedermedium resuspendiert und auf den gelatinierten Kulturschalen ausgesät. Frühestens nach zwei Stunden war der Schalenboden durch eine einschichtige Feederzellschicht bedeckt. Eingefrorene ES-Zellen wurden aufgetaut und das Zellpellet wurde in ES-Zell-Medium resuspendiert und auf einer mit Feederzellen kultivierten Schale ausgesät. Je nach Zellwachstum und ES-Zell-Koloniedichte wurden ES-Zellen spätestens alle zwei Tage passagiert und auf neue Kulturschalen mit Feederzellen ausgesät beziehungsweise wie beschrieben eingefroren. Der Mediumwechsel erfolgte bei ES-Zellen mindestens einmal täglich. Arbeiten mit ES-Zellen außerhalb des Brutschrankes wurden zügig durchgeführt, um die optimalen Kultivierungsbedingungen nicht unnötig lange zu unterbrechen.

3.5.5 Transfektion von embryonalen Stammzellen

ES-Zellen wurden auf 60 mm beziehungsweise 100 mm Kulturschalen, wie beschrieben, kultiviert. Außerdem wurde eine 6-Loch Kulturschale sowie drei weitere 60 mm

Kulturschalen gelatiniert und Feederzellen mit geeigneter Antibiotikaresistenz darauf ausgesät. Je nach Wachstum der ES-Zellen wurden diese von der 60 mm beziehungsweise 100 mm Schale gelöst, die Gesamtzellzahl in der Neubauer Zählkammer ermittelt und rund 300.000 ES-Zellen auf ein Well der 6-Loch-Kulturschale mit ES-Zell-Medium ohne Antibiotikum ausgesät.

Am Tag der Transfektion wurde das Medium gegen 1,5 ml frisches ES-Zell-Medium ohne Antibiotikum ausgetauscht. Außerdem wurden circa 5-8 µg Targetingvektor-DNA und etwa 1 µg Rekombinase-Plasmid (pCAGGS-Flpe zur Expression der Flip-pase (Buchholz et al. 1998), Fa. Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte) mit 125 µl OptiMEM (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) gemischt. Parallel wurden außerdem 25 µl Lipofectamine[®] 2000 Reagent (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) mit 110 µl OptiMEM gemischt. Beide Gemische wurden zusammengeführt, 15 min bei Raumtemperatur im Zentrifugenröhrchen inkubiert und dann in 1,25 ml ES-Zell-Medium ohne Antibiotikum gelöst und zu den vorbereiteten ES-Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von vier Stunden im Brutschrank wurde das Lipofektamin-Mediumgemisch entfernt, die Zellen von der Kulturschale gelöst und zu je einem, zwei und drei Sechsteln auf den drei mit antibiotikaresistenten Feederzellen vorbereiteten 60 mm Schalen aufgeteilt. Über Nacht erfolgte die Kultivierung in ES-Zell-Medium ohne Antibiotikum. Erst 12 h nach der Transfektion wurde das alte Medium durch Selektionsmedium ersetzt und die Zellen sieben bis zehn Tage unter Selektionsdruck bei täglichem Mediumwechsel kultiviert. Nachdem die antibiotikaresensitiven Zellen abgestorben waren, konnte man je nach Wachstum der verbliebenen ES-Zellen nach etwa sechs Tagen bereits erste resistente ES-Zellkolonien erkennen.

3.5.6 Einzelkultivierung von embryonalen Stammzellkolonien

Wenn die Größe der selektionierten ES-Zellkolonien ausreichend war, wurde für die Einzelkultivierung eine 96-Loch-Kulturschale gelatiniert und Feederzellen darauf ausgesät. Eine resistente ES-Zellkolonie wurden mit Hilfe einer 10 µl Pipette und steriler Pipettenspitze unter Binokularkontrolle von der Selektionsplatte abgenommen, in einer 96-Loch-Platte mit rundem Boden in Trypsin überführt und für mindestens 10 min bei 37 °C inkubiert bis die Kolonie gut vereinzelt war. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von ES-Zell-Medium beendet und die Zellsuspension einer Einzelkolonie auf die vorbereitete 96-Loch-Platte mit Feederzellen ausgesät. Bei Erreichen einer ausreichenden Koloniedichte nach etwa drei Tagen wurden die ES-Zellen einer 96 Loch-Platte zu gleichen Teilen auf drei neue gelatinierte Platten verteilt. Zwei Platten dienten der DNA-Gewinnung und eine weitere mit Feederzellen versehene Platte sollte zum Einfrieren genutzt werden. Diese Platte wurde nach Erreichen einer guten Koloniedichte mit Trypsin behandelt und die Reaktion mit Resuspendiermedium für Platten beendet. Es wurde das gleiche Volumen Einfriermedium für Platten hinzupipettiert und die Zellsuspension in eine 96-Loch-Platte mit rundem Boden überführt. Diese Platte wurde in Parafilm eingeschlagen und in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Die beiden verbliebenen DNA-Platten wurden so lange kultiviert bis sie dicht bewachsen waren. Nach zweimaligen Waschen mit DPBS erfolgte die Lyse der Zellen

direkt in der Platte bei 56 °C über Nacht in einer befeuchteten Plastikbox durch Zugabe von 50 µl Lysis-Puffer je Well mit einer Proteinase K-Konzentration von 1 mg/ml. Die DNA-Prezipitation wurde bei Raumtemperatur für 30 min durch Zugabe von 100 µl eiskalter 100 % Ethanol/ 75 mM Natriumchlorid-Lösung durchgeführt. Nachdem sich die genomische DNA als filamentöses Netzwerk am Boden der Platte abgesetzt hatte, wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und jedes Well dreimal mit jeweils 200 µl 70 % Ethanol gewaschen. Dann wurde die DNA kurz luftgetrocknet und in 24 µl 0,1 xTE-Puffer resuspendiert. Für eine bessere DNA-Suspension wurde die Platte bei 37 °C über Nacht inkubiert und war dann für PCR- oder *Southern Blot*-Analyse bereit.

3.5.7 *Southern Blot* Analyse von embryonalen Stammzellklonen

Verdau und Transfer der DNA Die Identifizierung der ES-Zell-Klone mit richtiger Integration des Transgens erfolgte anhand eines *Southern Blots*. Hierfür wurde die aus den Zellen extrahierte DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym direkt in der 96-Loch-Platte fragmentiert (Tab. 3.13). Nach circa zwei Stunden Inkubation bei 37 °C wurde der Verdau für eine bessere Durchmischung auf und ab pipettiert und weiter über Nacht bei 37 °C in einer Feuchtbox inkubiert. Der Verdau wurde schließlich mit circa 5 µl Auftragspuffer je Well versetzt und die DNA in ein 0,7%iges Agarosegel aufgetragen. Über Nacht erfolgte bei geringer Voltzahl (10 V) im Gel elektrophoretisch die DNA-Auftrennung. Die Gelelektrophorese wurde am Folgetag beendet, wenn sich die genomische DNA bei der UV-Lichtkontrolle als deutlicher Schmier im Gel darstellte und anhand des mitgeführten Größenmarkers eine Unterscheidung der zu erwartenden Banden in anschließenden *Southern Blot* problemlos erfolgen konnte. Das Agarosegel wurde dann mit einem Lineal fotografiert, um für die Auswertung die Entfernung der Banden von den Geltaschen zu dokumentieren.

Tabelle 3.13: *Southern Blot*-Verdau

Komponente	Volumen	Endkonzentration
genomische DNA	24 µl	-
10x Restriktionsenzym-puffer	3 µl	1x
Spermidin 100 mM	0,3 µl	1 mM/µl
RNase A 10 mg/ml	0,3 µl	100 µg/µl
BSA 10 mg/ml	0,3 µl	100 µg/µl
Restriktionsenzym 10 U/µl	2 µl	1 U/µl
Endvolumen	30 µl	-

Für den alkalischen Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran wurde das Gel für 20 min unter sanften Schwenkbewegungen mit 0,25 M HCl behandelt, damit eine Depurinierung der aufgetrennten DNA stattfinden konnte. Anschließend wurde das Gel kurz in Wasser gewaschen und dann zweimal für je 20 min mit 0,4 M NaOH inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Für den Transfer wurde ein Kapillarblot wie in Abbildung 3.1 aufgebaut und die DNA-Übertragung auf die Membran erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

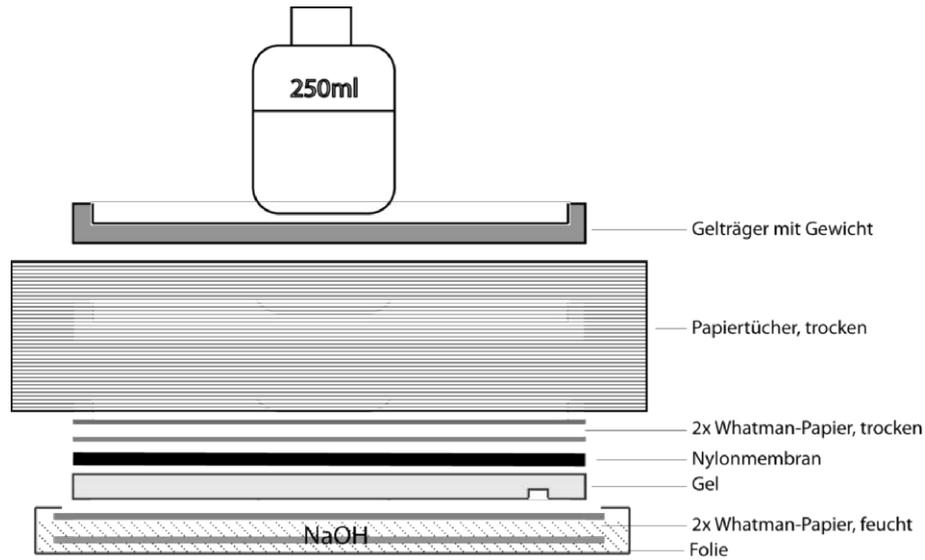


Abbildung 3.1: Aufbau des Kapillarblots für die *Southern Blot*-Analyse

Beim Abbau des Kapillarblots wurden mit einem weichen Bleistift die Geltaschen auf der Membran markiert und zur besseren Orientierung eine kleine Ecke unten rechts von der Membran entfernt. Die Membran wurde zwei- bis dreimal in 2xSSC-Lösung gewaschen, bis die Neutralisation des pH-Wertes vollzogen war. Mit Hilfe von UV-Licht erfolgte die Fixierung der DNA an die Membran, die dann bis zur Hybridisierung trocken in Whatman-Papier bei Raumtemperatur gelagert werden konnte.

Hybridisierung Die vorbereitete Membran wurde mit der DNA-Seite nach innen zeigend in einen verschraubbaren Glaszylinder überführt. Es wurden rund 25 ml Hybridisierungspuffer ExpressHyb™ (Fa. Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye in Frankreich) hinzugefügt und die Membran in einem 65 °C warmen Hybridisierungs-ofen unter rotierenden Bewegungen für mindestens eine Stunde prä-hybridisiert. Währenddessen erfolgte die Synthese der radioaktiv markierten Sonde. Hierfür wurden 25 ng Sonden-DNA in 1x TE-Puffer mit einem Gesamtvolumen von 45 µl gelöst. Nach 5 min Denaturierung bei 95 °C folgte eine Inkubation von 5 min auf Eis. Die denaturierte DNA wurde in ein Röhrchen des Amersham Rediprime II DNA Labeling Systems (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) gegeben und die Reaktion unter Zugabe von 5 µl α-P³² dCTP bei 37 °C für mindestens zwei Stunden

inkubiert. Anschließend wurde die mit radioaktiven Nukleotiden markierte Sonde über eine Gelmatrixsäule von überschüssigen Nukleotiden aufgereinigt. Der Einbau von radioaktiven Nukleotiden wurde semiquantitativ durch Messung der Zerfälle pro Minute an der fertigen, radioaktiven Sonde und dem Rückhalt in der Säulenmatrix abgeschätzt. Die Sonde wurde bei 95 °C für 5 min inkubiert, weitere 5 min auf Eis gestellt und schließlich zu der Membran in den Glaszylinder gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C über Nacht rotierend im Ofen. Am Folgetag wurde die Hybridisierungslösung entfernt und es erfolgten mehrerer Waschschrte mit vorgewärmten Waschlösungen. Zuerst wurde für wenige Sekunden mit 2x SSC/1 % SDS-Lösung gespült. Danach erfolgten mit jeweils frischer 2x SSC/0,1 % SDS-Lösung bei 65 °C rotierend im Ofen zwei Waschschrte für je 10 min. Im Anschluss wurde die Membran in eine Plastikbox überführt und zweimal für je 20 min mit 0,2x SSC/1 % SDS-Lösung bei 65 °C im Wasserbad gewaschen. Die noch feuchte Membran wurde in Plastikfolie eingeschlagen und mit einer Phosphorimager-Platte zusammen in einer Röntgenkassette über Nacht inkubiert. Bei der Auswertung gescannter Bilder wurden die Klone als positiv gewertet, die das erwartete Bandenmuster aufwiesen.

3.5.8 Expansion embryonaler Stammzellklone mit gewünschter Transgenintegration

Nach der Identifikation der positiven, also transgenen, ES-Zell-Klone anhand eines *Southern Blots* wurden diese für die diploide Aggregation expandiert. Hierfür wurden pro transgenem Konstrukt bis zu fünf positive ES-Zell-Klone von der eingefrorenen 96-Loch-Platte bei 37 °C aufgetaut, in ES-Zell-Medium resuspendiert und auf eine 48 Loch-Platte (am Vortag mit Feederzellen vorbereitet) ausgesät. Je nach Koloniedichte wurden die Klone auf größere Kulturschalen mit neuen Feederzellen umgesetzt bis 60 mm-Kulturschalen erreicht waren. Von diesem Format wurden die Zellen eingefroren und nach Bedarf für die diploide Aggregation aufgetaut.

3.6 Maushaltung und -zucht

3.6.1 Tierversuchsantrag

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten, transgenen Mauslinien und die tierexperimentellen Arbeiten, insbesondere die für die Generierung der transgenen Chimären benötigten Spendertiere, wurden als Ergänzung zum Rahmenantrag „Herstellung genetisch veränderter Mäuse“ - G 0368/08 der Abteilung Entwicklungsgenetik des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik in Berlin unter der Projektbezeichnung „Haploidspezifität in der Spermatogenese“ beantragt und durch das Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt.

3.6.2 Erzeugung von transgenen Mauslinien

Die genetisch veränderten ES-Zellen wurden durch diploide Aggregation zur Generierung von transgenen Mäusen genutzt. Die Methode wurde im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin freundlicher Weise von der Transgeneinheit des Tierhauses durch erfahrene Mitarbeiter, insbesondere durch K. Macura, durchgeführt. Die Vorgehensweise basiert auf einer in der Arbeitsgruppe von A. Nagy etablierten Alternative zur Mikroinjektion, bei der transgene ES-Zellen durch Aggregation mit Spenderembryonen im Morulastadium zur Erzeugung einer Mauslinie genutzt werden (Wood et al. 1993).

3.6.3 Allgemeine Haltung und Zucht

Haltung Die in Tabelle 3.14 erwähnten beziehungsweise im Rahmen dieser Arbeit generierten, transgenen Mauslinien wurden in den Tierräumen im Tierhaus des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik in Berlin gehalten. Die Haltung entspricht dort dem Status spezifiziert pathogenfrei und erfüllt damit die von der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* („FELASA“) empfohlenen Anforderungen an den Hygienestatus in Versuchstierhaltungen (Nicklas et al. 2002). Die Mäuse waren in individuell ventilierten Käfigen untergebracht und wurden mit HEPA-gefilterter Luft versorgt. Diese sogenannten IVC-Käfige waren mit Labortiereinstreu und Nestmaterial ausgestattet und wurden wöchentlich gewechselt. Die Tiere erhielten ad libitum Pelletfutter (ssniff V 1124-0 M-Z) und Wasser. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen, das heißt bei konstanter Luftfeuchtigkeit von 55 %, konstanter Temperatur von 22 °C und gleichmäßigem Lichtregime mit 12 Stunden Hellphase. Die Pflege, das Ansetzen von Verpaarungen und die Markierung der Tiere mit Ohrmarken und durch Ohrlochung erfolgte durch das Tierpflegepersonal.

Zucht und Vererbungstest Als erste Kontrolle der diploiden Aggregation wurde mit ausgewählten transgenen Mauslinien die Keimbahngängigkeit der Transgene in einem Keimbahntest überprüft. Hierfür wurden je Linie drei Chimäre mit NMRI-Weibchen durch Tierpfleger verpaart und die Fellfarbe sowie der Genotyp durch PCR anhand von Schwanzspitzenbiopsien überprüft. Für einen Transmissionstest wurden die transgenen *Tcr*-Deletionsmauslinien zunächst mit einer Mauslinie verpaart, die den partiellen *t*-Haplotyp $t^{h51}t^{h18}$ aufwies. Zuchtreife, transgene Böcke wurden mit Weibchen, die den genannten, partiellen *t*-Haplotyp trugen, verpaart und trächtige Weibchen einzeln gesetzt. Für den Verpaarungstest waren nur männliche Nachkommen mit einem bestimmten Genotyp relevant, deshalb wurde beim Absetzen von drei Wochen alten Jungtieren nur den Böcken eine Schwanzspitzenbiopsie entnommen (siehe 3.7.1). Durch Genotypisierung identifizierte Testtiere wurden im Alter von etwa acht Wochen mit acht bis zehn Wochen alten NMRI-Weibchen in einem Verhältnis 1:2 verpaart. Durch die Tierpfleger wurde morgens eine Vaginalpfropf-Kontrolle durchgeführt, um erfolgreich begattete Weibchen zu identifizieren.

Weibchen mit Plug wurden einzeln gesetzt und nach einer Tragzeit von 17-18 Tagen zur Embryonenpräparation herangezogen, wobei für die statistische Auswertung dokumentiert wurde, von welchem Testmännchen sie stammten.

Tabelle 3.14: Verwendete Mauslinien

Mauslinie	Spezifikationen
NMRI	Auszuchtstamm im Naval Medical Research Institut (USA) etabliert
$t^{h51}t^{h18}/+$	für den partiellen t -Haplotyp $t^{h51}t^{h18}$ heterozygote Mauslinie
$TgNV11/0$	für das zufällig im Genom integrierte Transgen Tg11 hemizygoter Mauslinie

3.7 Gewebeentnahme, Verarbeitung und Genotypisierung

3.7.1 Entnahme von Geweben

Schwanzspitzenbiopsie Zur Genotypisierung wurde aus Schwanzspitzenbiopsien genomische DNA gewonnen. Dafür wurde mindestens drei Wochen alten Mäusen mit einer Schere ein circa 5 mm Biopat an der Schwanzspitze abgesetzt und einzeln in Eppendorfröhrchen gesammelt. Die Schwanzspitzenbiopsie wurde routinemäßig durch Tierpfleger vorgenommen.

Hodenentnahme Zur Organentnahme wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Der abdominale Zugang erfolgte über eine Inzision in der mit Ethanol desinfizierten, caudoventralen Bauchwand. Der Hoden wurde in die sterile Bauchhöhle verlagert und herauspräpariert. Zum unverzüglichen Gefrieren wurde ein aus Alufolie geformtes Förmchen auf Isopropanol umspültes Trockeneis gesetzt und die Gewebeprobe in das Förmchen gelegt. Anhand der hellen Farbveränderung konnte der Gefriervorgang kontrolliert werden. Gefrorenes Gewebe wurde in vorgekühlte Gefrieröhrchen gegeben, auf Trockeneis überführt und dauerhaft bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Isolierung von Spermien für Immunfluoreszenzfärbung Zur Gewinnung von isolierten Spermien wurde die Cauda epididymidis und Teile des Ductus deferens aus dem Tierkörper präpariert und sofort in eine 35 mm Zellkulturschale verbracht, die 1 ml 1x EKR B als Kapazitationsmedium enthielt (Zeng et al. 2003). Mit Pinzette und Schere wurde das Gewebe sorgfältig zerkleinert bis eine milchig, trübe

Suspension entstand. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 2 ml Eppendorfröhrchen überführt und auf einem Heizblock für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation waren die Spermien weitestgehend in den Puffer ausgeschwommen und grobe Gewebestandteile hatten sich am Boden abgesetzt, so dass man den Flüssigkeitsüberstand in ein neues Röhrchen überführen konnte. Um mechanische Zerstörung der Spermien zu vermeiden, wurden die verwendeten Pipettenspitzen um circa 1 cm gekürzt. Die Spermiesuspension wurde 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Zum Spermienpellet wurde 1 ml DPBS gegeben und durch kurzes Anschneiden des Gefäßes die Zellen in Lösung gebracht. Die Spermiesuspension wurde daraufhin weitere 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Spermienpellet in etwa 100 µl DPBS vorsichtig resuspendiert. Auf Objektträgern wurde ein circa pfenniggroßes Areal mit einem Diamantstift umrissen, annähernd 10 µl der Spermienlösung aufgetragen und großzügig mit der Pipettenspitze verteilt. Nach kurzem Lufttrocknen wurden die Objektträger mit 500 µl 4 % PFA-Lösung überschichtet und für mindestens 15 min in einer Feuchtkammer fixiert. Zur besseren Antikörperpenetration wurden die Objektträger daraufhin in einer vorgekühlten Aceton/Methanol-Lösung (Verhältnis 1:1) für fünf Minuten bei -20 °C inkubiert und anschließend dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Anschließend konnte die Immunfluoreszenzfärbung erfolgen (siehe 3.8.5).

Proben für die *Dot Blot*-Analyse Die tragende Maus eines Vererbungstests wurde am Tag 17 beziehungsweise 18 der Trächtigkeit durch zervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle konnte der Uterus freipräpariert und in eine mit eiskaltem 1x PBS gefüllte Petrischale überführt werden. Die Embryonen wurden aus dem Uterus und den embryonalen Hüllen herauspräpariert und in eine neue Petrischale mit 1x PBS auf Eis gestellt. Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde eine maximal 1 cm lange Embryonenschwanzbiopsie abgesetzt und in circa 400 µl Laird's Lysispuffer über Nacht in einer Mikrotiterplatte (1,2 ml/Loch) bei 56 °C proteolytisch aufgeschlossen.

3.7.2 Genotypisierung

Genotypisierung durch Polymerase Kettenreaktion Für die Gewinnung von genomischer DNA für eine PCR wurden Schwanzspitzenbiopsate proteolytisch verdaut. Das Gewebe wurde 200-300 µl Laird's Lysispuffer bei 56 °C über Nacht lysiert. Das Lysat wurde durchmischt und 20 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 5 µl in 100 µl 10 mM Tris gelöst und in Thermozykler bei 80 °C für 20 min die Hitzeinaktivierung der Proteinase K durchgeführt. Diese Verdünnung wurde als *Template* für Genotypisierungs-PCRs verwendet. Es wurden Primer eingesetzt, die für das jeweilige Merkmal beziehungsweise Transgen spezifische PCR-Produkte amplifizierten, die mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und dokumentiert wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden standardmäßig Genotypisierungs-PCRs, wie in Tabelle 3.15 und 3.16 angegeben, durchgeführt.

Tabelle 3.15: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von transgenen Mauslinien mit Angabe des verwendeten Primerpaars

Eigene transgene Mauslinien Primer Hygro-s/Hygro-as			<i>Kontrollmauslinie TgNV11/0</i> Primer NV-55/NV-72		
Phase	Temp.	Zeit	Phase	Temp.	Zeit
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
Denaturierung	94 °C	30 s	Denaturierung	98 °C	30 s
Anlagerung	55 °C	30 s	Anlagerung	52,8 °C	15 s
Elongation	72 °C	30 s	Elongation	72 °C	45 s
Finale Elongation	72 °C	3 min	Finale Elongation	72 °C	2 min

Tabelle 3.16: PCR-Protokoll für die Genotypisierung der Mäuse mit dem partiellen *t*-Haplotyp $t^{h51}t^{h18}/+$, mit Angabe der verwendeten Primer

Merkmal t^{h51} Primer vil-s/vil-as			Merkmal t^{h18} Primer HB1/HB2		
Phase	Temp.	Zeit	Phase	Temp.	Zeit
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung	94 °C	0 min
Denaturierung	94 °C	30 s	Denaturierung	98 °C	30 s
Anlagerung	57 °C	35 s	Anlagerung	66 °C	15 s
Elongation	72 °C	30 s	Elongation	72 °C	30 s
Finale Elongation	72 °C	2 min	Finale Elongation	72 °C	3 min

Genotypisierung durch *Dot Blot* Für die Genotypisierung der Embryonen-DNA zur Erfassung der Vererbungsrate des Transgens auf die Nachkommen im Vererbungstest erwies sich die PCR aufgrund des Auftretens von falsch negativen Ergebnissen als nicht geeignet, deshalb wurde eine *Dot Blot* Analyse durchgeführt, in der neben der Hybridisierung mit einer transgenspezifischen Sonde auch eine Hybridisierung mit einer genomischen Sonde als Ladekontrolle vorgenommen wurde. Für die *Dot Blot*-Analyse musste das DNA-Lysat von Embryonenschwänzen (siehe 3.7.1) zunächst gefällt werden. Lysat und Isopropanol wurden 1:1 vermengt, gut durchmischt und 45 min bei 16.000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet zweimal in 70 % Ethanol gewaschen, kurz luftgetrocknet und schließlich in 0,2x TE-Puffer gelöst. Um die Resuspension zu verbessern, wurde die gelöste DNA über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für den Transfer auf eine Nylonmembran wurden 10 µl aufgereinigte, genomische DNA in 50 µl 0,4 M NaOH gelöst und für 15 min bei 37 °C denaturiert. Mit Hilfe eines 96-well Dot-Blotters und angeschlossenen Vakuums konnten bis zu 96 DNA-Proben gleichzeitig auf eine Membran transferiert werden. Nachdem in allen Slots die Flüssigkeit komplett durchgezogen war, wurde die Membran kurz auf Filterpapier getrocknet und sofort mit Hilfe von UV-Licht die DNA an die Membran gebunden. Von jeder Probe wurden mindestens zwei Transfers angefertigt, um Pipettierfehler aufdecken zu können. Die Membranen wurden wie ein *Southern Blot* Membran (siehe 3.5.7) mit der radioaktiv markierten, transgenspezifischen Hygro-Sonde über Nacht hybridisiert, gewaschen und auf einer Phosphorimager-Platte über Nacht exponiert. Nach der Dokumentation und Auswertung wurden die Membranen bei 90 °C mit 0,1 % SDS-Lösung von der Hygro-Sonde befreit und zur DNA-Ladekontrolle mit der ColA1-Sonde hybridisiert.

3.8 Histologische Methoden

3.8.1 Gewebeschnitte für histologische Untersuchungen

An einem Kryostat wurden 10 µm dünne Gewebeschnitte hergestellt und auf Objektträger gezogen. Hierfür wurde das gefrorene Hodengewebe mit Hilfe von Tissue-Tek® O.C.T.TM Compound (Fa. Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) auf Objekthalter befestigt, in das Gerät eingespannt und konstant bei -12 °C gekühlt. Bei einer durchschnittlichen Temperatur von -12 °C von Messer und Objektisch wurden die Gewebeschnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und auf einer Wärmeplatte getrocknet. Sollten die Schnitte für die *in situ* Hybridisierung herangezogen werden, wurde das Gewebe nach etwa 20 s Trocknung für eine bessere RNA-Stabilisierung sofort mit einigen Tropfen 4 % PFA-Lösung und Parafilm überdeckt und bis zur Fixierung (siehe 3.8.2) am selben Tag bei Raumtemperatur gelagert. Für die Immunhistochemie war diese Vorsichtsmaßnahme nicht erforderlich und die Schnitte wurden bis zu einer halben Stunde auf der Wärmeplatte getrocknet.

3.8.2 Fixierung von Kryoschnitten für die *in situ* Hybridisierung

Die Fixierung von Kryoschnitten für die *in situ* Hybridisierung wurde manuell in Glasküvetten bei Raumtemperatur durchgeführt. Als erstes erfolgte die Fixierung in 4 % Paraformaldehydlösung unter Ablösung des Parafilms und anschließend wurden die Objektträger zweimal für zwei Minuten in 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Daraufhin erfolgte eine manuelle Acetylierung in 0,1 M Triethanolaminlösung. Die Schnitte wurden hierfür zweimal 5 min in frisch hergestellter 0,1 M TEA-Lösung unter Zugabe von Essigsäureanhydrid acetyliert, wobei die Lösung für eine gleichmäßige Durchmischung ständig mit einem Rührfisch in Bewegung gehalten wurde. Im Anschluss wurde 2 min in 1x PBS und 2 min in 0,9 % NaCl gewaschen und dann erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 50 %, 70 %, 80 %, 95 % und zweimal 100 %igen Ethanol mit jeweils 2 min Verweildauer. Nach Lufttrocknung wurden die Schnitte bis zur Weiterverwendung bei -80 °C in Schnittkästen mit Silicat-Kugel-Päckchen gelagert oder direkt für die *in situ* Hybridisierung (siehe 3.8.3) herangezogen.

3.8.3 *In situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten

Fixierte Gewebeschnitte wurden zur Prähybridisierung mit Hybridisierungslösung für ein bis vier Stunden bei 65 °C im Hybridisierungsofen vorhybridisiert. Hierfür wurden die Schnitte mit 100 µl Lösung überschichtet und mit Parafilmabdeckung in einer aufrechten Objektträgerbox gestapelt. Für die Sondenhybridisierung wurde die RNA-Sonde 1:100 in Hybridisierungslösung verdünnt, gut gemischt und bei 85 °C für 5 min im Thermomixer denaturiert. Von dieser Lösung wurden auf jeden

Tabelle 3.17: Fixierung von Gefrierschnitten für die *in situ* Hybridisierung

Schritt	Lösung	Zeit
1	4 % PFA	20 min
2	0,9 % NaCl	2 min
3	0,9 % NaCl	2 min
4	0,1 M TEA + C ₄ H ₆ O ₃	5 min
5	0,1 M TEA + C ₄ H ₆ O ₃	5 min
6	1x PBS	2 min
7	0,9 % NaCl	2 min
8	30 % Ethanol	2 min
9	50 % Ethanol	2 min
10	70 % Ethanol	2 min
11	80 % Ethanol	2 min
12	95 % Ethanol	2 min
13	100 % Ethanol	2 min
14	100 % Ethanol	2 min

Objektträger 100 µl aufgetragen und mit Parafilmabdeckung bei 65 °C über Nacht in befeuchteter Objektträgerbox hybridisiert.

Nach der Hybridisierung erfolgten fünf Waschschrte bei 65 °C mit vorgewärmten Waschlösungen und Glasküvetten. Zunächst wurden die Schnitte zur Parafilmfernung in 5xSSC kurz gespült. Es folgte ein 30-minütiger Waschschrte in 1xSSC/50 % Formamid. Daraufhin wurden die Schnitte jeweils 20 min einmal in 2xSSC und zweimal in 0,2xSSC gewaschen und am Ende in der letzten Waschlösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Vorbereitend auf die Antikörper-Inkubation wurden die Schnitte zweimal für 5 min bei Raumtemperatur mit MABT-Lösung äquilibriert. Es erfolgte ein Blockierungsschrte mit 20 % Lammserum in MABT zu je 400 µl je Objektträger für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer. Der Antikörper Anti-Digoxygenin-AP (Tab. 3.19) wurde 1:2500 in 5 % Lammserum in MABT verdünnt, 400 µl je Objektträger aufgetragen und mit Parafilmabdeckung bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert.

Tabelle 3.18: Tabellarisches Protokoll *in situ* Hybridisierung

Schritt	Lösung	Temperatur	Zeit
1	Hybridisierungslösung	65 °C	1-4 h
2	Hybridisierungslösung mit Sonde	65 °C	ü.N.
3	5x SSC	65 °C	5 min
4	1x SCC/50 % Formamid	65 °C	30 min
5	2x SSC	65 °C	20 min
6	0,2x SSC	65 °C	2x 20 min
7	MABT	20 °C	2x 5 min
8	MABT/20 % LS	20 °C	1 h
9	MABT/5 % LS und Anti-Dig-AP	4 °C	ü.N.
10	MABT	20 °C	2x 5 min
11	NTMT	20 °C	10 min
12	Färbelösung BM Purple	4 °C oder 20 °C	1-3 d
13	NTMT	20 °C	5 min
14	1x PBS	20 °C	2x 5 min
15	4 % PFA	20 °C	30 min
16	1x PBS	20 °C	3x 5 min

Es erfolgten schließlich drei Waschschritte bei Raumtemperatur in MABT und für die von der alkalischen Phosphatase katalysierte Farbreaktion wurden die Schnitte in NTMT für zehn Minuten äquilibriert bevor jeder Objektträger mit 200 µl Farblösung BM Purple (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen) überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt wurde. Die Farbreaktion, das heißt die Komplexbildung aus 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, erfolgte bei Raumtemperatur oder 4 °C in einer befeuchteten Kammer und je nach eingesetzter Sonde konnte die Farbentwicklung ein bis drei Tage dauern, wobei sie täglich mikroskopisch kontrolliert wurde. Zum Beenden der Farbreaktion wurden die Schnitte zunächst 5 min bei Raumtemperatur in NTMT gewaschen und durchliefen danach zwei fünfminütige Waschschritte in 1xPBS-Lösung. Zur Fixierung wurden auf jeden Objektträger 500 µl 4 % PFA Lösung pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Drei fünfminütige Waschschritte in 1xPBS-Puffer folgten, bevor die Schnitte mit einigen Tropfen Kaisers Glyceringelatine (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) und Deckglas eingedeckt wurden. Je transgener Mauslinie wurden zu einer Untersuchung der RNA-Expression durch *in situ* Hybridisierung auf Hodenschnitten bis zu drei verschiedenen Individuen herangezogen.

Tabelle 3.19: Bei den histologischen Methoden verwendete Antikörper

Antikörper	Spezifikationen	Vertreiber
Anti-beta Tubulin[TUB](Cy3 [®])	monoklonaler Erstantikörper von der Maus, gegen β -Tubulin, mit rotem Fluoreszenzmarker gekoppelt	Abcam PLC, Cambridge in England
Anti-Digoxygenin-AP	polyklonaler Erstantikörper vom Schaf, gegen Dig, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt	Roche Deutschland GmbH, Grenzach-Wyhlen
Anti-mouse Ig Peroxidase ImmPREESS Reagent Kit	Zweitantikörper gegen Maus IgG, mit Meerrettich Peroxidase gekoppelt	Vector Laboratories Ltd., Burlingame in den USA
Anti-c-Myc	polyklonaler Erstantikörper, vom Kaninchen, gegen Myc-Epitop	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg
Anti-Myc-Tag Klon 4A6	monoklonaler Erstantikörper von der Maus, gegen Myc-Epitop	Merck KGaA, Darmstadt
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)-Alexa Fluor 488	polyklonaler Zweitantikörper von der Ziege, gegen Kaninchen IgG, gekoppelt mit grünem Fluoreszenzmarker	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG (H+L)-Alexa Fluor 488, MinX keine	polyklonaler Zweitantikörper von der Ziege, gegen Maus IgG, gekoppelt mit grünem Fluoreszenzmarker	Dianova GmbH, Hamburg

3.8.4 Immunhistochemie auf Gewebeschnitten

Vom gefrorenen Hodengewebe wurden wie unter 3.8.1 beschrieben 10 μ m dünne Schnitte am Kryostat angefertigt, auf Objektträger gezogen und auf einer Wärmeplatte bei 37 °C getrocknet. Zur Fixierung wurden die Schnitte für drei Minuten in -20 °C kaltem 100 % Methanol fixiert und anschließend dreimal in 1x PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Reduktion der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte durch Inkubation in 1xPBS mit 1,5 % H₂O₂ bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal in 1xPBS gewaschen. ei den Mit Hilfe von Filterpapier wurde der Objektträger um das Gewebe herum getrocknet und dann mittels PAPpen (Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt) ein Ring um die Gewebeproben gezogen. Die so vorbereiteten Objektträger wurden nun zur Blockierung in einer Feuchtkammer

für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit 1,5 % BSA in PBS Lösung überschichtet. Für die Erstantikörperinkubation gegen ein Myc-Epitop (Tab. 3.19) wurde die Blockierlösung vom Objektträger abgekippt, durch 100 µl einer 1:100 Verdünnung des jeweiligen Erstantikörpers in 1,5 % BSA in PBS Lösung ersetzt und mit Parafilmabdeckung in einer Feuchtkammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal in 1x PBS unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur gewaschen. Für die Zweitantikörperreaktion wurde das Gewebe mit 2-3 Tropfen der ImmPREESS-Sekundärantikörperlösung (Tab. 3.19) überschichtet und in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde inkubiert. Vor der Farbreaktion wurden die Schnitte dreimal in 1x PBS unter ständigem Rühren gewaschen. Die Färbung erfolgte mit dem ImmPACT Nova-RED Peroxidase Substrate (Fa. Vector Laboratories Ltd., Burlingame in den USA). Ein für die Objektträgeranzahl angemessenes Volumen an Gebrauchslösung wurde durch Mischen der drei Komponenten hergestellt, auf die Schnitte getropft und bei Raumtemperatur die Farbentwicklung am Lichtmikroskop verfolgt. Wenn die Farbentwicklung ausreichend war, wurde sie durch Waschen in Leitungswasser für mindestens 5 min gestoppt. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 10 Sekunden in Hämatoxylin-Lösung getaucht und anschließend kurz in Leitungswasser gewaschen. Zum Eindeckeln wurden die Objektträger entwässert. Hierzu durchliefen sie für jeweils 10 Sekunden zweimal 95 % Ethanol und zweimal 100 % Xylol. Schließlich wurden die Gewebe mit zwei Tropfen Entellan (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) und einem Deckglas eingedeckt und über Nacht unter einem Abzug getrocknet. Die Lagerung bis zur mikroskopischen Auswertung erfolgte bei 4 °C. Je transgener Mauslinie wurden für eine Untersuchung der Proteinexpression bis zu drei verschiedenen Individuen zu der Immunhistochemie herangezogen.

3.8.5 Immunfluoreszenzfärbung von Spermien

Die Immunfluoreszenz wurde auf isolierten Mausspermien durchgeführt, wobei aufgrund der aufwendigen Spermienisolierung maximal fünf verschiedene Tiere gleichzeitig untersucht werden konnten. Durch Wiederholung wurde gewährleistet, dass jede herangezogene Mauslinie mit Spermienproben von mindestens drei unterschiedlichen Individuen untersucht wurde. Die vorbereiteten Objektträger (siehe 3.7.1 Isolierung von Spermien) wurden in einer befeuchteten Kammer für 30 min bei Raumtemperatur mit je 500 µl PBST mit 5 % Ziegenserum (NGS) blockiert. Anschließend erfolgte die Erstantikörperinkubation. Hierfür wurde der jeweilige Antikörper (Tab. 3.19) in Blockierungslösung 1:100 verdünnt, von dieser Lösung 100 µl auf jeden Objektträger gegeben und mit einem Parafilm abgedeckt bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

Zum Entfernen des Erstantikörpers und der Abdeckung wurden die Schnitte am nächsten Tag zweimal für je zehn Minuten in PBST in Glasküvetten gewaschen. War der eingesetzte Erstantikörper bereits mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt wurde direkt die DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Ansonsten erfolgte erst noch die Zweitantikörperinkubation für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten, befeuchteten Kammer. Ein mit Fluoreszenzmarker gekoppelter

Zweitantikörper (Tab. 3.19) wurde hierfür in einer Verdünnung 1:1000 in PBST mit 5 % NGS zu jeweils 500 μ l pro Objektträger eingesetzt. Im Anschluss erfolgten zwei Waschschrte für je 10 min in PBST unter Abdunklung. Zur Kernfärbung von Geweben auf Objektträgern wurde DAPI in einer Verdünnung 1:5000 in PBST zu 500 μ l je Objektträger eingesetzt und für 5 min bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger abgedunkelt bei Raumtemperatur einem letzten Waschschrte in PBST unterzogen. Auf die Objektträger wurde schließlich ein Tropfen Vectashield H-1000 (Fa. Vector Laboratories Ltd., Burlingame in den USA) und ein Deckgläschen gegeben, welches durch Auftragen von Nagellack an den Rändern am Objektträger fixiert wurde. Die Lagerung der fertigen Objektträger erfolgte bei 4 °C. Da die Fluoreszenzsignale im Laufe der Zeit an Intensität verloren, wurde die mikroskopische Untersuchung und Dokumentation innerhalb von maximal drei Tagen nach der Färbung durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Gezielte Integration von Transgenen in den *ColA1*-Locus embryonaler Stammzellen

Zur Integration von Transgenen in embryonale Stammzellen, die für die Generierung von Mauslinien herangezogen werden sollten, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch an einem spezifischen Genlocus durchgeführt. Zum besseren Verständnis der Auswertung der erfolgreichen Transgenintegration werden wichtige Details der Strategie erläutert.

Um ES-Zellen genetisch zu verändern gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, die ihre Vor- und Nachteile für den jeweiligen Verwendungszweck mit sich bringen. Die Rekombinase-vermittelte Integration eines Transgens an einen definierten Genlocus bietet bei der Expressionsanalyse *in vivo* viele Vorteile gegenüber einer Zufallsintegration und schafft einheitliche Verhältnisse für vergleichende Expressionsanalysen verschiedener Transgene. Zum einen kann ein Integrationsort gewählt werden, der geringe Positionseffekte aufweist, von denen die Expression eines Transgens negativ beeinflusst werden könnte. Zum anderen besteht die Möglichkeit ein Transgen als einfache Kopie in das Genom zu integrieren, wodurch in der Analyse ausgeschlossen werden kann, dass der Phänotyp durch mehrfach integrierte Kopien des Konstruktes hervorgerufen wird, wie es bei Zufallsintegrationen häufig auftreten kann. Beim zufälligen Einbau eines Transgens besteht zudem immer die Möglichkeit, dass ein essentielles Gen zerstört oder negativ beeinflusst wird, so dass für jedes Transgen in der Regel mehrere Mauslinien analysiert werden, um den beobachteten Phänotyp eindeutig dem Transgen zuordnen zu können. Für eine gezielte Integration findet neben dem weit verbreiteten Cre/loxP-System auch das Flp/FRT-System immer häufiger Verwendung. Die Grundlage eines solchen sequenzspezifischen Rekombinationssystems bildet eine relativ kurze Erkennungssequenz (Abb. 4.1). Diese wird von einer Rekombinase erkannt, von der wiederum die Rekombination katalysiert wird.

Alle transgenen Konstrukte dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines Flp/FRT-Rekombinationssystems (in der Abteilung Entwicklungsgenetik am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin etablierte, unveröffentlichte Methode) erfolgreich in den *ColA1*-Locus von embryonalen Stammzellen integriert. Dafür wurde das Protokoll eines Gene Targeting Kits (Fa. Life Technologies GmbH, Darmstadt) modifiziert, das in der Arbeitsgruppe von Rudolf Jaenisch etabliert wurde (Beard et al. 2006). Als Integrationsort wählte man den *ColA1*-Locus, da dort integrierte Transgene stark exprimiert wurden, auch in Geweben, in denen das Gen für Kollagen Typ 1 nicht transkribiert wurde. Beard und ihre Mitarbeiter haben durch homologe



Abbildung 4.1: Aufbau der FRT-Erkennungssequenz

Die *Flippase Recognition Target*-Sequenz besteht aus einem 8 bp großen, asymmetrischen *Spacer*, der von zwei inversen, 13 bp großen Sequenzwiederholungen flankiert ist. Die aus *Saccharomyces cerevisiae* stammende Flippase katalysiert die Rekombination zwischen zwei FRT-Erkennungssequenzen.

Rekombination circa 550 bp stromabwärts der 3'-UTR des *ColA1*-Gens in ES-Zellen eine Selektionskassette eingefügt, die aus einem Neomycin-Resistenztransgen, flankiert von zwei FRT-Erkennungssequenzen sowie einem Hygromycin-Resistenzgen ohne Promoter und Start-ATG bestand (Abb. 4.2, B). Abweichend von der Publikation wurde in der Abteilung von Prof. Dr. B.G. Herrmann am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin ein alternativer Targetingvektor pPGK-2FRT-*ins* kloniert (unveröffentlicht), der eine herkömmliche FRT-Sequenz, eine Integrationsstelle für Transgene, einen *Chicken β-globin*-Isolator, einen Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promoter und eine FRT-Sequenz mit Start-Codon enthielt (Abb. 4.2, A). Transgene konnten in diesen Vektor integriert und für den Kassettenaustausch herangezogen werden. Bei einer Rekombination sollte dabei das Transgen im Targetingvektor gegen das Neomycinresistenzgen im modifizierten Locus ausgetauscht werden. Durch die Lokalisation der FRT-Sequenzen im Targetingvektor sollte außerdem das Hygromycingen im *ColA1*-Locus durch einen PGK-Promoter und ein Start-Codon ergänzt werden. Bei richtiger Rekombination sollten die transgenen ES-Zellen in der Lage sein, eine Hygromycin-Phosphotransferase zu exprimieren und das Transgen ohne Rückgrat des Targetingvektors spezifisch im *ColA1*-Locus integriert haben. Der Vorteil gegenüber der ursprünglichen Rekombinationsstrategie der Publikation von Beard und ihren Mitarbeitern sollte vor allem die weitestgehende Ausschaltung von Effekten sein, von denen die Expression des eigentlichen Transgens beeinflusst werden könnte. Der eingeschobene *Chicken β-globin*-Isolator sollte zudem das Transgen gegenüber dem PGK-Promoter des Resistenzgens Hygromycin abschirmen (Chung et al. 1993) und eine Repression der Transgenexpression, die häufig durch Methylierung des Targetingvektorrückgrats ausgelöst wird, sollte so ebenfalls ausgeschlossen werden (Abb. 4.2, C).

Alle im Rahmen dieser Arbeit klonierten Transgene wurden in den hier beschriebenen Targetingvektor integriert. Der transgentragende Targetingvektor wurde mit dem Flippase exprimierenden Vektor pCAGGS-FLPe zusammen in ES-Zellen (C2) mit modifiziertem *ColA1*-Locus transfiziert, die Zellen wurden mit dem Antibiotikum Hygromycin auf erfolgreiche Rekombination selektioniert und die resistenten ES-Zell-Klone durch *Southern Blot*-Analyse untersucht. Hierfür kamen externe Sonden zum Einsatz, die im 5'- beziehungsweise im 3'-Bereich des modifizierten Integrationsortes hybridisierten (Abb. 4.2, C). Bei der Wahl des Restriktionsenzym zum Verdau der genomischen DNA wurde berücksichtigt, dass die Sonden auch im Wildtypallel des *ColA1*-Locus hybridisierten und im *Southern Blot* zwei Banden auftreten würden, die größentechnisch voneinander unterscheidbar sein sollten.

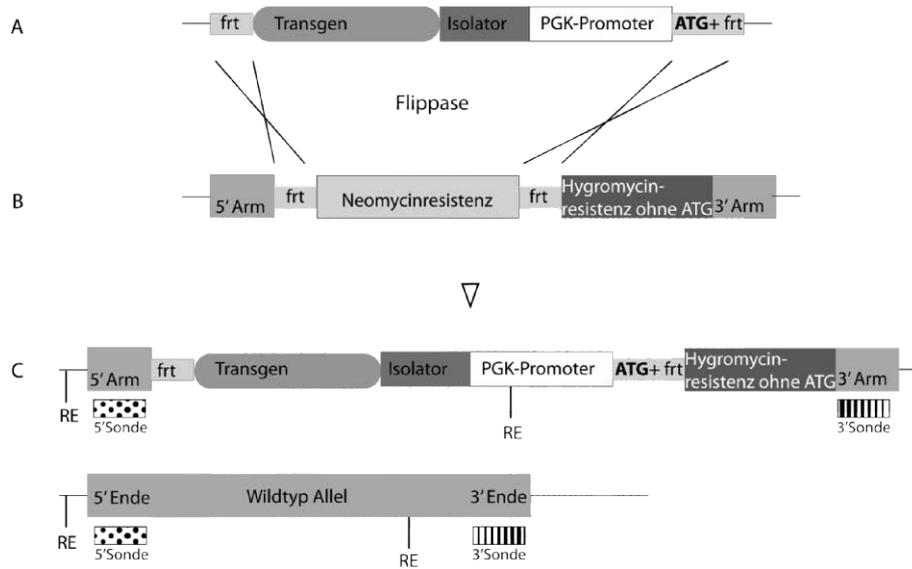


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausches im *ColA1*-Locus von ES-Zellen (entsprechend der unveröffentlichten Methode der Abteilung Entwicklungsgenetik am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin erstellt, mit allen wichtigen relevanten Bestandteilen im Plasmid bzw. *ColA1*-Locus)

A: Targetingvektor pPGK-2FRT-ins mit Transgen,
B: modifizierter *ColA1*-Locus vor der Rekombination,
C: oben: modifizierter *ColA1*-Locus mit einem integriertem Transgen nach erfolgreicher Rekombination; unten: Wildtypallel des *ColA1*-Locus (gepunktet/gestreift=Lage der Bindungsdomänen für die *Southern Blot*-Sonden; RE=Lokalisation der Restriktionsenzymchnittstelle für die *Southern Blot*-Analyse)

Wie in Abbildung 4.3 beispielhaft für das transgene Konstrukt Tg11 gezeigt, ergaben sich bei erfolgreicher Integration in den *ColA1*-Locus nämlich eine transgenspezifische Bande sowie eine Bande für das Wildtypallel. In der *Southern Blot*-Untersuchung hatten dabei bis zu 99 % der hygromycinresistenten ES-Zell-Klone das Transgen, wie beschrieben, integriert und konnten zur Generierung von Mauslinien herangezogen werden. Neben vereinzelt Fehlintegrationen war vor allem zu geringe DNA-Konzentration, zum Beispiel durch Verlust bei der Fällung, ein Problem. Die Transfektionseffizienz war dennoch sehr überzeugend, so dass die Untersuchung von maximal 30 resistenten Klonen je verwendetem transgenem Konstrukt ausreichend war, um genügend positive Klone für die Generierung von Mauslinien zu erhalten.

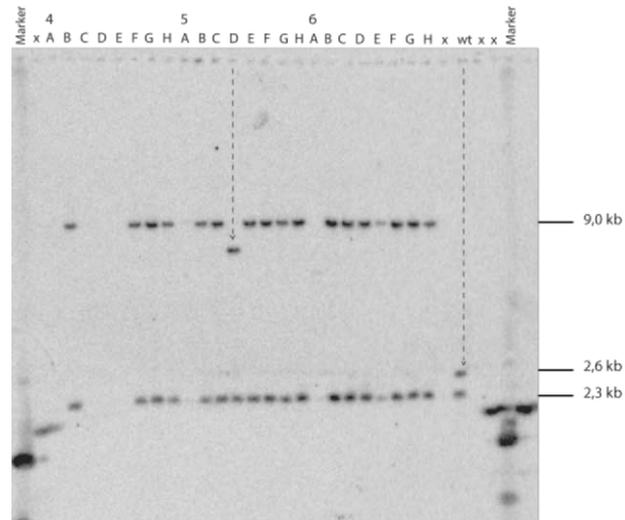


Abbildung 4.3: *Southern Blot* der *ColA1*-Integration von Tg11 in C2 ES-Zellen
 Genomische DNA der ES-Zell-Klone wurde mit *StuI* verdaut, von einem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert und diese mit der externen 5'-*ColA1*-Sonde hybridisiert. Bei richtiger Integration von Tg11 ist bei der Mehrheit der Klone eine Bande bei 9,0 kb sowie eine 2,3 kb-Bande des Wildtypallels zu erkennen. Die Bande für den modifizierten *ColA1*-Locus ohne Transgenintegration liegt bei 2,6 kb, wie unter wt zu erkennen ist.
 Neben wenigen Transferausfällen (z.B. Klon 4C oder 6A) beziehungsweise zu geringer DNA-Konzentration (z.B. Klon 5A) gibt es auch eine ungeklärte Fehlintegration beim Klon 5D. Im Bereich des Größenmarkers zeigt die eingesetzte Sonde unspezifische Kreuzhybridisierungen. (x=leer; wt=untransfizierte C2 ES-Zell-DNA; Zahlen/Buchstaben bezogen auf Lokalisation in einer 96-Loch-Platte)

4.2 *Tcr*-Deletionskonstrukte in der Maus

Die codierende Region von *Smok1^{Tcr}* gliedert sich in eine katalytische und eine regulatorische Domäne (Herrmann et al. 1999). Durch Deletionen in diesem Bereich sollte untersucht werden, welche Bedeutung die jeweilige Domäne am Phänomen TRD hat. Als Ausgangskonstrukt diente Tg11, welches von Prof. Dr. Bernhard G. Herrmann am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin zur Verfügung gestellt wurde (Abb. 4.4, unveröffentlicht). Dieses auf *Tcr* basierende Konstrukt bestand aus dem *Tcr*-Promoter sowie Exon 1 und 2 von *Smok1^{Tcr}*, welche aus dem *t*-Haplotyp *t^{w12}* stammen. Das Exon 1 enthielt ausschließlich die 5'-untranslatierte Region von *Tcr* und erst im zweitem Exon befanden sich die codierende Sequenz sowie Teile der 3'-untranslatierten Region mit Splice-Donor, gefolgt von einem Intron und dem Simian Virus Polyadenylierungssignal (SV40polyA). Die *Smok1^{Tcr}*-Kinase war zudem im N-terminalen Bereich mit einem sechsfachen Myc-Epitop fusioniert, um Transkript und Protein in der Expressionsanalyse darstellen zu können. Während dem im Rahmen dieser Arbeit klonierten Deletionskonstrukt Tg11del1 im Vergleich zu Tg11 die katalytische Domäne fehlte, wurde im Konstrukt Tg11del2 darüber hinaus auch ein Teil der regulatorischen Domäne deletiert.

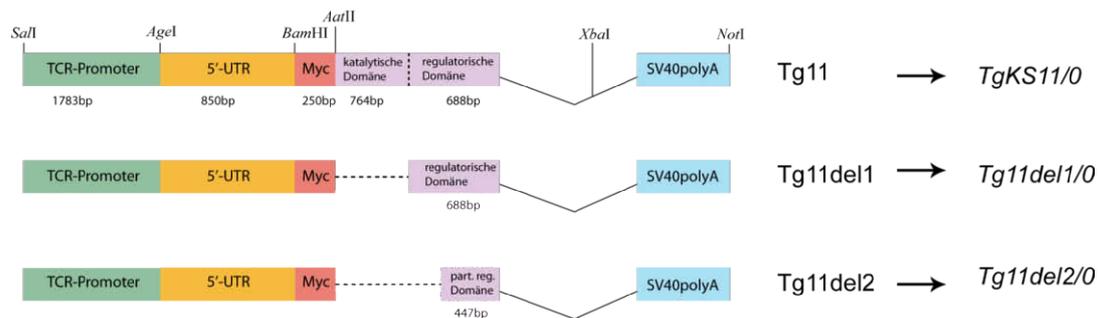


Abbildung 4.4: *Tcr*-Deletionskonstrukte mit Bezeichnung der daraus generierten → Mauslinien

Schematische Darstellung des Ausgangskonstruktes Tg11 mit seinen Bestandteilen (Promoter, UTR, codierende Region, Intron (durchgezogene Linien), Polyadenylierungssignal) und der Lokalisation von klonierungsrelevanten Restriktionsenzymkennungssequenzen.

Bei den Konstrukten Tg11del1 und Tg11del2 sind die Deletionen (---) im *Tcr*-ORF angedeutet.

(Bestandteile der Transgene sind im Abschnitt 4.2. näher erläutert)

4.2.1 RT-PCR Analyse auf transgene Transkripte im Maushoden

Bevor die aus transgenen ES-Zellen generierten Mauslinien histologischen Untersuchungen unterzogen wurden, sollte die Expression der Transgene in einer RT-PCR untersucht werden.

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus Maushoden der Linien *TgKS11/0*, *Tg11del1/0*,

Tg11del2/0, der Kontrollmauslinie *TgNV11/0* sowie einer Wildtypmauslinie isoliert und in einer reversen Transkription eingesetzt. Zum Nachweis von effektiver Transkription der transgenen Konstrukte wurde die cDNA als *Template* in einer PCR verwendet, in der das Primerpaar tqm-s und tqm-as zum Einsatz kamen. Dieses Primerpaar amplifizierte im Falle des Vorliegens eines gespleißten Transkripts ein PCR-Produkt von rund 100 bp, wie in Abbildung 4.5 deutlich für alle untersuchten, transgenen Mauslinien zu erkennen ist. Darüber hinaus konnte auch ungespleißtes Transkript durch ein zweites PCR-Produkt bei 536 bp nachgewiesen werden, allerdings in deutlich schwächerer Ausprägung.

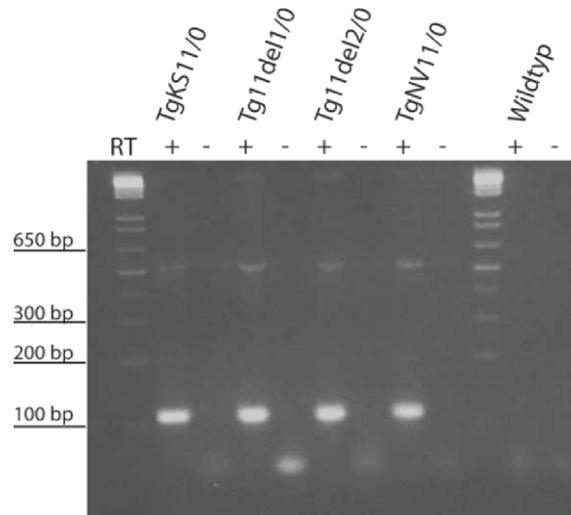


Abbildung 4.5: RT-PCR der *Tcr*-Deletionsmauslinien

Mit dem Primerpaar tqm-s/tqm-as wurde auf cDNA aus Maushoden der angegebenen Mauslinien eine transkriptspezifische PCR durchgeführt. Deutlich ist jeweils das PCR-Produkt der gespleißten mRNA des jeweiligen Transgens von 100 bp zu erkennen, aber auch ein Produkt von 536 bp, als Hinweis auf ungespleißte mRNA, ist noch schwach vorhanden.

(Die Dokumentation erfolgte in einer UV-Licht-Geldokumentation mit einem 2%igen, mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Die DNA ist als weiße Bande abgebildet, wichtige Banden des Größenmarkers sind links angegeben. RT \oplus /RT \ominus =mit/ohne reverse Transkriptase bei cDNA-Synthese)

Anhand der RT-PCR Analyse wurde davon ausgegangen, dass die ausgewählten Transgene im *ColA1*-Integrationsort transkribiert wurden und auch ein ordnungsgemäßes Spleißen, also eine RNA-Prozessierung, vollzogen wurde, was die Grundvoraussetzung für die Translation darstellt. Als Negativ-Kontrolle wurde cDNA einer Wildtypmauslinie mitgeführt, in der keines der Transkripte nachweisbar ist. Die Mauslinie *TgNV11/0* diente als ideale Positivkontrolle, da sie eine bereits etablierte Linie mit zufällig im Genom integrierten Transgen Tg11 darstellte. Es waren keine PCR-Produkte in den RT \ominus -Ansätzen nachweisbar, das heißt, es lag keine DNA-Kontamination der RNA bei der cDNA-Synthese vor. Somit war sichergestellt, dass die PCR-Amplifikation in den RT \oplus -Ansätzen ausschließlich auf das cDNA-*Template* zurückzuführen war.

4.2.2 Histologische Expressionsanalyse von Tg11 in der Maus

Aufgrund der gezielten Integration der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte in einen spezifischen Genlocus, wurde zunächst ein Vergleich der Expression mit einer bereits etablierten Mauslinie durchgeführt. Die vergleichende Analyse der Transkript- und Proteinexpression von Tg11 bei zufälliger und gezielter Genomintegration sollte Hinweise darüber liefern, inwieweit der gewählte *ColA1*-Locus für die weiteren vergleichenden Analysen geeignet ist.

Transkriptlokalisierung im Maushoden bei zufälliger Integration von Tg11

Zur vergleichenden Darstellung der Lokalisation des Transgentranskripts wurde eine *in situ* Hybridisierung auf Hodenschnitten der Kontrollmauslinie *TgNV11/0* durchgeführt, die bereits eine haploidspezifische Expression der mRNA des zufällig im Genom integrierten, transgenen Konstruktes Tg11 aufgewiesen hat (Véron 2008). Mit der transgenspezifischen Myc-Sonde konnte im Rahmen dieser Arbeit bei einer *in situ* Hybridisierung erneut gezeigt werden, dass das Transkript nicht in allen runden Spermatisden lokalisiert war (Abb. 4.6, oben rechts). Zum Vergleich wurde eine Smok-Sonde verwendet, die spezifisch das Transkript des Wildtypallels *Smok1* nachwies und eine Lokalisation in allen runden Spermatisden zeigte. Als Negativkontrolle wurden Hodenschnitte einer Wildtypmauslinie mit den selben Sonden hybridisiert. Das natürlich exprimierte Transkript von *Smok1* war auch beim Wildtyp in allen runden Spermatisden darstellbar, die Myc-Sonde dagegen konnte erwartungsgemäß kein Transkript nachweisen (Abb. 4.6, unten). Da sich die abgebildeten Tubulusanschnitte der gezeigten Mauslinien nicht alle im gleichen Spermatogenesestadium befanden, konnten die nur in haploiden Zellen nachweisbaren Transkripte nicht in jedem Querschnitt nachgewiesen werden.

Auch ohne quantitative Analyse war bereits erkennbar, dass das Transkript des Transgens Tg11 nur in etwa der Hälfte der runden Spermatisden dieser transgenen Linie exprimiert war und man konnte bei diesem auf *Smok1^{Tcr}* basierenden, transgenem Konstrukt von einer haploidspezifischen Expression auf Transkriptebene sprechen. Somit war die Linie *TgNV11/0* die ideale Positivkontrolle für die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit und konnte als Bezugsgröße für Haploidspezifität des Transkripts herangezogen werden.

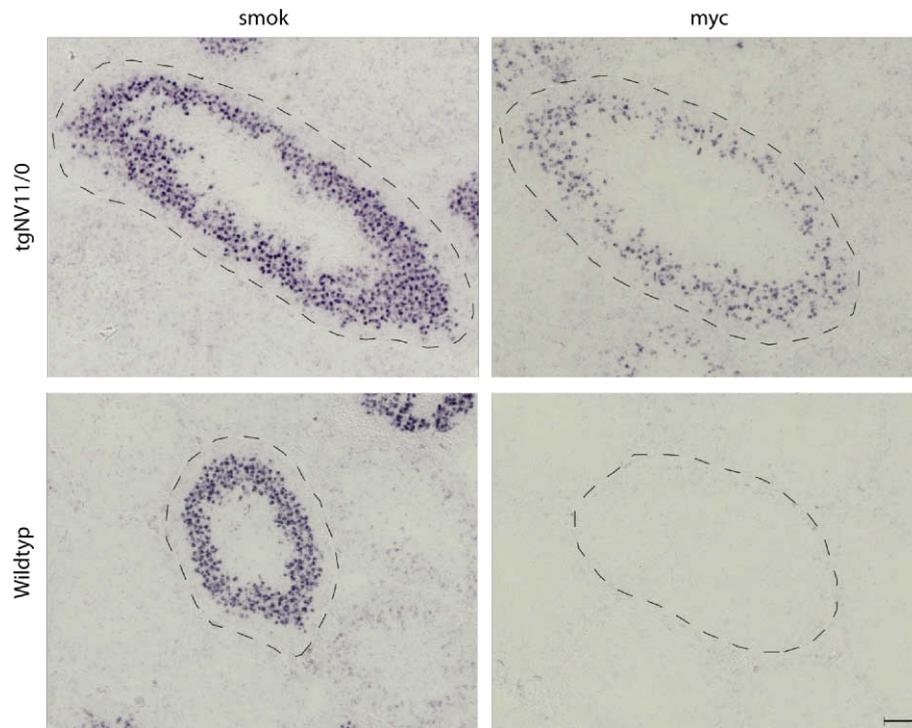


Abbildung 4.6: *In Situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden. Nachweis der Transkripte mit Smok- beziehungsweise transgenspezifischer Myc-Sonde im Querschnitt eines Tubulus seminiferus im Hoden der Linie *TgNV11/0* beziehungsweise einer Wildtypmauslinie durch eine an den Sonden gebundene, alkalische Phosphatase, die eine Farbreaktion unter Bildung eines blau-violetten Indigo-Farbstoffkomplexes katalysierte. Während die Smok-Sonde bei beiden Mauslinien ein in allen runden Spermatiden lokalisiertes Transkript-Farbsignal zeigt, weist die transgenspezifische Myc-Sonde die mRNA von Tg11 nur bei der transgenen Mauslinie in etwa der Hälfte der runden Spermatiden nach. (Maßstab=50µm)

Transkriptlokalisierung bei *ColA1*-Integration von Tg11

Die Mauslinie *TgKS11/0* entsprach im Grunde der Linie *TgNV11/0* und unterschied sich von dieser lediglich durch die gezielte Integration des Transgens Tg11 in den *ColA1*-Locus. Die Lokalisation des transgenen Transkripts wurde durch *in situ* Hybridisierung mit der transgenspezifischen Myc-Sonde untersucht. Die mRNA war wie bei der Kontrolle *TgNV11/0* (vgl. Abb. 4.6) im Bereich der runden Spermatiden anzutreffen, allerdings erschien die Intensität der Färbung beziehungsweise die Anzahl der gefärbten runden Spermatiden geringer ausgeprägt zu sein (Abb. 4.7).

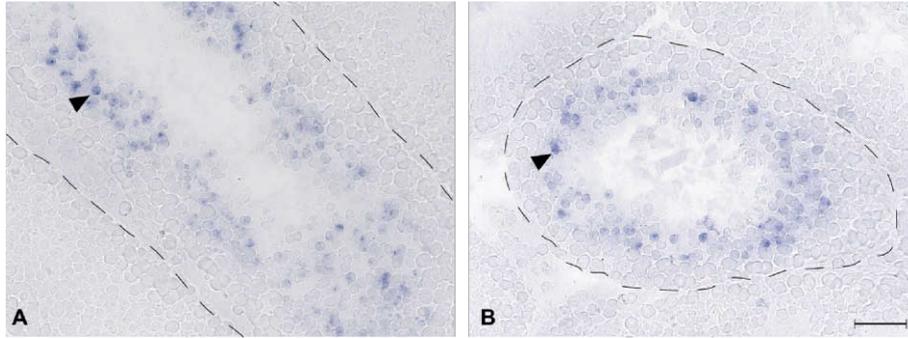


Abbildung 4.7: *In situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden
Nachweis des Transkripts mit der transgenspezifischen Myc-Sonde im
A: Längs- und B: Querschnitt eines Tubulus seminiferus der Mauslinie
tgKS11/0 durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farbreak-
tion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphatase
katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar ist.
Die nachgewiesene mRNA ist in den runden Spermatiden ► lokalisiert
und tritt in etwa der Hälfte der Zellen dieses Typs auf. (Maßstab=50µm)

Eine Haploidspezifität schien dennoch vorzuliegen, da exprimierende Zellen zumeist auch in direkter Umgebung von nicht exprimierenden Zellen zu finden waren, wie die höhere Vergrößerung in Abbildung 4.8 zeigt. Außerdem erschien die Färbung der einzelnen Zelle nicht homogen, vielmehr gab es intrazelluläre Bereiche, in denen eine Konzentration des Farbsignals vorlag.

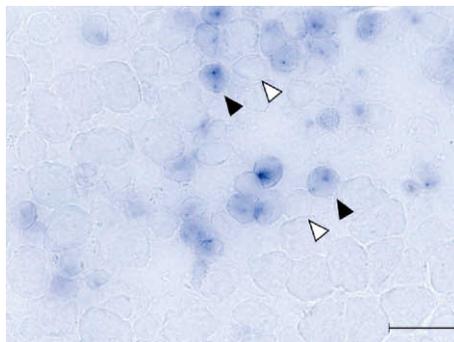


Abbildung 4.8: *In situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden
Nachweis des Transkripts mit einer transgenspezifischen Myc-Sonde in
einer Gruppe runder Spermatiden (Ausschnitt aus Tubulus seminiferus)
im Hoden der Mauslinie *TgKS11/0* durch chromogene *in situ* Hybridi-
sierung mit einer Farbreaktion, die durch eine an der Sonde gebundene,
alkalische Phosphatase katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex
(blau-violett) sichtbar ist.
Die nachgewiesene mRNA ist in den runden Spermatiden ► lokalisiert,
aber es treten auch ungefärbte Zellen ▷ in unmittelbarer Nähe auf.
(Maßstab=20µm)

Proteinlokalisierung im Maushoden bei zufälligem Integrationsort von Tg11

Aufgrund der Fusion eines Myc-Epitops mit der codierenden Region von *Tcr* in Tg11 war es möglich, mit einem spezifischen Antikörper gegen Myc-Protein die Lokalisation des Transgens auf Proteinebene zu untersuchen. In der immunhistochemischen Färbung wurde mit einem monoklonalen Antikörper anti-Myc 4A6 das Fusionsprotein in Hodenschnitten der Linie *TgNV11/0* nachgewiesen.

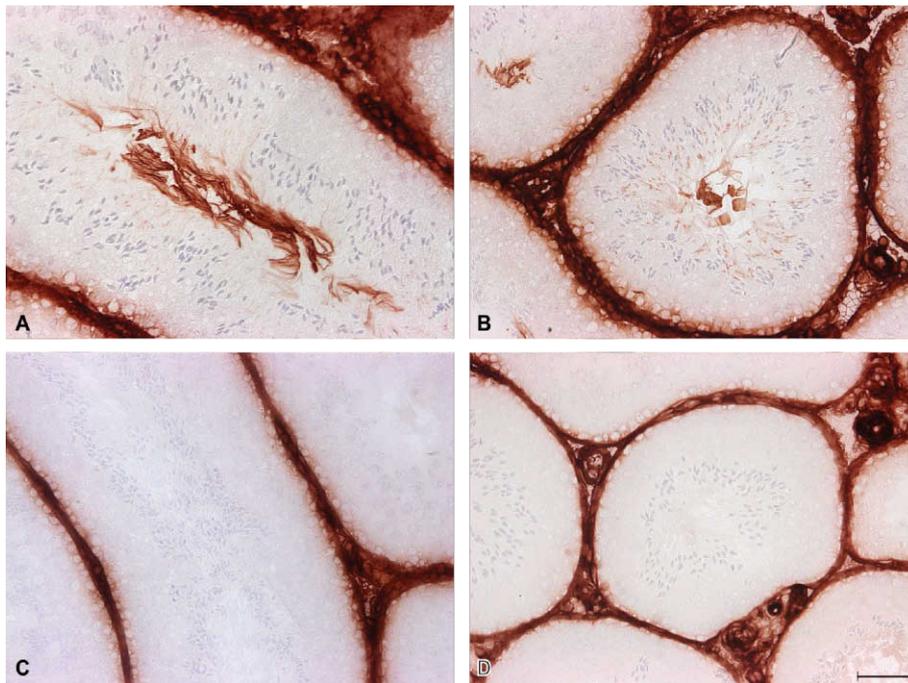


Abbildung 4.9: Immunhistochemische Färbung auf Gefrierschnitten von Maushoden. Nachweis des transgenspezifischen Myc-Proteins im Längs- (links) und Querschnitt (rechts) eines Tubulus seminiferus im Maushoden mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper durch ein rotbraunes Farbsignal, das von einer am Zweitantikörper gebundenen Peroxidase aus dem eingesetzten Substrat (ImmPACT NovaRED Peroxidase Substrate) gebildet wurde.

Während in der transgenen Mauslinie *TgNV11/0* (A/B) Protein in den Flagellen (fädige, rotbraune Strukturen) der Spermien im Tubuluslumen exprimiert ist, kann bei der Wildtypmauslinie (C/D) dieses Protein nicht nachgewiesen werden. Beide Linien zeigen im Interstitium eine unspezifische Artefaktfärbung unbekannter Ursache. (Kernfärbung Hämatoxylin, Maßstab=50µm)

Wie aus der Abbildung 4.9 A und B ersichtlich wird, war das Protein bei der transgenen Mauslinie in den Flagellen der Spermien lokalisiert. Die fädigen Strukturen waren dabei besonders gut im Längsschnitt erkennbar und ließen sich zum Teil bis zu den mit Hämatoxylin hervorgehobenen Spermienköpfen verfolgen. Aufgrund ih-

rer hohen Zahl und sicherlich auch durch den Verarbeitungsprozess des Gewebes bedingt, erschien ein Großteil der Flagellen im Tubuluslumen zu einer kompakten Masse komprimiert. Der Vergleich zur Lokalisation der mRNA des Transgens für diese Referenzmauslinie zeigte erneut, dass eine verzögerte Translation vorlag. Des Weiteren fiel auf, dass auch die interstitiellen Bereiche zwischen den Tubulusanschnitten starke Färbung aufwiesen. Diese konnte man allerdings auch in der Wildtypkontrolle wiederfinden und sie wurde deshalb als nicht spezifisches Artefakt dieser Färbemethode angesehen, dessen Ursache ungeklärt blieb. Ein in den Flagellen exprimiertes Myc-Protein war bei der Wildtypmauslinie dagegen erwartungsgemäß nicht darstellbar (Abb. 4.9 C/D).

Proteinlokalisierung bei *ColA1*-Integration von Tg11

Lokalisation im Maushoden Mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper wurde in der Immunhistochemie die Lokalisation des Fusionsproteins im Maushoden bei der Linie *TgKS11/0* untersucht. Wie in der Abbildung 4.10 dargestellt, war das Protein in den Flagellen der Spermien als fädige Struktur im Tubuluslumen zu erkennen. Dieses Ergebnis war vergleichbar mit der Proteinlokalisierung der Linie *TgNV11/0* (vgl. Abb. 4.9). Darüber hinaus wurden wieder interstitielle Bereiche zwischen den Tubulusanschnitten artifiziell mit angefärbt. Das histologische Bild für die Immunexpression war somit vergleichbar mit dem Ergebnis der Referenzmauslinie *tgNV11/0* und im Vergleich zur Transkriptexpression konnte ebenfalls eine zeitverzögerte Translation verzeichnet werden.

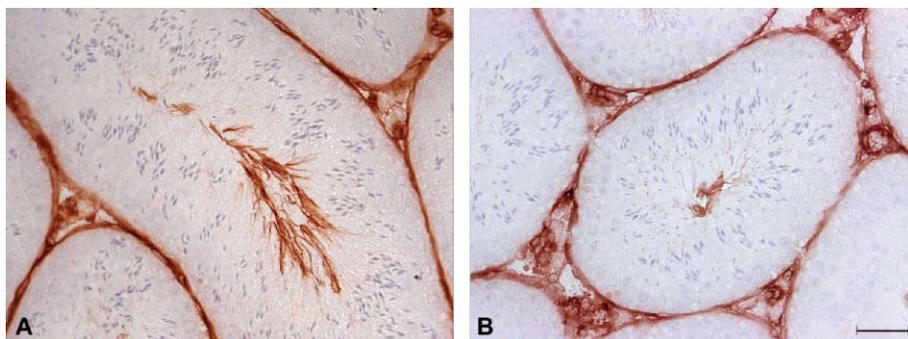


Abbildung 4.10: Immunhistochemische Färbung auf Gefrierschnitten von Maushoden der Linie *TgKS11/0*

Mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper wurde das transgenspezifische Myc-Proteins immunhistochemisch durch ein rotbraunes Farbsignal, das von einer am Zweitantikörper gebundenen Peroxidase aus dem eingesetzten Substrat (ImmPACT NovaRED Peroxidase Substrate) gebildet wurde, nachgewiesen.

Das Protein ist in den im Tubuluslumen lokalisierten Flagellen (fädige, rotbraune Strukturen) der Spermien exprimiert. Im Interstitium fällt eine unspezifische Artefaktfärbung unbekannter Ursache auf. A: Längs- B: Querschnitt eines Tubulus seminiferus (Kernfärbung Hämatoxylin, Maßstab=50µm)

Lokalisation in Spermien Mit einem polyklonalen anti-Myc-Antikörper wurde zudem eine Co-Färbung für Myc- und Tubulinprotein auf dem selben Spermienausstrich durchgeführt. Wie die Abbildung 4.11 zeigt, waren Myc- und Tubulinprotein im Flagellum coexprimiert und -lokalisiert. Es fiel allerdings auf, dass die Myc-Proteinfärbung eher punktuell konzentriert erschien und im distalen Flagellenabschnitt abnimmt, während die Tubulinexpression durchgehend homogener über die gesamte Länge des Flagellums vorlag. Subzellulär waren vermutlich unterschiedliche Strukturen des Flagellums die Träger des jeweilig nachgewiesenen Antigens. Die hier beispielhaft gezeigte Immunfluoreszenzfärbung in Spermien der Linie *TgKS11/0* war so auch bei allen anderen untersuchten, transgenen Mauslinien im Rahmen dieser Arbeit zu verzeichnen, sofern diese eine erfolgreiche Proteinexpression in Flagellen aufwiesen.

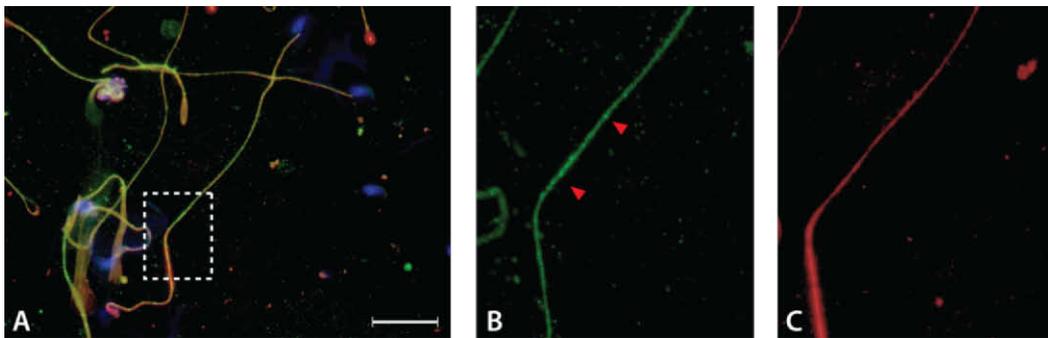


Abbildung 4.11: Immunfluoreszenz-Co-Färbung von isolierten Spermien der Mauslinie *TgKS11/0*

Auf einem Ausstrich isolierter Spermien wurde mit einem anti-Tubulin- und einem anti-Myc-Antikörper die Co-Lokalisation des Proteins Tubulin mit dem transgenspezifischen Myc-Protein nachgewiesen.

A: Im Fluoreszenzmikroskop erscheint bei der überlagerten Darstellung beider Signale die Expression des Myc-Proteins in grün (Zweitantikörper mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt) annähernd deckungsgleich mit der Lokalisation von Tubulin (Erstantikörper mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt). **B:** Das Myc-Protein ist v.a. im hinteren Flagellenabschnitt eher punktuell ► exprimiert, während das Tubulin-Protein (in **C**) gleichmäßig nachweisbar ist. (Detailansicht für den in **A** weiß umrandeten Bereich für Myc-Protein (grün in **B**) und Tubulin (rot in **C**), Kernfärbung mit DAPI (blau), Maßstab=20µm)

4.2.3 Histologische Expressionsanalyse der *Tcr*-Deletionskonstrukte

Transkriptlokalisierung der *Tcr*-Deletionskonstrukte im Maushoden

Bei den *Tcr*-Deletionslinien *Tg11del1/0* und *Tg11del2/0* konnte die mRNA der transgenen Konstrukte mit der Myc-Sonde in einer *in situ* Hybridisierung in runden Spermatischen lokalisiert werden. Das Transkript war allerdings in weniger als der Hälfte der Zellen nachweisbar (Abb. 4.12). Die Lokalisation war dennoch mit der von *TgNV11/0* (vgl. Abb. 4.6) beziehungsweise *TgKS11/0* (vgl. Abb. 4.7) vergleichbar und konnte als haploidspezifisch bezeichnet werden. Die Signalintensität dagegen erschien bei beiden Linien wieder schwächer ausgeprägt als bei der Kontrolllinie *TgNV11/0*. In einer höheren Vergrößerung wurde zudem deutlich, dass die Transkripte dieser Transgene wieder an einem Ort in der Zelle akkumulieren (Abb. 4.13). Auch hier gab es Hinweise auf Haploidspezifität der Transkriptexpression, da gefärbte und ungefärbte Zellen in direkter Lagebeziehung zueinander zu finden waren.

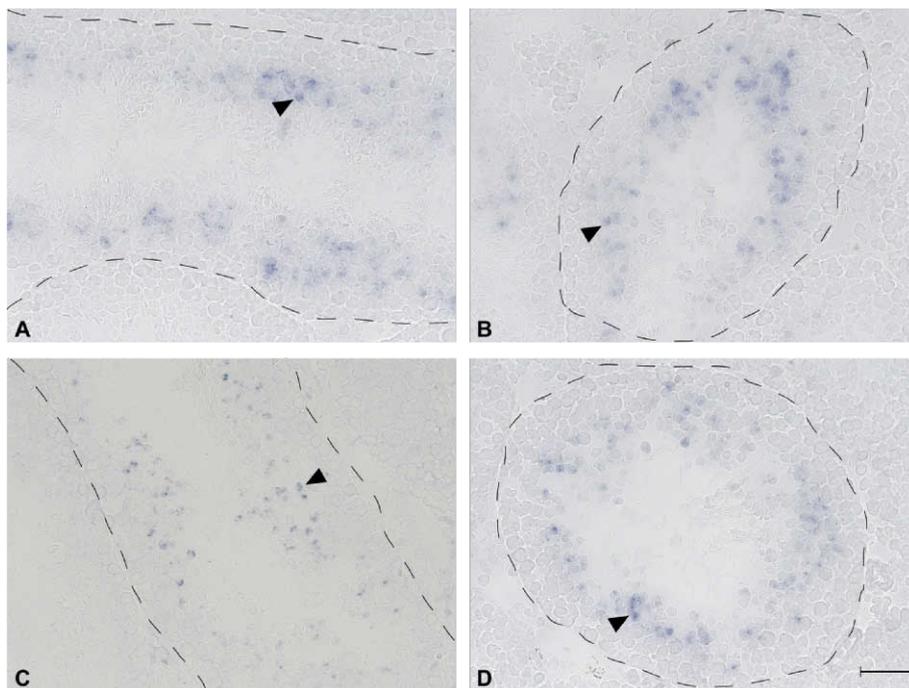


Abbildung 4.12: *In situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden. Nachweis des Transkripts mit einer transgenspezifischen Myc-Sonde in Längs- (links) und Querschnitten (rechts) des Tubulus seminiferus der Mauslinie **A/B:** *Tg11del1/0* **C/D:** *Tg11del2/0* durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farbreaktion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphatase katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar ist. Das Farbsignal der mRNA ist nicht in allen runden Spermatischen ► lokalisiert. (Maßstab=50µm)

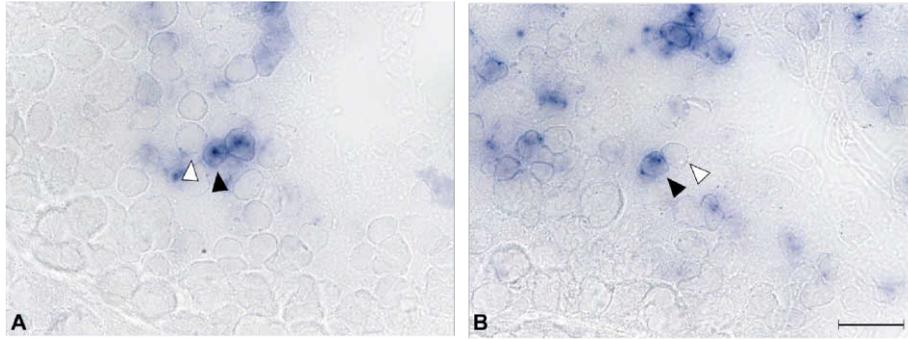


Abbildung 4.13: *In situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden
 Nachweis des Transkripts mit einer transgenspezifischen Myc-Sonde in einer Gruppe runder Spermatiden (Ausschnitt aus Tubulus seminiferus) im Hoden der Mauslinie **A:** *Tg11del1/0* und **B:** *Tg11del2/0* durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farbreaktion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphatase katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar ist. Die nachgewiesene mRNA ist nicht in allen runden Spermatiden ▶ lokalisiert, es treten auch ungefärbte Zellen ▷ dieses Typs auf. (Maßstab=20µm)

Proteinlokalisierung der *Tcr*-Deletionskonstrukte im Maushoden

Bei der Analyse der Proteinexpression der *Tcr*-Deletionskonstrukte durch Immunhistochemie konnte, wie in Abbildung 4.14 dargestellt, bei der Linie *Tg11del1/0* ein positives Farbsignal in den Flagellen der Spermien im Tubuluslumen nachgewiesen werden und im Vergleich zur Transkriptlokalisierung konnte wieder eine verzögerte Translation verzeichnet werden. Die Intensität des Signals fiel aber trotz längerer Inkubationszeit bei der Farbentwicklung schwächer aus als bei den Kontrollen ohne Deletion (vgl. Abb. 4.9 und 4.10).

In der Linie *Tg11del2/0* dagegen konnte bei gleichen Farbentwicklungszeiten kein Signal nachgewiesen werden, diese Deletion zeigte also keine Proteinexpression mehr. Neben dem spezifischen Proteinsignal in den Flagellen der Linie *Tg11del1/0* waren bei beiden *Tcr*-Deletionslinien die intertubulären Bereiche angefärbt. Diese Artefaktfärbung erschien hier intensiv dunkel, da durch längere Farbentwicklungszeit versucht wurde, auch geringe, transgenspezifische Proteinexpression noch zu erfassen.

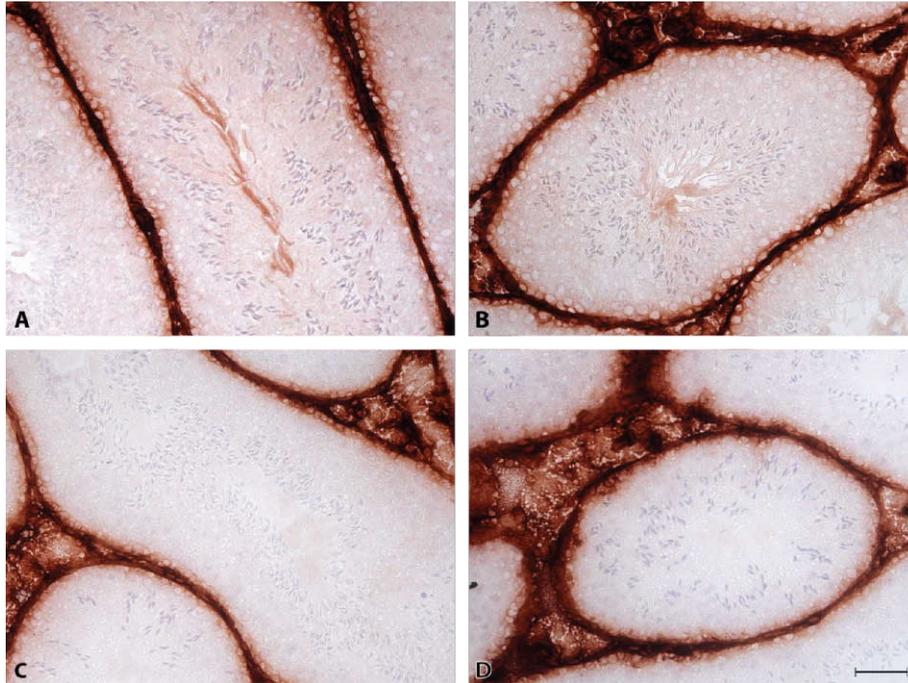


Abbildung 4.14: Immunhistochemische Färbung auf Gefrierschnitten von Mausehodentubuli. Nachweis des transgenspezifischen Myc-Proteins mit monoklonalem anti-Myc-Antikörper im Längs- (links) und Querschnitt (rechts) eines Tubulus seminiferus im Hoden bei den Mauslinien **A/B:** *Tg11del1/0* und **C/D:** *Tg11del2/0* durch ein rotbraunes Farbsignal, das von einer am Zweitantikörper gebundenen Peroxidase aus dem eingesetzten Substrat (ImmPACT NovaRED Peroxidase Substrate) gebildet wurde. Das Proteinsignal ist bei der Linie *Tg11del1/0* in den Flagellen (fädige, rotbraune Strukturen) im Tubuluslumen lokalisiert. Das Konstrukt *Tg11del2* wird auf Proteinebene nicht exprimiert. Im Interstitium fällt bei beiden Linien eine unspezifische Artefaktfärbung unbekannter Ursache auf. (Kernfärbung Hämatoxylin, Maßstab=50µm)

4.2.4 Zusammenfassung

Aus der vergleichenden Expressionsanalyse der auf den Responder basierenden, transgenen Konstrukte mit oder ohne Deletionen in der codierenden Region dieses Gens im Mausehodentubulus wurde deutlich, dass unabhängig von den Deletionen ein Transkript im Hoden nachweisbar war, welches bei jedem der hier untersuchten Transgene in der für *Tcr* typischen, haploidspezifischen Lokalisation vorlag. Auf die Transkriptlokalisierung und -stabilität hatte die Verkürzung der codierenden Region des Respondergens also keinen wesentlichen Einfluss. Es muss allerdings festgehalten werden, dass die Restriktion des Transkripts in nur der Hälfte der runden Spermatozoen am deutlichsten bei der Kontrollmauslinie, *tgNV11/0* mit Zufallsintegration des Transgens, zu erkennen war. Bei *ColA1*-Integrationen war das Signal in der *in situ* Hybridisierung bereits bei der Linie ohne Deletionen, *TgKS11/0*, schwächer ausgeprägt und mit zunehmenden Deletionsumfang war sogar in weniger als 50%

der Zellen noch Transkript nachweisbar.

Beim Vergleich der Proteinexpression fiel auf, dass infolge der Entfernung von Anteilen der regulatorischen Subdomäne in der codierenden Region des Responders keine Translation mehr stattfinden kann. Die Anwesenheit dieser Subregion in der codierenden Sequenz war also essentiell für die erfolgreiche Proteinsynthese in einem Respondertransgen. Außerdem wurde ersichtlich, dass bei *ColA1*-Integration eines Transgens, wie bei den Linien *TgKS11/0* und *Tg11del1/0*, die Translation zwar wie für *Tcr* typisch erst spät im Flagellum erfolgte, aber das Proteinlevel geringer ausgeprägt war als bei der Kontrolllinie mit zufällig integriertem Transgen.

Tabelle 4.1: Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen *Tcr*-Deletionstransgene inklusive der Positivkontrolle *TgNV11/0* auf Transkript- und Proteinebene (✓/× = erfolgreicher/erfolgloser Expressionsnachweis, Farbintensität des Symbols deutet Expressionslevel an)

Mauslinie (Integration)	Transkription		Translation	
	Transkript	Lokalisation	Protein	Zeitpunkt und Lokalisation
<i>TgNV11/0</i> (zufällig)		in 50% der runden Spermatiden haploidspezifisch		spät im Flagellum
<i>TgKS11/0</i> (<i>ColA1</i> -Locus)		in ≈ 50% der runden Spermatiden haploidspezifisch		spät im Flagellum
<i>Tg11del1/0</i> (<i>ColA1</i> -Locus)		in ≤ 50% der runden Spermatiden haploidspezifisch		spät im Flagellum
<i>Tg11del2/0</i> (<i>ColA1</i> -Locus)		in ≤ 50% der runden Spermatiden haploidspezifisch		

4.3 Mauslinien der 5'-UTR-Deletionen

Zur Untersuchung des Einflusses der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) von *Tcr* in posttranskriptionellen Regulationsmechanismen wurden transgene Konstrukte mit unterschiedlichen Deletionen in der 5'-UTR kloniert (Abb. 4.15). Die Deletionen wurden dabei gezielt um die in Datenbanken vorhergesagte Sequenz konstruiert, die einem Bruno Response Element (BRE) ähnlich war.

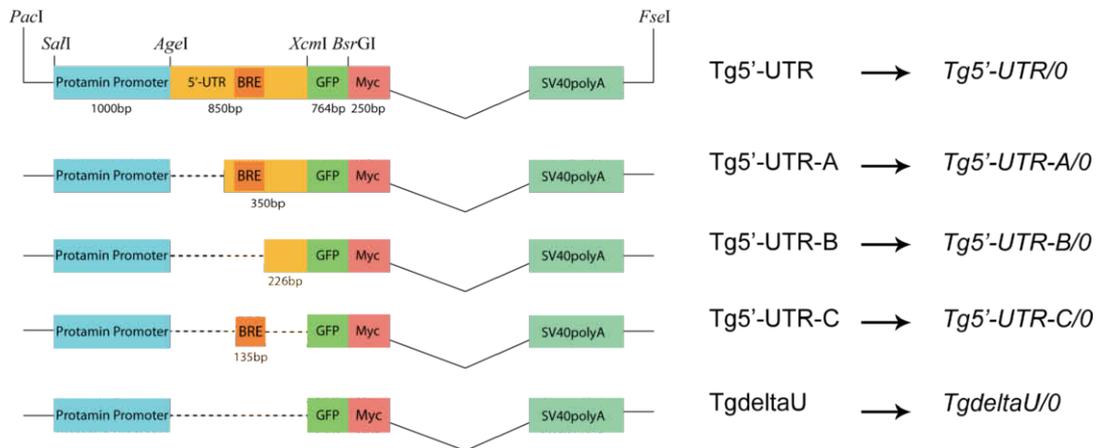


Abbildung 4.15: 5'-UTR-Deletionskonstrukte mit Bezeichnung der daraus generierten → Mauslinien

Schematische Darstellung des Ausgangskonstruktes Tg5'-UTR mit seinen Bestandteilen (Promoter, UTR, codierende Region, Intron (durchgezogene Linien), Polyadenylierungssignal) und der Lokalisation von klonierungsrelevanten Restriktionsenzymerserkennungssequenzen.

Bei den Deletionskonstrukten sind die Deletionen (---) in der UTR angedeutet. (Bestandteile der Transgene sind im Abschnitt 4.3. näher erläutert)

Hierfür wurde das Konstrukt Tg9-EGFP als Ausgangspunkt für die Klonierung genutzt, welches freundlicher Weise von Prof. Dr. Bernhard G. Herrmann am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Transgen entsprach in seinen Grundzügen Tg11 (vgl. Abschnitt 4.2), allerdings befand sich zusätzlich als Marker ein *enhanced GFP* vor dem sechsfachen Myc-Epitop. Als Referenzkonstrukt wurde zunächst Tg5'-UTR kloniert, in dem sich die gesamte 5'-UTR befand. Dieses Konstrukt verfügte außerdem über einen *Protamin 1*-Promoter und die codierende Sequenz von GFP und Myc-Epitop gefolgt von einem Intron und SV40-Polyadenylierungssignal. Neben den drei Deletionskonstrukten Tg5'-UTR-A, -B und -C mit verschiedenen großen Deletionen in der 5'-UTR wurde außerdem auch ein Konstrukt TgdeltaU hergestellt, das keine 5'-UTR von *Tcr* mehr aufwies. Durch Deletion A wurden alle uAUGs entfernt, Deletion B besaß nur noch die microRNA-Bindungsmotive und Deletion C bestand nur noch aus dem BRE-ähnlichen Element.

4.3.1 Expressionsanalyse der 5'-UTR-Deletionsmauslinien

Transkriptlokalisierung durch *in situ* Hybridisierung

Eine Untersuchung der mRNA-Expression bei den transgenen Mauslinien mit Deletionen in der 5'-UTR von *Tcr* zeigte, dass alle Linien ein im Bereich der runden Spermatiden lokalisiertes Transkript (Abb. 4.16) aufwiesen.

Die drei Deletionslinien *Tg5'-UTR-A/0*, *-B/0* und *-C/0* unterschieden sich dabei nicht wesentlich in ihrem Expressionsmuster von der Linie mit kompletter 5'-UTR. Das Signal der angefärbten Zellen war allerdings nicht so gleichmäßig ausgeprägt wie in der Kontrolle *TgNV11/0* (vgl. Abb. 4.6). Daher war es schwieriger zu erkennen, ob etwa die Hälfte der runden Spermatiden ein Transkript aufwiesen und somit eine Haploidspezifität vorlag.

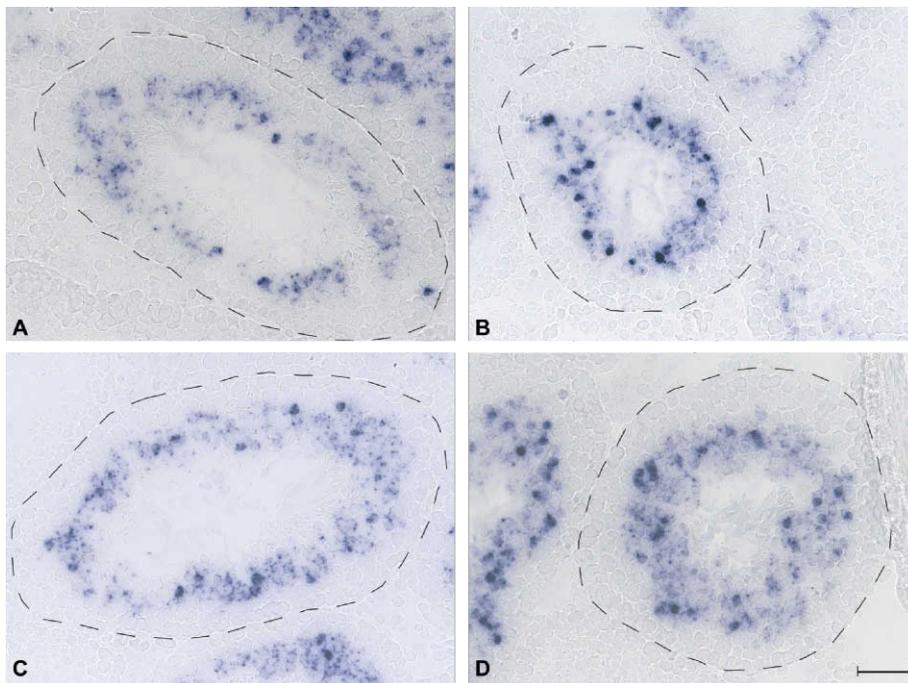


Abbildung 4.16: *In Situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden. Nachweis des Transkripts mit einer transgenspezifischen Myc-Sonde im Querschnitt des Tubulus seminiferus der Mauslinien **A:** *Tg5'-UTR/0*, **B:** *Tg5'-UTR-A/0*, **C:** *Tg5'-UTR-B/0*, **D:** *Tg5'-UTR-C/0* durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farbreaktion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphatase katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar ist. Die nachgewiesene mRNA ist bei allen Linien in den runden Spermatiden lokalisiert und tritt in nur in etwa der Hälfte der Zellen dieses Typs auf. (Maßstab=50µm)

Bei einer höheren Vergrößerung in der Region der runden Spermatiden konnte bei allen Linien die haploidspezifische Expression verdeutlicht werden (Abb. 4.17), die

zudem vergleichbar mit den *Tcr*-Deletionslinien war (vgl. Abschnitt 4.2.2). Neben eindeutig gefärbten Zellen traten auch ungefärbte Zellen auf. Bei den Linien *Tg5'*-*UTR-A/0* und *tg5'*-*UTR-C/0* war das Signal zum Teil so intensiv, dass es die gesamte Zelle ausfüllte. Daneben gab es auch eine weitere Gruppe runder Spermatiden bei diesen Mauslinien, die eher schwach gefärbt waren und bei denen sich die mRNA an einem Punkt in der Zelle konzentrierte.

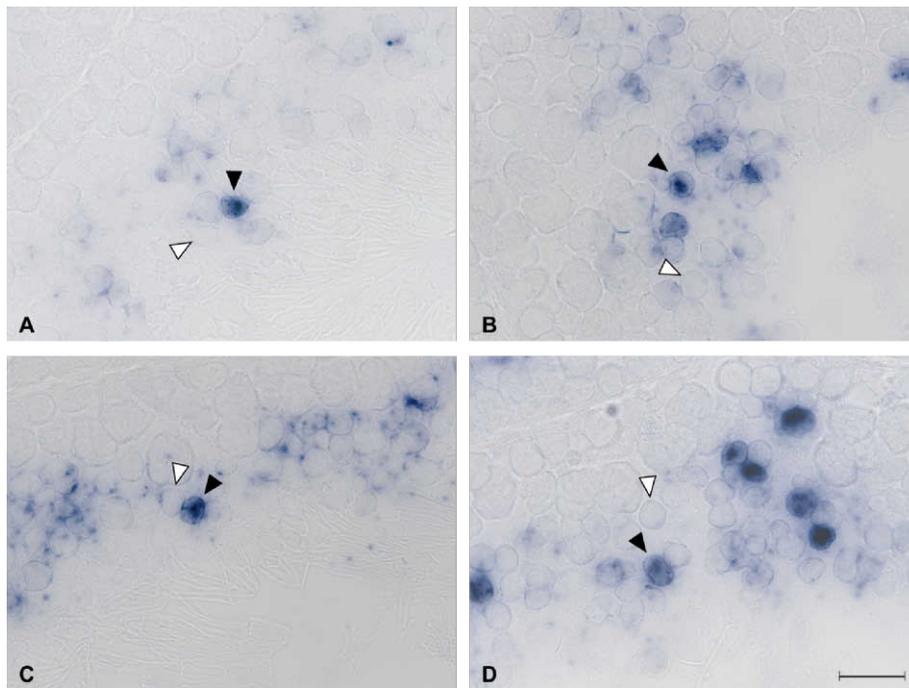


Abbildung 4.17: *In Situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden
Nachweis des Transkripts mit einer transgenspezifischen Myc-Sonde in einer Gruppe von runden Spermatiden (Ausschnitt aus Tubulus seminiferus) im Hoden der Mauslinien **A:** *Tg5'*-*UTR/0*, **B:** *Tg5'*-*UTR-A/0*, **C:** *Tg5'*-*UTR-B/0* und **D:** *Tg5'*-*UTR-C/0* durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farbreaktion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphatase katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar ist.
Die mRNA ist in den runden Spermatiden ▶ lokalisiert, aber es treten auch ungefärbte Zellen ▷ auf. (Maßstab=20µm)

Wenn die 5'-UTR dagegen vollständig deletiert war, fehlten dem transgenen Konstrukt jegliche Elemente von *Tcr*. Im Maushoden der Linie *TgdeltaU/0* war das Transkript somit in den runden Spermatiden und verstärkt in den elongierenden Spermatiden lokalisiert (Abb. 4.18). Die intensive Färbung erstreckte sich auf alle Zellen im genannten Bereich und es konnte nicht mehr von haploidspezifischer Expression gesprochen werden.

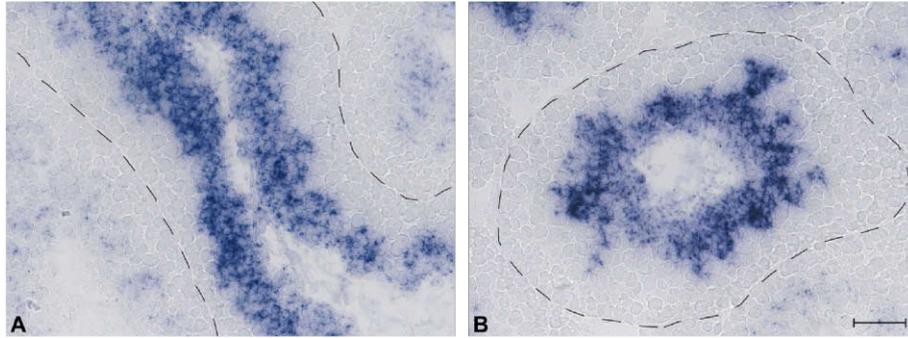


Abbildung 4.18: *In Situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden
 Nachweis des Transkripts mit der transgenspezifischen Myc-Sonde im
 A: Längs- und B: Querschnitt des Tubulus seminiferus der Mauslinie
TgdeltaU/0 durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farb-
 reaktion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphata-
 se katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar
 ist.
 Mit der Myc-Sonde wird ein Transkript in allen runden und elongieren-
 den Spermatiden nachgewiesen. (Maßstab=50µm)

Proteinexpression bei den 5'-UTR-Deletionsmauslinien

In der Immunhistochemie mit monoklonalem anti-Myc-Antikörper sollte analog zu den *Tcr*-Deletionsmauslinien die Proteinexpression der 5'-UTR-Deletionsmauslinien lokalisiert werden. Bei den 5'-UTR-Deletionslinien konnte allerdings beim Basiskonstrukt mit kompletter 5'-UTR kein Protein mehr in den Tubuli seminiferi des Hodens nachgewiesen werden (Abb. 4.19).

Interessanter Weise zeigte sich bei der Linie mit Deletion A bereits im adluminalen Bereich der Spermatozyten und eventuell auch der Spermatogonien ein Proteinsignal. In den runden Spermatiden erschien das Signal bei dieser Linie schwächer ausgeprägt und in den folgenden Zelltypen, wie den elongierenden Spermatiden sowie Spermien, war es nicht mehr erkennbar. Dieses Ergebnis wurde allerdings kritisch betrachtet, da erst eine relativ lange Farbentwicklungszeit zu diesem Ergebnis führte, wie durch die recht starke interstitielle Artefaktfärbung zwischen den Samenkanälchen deutlich wurde. Außerdem stand diese Proteinlokalisierung der Deletion A nicht im Einklang mit der ausschließlich in den runden Spermatiden nachgewiesenen Transkriptexpression dieses Konstruktes (vgl. Abb. 4.16 B). Es ist allerdings anzumerken, dass dieses Resultat bei ähnlichen Inkubationszeiten für die Farbentwicklung in der Mauslinie *Tg5'-UTR/0* und *Tg5'-UTR-B/0* nicht gezeigt werden konnte. Auch bei der Mauslinie mit der Deletion C war es nicht möglich mit der Immunhistochemischen Färbung Myc-Protein im Hoden darzustellen. Bei allen Linien konnte eine unspezifische Artefaktfärbung unbekannter Ursache im Interstitium verzeichnet werden.

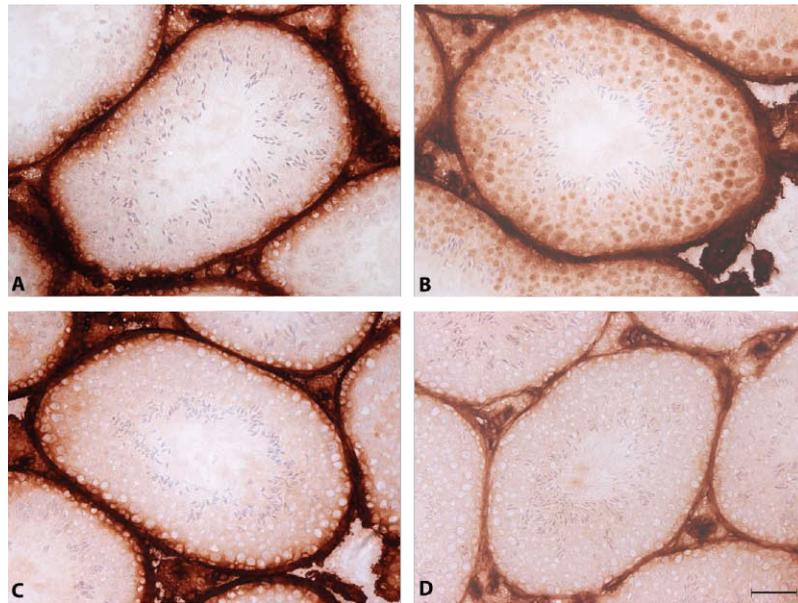


Abbildung 4.19: Immunhistochemische Färbung auf Gefrierschnitten von Maushoden. Nachweis des transgenspezifischen Myc-Proteins mit monoklonalem anti-Myc-Antikörper im Querschnitt des Tubulus seminiferus im Hoden bei den Mauslinien **A:** *Tg5'-UTR/0*, **B:** *Tg5'-UTR-A/0*, **C:** *Tg5'-UTR-B/0* und **D:** *Tg5'-UTR-C/0* durch ein rotbraunes Farbsignal, das von einer am Zweitantikörper gebundenen Peroxidase aus dem eingesetzten Substrat (ImmPACT NovaRED Peroxidase Substrate) gebildet wurde. Trotz langer Inkubationszeit bei der Farbentwicklung konnte lediglich bei der Linie *Tg5'-UTR-A/0* ein Farbsignal (rotbraune Punkte) in den sich entwickelnden Keimzellstadien nachgewiesen werden, allerdings handelt es sich hier wahrscheinlich um ein Artefakt, da die Proteinexpression zeitlich nicht vor der Transkriptexpression (vgl. Abb. 4.16 B) auftritt. Im Interstitium aller Linien fällt zudem eine Artefaktfärbung unbekannter Ursache auf. (Kernfärbung Hämatoxylin, Maßstab=50µm)

Bei der Mauslinie *TgdeltaU/0* mit kompletter Deletion der 5'-UTR zeigte sich jedoch ein homogenes Signal für Myc-Protein in den elongierenden Spermatozyten in unmittelbarer Nähe zum Tubuluslumen (Abb. 4.20). Das Proteinsignal war trotz verhältnismäßig kurzer Farbentwicklungszeit äußerst schnell und stark in Erscheinung getreten, so dass das Lumen je nach Schnittebene ausgefüllt erschien. Es konnte weder Expression in früheren Keimzellstadien noch in Flagellenstrukturen nachgewiesen werden, aber die artifizielle Färbung der intertubulären Bereiche lag vor.

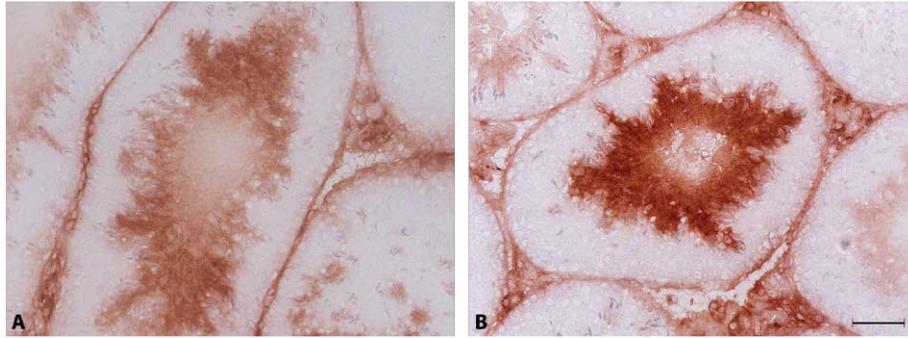


Abbildung 4.20: Immunhistochemische Färbung auf Gefrierschnitten von Maushoden. Nachweis des transgenspezifischen Myc-Proteins mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper im **A**: Längs- und **B**: Querschnitt eines Tubulus seminiferus im Hoden bei der Mauslinie *TgdeltaU/0* durch ein rotbraunes Farbsignal, das von einer am Zweitantikörper gebundenen Peroxidase aus dem eingesetzten Substrat (ImmPACT NovaRED Peroxidase Substrate) gebildet wurde. Das Proteinsignal ist ausschließlich im Bereich der elongierenden Spermatisiden lokalisiert. Im Interstitium fällt eine Artefaktfärbung unbekannter Ursache auf. (Kernfärbung Hämatoxylin, Maßstab=50µm)

4.3.2 Zusammenfassung

Die vergleichende Expressionsanalyse von Transgenen mit Deletionen in der 5'-UTR des Respondergens im Mausmodell zeigte, dass unabhängig von der Größe der Deletion immer ein Transkript in annähernd der Hälfte der runden Spermatisiden im Hoden lokalisiert war. Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass die haploidspezifische Lokalisation der mRNA des Responders durch die 5'-UTR realisiert wird, aber nicht auf ein darin enthaltenes, regulatorisches Element allein zurückzuführen war. Sowohl für das Konstrukt mit der gesamten 5'-UTR als auch mit den Deletionen in dieser Region war im Hoden transgener Mäuse kein Protein nachweisbar, das heißt, für die erfolgreiche Translation fehlten diesen Transgenen offenbar wichtige Responder-elemente.

Bei der Deletion der gesamten 5'-UTR war allerdings nachweislich Transkript in allen runden beziehungsweise elongierenden Spermatisiden vorhanden und eine sofortige Translation mit Proteinlokalisierung vorwiegend in elongierenden Spermien zu erkennen. Die haploidspezifische Transkriptlokalisierung war in diesem Fall ohne Anteile der 5'-UTR des Responders nicht mehr realisierbar und eine translationelle Repression fand ebenfalls nicht mehr statt.

Tabelle 4.2: Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen 5'-UTR-Deletions-transgene auf Transkript- und Proteinebene (✓/× = erfolgreicher/erfolgloser Expressionsnachweis, Farbintensität des Symbols deutet Expressionslevel an)

Mauslinie	Transkription		Translation	
	Transkript	Lokalisation	Protein	Zeitpunkt und Lokalisation
<i>Tg5'-UTR/0</i>		50% der runden Spermatiden haploidspezifisch		
<i>Tg5'-UTR-A/0</i>		50% der runden Spermatiden haploidspezifisch		
<i>Tg5'-UTR-B/0</i>		50% der runden Spermatiden haploidspezifisch		
<i>Tg5'-UTR-C/0</i>		50% der runden Spermatiden haploidspezifisch		
<i>TgdeltaU/0</i>		alle runden und elongierenden Spermatiden		in elongierenden Spermatiden nicht im Flagellum

4.4 Mauslinien der *Tcr*-Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen

Zusätzlich zu der individuellen Untersuchung der 5'-UTR sollte ihre Funktion in Kombination mit der codierenden Region von *Tcr* in einem Expressionstest in transgenen Mäusen untersucht werden. Hierfür wurden im Tg11-Ausgangskonstrukt (vgl. Abschnitt 4.2) die gleichen 5'-UTR-Deletionen eingefügt (vgl. Abschnitt 4.3), wie sie schon für die 5'-UTR-Deletionskonstrukte Verwendung fanden. Neben den drei Deletionskonstrukten Tg11-5'-UTR-A, -B und -C wurde auch ein Transgen Tg11deltaU kloniert, dem die 5'-UTR vollständig fehlte (Abb. 4.21).

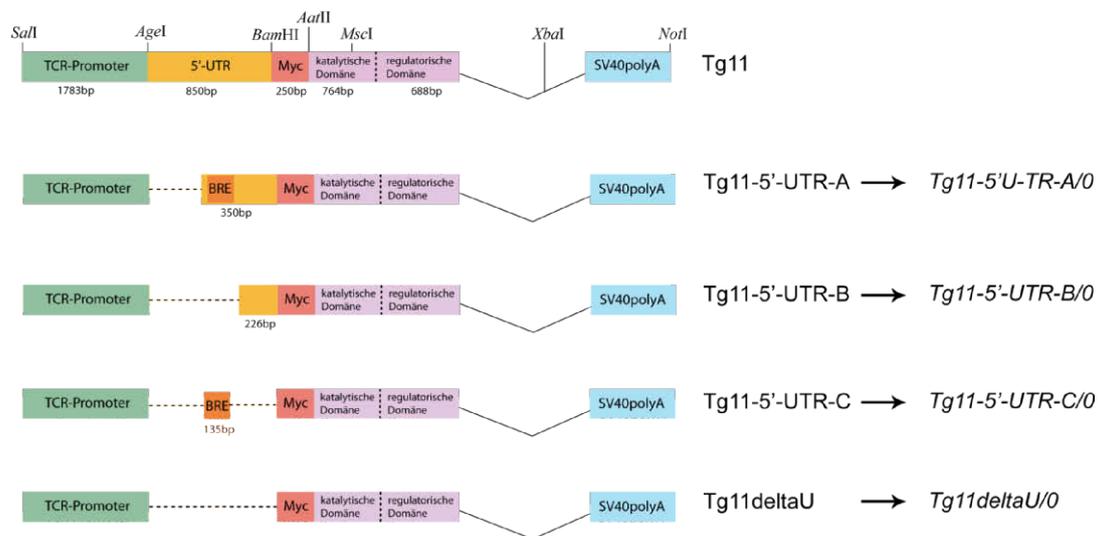


Abbildung 4.21: *Tcr*-Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen sowie der → Mauslinienbezeichnung

Schematische Darstellung des Ausgangskonstruktes Tg11 (zum Vergleich) mit seinen Bestandteilen (Promoter, UTR, codierende Region, Intron (durchgezogene Linien), Polyadenylierungssignal) und der Lokalisation von klonierungsrelevanten Restriktionsenzymerkennungssequenzen.

Bei den eigentlichen Deletionskonstrukten sind die Deletionen (---) in der UTR angedeutet.

4.4.1 Expressionsanalyse der *Tcr*-Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen

Transkriptlokalisierung im Maushoden durch *in situ* Hybridisierung

Die aus den *Tcr*-Konstrukten mit verschiedenen 5'-UTR-Deletionen generierten Mauslinien wurden ebenfalls bezüglich der Lokalisation ihres Transkripts untersucht.

In der *in situ* Hybridisierung mit transkriptspezifischer Myc-Sonde fiel auf, dass lediglich das Transkript für das Konstrukt mit der kleinsten Deletion, 5'-UTR-A, in den runden Spermatisiden nachweisbar war. Bei den größeren Deletionen B und C sowie der kompletten Deletion der untranslatierten Region von *Tcr* war im Mausehoden keine nachweisbare Transkriptexpression darstellbar (Abb. 4.22).

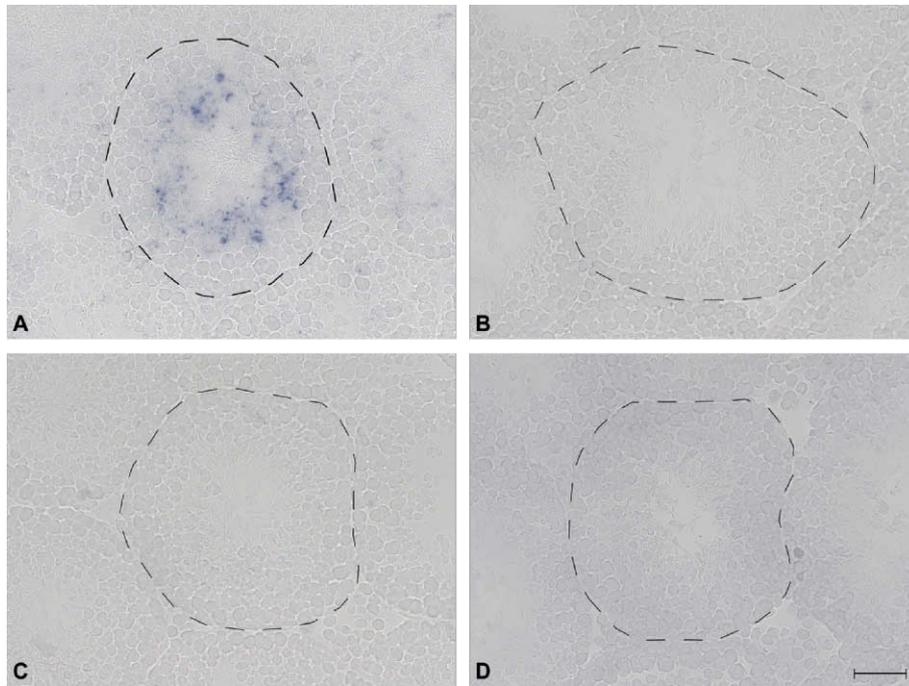


Abbildung 4.22: *In situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Mausehoden
Nachweis des Transkripts mit der transgenspezifischen Myc-Sonde im Querschnitt des Tubulus seminiferus im Hoden der Mauslinien **A:** *Tg11-5'-UTR-A/0*, **B:** *Tg11-5'-UTR-B/0*, **C:** *Tg11-5'-UTR-C/0* und **D:** *Tg11deltaU/0* durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farb-reaktion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphatase katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar ist. Während in *Tg11-5'-UTR-A/0* noch Transkript-Farbsignal in einigen runden Spermatisiden lokalisiert ist, weisen die anderen Deletionskonstrukte kein Signal mehr auf. (Maßstab=50µm)

Bei der Linie *Tg11-5'-UTR-A/0* war die Färbung vergleichsweise schwach ausgeprägt und in weniger als der Hälfte der runden Spermatisiden nachweisbar. In einer höheren Vergrößerung waren wieder gefärbte und ungefärbte Zellen in unmittelbarer Nähe zueinander darstellbar (Abb. 4.23), so dass man von haploidspezifischer Expression ausgehen konnte. Auch hier zeigte sich eine subzelluläre Akkumulation des Transkriptsignals.

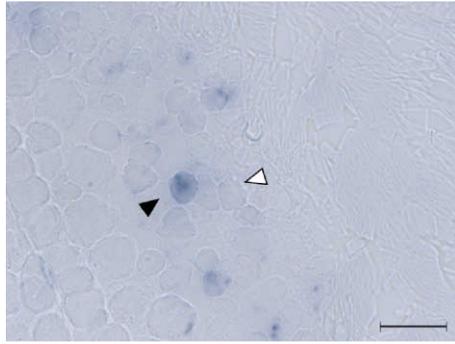


Abbildung 4.23: *In situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden
 Nachweis des Transkripts mit der transgenspezifischen Myc-Sonde in einer Gruppe runder Spermatiden (Ausschnitt aus einem Tubulus seminiferus) im Hoden der Mauslinie *Tg11-5'-UTR-A/0* durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farbreaktion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphatase katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar ist. Die nachgewiesene mRNA ist in den runden Spermatiden ► lokalisiert, aber es treten auch ungefärbte Zellen ▷ dieses Typs auf. (Maßstab=20µm)

Proteinlokalisierung der *Tcr*-Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen in der Maus

Die Darstellung des transgenspezifischen Myc-Fusionsprotein erfolgte im Maushoden mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörpers immunhistochemisch (Abb. 4.24). Bei dem *Tcr*-Konstrukt mit 5'-UTR-Deletion A fiel die entsprechende Mauslinie *Tg11-5'-UTR-A/0*, ähnlich wie *TgKS11/0* (vgl. Abschnitt 4.2.2), durch ein starkes Proteinsignal in den Flagellen der Spermien im Tubuluslumen auf. Das Signal erschien auch trotz geringer Farbentwicklungszeit intensiv braun und ließ sich als fädige Struktur bis zum Spermienkopf verfolgen. Durch die Methode bedingt, akkumulierten die Flagellen im Lumen zu einer kompakten Masse. Bei den *Tcr*-Konstrukten mit Deletion B, C beziehungsweise kompletter Deletion der 5'-UTR konnte trotz vergleichbarer Inkubationszeiten kein Proteinsignal gezeigt werden. Die im Interstitium auftretende Färbung bei allen Linien wurde als Artefakt eingestuft.

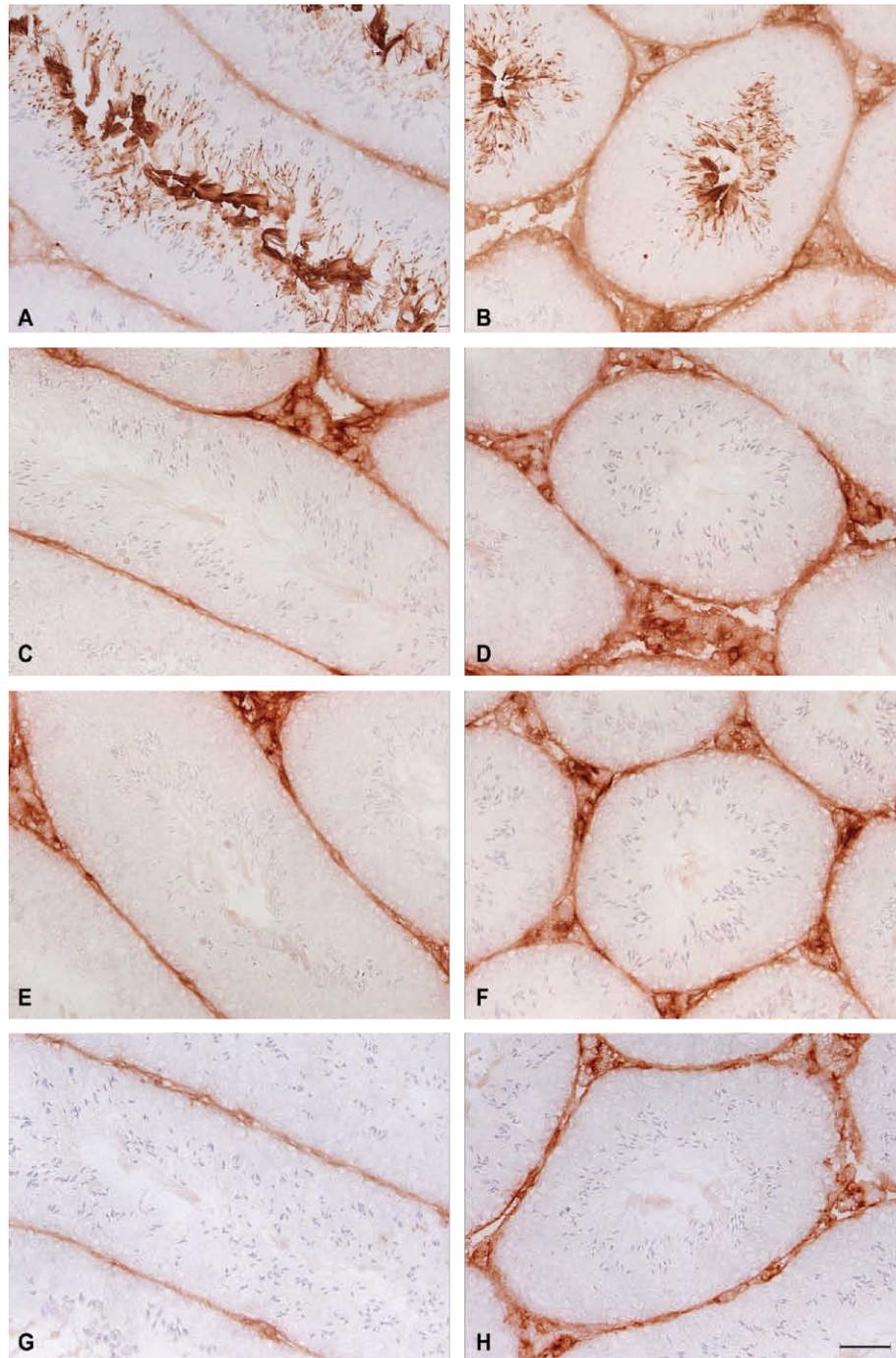


Abbildung 4.24: Immunhistochemische Färbung auf Gefrierschnitten von Maushoden. Nachweis des transgenspezifischen Myc-Proteins mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper im Längs- (links) und Querschnitt (rechts) des Tubulus seminiferus im Hoden der Mauslinien **A/B:** *Tg11-5'-UTR-A/0*, **C/D:** *Tg11-5'-UTR-B/0*, **E/F:** *Tg11-5'-UTR-C/0* und **G/H:** *Tg11deltaU/0* durch ein rotbraunes Farbsignal, das von einer am Zweitantikörper gebundenen Peroxidase aus dem eingesetzten Substrat (ImmPACT NovaRED Peroxidase Substrate) gebildet wurde. Das Protein ist lediglich bei *Tg11-5'-UTR-A/0* nachweisbar und in den Flagellen (fädige, rotbraune Strukturen) elongierter Spermien im Tubuluslumen lokalisierbar. Im Interstitium aller Linien fällt eine unspezifische Artefaktfärbung unbekannter Ursache auf. (Kernfärbung Hämatoxylin, Maßstab=50µm)

4.4.2 Zusammenfassung

Basierend auf der Untersuchung der transgenen Konstrukte mit Deletionen in der 5'-UTR von *Tcr* wurde das Zusammenspiel und die möglicherweise essentielle Interaktion von regulatorischen Elementen der untranslatierten Region mit der codierenden Region des Respondergens untersucht, indem Transgene mit 5'-UTR-Deletionen in Kombination mit der codierenden Sequenz in ihrer Expression im Maus Hoden analysiert wurden. Lediglich die Mauslinie mit der 5'-UTR-Deletion A zeigte neben der haploidspezifischen Transkriptlokalisierung in runden Spermatozoen auch eine späte Translation in den Flagellen der Spermien. Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass für eine typische Responderexpression insbesondere für die Transkriptstabilität und -lokalisierung sowie die erfolgreiche Translation das letzte Drittel der 5'-UTR in Kombination mit der codierenden Region des Gens notwendig waren. Fielen die Deletionen in der 5'-UTR größer aus, dann war bereits die Transkriptstabilität beeinträchtigt und damit auch keine Proteinsynthese mehr nachweisbar.

Tabelle 4.3: Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen *Tcr*-Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen auf Transkript- und Proteinebene (✓/× = erfolgreicher/erfolgloser Expressionsnachweis, Farbintensität des Symbols deutet Expressionslevel an)

Mauslinie	Transkription		Translation	
	Transkript	Lokalisation	Protein	Zeitpunkt und Lokalisation
<i>Tg11-5'-UTR-A/0</i>	✓	50 % der runden Spermatozoen haploidspezifisch	✓	spät Flagellum
<i>Tg11-5'-UTR-B/0</i>		×		×
<i>Tg11-5'-UTR-C/0</i>		×		×
<i>Tg11deltaU/0</i>		×		×

4.5 *Tcr*-Konstrukt mit *Protamin 1*-Promoter in der Maus

Um den Einfluss des relativ starken *Protamin 1*-Promoters auf *Tcr*-Konstrukte zu untersuchen, wurde ein Transgen mit diesem Promoter kloniert. Hierfür wurde der *Tcr*-Promoter des Transgens Tg11 (vgl. Abschnitt 4.2) gegen den *Protamin 1*-Promoter ausgetauscht und so das Konstrukt Tg11-P1P kloniert (Abb. 4.25). Außerdem sollte mit diesem Konstrukt überprüft werden, ob der *Tcr*-Promoter bei der haploidspezifischen Transkriptlokalisierung sowie bei der translationellen Regulation eine Rolle spielt.

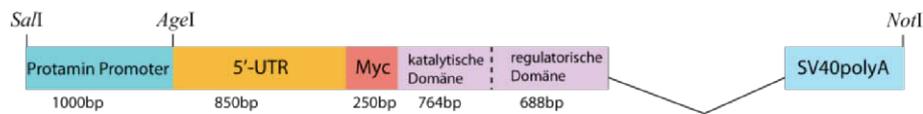


Abbildung 4.25: *Tcr*-Konstrukt mit *Protamin 1*-Promoter aus dem die Mauslinie *Tg11-P1P/0* generiert wurde.

Schematische Darstellung des Konstruktes mit seinen Bestandteilen (Promoter, UTR, codierende Region, Intron (durchgezogene Linien), Polyadenylierungssignal) und der Lokalisation von klonierungsrelevanten Restriktionsenzymkennungssequenzen.

4.5.1 Expressionsanalyse im Maushoden

Transkriptlokalisierung bei der Mauslinie *Tg11-P1P/0*

Tcr-Transgene mit *Tcr*-Promoter zeigten im Rahmen dieser Arbeit eher eine schwache mRNA-Expression im Mausmodell (vgl. Abschnitt 4.2.2 und 4.4.1). Daraus resultierend wurde erwartet, dass ein Austausch gegen den *Protamin 1*-Promoter zu einer Expressionszunahme führt. Bei der *in situ* Hybridisierung mit der transkriptspezifischen Myc-Sonde wurde bereits ersichtlich, dass das Signal deutlich intensiver war als beim vergleichbaren Konstrukt *TgKS11/0* mit *Tcr*-Promoter (vgl. Abb. 4.7), sich aber genauso im Bereich der runden Spermatozoen lokalisieren lies (Abb. 4.26). Der Austausch des Promoters in einem Respondertransgen hatte also keine Auswirkungen auf den Erfolg der Transkription, die Transkriptstabilität noch auf die mRNA-Lokalisation. Die intensivere Färbung der einzelnen Zellen erschwerte allerdings die Beurteilung, wie viele runde Spermatozoen ein Transkript exprimierten. Es wurde geschätzt, dass in etwa die Hälfte der runden Spermatozoen eine Transkriptexpression zeigten. Die höhere Auflösung unterstützte diese Abschätzung und zeigte zudem eine Haploidspezifität, das heißt, neben intensiv gefärbten Zellen fanden sich auch Zellen ohne Signal (Abb. 4.27). Das Transkript war intrazellulär nicht gleichmäßig verteilt, sondern konzentrierte sich an ein bis zwei Punkten in der Zelle.

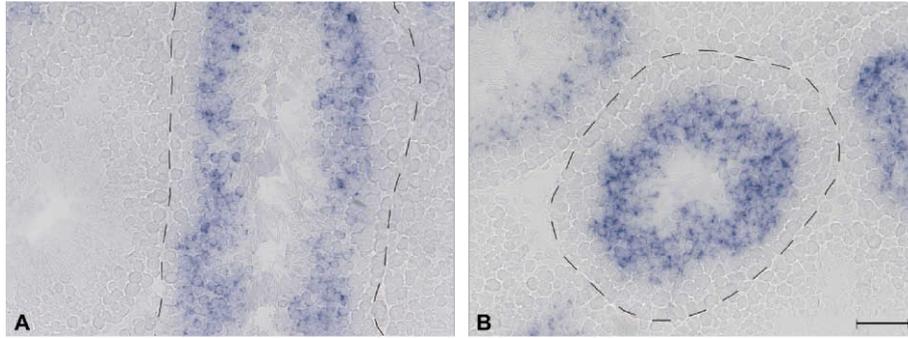


Abbildung 4.26: *In situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden
 Nachweis des Transkripts mit der transgenspezifischen Myc-Sonde bei der Mauslinie *Tg11-P1P/0* im **A**: Längs- und **B**: Querschnitt eines Tubulus seminiferus durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farbreaktion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphatase katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar ist.
 Die nachgewiesene mRNA ist in circa der Hälfte der runden Spermatischen lokalisiert. (Maßstab=50µm)

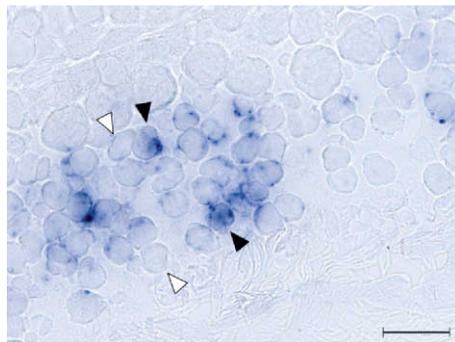


Abbildung 4.27: *In situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten von Maushoden
 Nachweis des Transkripts mit der transgenspezifischen Myc-Sonde in einer Gruppe runder Spermatischen (Ausschnitt aus Tubulus seminiferus) im Hoden der Mauslinie *Tg11-P1P/0* durch chromogene *in situ* Hybridisierung mit einer Farbreaktion, die durch eine an der Sonde gebundene, alkalische Phosphatase katalysiert wurde und als Indigo-Farbkomplex (blau-violett) sichtbar ist.
 Das nachgewiesene Transkript ist in den runden Spermatischen ► lokalisiert, aber es treten auch ungefärbte Zellen ▷ dieses Typs auf. (Maßstab=20µm)

Proteinlokalisierung bei der Mauslinie *Tg11-P1P/0*

Bei der Mauslinie *Tg11-P1P/0* konnte immunhistochemisch mit Hilfe eines monoklonalen anti-Myc-Antikörpers ein kräftig braunes Signal für das Fusionsprotein in den Flagellen elongierter Spermien im Tubuluslumen dargestellt werden (Abb. 4.28). Vom Spermienkopf an ließen sich die fädigen Strukturen bei ihrem Verlauf ins Lumen

verfolgen, wo sie durch die Herstellung der Schnitte bedingt zu einer kompakten Masse aneinander gelagert erschienen. Im Interstitium zwischen den angeschnittenen Samenkanälchen befand sich eine als Artefakt angesehene Hintergrundfärbung. Mit einem *Tcr*-Transgen, in dem der Promoter ausgetauscht wurde, war also ein späte Proteinsynthese des transgenen Konstruktes nachweisbar.

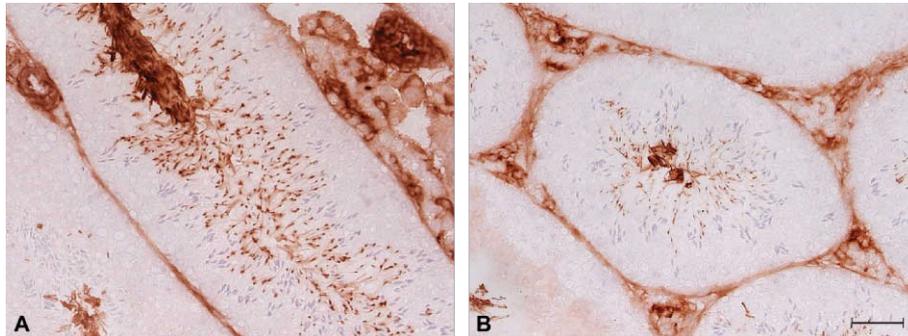


Abbildung 4.28: Immunhistochemische Färbung auf Gefrierschnitten von Maushoden. Nachweis des transgenspezifischen Myc-Proteins mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper im Längs- (links) und Querschnitt (rechts) des Tubulus seminiferus im Hoden der Mauslinie *Tg11-P1P/0* durch ein rotbraunes Farbsignal, das von einer am Zweitantikörper gebundenen Peroxidase aus dem eingesetzten Substrat (ImmPACT NovaRED Peroxidase Substrate) gebildet wurde. Das Protein ist deutlich in den Flagellen (fädige, rotbraune Strukturen) der elongierten Spermien im Tubuluslumen lokalisierbar. Im Interstitium fällt eine Artefaktfärbung unbekannter Ursache auf. (Kernfärbung Hämatoxylin, Maßstab=50µm)

4.6 Vererbungstest mit Mauslinien der *Tcr*-Deletionen

4.6.1 Organisation des Transmissionstests und die *Dot Blot*-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Vererbungstests durchgeführt, die zur Ermittlung der Vererbungsrate des jeweiligen Transgens genutzt werden sollten, da in vorangegangenen Experimenten bereits gezeigt werden konnte, dass auf *Tcr* basierende Transgene in einem Distorterhintergrund als Responder funktionell sein können (Herrmann et al. 1999).

Von den *Tcr*-Deletionsmauslinien *Tg11del1/0* und *Tg11del2/0* sowie von der als Referenz dienenden Mauslinie *TgKS11/0* wurden Testmännchen mit Distorter- beziehungsweise Wildtyphintergrund zusammengestellt und in einem Verpaarungstest mit NMRI-Weibchen die Vererbung des Transgens auf die Nachkommen geprüft. Die Kreuzung der Chimären erfolgte mit einer Mauslinie, die den partiellen *t*-Haplotyp *th⁵¹th¹⁸* und somit verschiedene Distorter aber keinen Responder enthielt. Die aus dieser Kreuzung hervorgehenden Testböcke mit Distorterhintergrund wiesen sowohl das jeweilige *Tcr*-Transgen sowie die Distorter des partiellen *t*-Haplotyps auf, während ihre Brüder beziehungsweise Halbbrüder, welche nur das jeweilige Transgen trugen, die Testgruppe mit Wildtyphintergrund bildeten.

Die Ermittlung des Genotyps der Nachkommen aus den Verpaarungen der beschriebenen Testmännchen mit NMRI-Weibchen erfolgte mit Hilfe der *Dot Blot*-Analyse. Wie in Abbildungen 4.29 und 4.30 dargestellt, wurden von den Nachkommen eines jeden Testbocks Embryonenschwanzproben in Mikrotiterplatten gesammelt. Diese Proben wurden lysiert und nach Aufreinigung der genomischen DNA wurde ein Transfer mittels *Dot Blotter* auf eine Nylon-Membran durchgeführt. Zur internen Kontrolle wurde jede Probe mindestens zweimal auf die Membran transferiert. Es erfolgte zunächst die Hybridisierung mit der transgenspezifischen Hygro-Sonde. In Abbildung 4.29 ist beispielhaft für eine Platte mit 96 DNA-Proben gezeigt, dass sich in einem transgenspezifischen *Dot Blot* die transgenen Tiere durch ihr intensives schwarzes Signal problemlos von Wildtypembryonen, die hellgrau erscheinen, sowie den signalfreien Wasserkontrollen unterscheiden ließen. Außerdem war das Ergebnis durch die doppelte Ausführung zusätzlich abgesichert. Im Anschluss wurden die selben Membranen einer weiteren Hybridisierung mit der *ColA1*-Sonde unterzogen, um die geladene DNA-Konzentration zu kontrollieren. Diese Sonde sollte erwartungsgemäß bei allen Tieren hybridisieren, da sie spezifisch im 5'-Bereich des *ColA1*-Locus bindet, der sowohl in transgenen Tieren als auch in Wildtypmäusen anzutreffen ist.

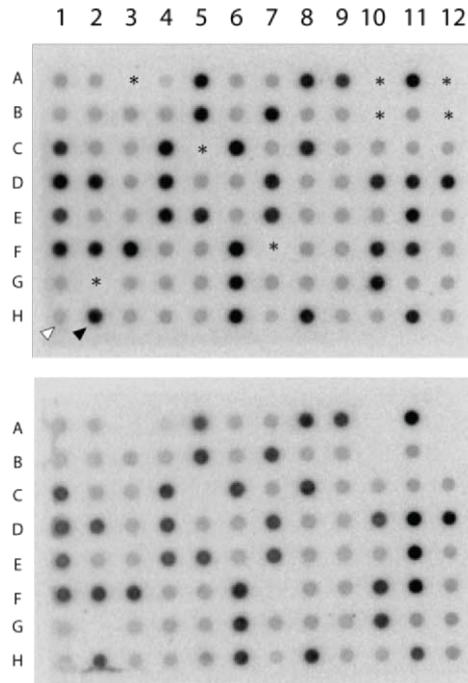


Abbildung 4.29: Genotypisierung von genomischer Embryonen DNA mittels *Dot Blot*. Genomische DNA-Proben von Embryonen wurden in zweifacher Ausführung auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer transgenspezifischen, radioaktiv markierten Hygro-Sonde hybridisiert. Transgene Embryonen ▶ waren eindeutig von Wildtypembryonen ▷ unterscheidbar.

Abgebildet ist das eingescannte Signal von einer Phospho-Imager-Platte, die zusammen mit den hybridisierten Nylonmembranen inkubiert wurde und in Abhängigkeit der radioaktiven Strahlung eine chemische Veränderung durchlief, die vom Scanner erfasst werden konnte. (Wasserkontrollen mit * markiert, Zahlen/Buchstaben bezogen auf Lokalisation in einer 96-Loch-Platte)

In Abbildung 4.30 ist für die bereits in Abbildung 4.29 gezeigten Membranen die Hybridisierung mit der ColA1-Sonde dargestellt. Der Vergleich beider Hybridisierungsergebnisse zeigt, dass die ColA1-Sonde bei fast allen Proben ein gleichmäßig intensives, schwarzes Signal produzierte, demzufolge lagen annähernd gleichmäßig konzentrierte DNA-Mengen auf den Membranen vor. Eine Probe an der Position A4 schien eine schwächere Hybridisierung mit der Sonde eingegangen zu sein. Dies sprach für eine geringere DNA-Konzentration dieser Probe und da auch in der transgenspezifischen Hybridisierung nur ein schwaches Signal erkennbar war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Tier fälschlicher Weise als Wildtyp angesehen wurde. Demzufolge wurden DNA-Proben, die in der Ladekontrolle schwach ausgeprägte Signale zeigten, bei der Auswertung ermittelt, erneut auf eine Membran transferiert und der Hybridisierungsprozedur mit Hygro- und ColA1-Sonde unterzogen. Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nachkommen aus einem Verpaarungstest wurden mit der *Dot Blot*-Analyse genotypisiert und die Auswertung wurden für jede getestete, transgene Mauslinie (vgl. Abschnitt 4.6.2) zusammengestellt.

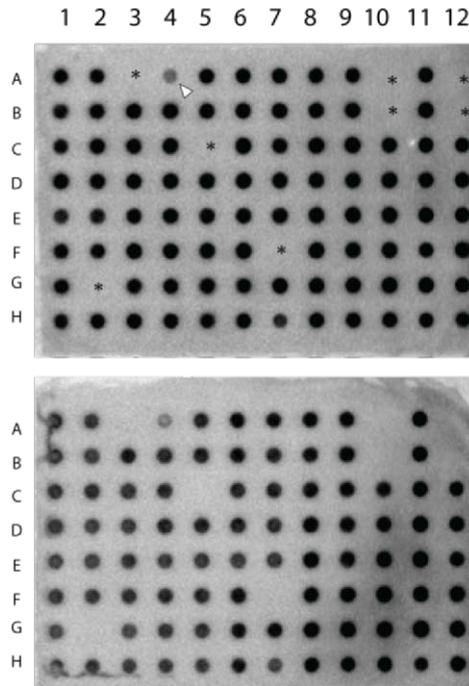


Abbildung 4.30: Genotypisierung von genomischer Embryonen-DNA mittels *Dot Blot*. Genomische DNA von Embryonen wurde in zweifacher Ausführung auf eine Membran transferiert und nach der Hybridisierung mit transgenspezifischer Sonde ein weiteres Mal mit der radioaktiv markierten ColA1-Sonde hybridisiert, um die DNA-Konzentration zu prüfen. DNA-Proben mit schwacher Konzentration \triangleright wurden erneut auf eine Membran transferiert und überprüft. Abgebildet ist das eingescannte Signal von einer Phospho-Imager-Platte, die zusammen mit den hybridisierten Nylonmembranen inkubiert wurde und in Abhängigkeit der radioaktiven Strahlung eine chemische Veränderung durchlief, die vom Scanner erfasst werden konnte. (Wasserkontrollen mit * markiert, Zahlen/Buchstaben bezogen auf Lokalisation in einer 96-Loch-Platte)

4.6.2 Ergebnisse des Vererbungstests

Für die beiden *Tcr*-Deletionsmauslinien wurden Testböcke mit Wildtyp- beziehungsweise Distorterhintergrund in Verpaarungstests mit NMRI-Mäusen eingesetzt, um die Transmission des jeweiligen Deletionstrangens auf die Nachkommen zu ermitteln (Tab. 4.4). Diesen Daten sollten eine Beurteilung ermöglichen, inwiefern ein *Tcr*-Trangens mit Deletionen noch Responderaktivität zeigt und TRD auslösen kann. Von der Linie *TgKS11/0* wurden ebenfalls Testmännchen mit oder ohne Distorterhintergrund auf ihre Transmissionseigenschaften getestet, da dieses Trangens keine Deletion enthielt und Transmissionsraten erwartet wurden, die als Referenzwerte dienen sollten.

Die Erwartungen für die Linie *TgKS11/0* orientierten sich dabei an bereits erzielten Testergebnissen einer Mauslinie *TgNV11/0*, die das gleiche Trangens zufällig im Genom integriert hatte und dieses im Distorterhintergrund zu 71,1% an die Nachkom-

men weitervererbt (Véron 2008). Demzufolge wurde auch bei den in dieser Arbeit eingesetzten Testgruppen mit Distorterhintergrund eine von der Mendelschen Vererbungsrate abweichende Transmission erwartet, die bei starker Responderfunktion des Transgens im Zusammenspiel mit den Distortern deutlich über 50 % liegen könnte. Bei den Testmännchen mit Wildtyphintergrund hingegen war aufgrund des Fehlens von Distortern je nach Stärke des Respondereffekts des Transgens eher ein *t-low* Phänomen beziehungsweise annähernd Mendelsche Vererbung zu erwarten.

Tabelle 4.4: Vererbungstest der *Tcr*-Deletionsmauslinien mit und ohne Distorterhintergrund

Testgruppen			Nachkommen				
	Genotyp der ♂	Anzahl	tg	Wildtyp	Gesamt	tg(%)	p-Wert
Distorter	<i>Tg11del1/0</i> $t^{h51}t^{h18}/+$	6	73	111	184	39,7	0.0051
	<i>Tg11del2/0</i> ; $t^{h51}t^{h18}/+$	3	20	18	38	52,6	0.7456
	<i>TgKS11/0</i> ; $t^{h51}t^{h18}/+$	2	55	66	121	45,5	0.3173
Wildtyp	<i>Tg11del1/0</i>	3	82	86	168	48,8	0.7576
	<i>Tg11del2/0</i>	3	56	86	142	39,4	0.0118
	<i>TgKS11/0</i> ¹	3	57	86	143	39,9	0.0153

tg=transgen; tg(%)=prozentualer Anteil von tg an der Gesamtzahl; p-Wert= statistische Signifikanz der Abweichung von 50 %

¹ Daten aus Keimbahntransmissionstest der Chimären

Aus der Kreuzung *TgKS11/0* mit $t^{h51}t^{h18}/+$ waren im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nur zwei Testtiere mit Distorterhintergrund hervorgegangen. Beim Verpaarungstest zeigten beide Männchen eine ähnliche Vererbungsrate des Transgens an die Nachkommen und diese lag durchschnittlich bei 45,5 % (Tab. 4.4, dritte Reihe). Die Zusammenstellung einer Gruppe mit Wildtyphintergrund scheiterte aufgrund unvorhersehbarer Nachzuchtprobleme bei der Kreuzung von Chimären mit der Distortermauslinie. Es konnte allerdings auf die Vererbungsrate des Transgens der chimären Mäuse selbst zurückgegriffen werden, die zusätzlich bei der Überprüfung der Keimbahntransmission des Transgens dieser Linie ermittelt wurde. Die drei darin untersuchten, chimären Männchen trugen ebenfalls nur das Transgen Tg11 im *ColA1*-Locus und entsprachen demnach genetisch der geplanten Testgruppe mit Wildtyphintergrund für dieses Konstrukt. Ihre Transgentransmission bei Verpaarungen mit NMRI-Mäusen lag bei 39,9 % (Tab. 4.4, letzte Reihe). Zusammenfassend konnte für das Transgen TgKS11 festgehalten werden, dass die Anwesenheit von Distortern die Vererbung des Transgens nur um 5,6 % im Vergleich zur Wildtyphintergrundgruppe gesteigert wurde und damit bereits das Referenzkonstrukt keine deutlich Responderaktivität in Form von TRD aufwies. Diese geringe Steigerung musste zudem kritisch betrachtet werden, da das Ergebnis für die Testtiere mit Distortern keine statistisch signifikante Abweichung von der Mendelschen Vererbung darstellte.

Für die Linie *Tg11del1/0* waren sechs Testmännchen mit Distorterhintergrund am Verpaarungstest beteiligt. Die Fruchtbarkeit dieser Tiere fiel sehr unterschiedlich aus, worauf in Abschnitt 4.6.3 ab Seite 86 näher eingegangen wird. Dies war allerdings auch der Grund für die Größe dieser Testgruppe, die mit sechs Männchen deutlich höher lag als bei den anderen Testgruppen mit Distorterhintergrund. Die durchschnittliche Vererbungsrate dieser sechs Männchen mit Distortern lag bei 39,7% (Tab. 4.4, erste Reihe), während die Testgruppe mit Wildtyphintergrund das Transgen *Tg11del1* durchschnittlich zu 48,8% an die nächste Generation vererbte (Tab. 4.4, vierte Reihe). Das transgene Konstrukt *Tg11del1* verfügte also in Anwesenheit von Distortern über keine Responderaktivität und dies führte sogar zu einer Verringerung der Transmission von 9,1% im Vergleich zum Wildtyphintergrund. Auch hier muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die statistische Signifikanz für das Ergebnis der Testmännchen mit Wildtyphintergrund nicht gegeben war.

Bei der Mauslinie *Tg11del2/0* zeigten die drei Testböcke im Distorterhintergrund in ihrem Vererbungstest eine Transmission des Transgens von 52,6%, allerdings floss in diese Vererbungsrate lediglich die Auswertung von insgesamt nur 38 Nachkommen ein (Tab. 4.4, zweite Reihe). Für eine statistische signifikante Abweichung von 50% reichte dies nicht aus. Die drei Testtiere dieser Linie mit Wildtyphintergrund vererbten das Transgen zu 39,4% an die nächste Generation weiter (Tab. 4.4, fünfte Reihe). Demnach lag beim Transgen *Tg11del2* im Distorterhintergrund eine Zunahme der Vererbungsrate um 13,2% im Vergleich zum Wildtyphintergrund vor. Diese Schlussfolgerung konnte jedoch nur unter Vorbehalt gestellt werden, da das negative Expressionsergebnis des Transgens *tg11del2* auf Proteinebene (vgl. Abschnitt 4.2.3) ebenfalls einen Einfluss auf die erzielten Vererbungsdaten haben könnte und berücksichtigt werden musste.

Eine vergleichende Betrachtung der Transmissionsraten der beiden *Tcr*-Deletionsmauslinien in diesem Test gestaltete sich schwierig, da bereits die Referenzmauslinie *TgKS11/0* mit ihren erzielten Vererbungsdaten deutlich unter den Erwartungen lag. Der negative Einfluss des Integrationsortes *ColA1* wurde bereits bei den unerwarteten Daten dieser Referenzlinie deutlich. Die Beurteilung der Funktionalität eines Respondertransgens mit Deletionen in der codierenden Region konnte mit den Daten dieses Tests nicht abschließend erfolgen, da auch hier vergleichbare hemmende Einflüsse des Integrationsortes einbezogen werden mussten. Die beiden Deletionstransgene im Distorterhintergrund zeigten zudem die bereits erwähnten Beeinträchtigungen der Fruchtbarkeit, was eine Auswertung der Testergebnisse zusätzlich erschwerte.

4.6.3 Fruchtbarkeitsdaten

Beim Vererbungstest fielen einige Individuen besonders in den Testgruppen mit Distorterhintergrund durch ihre zum Teil außerordentlich schlechte Fruchtbarkeit auf, deshalb wurde eine Erhebung wichtiger Parameter, wie dem Befruchtungserfolg und der Wurfgrößen, zusammengestellt. Neben Daten der Einzelindividuen (Tab. 4.5 und 4.7) wurden auch durchschnittliche Werte (Tab. 4.6 und 4.8) der getesteten Li-

nien erfasst und die Ergebnisse nach genetischen Hintergründen getrennt zusammengestellt.

Erfahrungsgemäß waren bei einer Testverpaarung mit NMRI-Weibchen Wurfgrößen von durchschnittlich 12 Jungtieren zu erwarten, wie schon im zuvor durchgeführten Keimbahntransmissionstest mit den Chimären der untersuchten Mauslinien ermittelt werden konnte. Grundsätzlich wurden die Männchen relativ zeitnah nach dem Eintritt ihrer Geschlechtsreife in Testverpaarungen eingesetzt. Bei der Betrachtung der durchschnittlichen Ergebnisse fielen die Fruchtbarkeitsprobleme zunächst gar nicht auf, erst die Daten der Einzelindividuen deuteten auf eine Sterilitätstendenz einzelner Tiere hin.

Fruchtbarkeitsdaten im Distorterhintergrund Für die Linie *TgKS11/0* konnte bei Testern mit Distorterhintergrund eine relativ konstante Fruchtbarkeit festgehalten werden. Die Wurfgröße lag bei durchschnittlich 13,4 Jungtieren pro Wurf. Die Zahlen für nicht tragende Weibchen mit 40 % und tragende Weibchen mit 60 % waren allerdings annähernd ausgeglichen (Tab. 4.5 bzw. Tab. 4.6, jeweils unten). Die Fruchtbarkeit dieser Testgruppe konnte somit als normal bewertet werden.

Tabelle 4.5: Fruchtbarkeitsdaten der Einzelindividuen mit Distorterhintergrund

Genotyp	Tier- nummer	Plugs	tragend	nicht tragend	Jungtiere gesamt	pro Wurf
<i>Tg11del1/0; th⁵¹th¹⁸/+</i>	#84	2	2	0	31	15,5
	#91	7	0	7	0	0
	#92	12	1	11	21	21
	#112	2	2	0	31	15,5
	#188	7	6	1	64	10,7
	#191	5	3	2	37	12,3
<i>Tg11del2/0; th⁵¹th¹⁸/+</i>	#169	11	4	7	29	7,25
	#171	10	0	10	0	0
	#206	6	1	5	9	9
<i>TgKS11/0; th⁵¹th¹⁸/+</i>	#96	7	4	3	55	13,7
	#97	8	5	3	66	13,2

Plugs = Vaginalpfropfanzahl als Indiz für erfolgte Kopulation
tragend/nicht tragend = Anzahl der trächtigen/nicht trächtigen NMRI-Weibchen

In der Testgruppe der Linie *Tg11del1/0* mit Distortern kristallisierten sich dagegen zwei verschiedene Tendenzen in der Fruchtbarkeit der eingesetzten Männchen heraus, die nur bei der Betrachtung der Einzelindividuen deutlich wurden (Tab. 4.5, oben). Auf der einen Seite zeigten mindestens zwei Individuen erhebliche Einschränkungen in ihrer Fruchtbarkeit. Das Männchen #92 wies bei zwölf Verpaarungen nur

eine erfolgreiche Befruchtung auf. Zwar lag die Wurfgröße mit 21 Embryonen bei diesem Einzelfall besonders hoch, sie konnte allerdings nur nach längerer Dauerverpaarung mit einem Weibchen erzielt werden. Dagegen waren mit dem Bock #91 auch nach sechs Verpaarungen sowie anschließender Dauerverpaarung keine Nachkommen für die Genotypisierung zu verzeichnen. Beide Testmännchen fielen also durch starke Sterilitätstendenz auf und dies führte im Verlauf des Verpaarungstests auch zu der Entscheidung, weitere Böcke für diese Mauslinie *Tg11del1/0* einzusetzen, obwohl dadurch die Gruppengröße deutlich größer ausfiel als bei den anderen Testgruppen im Distorterhintergrund. So konnte allerdings eine zweite Gruppe von Testböcken dieser Linie mit Distorterhintergrund identifiziert werden, die durch relativ gute Fruchtbarkeitsparameter charakterisiert war (Tab. 4.5, oben). Die Böcke mit den Tiernummern #84, #112 und #191 zeigten den Erwartungen entsprechende, durchschnittliche Wurfgrößen von 12,3 bis 15,5 Jungtieren je Wurf, lediglich das Testmännchen #188 lag mit 10,7 Jungtieren etwas niedriger. Auch die Befruchtungsraten waren bei diesen vier Testböcken relativ normal. Mit maximal zwei nicht tragenden NMRI-Weibchen für das Tier #191 fiel die Anzahl der nicht tragenden NMRI-Weibchen nicht dramatisch hoch aus. Diese Daten der Tester mit guter Fruchtbarkeit führten in der gesamten Testgruppe schließlich dazu, dass sich die Linie mit Deletion 1 im Distorterhintergrund bezüglich der erhobenen Parameter durchschnittlich betrachtet auf einem Level einpendelte, welches der Linie *TgKS11/0* im selben genetischen Hintergrund ähnlich war. Somit fiel eine Sterilitätsproblematik bei Betrachtung der durchschnittlichen Werte bei dieser Linie nicht sofort ins Auge (Tab. 4.6, oben).

Tabelle 4.6: Durchschnittliche Fruchtbarkeitsdaten der Testgruppen mit Distorterhintergrund

Genotyp der Gruppe	Plugs gesamt	tragend		Jungtiere	
		(%)	nicht tragend (%)	gesamt	pro Wurf
<i>Tg11del1/0; th⁵¹th¹⁸/+</i>	35	40	60	184	13,1
<i>Tg11del2/0; th⁵¹th¹⁸/+</i>	27	18,5	81,5	38	7,6
<i>TgKS11/0; th⁵¹th¹⁸/+</i>	15	60	40	121	13,4

Plugs = Vaginalpfropfanzahl als Indiz für erfolgte Kopulation

tragend/nicht tragend = Anzahl der trächtigen/nicht trächtigen NMRI-Weibchen

Bei der Linie *Tg11del2/0* stellte sich die Lage noch dramatischer dar, da alle eingesetzten Testböcke mit Distorterhintergrund unterdurchschnittlich schlechte Befruchtungserfolge zeigten (Tab. 4.5 bzw. Tab. 4.6, jeweils mittlere Reihe). Unter anderem waren im Mittel fast 82 % der NMRI-Weibchen nach der Verpaarung nicht tragend und die Wurfgröße, sofern überhaupt vorhanden, mit durchschnittlich 7,6 Jungtieren vergleichsweise eher klein, so dass man kaum statistisch relevante Nachkommenzahlen für den Transmissionstest dieser Testgruppe erhalten konnte. Das Individuum #171 musste als steril angesehen werden, da auch nach zehn Verpaarungen sowie Dauerverpaarung keine Nachkommen zu verzeichnen waren. Allerdings zeigten auch die beiden anderen Testmännchen #169 und #206 eine deutliche Sterilitätstendenz,

wenn man ihre kleinen Wurfgrößen und schlechten Befruchtungserfolge berücksichtigte.

Fruchtbarkeitsdaten im Wildtyphintergrund Die Testgruppen der beiden Deletionsmauslinien ohne Distorter verhielten sich bezüglich ihrer Fruchtbarkeit eher den Erwartungen entsprechend. Die Verpaarungen der Linie *Tg11del1/0* erreichten im Wildtyphintergrund mit durchschnittlich 12 Jungtieren pro Wurf die Wurfgrößen, die regelmäßig bei NMRI-Verpaarungen beobachtet werden konnten (Tab. 4.8, oben). Auch der Befruchtungserfolg mit 73,7% tragenden NMRI-Weibchen fiel gut aus. Bei der Betrachtung der Daten der Einzelindividuen konnte man feststellen, dass alle drei Testböcke vergleichbare Wurfgrößen und Befruchtungserfolge aufwiesen (Tab. 4.7, oben). Nur das Tier #83 wies ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen tragenden und nicht tragenden Weibchen auf. Die Fruchtbarkeitsparameter dieser Testgruppe waren insgesamt als normal zu bewerten.

Bei der Linie *Tg11del2/0* ohne Distorterhintergrund umfassten die Würfe der Testböcke durchschnittlich 15,8 Jungtiere und dies spiegelte auch die erzielten Wurfgrößen der Einzelindividuen wieder (Tab. 4.8 und 4.7, jeweils mittlere Reihe). Die Erfolgsquote bei der Befruchtung war mit über 80% tragender Weibchen sehr gut, lediglich beim Tier #168 wurden zwei von fünf verpaarten Weibchen nicht tragend. Die Fruchtbarkeit dieser Testgruppe fiel also normal aus.

Tabelle 4.7: Fruchtbarkeitsdaten der Einzelindividuen mit Wildtyphintergrund

Genotyp	Tier- nummer	Plugs	tragend	nicht tragend	Jungtiere gesamt	Wurf
<i>Tg11del1/0</i>	#83	8	4	4	50	12,5
	#88	3	3	0	41	13,7
	#189	8	7	1	77	11
<i>Tg11del2/0</i>	#168	5	3	2	55	18,3
	#172	3	3	0	41	13,6
	#174	3	3	0	46	15,3
<i>TgKS11/0</i> ¹	#6	4	4	0	49	12,25
	#8	3	3	0	36	12
	#9	5	4	1	58	14,5

Plugs = Vaginalpfropfanzahl als Indiz für erfolgte Kopulation

tragend/nicht tragend = Anzahl der trächtigen/nicht trächtigen NMRI-Weibchen

¹ Daten aus Keimbahntransmissionstest mit Chimären

Für die Linie *TgKS11/0* konnten keine Testböcke ohne Distorterhintergrund aus der Kreuzung mit $t^{h51}t^{h18}/+$ im Transmissionstest eingesetzt werden. Wie schon für den Vererbungstest wurden die Fruchtbarkeitsdaten des Keimbahntests von Chimären

dieser Linie herangezogen. Mit einer durchschnittlichen Wurfgröße von 13 Jungtieren lagen diese Testmännchen im erwarteten Bereich (Tab. 4.8, unten). Hinzu kam eine sehr gute Befruchtungsfähigkeit, denn bei allen Verpaarungen dieser Testgruppe wurden nur 8,3% der Weibchen nicht tragend. Die durchschnittlichen Daten dieser Testgruppe fassten dabei sehr gut die Ergebnisse der Einzelindividuen zusammen, da die Testböcke mit ihren Befruchtungsparametern sehr vergleichbare Werte erzielten (Tab. 4.7, unten). Somit zeichnete sich auch die Testgruppe des Referenztransgens *TgKS11/0* durch gute Fruchtbarkeit aus und war den anderen beiden Gruppen mit Wildtyphintergrund bezüglich der erhobenen Parameter sehr ähnlich.

Tabelle 4.8: Durchschnittliche Fruchtbarkeitsdaten der Testgruppen mit Wildtyphintergrund

Genotyp der Gruppe	Plugs gesamt	tragend (%)	nicht tragend (%)	Jungtiere gesamt	Wurf
<i>Tg11del1/0</i>	19	73,7	26,3	168	12
<i>Tg11del2/0</i>	11	81,8	18,2	142	15,8
<i>TgKS11/0</i> ¹	12	91,7	8,3	143	13

Plugs = Vaginalpfropfanzahl als Indiz für erfolgte Kopulation
tragend/nicht tragend = Anzahl der trächtigen/nicht trächtigen NMRI-Weibchen

¹ Daten aus Keimbahntransmissionstest mit Chimären

4.6.4 Zusammenfassung

Bei der Analyse der einzelnen auf *Tcr* basierenden, transgenen Konstrukte auf ihre Funktionalität als Responder in Form eines Vererbungstests musste festgehalten werden, dass die erzielten Transmissionsraten deutlich hinter den Erwartungen zurück blieben und zum Teil sogar unerwartete Ergebnisse lieferten, die nicht allein auf das Transgen zurückzuführen waren.

Bereits das Transgen *tgKS11* konnte im Mausmodell mit Distorterhintergrund keine deutliche, nicht-Mendelsche Vererbung mehr auslösen, obwohl dies mit einer Mauslinie *TgNV11/0* mit dem selben, zufällig integrierten Respondertransgen möglich war (Véron 2008). Damit konnte diese Linie keine Referenzwerte liefern und eine aussagekräftige Einschätzung der Transmissionsraten der Deletionskonstrukte war nicht abschließend möglich. Der Vererbungstest verdeutlichte statt dessen, dass der Integrationsort *ColA1* einen negativen Einfluss auf die Transgenexpression und damit auch auf ihre Responderfunktionalität hatte, was schließlich in Anwesenheit von Distortern mit einer Infertilitätsproblematik einzelner Individuen einherging. Während die Testmännchen der drei *Tcr*-Transgene im Wildtyphintergrund eine vergleichbar gute Fruchtbarkeit zeigten, wiesen im Distorterhintergrund vereinzelte Böcke mehr oder weniger starke Sterilitätstendenzen auf. Beim Transgen *Tg11del1*

im Distorterhintergrund war davon circa ein Drittel der eingesetzten Männchen betroffen und beim Transgen Tg11del2 waren alle verpaarten Testböcke in ihrer Fruchtbarkeit beeinträchtigt. Lediglich bei der Referenzlinie *TgKS11/0* hatte der Distorterhintergrund keinen wesentlichen Einfluss auf die Fertilität. Die Responderaktivität der hier untersuchten *Tcr*-Transgene wurde also nicht in Form der Verschiebung der Transmissionsrate deutlich, sondern durch ihre Fähigkeit charakterisiert, in Anwesenheit der Distorter die Fertilität zu erhalten.

Tabelle 4.9: Zusammenfassende Übersicht der Transmissions- und Fertilitätsdaten der einzelnen auf *Tcr* basierenden Transgene inklusive der Daten der Positivkontrolle *TgNV11/0*

Mauslinie	Intergration	Transmission	Fertilität
<i>TgNV11/0</i>	zufällig	71,1 % bei Distorterhintergrund 66,4 % bei Wildtyphintergrund Transgen besitzt Responderaktivität → TRD (Veron 2008)	keine Angaben
<i>TgKS11/0</i>	ColA1- Locus	45,5 % bei Distorterhintergrund 39,9 % bei Wildtyphintergrund Transgen besitzt geringe Responderaktivität	→ mäßig → normal
<i>Tg11del1/0</i>	ColA1- Locus	39,7% bei Distorterhintergrund 48,8 % bei Wildtyphintergrund Transgen besitzt sehr geringe Responderaktivität	→ z.T. steril , z.T. normal → normal
<i>Tg11del2/0</i>	ColA1- Locus	52,6 % bei Distorterhintergrund 39,4 % bei Wildtyphintergrund keine Responderaktivität	→ sehr schlecht, z.T. steril → normal

z.T. = zum Teil

TRD = *Transmission Ratio Distortion*

5 Diskussion

Transmission Ratio Distortion bezeichnet das Phänomen der nicht-Mendelschen Vererbung des *t*-Haplotyps von heterozygoten *t/+* Mausemännchen auf ihre Nachkommen (Lyon 2003). Der *t*-Haplotyp, eine abweichende Form des *t*-Komplexes, erstreckt sich über ein Drittel des Chromosoms 17 und kann eine außergewöhnlich hohe Vererbungsrate von bis zu 99% erreichen. Dies ist nur möglich, weil in der Spermatogenese von *t*-heterozygoten Männchen durch ein Zusammenspiel von *trans*-wirkenden Distortern und dem *cis*-aktiven Responder zwei unterschiedliche Spermienpopulationen gebildet werden (Herrmann et al. 1999). Während die *+*-Spermien durch die Distorterwirkung Motilitätsdefizite aufweisen, wird dieser Zustand in *t*-Spermien, die den *t*-Haplotyp tragen, durch den Responder wieder kompensiert, was ihnen den entscheidenden Vorteil bei der Befruchtung verschafft und schließlich zur gesteigerten Transmissionsrate des *t*-Haplotyps führt (Olds-Clarke 1997). Die haploidspezifische, zelluläre Restriktion des Respondergens *Smok1^{Tcr}*, wie sie im transgenen Mausmodell auf Transkriptebene bereits gezeigt wurde (Véron et al. 2009), stellt allerdings eine Ausnahme von der Regel dar, dass die sich im Synzytium entwickelnden Zellen während der Spermatogenese Genprodukte untereinander austauschen (Fawcett et al. 1959; Braun et al. 1989). Darüber hinaus ist die außergewöhnliche Expression des Responder durch eine verhältnismäßig späte Translation gekennzeichnet (Véron et al. 2009). Im Hoden verstärkelt anzutreffende, translationelle Regulationsmechanismen spielen also auch eine wichtige Rolle bei der Realisierung der haploidspezifischen Transkriptlokalisation und späten Translation des Respondergens *Smok1^{Tcr}*. Die 5' untranslatierte Region von *Smok1^{Tcr}* weist bei einer Länge von 850 bp eine Vielzahl von möglicherweise die Translation kontrollierenden Elementen auf (Véron 2008), die auch eine Rolle in der Transkriptstabilität und mRNA-Lokalisation spielen können.

In dieser Arbeit wurden zunächst Deletionskonstrukte in der 5'-UTR des Responders in der Maus hinsichtlich ihrer Expression im Hoden charakterisiert. Die Analyse auf Transkriptebene zeigte, dass die 5'-UTR für die haploidspezifische Lokalisation der mRNA in den runden Spermiden verantwortlich ist, dies allerdings nicht auf ein bestimmtes regulatorisches Element allein zurückzuführen war. Mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur Proteinlokalisation bei den 5'-UTR-Deletionsmauslinien wurde deutlich, dass diesen transgenen Konstrukten scheinbar ein entscheidendes Element für eine erfolgreiche Translation fehlte.

Durch die Verwendung der selben 5'-UTR-Deletionen in Kombination mit der codierenden Region des Responders konnte die Bedeutung der codierenden Region für die translationelle Regulation geklärt werden. Die Analysen auf Transkript- und Proteinebene zeigten, dass für eine haploidspezifische mRNA Lokalisation, für die Transkriptstabilität und für die erfolgreiche Translation das letzte Drittel der 5'-

UTR in Kombination mit der codierenden Region notwendig waren. Die codierende Sequenz des Responders übernahm scheinbar dabei einen wesentlichen Anteil an der Transkriptstabilisierung und der Translationskontrolle.

Mit Hilfe von Deletionen in der codierenden Region von *Tcr* konnte in transgenen Mäusen außerdem gezeigt werden, dass die Verkürzung der codierenden Sequenz keinen Einfluss auf die Transkriptlokalisation hatte, allerdings der Erfolg der Translation mit zunehmenden Deletionsumfang beeinträchtigt war. Zumindest die Anwesenheit der vollständigen, regulatorischen Domäne des Responders war für die Proteinsynthese erforderlich, wenngleich die gesamte codierende Sequenz die effektivste Translation ermöglichte. Der Austausch des Promoters in einem *Tcr*-Transgen hatte dagegen keinen störenden Einfluss. Statt dessen konnten die Expressionslevel auf Transkript- sowie Proteinebene mit einem starken Promoter sogar gesteigert werden.

Ein zusätzlich mit den *Tcr*-Deletionsmauslinien durchgeführter Vererbungstest zur Beurteilung der Responderfunktionalität der jeweiligen Deletion in der codierenden Region blieb hinter den Erwartungen zurück und zeigte außerdem, dass der verwendete Integrationsort *ColA1* einen nicht zu vernachlässigenden, negativen Effekt auf die Transgenexpression hatte, worauf es schon bei den Expressionsanalysen im Maushoden erste Hinweise gab. Damit wurde offensichtlich, dass die gewählte Strategie zur Generierung transgener Mäuse, durch Integration der Transgene an einen spezifischen Locus, nicht die erwarteten, vergleichbaren Verhältnisse für die Transgenexpression liefern konnte. Im Transmissionstest wirkte sich die durch den Integrationslocus eingeschränkte Expression der Transgene auch auf die Fertilität der Testmäuse in Anwesenheit von Distortern aus. Die Responderaktivität eines *Tcr*-Deletionskonstruktes wurde also nicht durch eine Verschiebung der Vererbungsrate charakterisiert, sondern war durch das Potenzial des Transgens gekennzeichnet, die von den Distortern ausgehende Infertilität zu kompensieren.

Bei den Untersuchungen in dieser Arbeit stellte sich also heraus, dass der *t*-Komplex Responder ein komplex reguliertes Gen ist, bei dem unterschiedliche Bereiche im Transkript sowohl in der 5'-UTR als auch in der codierenden Region des Gens Aufgaben in der posttranskriptionellen Regulation übernehmen und dabei zusammen interagieren. Demzufolge ist die Reduktion des Phänomens TRD auf einzelne regulatorische Elemente des Responders und damit eine einfache Übertragung der molekularen Grundlagen der nicht-Mendelschen Vererbung des *t*-Haplotyps der Maus auf andere Mausgene oder sogar andere Spezies deutlich komplizierter.

5.1 Translationelle Regulation durch die 5'-UTR von *Smok1*^{*Tcr*}

5.1.1 Komplexe Translationskontrolle des Respondergens

Die 5'-untranslatierte Region des *Smok1*^{*Tcr*}-Transkripts weist eine Reihe von in Datenbanken vorhergesagten, translationell regulatorischen Elementen auf und scheint demzufolge ein essentieller Bestandteil der speziellen Expressionsregulation des Res-

pondergens zu sein (Véron 2008). Bereits in zuvor durchgeführten *in vitro* Experimenten mit 5'-UTR-Reporterkonstrukten wurde von Véron untersucht, inwiefern die vorhergesagten uAUGs, microRNA-Bindungsstellen oder die BRE-ähnliche Sequenz eine besondere Rolle in der Translationskontrolle von *Tcr* spielen. Diese lieferten allerdings nur unzureichende Resultate und es ist zu vermuten, dass bei den von Véron verwendeten Zellen Hek293T und NIH3T3-Fibroblasten nicht alle während der Spermatogenese im Hoden vorliegenden Faktoren vorhanden waren, die wichtig für die translationelle Regulation sein könnten. Somit lag es nahe diese translationelle Regulation systematisch mit Deletionskonstrukten in der 5'-UTR mit oder ohne CDS des *Smok1^{Tcr}*-Gens *in vivo* zu untersuchen, da sich die besonderen Verhältnisse der Spermatogenese und der Genexpression im Hoden je nach Zielsetzung in der Zellkultur nur eingeschränkt nachahmen lassen (Dores et al. 2012).

Die Untersuchung der 5'-UTR-Deletionsmauslinien ohne die codierende Region des Respondergens zeigte zwar eine annähernd gleichwertige Beteiligung der vorhergesagten regulatorischen Elemente an der haploidspezifischen Transkriptlokalisation, die Translation war bei diesen Konstrukten allerdings nicht erfolgreich (Tab. 5.1, fünfte Reihe). Die besondere Funktion der 5'-UTR des Responders konnte jedoch durch das vollständige Fehlen dieser Region hervorgehoben werden, da bei der entsprechenden Mauslinie *Tg5^{'deltaU/0}* nur eine Promoter abhängige, späte Transkription sowie eine scheinbar sofortige Translation in allen elongierenden Spermatiden zu verzeichnen war (Tab. 5.1, sechste Reihe). Die 5'-UTR von *Smok1^{Tcr}*-Transkripten war somit definitiv in posttranskriptionelle Regulationsprozesse, vor allem der mRNA-Lokalisation, involviert. Die Kombination mit der CDS von *Tcr* konnte auch die Beteiligung der 5'-UTR an der translationellen Kontrolle und mRNA-Stabilität bestätigen. Nur in Anwesenheit der codierenden Region war nämlich zumindest für die UTR-Deletion A neben Transkript auch Protein nachweisbar. Beim Respondergen schien demnach eine Interaktion zwischen der 5'-UTR, insbesondere dem letzten Drittel inklusive der BRE-ähnlichen Sequenz, und der codierenden Region des Gens vorzuliegen, die zur charakteristischen Responderexpression führte (Tab. 5.1, siebte Reihe).

Dagegen konnte überraschender Weise bei den Deletionen B, C und deltaU in der 5'-UTR auch in Anwesenheit der codierenden Region von *Smok1^{Tcr}* bereits kein Transkript mehr in der *in situ* Hybridisierung dargestellt werden (Tab. 5.1, vorletzte Reihe), obwohl dies bei den selben 5'-UTR-Deletionen ohne CDS noch ohne weiteres möglich war. Dieses Ergebnis wies daraufhin, dass die 5'-UTR nicht nur Bedeutung in der Transkriptlokalisation sondern auch mRNA-Stabilität hatte, die nur durch Interaktion mit der codierenden Sequenz realisiert wurde. Außerdem ist zu vermuten, dass neben den bereits vorhergesagten 5'-UTR-Elementen beziehungsweise ihrer Interaktion mit der codierenden Region, möglicherweise auch ausgebildete Sekundärstrukturen der untranslatierten Region oder weitere, bisher noch unbekannte Elemente einen Anteil an der komplexen translationellen Kontrolle von *Smok1^{Tcr}* haben. Eine Beteiligung des *Tcr*-Promoters konnte dagegen schon vollkommen ausgeschlossen werden, da sein Austausch in einem Respondertransgen weiterhin die für dieses Gen typische Expression zeigte (Tab. 5.1, letzte Reihe).

Tabelle 5.1: Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen Transgene auf Transkript- und Proteinebene (✓/× = erfolgreicher/erfolgloser Expressionsnachweis, Farbintensität des Symbols deutet Expressionslevel an)

Mauslinie	Transkription		Translation	
	Transkript	Lokalisation	Protein	Zeitpunkt und Lokalisation
<i>TgNV11/0</i>		50 % der runden Spermatiden haploid-spezifisch		spät im Flagellum
<i>TgKS11/0</i>		50 % der runden Spermatiden haploid-spezifisch		spät im Flagellum
<i>Tg11del1/0</i>		≤ 50 % der runden Spermatiden haploid-spezifisch		spät im Flagellum
<i>Tg11del2/0</i>		≤ 50 % der runden Spermatiden haploid-spezifisch		
<i>Tg5'-UTR/0</i> <i>Tg5'-UTR-A/0</i> <i>Tg5'-UTR-B/0</i> <i>Tg5'-UTR-C/0</i>		50 % der runden Spermatiden haploid-spezifisch		
<i>TgdeltaU/0</i>		alle runden und elongierenden Spermatiden		in elongierenden Spermatiden nicht im Flagellum
<i>Tg11-5'-UTR-A/0</i>		50 % der runden Spermatiden haploid-spezifisch		spät im Flagellum
<i>Tg11-5'-UTR-B/0</i> <i>Tg11-5'-UTR-C/0</i> <i>Tg11deltaU/0</i>				
<i>Tg11-P1P/0</i>		50 % der runden Spermatiden haploid-spezifisch		spät im Flagellum

5.1.2 Bruno Response Element-ähnliche Sequenz

Die verschiedenen Deletionen der 5'-UTR in den Transgenen waren bereits gezielt um die vorhergesagte BRE-ähnliche Sequenz konstruiert, da vermutet wurde, diese könnte das entscheidende regulatorische Element der *Smok1^{Tcr}*-Expression sein. Zuvor durchgeführte Zellkulturexperimente gaben allerdings noch keine eindeutigen Hinweise, dass die BRE-ähnliche Sequenz bedeutsam ist (Véron 2008), obwohl dieser Weg bei der Untersuchung des Bruno Response Elementes von *Drosophila melanogaster* durchaus erfolgreich war (Castagnetti et al. 2000).

In der Fruchtfliege wird durch Bindung des Proteins Bruno an mehrere BREs der *oskar*-mRNA dessen Translation unterdrückt, bis sich das Transkript am posterioren Pol der Oozyte befindet, da diese polarisierte Genexpression eine Grundvoraussetzung der Embryonalentwicklung dieser Spezies darstellt (Kim-Ha et al. 1995). Solch ein Mechanismus mit Verankerung eines translationell reprimierten Transkriptes in der Zelle wäre allerdings auch die ideale Grundlage für die Realisierung der haploidspezifischen Expression von *Smok1^{Tcr}* im Hoden, wenngleich der Prozess bei der Fruchtfliege in einem vollkommen anderen Gewebe stattfindet. Für *Drosophila melanogaster* konnte bereits gezeigt werden, dass der Regulationsmechanismus nicht allein durch die BREs und Brunoproteine realisiert wird, sondern weitere regulatorische Elemente in der 3'- und 5'-UTR des Transkripts beteiligt sind und darüber hinaus wurde diese Form der Translationskontrolle nachweislich nicht nur vom *oskar*-Gen genutzt (Lie et al. 1999; Gunkel et al. 1998). Das Regulationsprinzip ist also schon bei der Fruchtfliege komplexer beziehungsweise auf weitere Gene ausgeweitet und wahrscheinlich übernehmen Bruno beziehungsweise ähnliche Proteine, wie sie unter anderem auch bei der Maus konserviert vorliegen, bei der Genexpression in anderen Spezies eine vergleichbare, regulatorische Funktion (Webster et al. 1997). Ein weiterer vielversprechender Aspekt, der in der Fruchtfliege aufgedeckt wurde und so auch im Maushoden für *Smok1^{Tcr}*-Transkripte vorliegen könnte, ist die Beteiligung von Brunoprotein an der Akkumulation von Transkripten in spezifischen Ribonukleotidprotein-Komplexen, den *Silencing Particles*, in denen die Translation unterbunden ist (Chekulaeva et al. 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit mit den 5'-UTR-Deletionskonstrukten beobachteten Transkriptakkumulationen in der Zelle könnten als solche von Chekulaeva und ihren Mitarbeitern beschriebenen Partikel interpretiert werden.

Der entscheidende Unterschied zur mRNA von *Smok1^{Tcr}* ist allerdings, dass BREs von *oskar*-Transkripten beziehungsweise auch die Bindungsregion anderer durch Bruno regulierter Gene bisher ausschließlich in der 3'-UTR lokalisiert wurden und dieser translationelle Repressionsmechanismus in der Regel mit einem Vorhandensein mehrerer Bruno-Bindungsmotive in der mRNA einher ging (Reveal et al. 2011). Vermutlich war auch die BRE-ähnliche Sequenz von *Smok1^{Tcr}*-Transkripten in der vorliegenden Arbeit nicht allein für die Regulation verantwortlich, schließlich zeigten Expressionsanalysen auf Transkriptebene, dass sich Deletionen in der 5'-UTR von *Smok1^{Tcr}* ohne die Anwesenheit der codierenden Region alle ähnlich verhielten, indem sie die für den Responder typische, haploidspezifische Expression aufwiesen. Zumindest auf mRNA-Ebene schien die Abwesenheit bestimmter regulatorischer Elemente, auch der BRE-ähnlichen Sequenz, keinen Einfluss zu haben, ledig-

lich das Fehlen der gesamten 5'-UTR führte zu einem Zusammenbruch der für den Responder typischen Transkriptlokalisierung. Auch das kleinste 5'-UTR-Deletionsfragment C, welches nur die BRE-ähnliche Sequenz umfasste, rief immer noch eine subzelluläre Akkumulation der Transkripte hervor, das heißt, zumindest bezüglich der Transkriptlokalisierung schien diese Sequenz eine BRE-ähnliche Funktion im Rahmen translationeller Kontrolle zu übernehmen. Da die Translation bei Transgenen mit 5'-UTR-Deletionen gestört war, wurde vermutet, dass die Transkriptstabilität und Initiation der Proteinsynthese durch das Fehlen wichtiger Bestandteile in der 5'-UTR oder der codierenden Region verhindert war. Im Falle des möglicherweise regulatorisch wirkenden, BRE-ähnlichen Sequenz war nicht auszuschließen, dass wie in der Fruchtfliege weitere regulatorische Elemente in der 5'-UTR sowie die Interaktion mit der 3'-UTR beziehungsweise anderen Proteinen notwendig sein könnten, um eine Translation erfolgen zu lassen. Erste Hinweise darauf konnten aus der Analyse der 5'-UTR-Deletionskonstrukte in Kombination mit der codierenden Region von *Smok1^{Tcr}* gezogen werden. Hier ließ sich zumindest bei der Deletion A in der Mauslinie *Tg11-5'-UTR-A/0* sowohl Transkript als auch Protein nachweisen, während das BRE-ähnliche Sequenz allein in Form der Deletion C in der Linie *Tg11-5'-UTR-C/0* keine Expression mehr zeigte. Vermutlich waren also mehrere beteiligte Elemente im Transkript sowie ihre Interaktionen untereinander für die Regulation der Translation von *Smok1^{Tcr}* verantwortlich und die BRE-ähnliche Sequenz war nur eines davon.

5.1.3 *Upstream* AUGs im *Smok1^{Tcr}*-Transkript

Da sich in der 5'-UTR von *Smok1^{Tcr}* zahlreiche uAUGs befinden, wurde vermutet, dass diese an der translationeller Regulation des Gens beteiligt sind. AUGs beziehungsweise kurze ORFs findet man regelmäßig stromaufwärts des eigentlichen Start-Codons in der 5'-UTR vieler translationell regulierter Gene (Iacono et al. 2005). Sie führen zu einer ineffizienten Translation des eigentlichen Proteins, da sie den *Scanning*-Mechanismus des Translationsapparates stören, indem die Ribosomen uAUGs als falschen Translationsstart nutzen und Nonsense-Proteine synthetisieren oder wieder von der mRNA dissoziieren, so dass sich ein Auffinden des eigentlichen Start-Codons sehr ineffektiv gestaltet (Mignone et al. 2002).

Beispielsweise bildet *c-mos* eine mRNA mit vier uAUGs in der 5'-UTR aus, die in testisspezifischer Repression der Translation dieses an der Meioseregulation beteiligten Gens eine Rolle spielen, was bereits in Zellkulturexperimenten durch Deletionskonstrukte bewiesen werden konnte (Steel et al. 1996). Die translationelle Regulation durch uAUGs findet also prinzipiell auch im Hoden statt und so wurde durch das Transgen mit der Deletion A in der 5'-UTR von *Smok1^{Tcr}* im Rahmen dieser Arbeit erwartet, dass die Translation eines Transkripts in Abwesenheit der uAUGs effizienter erfolgen würde, wenn diese tatsächlich an der Repression der Proteinsynthese beteiligt sind. In der Mauslinie *Tg5'-UTR-A/0* konnte die mRNA noch nachgewiesen werden, die Proteindetektion bereitete allerdings schon Schwierigkeiten. Das scheinbare Proteinsignal, welches nur nach längerer Inkubationszeit zu erhalten war, wurde in dieser Form zwar bei keiner anderen 5'-UTR-Deletionsmauslinie ohne

codierende Region des Respondergens mit vergleichbaren Färbebedingungen gefunden, es war allerdings recht naheliegend, dass es nur ein Färbeartefakt darstellt. Die Vermutung, dass durch das Fehlen der uAUGs bei dieser Mauslinie zwar noch eine haploidspezifische Transkriptlokalisierung durch andere regulatorische Elemente möglich war die Translationsrepression aber unterbunden wurde, konnte somit nur unter großem Vorbehalt geäußert werden, da das Proteinsignal auch in Zelltypen lokalisiert war, die kein Transkript in der *in situ* Hybridisierung aufwiesen.

Das Fehlen der uAUGs in Kombination mit der codierenden Region von *Smok1^{Tcr}* zeigte in der entsprechenden Mauslinie *Tg11-5'-UTR-A/0* neben Transkript in runden Spermatozyten auch ein deutliches Proteinsignal mit Lokalisation in den Flagellen der Spermien. Dieses Transgen schien damit die Erwartungen für eine effizientere, aber immer noch späte Translation durch Fehlen der uAUGs in der 5'-UTR zumindest teilweise zu erfüllen, verdeutlichte allerdings auch die Notwendigkeit der codierenden Region in diesem Zusammenhang. Somit musste im Falle der uAUGs von *Smok1^{Tcr}* vermutet werden, dass sie nur einen Teil der regulatorischen Elemente des Responders darstellen, die an der translationellen Kontrolle dieses Gens beteiligt sein könnten.

5.1.4 Beteiligung von microRNAs an der Expression von *Smok1^{Tcr}*

Möglicherweise sind auch microRNAs an der posttranskriptionellen Regulation von *Smok1^{Tcr}* beteiligt, da in der 5'-UTR Bindungsstellen für die microRNA mir342 vorhergesagt wurden (Véron 2008). Mit Hilfe der 5'-UTR-Deletionskonstrukte konnte dieser Aspekt im Rahmen dieser Arbeit näher beleuchtet werden.

Bereits durch Lee wurden erstmals 1993 beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* die wenige Nukleotide umfassenden, nicht-codierenden microRNAs identifiziert und sie stellen bei diversen Spezies einen wichtigen Vertreter translationeller Regulationsmechanismen dar (Lee et al. 1993). Die Repression der 5'-Cap abhängigen Translation erfolgt durch weitestgehend sequenzspezifische Bindung der microRNA an komplementäre Sequenzen, meist in der 3'-UTR von Transkripten sowie deren Lokalisation in *Chromatoid Bodies*, den perinukleären Aggregaten, die als eine Art Depot für untranslatierte mRNA dienen und in denen das Transkript gegebenenfalls auch degradiert wird (Pillai 2005; Parvinen 2005). MicroRNAs sind darüber hinaus in der Genregulation während der Spermatogenese vertreten und einige sind dabei testis-spezifisch oder zum Teil sogar nur in ganz bestimmten diploiden Spermatogenesezelltypen anzutreffen (Smorag et al. 2012). Die Vorhersage von microRNA-Bindungsstellen in der 5'-UTR von *Smok1^{Tcr}* könnte also ein Hinweis für deren Beteiligung an der spezifischen Expression des Respondergens darstellen. Bisher konnte allerdings noch nicht gezeigt werden, dass microRNAs auch in haploiden Zelltypen der Spermatogenese an translationeller Regulation beteiligt sind.

Wie auch schon für die anderen potentiellen, regulatorischen Elemente des Respondertranskripts dargestellt, konnte mit den gewählten 5'-UTR-Deletionstransgenen mit oder ohne CDS des Respondergens im Mausmodell kein eindeutiger Hinweis gewonnen werden, dass bei der *Smok1^{Tcr}*-Expression die translationelle Regulation

vorwiegend durch microRNAs vermittelt wurde. Besonders die Deletion B, in der nur die microRNA-Bindungsmotive vorlagen, wäre im Hinblick auf diese Fragestellung interessant gewesen, doch während die haploidspezifische Transkriptlokalisierung in der entsprechenden Mauslinie *Tg5'-UTR-B/0* noch nachweisbar war, fand bei dieser Linie scheinbar keine Translation mehr statt. Die Situation wurde durch das gleichzeitige Vorliegen der codierenden Region in der Linie *Tg11-5'-UTR-B/0* nicht verbessert, sondern hier konnte nicht einmal mehr das Transkript gezeigt werden. Zwar lagen auch bei der Deletion A die vorhergesagten microRNA-Bindungsmotive vor, das Expressionsergebnis änderte sich allerdings nur in Kombination mit der codierenden Region bei der Linie *Tg11-5'-UTR-A/0*. Es konnte allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden, dass der Nachweis von Transkript und die spät erfolgende Proteinsynthese bei dieser Linie nicht auch durch die gleichzeitig in dieser 5'-UTR-Deletion enthaltene, BRE-ähnliche Sequenz beziehungsweise durch eine Interaktion mit ihr oder der codierenden Region verursacht wurde. Lediglich die Akkumulation von Transkript, wie sie beim Vorhandensein der microRNA-Bindungsmotive in den Linien *Tg5'-UTR-A/0*, *Tg5'-UTR-B/0* und *Tg11-5'-UTR-A/0* vorlagen, konnten auch als *Chromatoid Bodies* gedeutet werden, in denen die mRNA möglicherweise durch beteiligte microRNAs lokalisiert wurde. Insgesamt waren die Ergebnisse der Expressionsanalyse mit Deletionen in der 5'-UTR des Responders im Hinblick auf die Beteiligung einer microRNA-abhängigen Regulation nur begrenzt aussagekräftig.

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt ist dabei die Tatsache, dass regulatorische microRNAs in der Regel Bindungsstellen in der 3'-UTR von Transkripten besitzen und nicht wie bei *Smok1^{Ter}* in der 5'-UTR zu finden sind (Filipowicz et al. 2008). Für diverse microRNA-Bindungsstellen konnte zwar gezeigt werden, dass ihre Verlagerung von der 3'-UTR in die 5'-UTR durchaus weiterhin translationelle Repression verursacht (Lytle et al. 2007), aber ob dies auch auf das Respondertranskript zutrifft, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend beurteilt werden. Zusätzlich wurden bereits vermehrt natürlich vorkommende Bindungsmotive für microRNAs in der 5'-UTR verschiedenster Gene unter anderem bei der Fruchtfliege verzeichnet, die dort auch in die Translationsinitiation eingreifen, dabei waren zwei Bindungsstellen in der 5'-UTR aber ineffektiver als bei einer Lokalisation in der 3'-UTR (Moretti et al. 2010). Für verschiedene microRNAs konnte dabei gezeigt werden, dass sie durch Bindung in der 5'-UTR eher einen stimulierenden Effekt auf die Translation ausüben, wobei dies häufig in Abhängigkeit von besonderen Stress- oder Zellzyklussituationen der jeweiligen Zelle erfolgte (Fabian et al. 2010; Vasudevan 2012). Relativ häufig hat dieselbe microRNA Bindungsmotive in beiden UTRs und durch die Bindung der microRNA in beiden untranslatierten Regionen in Kombination mit weiteren Proteinen wird eine Interaktion ausgelöst, die repressiv auf die Translation dieser von den Autoren als *miBridge* bezeichneten Transkriptklasse wirkt (Lee et al. 2009). Ein weiterer interessanter Aspekt der sich im Zusammenhang mit *miBridge*-Transkripten herausgestellt hatte, ist die möglicherweise synergistische Zusammenarbeit von microRNAs und uAUGs in der translationellen Repression. Scheinbar ermöglicht erst diese Interaktion eine gewebs- oder sogar zelltypspezifische Unterdrückung der Translation von verschiedenen Genen (Ajay et al. 2010).

Bisher ist ein solche Genregulation im Hoden allerdings noch nicht bekannt. Das

Expressionsergebnis der Linie *Tg11-5'-UTR-A/0* in dieser Arbeit könnte jedoch auf einen ähnlichen Mechanismus hinweisen, da in Anwesenheit von vorhergesagten microRNA-Bindungsstellen scheinbar nur in Kombination mit der codierenden Region haploidspezifische Transkriptexpression und späte Proteinsynthese nachweisbar war. Die Rolle der codierenden Region in microRNA assoziierten Regulationsmechanismen waren schon durch umfangreiche Transkriptanalysen mit der Vorhersage von Bindungsstellen für microRNAs hervorgehoben worden (John et al. 2004). Es würde sich also anbieten die 3'-UTR und auch die codierende Region von *Smok1^{Tcr}* nach Bindungsmotiven für die in der 5'-UTR vorhergesagten microRNA mir342 zu untersuchen, um herauszufinden, ob das *Smok1^{Tcr}*-Transkript zur neuen *miBridge*-Transkriptklasse gezählt werden könnte. Es zeichnete sich allerdings wie schon bei den anderen potentiell regulatorischen Elementen ab, dass microRNAs nicht allein für die *Smok1^{Tcr}*-spezifische Expression verantwortlich waren, sondern ein komplexer Regulationsmechanismus vorlag.

5.1.5 Sekundärstrukturen des Respondertranskripts

Die mRNA von *Smok1^{Tcr}* weist nicht nur regulatorische Elemente in der 5'-UTR auf, sondern ist mit einer Länge von 850 bp in dieser Region wie geschaffen für die Ausbildung von räumlichen Strukturen (Véron 2008). Komplexe Sekundärstrukturen bilden neben Interaktionen mit dem 3'-Ende der mRNA, insbesondere der 3'-UTR oder dem polyA-bindenden Protein, die Voraussetzung für eine erfolgreiche Proteinsynthese im Anschluss an eine translationelle Repression (Kozak 2004). Es ist also möglich, dass bei diversen Deletionskonstrukten dieser Arbeit regulatorische Elemente fehlten, die neben ihrem Beitrag an der Transkriptstabilität und -lokalisierung auch an der Ausbildung von räumlichen Strukturen als Translationsvoraussetzung beteiligt sein könnten.

Komplexe Sekundärstrukturen sind dabei häufig in der Bildung von IRES involviert, die im Wesentlichen einen alternativen Translationsmechanismus realisieren (Hellen et al. 2001). Auch für die 5'-UTR des Respondertranskripts gab es Hinweise, dass sie sekundäre Strukturen formt, die an einer IRES-Ausbildung beteiligt sein könnten (Véron 2008). Sollte so eine interne ribosomale Eintrittsstelle durch Deletionen nicht mehr gebildet werden, könnte dies allein schon zu einer verschlechterten oder sogar gänzlich ausbleibenden Translation führen, wie schon bei diversen IRES anderer Gene gezeigt wurde (Stoneley et al. 2004). Für das in Neuronen exprimierte Gen eines Tyrosinkinase-Rezeptors TrkB konnte beispielsweise durch systematische Deletionskonstrukte in Reporterassays *in vitro* nachgewiesen werden, dass eine IRES-abhängige Translation aktiviert beziehungsweise reprimiert werden kann (Dobson et al. 2005). Die Translation dieses Rezeptorproteins erfolgte dabei erst nach einem Transport des Transkripts in die Dendriten und zeigte damit eine translationelle Repression bis zu einem bestimmten Zeitpunkt. Diese Translationskontrolle ist vergleichbar mit der Expressionsregulation des Responders. Es wäre also möglich, dass auch bei *Tcr* ein IRES-abhängiger Translationsmechanismus vorliegt. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die translationelle Regulation von *cat-1*, bei dem die Bildung einer funktionellen IRES nur durch einen zuvor translatierten uORF ausge-

löst wurde und so die cap-unabhängige Translation ermöglicht wurde (Yaman et al. 2003). Dieser Mechanismus liegt beim Respondertranskript wahrscheinlich nicht vor, da bei der Deletion der uAUGs in Anwesenheit der CDS in der transgenen Mauslinie *Tg11-5'-UTR-A/0* der vorliegenden Arbeit trotzdem eine Translation stattfand.

In Anbetracht der Expressionsanalysen der 5'-UTR-Deletionsmauslinien dieser Arbeit wäre es dennoch sinnvoll die 850 bp lange Region genaueren Strukturanalysen zu unterziehen, um eventuell IRES-typische Motive wie Pseudoknoten gefolgt von kleineren Haarnadelschleifen aufdecken zu können (Le et al. 1997), die das Vorliegen eines wirklichen, alternativen Translationsmechanismus stützen würden. Wobei zu berücksichtigen ist, dass bislang nur wenige Erkenntnisse zu IRES in eukaryotischen Zellen vorliegen und eine große Diversität bezüglich der Struktur und den Regulationsmechanismen anzutreffen ist (Stoneley et al. 2004), so dass sich eine solche Analyse auch als schwierig erweisen kann. Da IRES eine häufig alternative Translationsmöglichkeit in Stresssituationen der Zelle oder in der Mitose darstellen, wie sie auch in der ersten Phase der Spermatogenese auftreten, könnte eine Beteiligung an der Responderexpression im Hoden trotzdem in Erwägung gezogen werden. Erwiesenermaßen sind IRES auch an der Regulation von Genen im Hoden beteiligt (Créancier et al. 2000), was zumindest die Möglichkeit bestätigt, dass ein solcher translationeller Regulationsmechanismus für das ebenfalls im Hoden exprimierte Gen *Smok1^{Tcr}* vorliegen könnte.

Bisher in Viren oder auch Eukaryoten untersuchte IRES lieferten ganz unterschiedliche Ergebnisse, wenn man ihre Funktion durch Deletionen zu stören versuchte. Für gezielte Untersuchung auf IRES Strukturen bietet sich zudem eher die Nutzung von bicistronischen Reporterkonstrukten in Zellkultursystemen an. Es wäre dann im Zusammenhang mit einer Untersuchung des Transkripts von *Smok1^{Tcr}* allerdings sinnvoll, eine Zelllinie zu verwenden, die annähernd die Verhältnisse der Spermatogenese widerspiegelt. Vermutlich würden für solche systematischen Untersuchungen schon Monokulturen der verschiedenen Spermatogenesezelltypen ausreichend sein, deren Handhabung relativ einfach zu realisieren wäre (Hunter et al. 2012). Der Fortschritt auf dem Gebiet der *in vitro* Spermatogenese hat sich mit der Entwicklung von 3D-Kultursystemen auch deutlich verbessert, inwiefern diese für eine Expressionsanalyse von transfizierten Reporterkonstrukten herangezogen werden können, bleibt allerdings abzuwarten (Mahmoud 2012).

Dieser Untersuchungsansatz in Zellkultur würde vermutlich auch die Rolle der bereits vorhergesagten regulatorischen Elemente (Véron 2008) besser beantworten können, da man deutlich mehr Möglichkeiten zu kleineren Deletionen in den UTRs und der codierenden Region hätte und verschiedenste Kombinationen realisierbar wären. Die vermuteten Interaktionen der bereits vorhergesagten regulatorischen Elemente untereinander oder mit der codierenden Region könnten so präzisiert und eventuell sogar noch unbekannte, beteiligte Faktoren aufgespürt werden. Der Untersuchung im Tiermodell sind bei dieser Zielsetzung letztendlich Grenzen gesetzt und die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse gaben schon erste Hinweise auf mögliche Interaktionen und komplexere Regulationsmechanismen. Darüber hinaus war ein nicht zu vernachlässigender Punkt der Einfluss des Integrationsortes der Transgene, der unter Umständen zu unerwarteter Repression der Expression führte, wie im Abschnitt 5.3 weiter diskutiert wird, so dass die Ergebnisse der Expressionsanalyse noch kritischer

betrachtet werden mussten.

5.2 Einfluss der codierenden Region von *Smok1^{Tcr}* auf die Responderexpression

Die codierende Region des Respondergens *Smok1^{Tcr}* codiert eine Spermienmotilitätskinase, die sich durch verminderte Aktivität im Vergleich zur Wildtypvariante auszeichnet und in eine katalytische und regulatorische Domäne gegliedert ist (Herrmann et al. 1999). Die Transgene mit Deletionen in dieser Region sollten vor allem bei der Aufklärung helfen, inwieweit die Untereinheiten der Kinase für deren Funktion und Aktivität eine Rolle spielen. Das molekulare Modell von Herrmann diene als Grundlage der theoretischen Überlegungen, wobei besonders die mögliche Interaktion von Wildtyp-Smok1 und *Smok1^{Tcr}* untereinander sowie deren Auswirkung auf die Spermienmotilität von Interesse waren.

Sollten *Smok1^{Tcr}* und die Wildtypkinase Smok1 um gemeinsame Zielproteine, die von ihnen phosphoryliert werden, konkurrieren, dann könnte *Smok1^{Tcr}* durch die Entfernung der kompletten katalytischen Domäne, wie es beim Transgen mit Deletion 1 der Fall war, die Reaktion nicht mehr durchführen. Dies würde in verminderter Responderaktivität resultieren und somit die Normalisierung der Spermienmotilität ausbleiben, so dass auch keine erhöhte Vererbung des entsprechenden Transgens in Anwesenheit von Distortern an die Nachkommen mehr stattfinden könnte. Wenn die katalytische Domäne allerdings nicht das entscheidende Kriterium der Responderaktivität darstellt und trotz Deletion dieser Domäne weiterhin eine erhöhte Transmission des Transgens Tg11del1 vorliegt, spräche das für eine bedeutsamere Rolle der regulatorischen Kinaseuntereinheit.

Es wurde vermutet, dass die regulatorische Domäne vor allem beim Transport und der Lokalisation des Proteins, nämlich der Restriktion auf *t*-Spermien, eine Rolle spielt. Für MARK-Kinasen, zu denen auch *Smok1^{Tcr}* Ähnlichkeiten hat, ist eine Beteiligung an mikrotubuliabhängigen Transportvorgängen nämlich im weitesten Sinne bereits beschrieben worden (Drewes et al. 1997; Mandelkow et al. 2004). Die regulatorische Untereinheit könnte zum Beispiel Bindungsdomänen für Mikrotubulistrukturen aufweisen, die bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukt mit der Deletion 2 entweder fehlten oder noch erhalten waren, so dass diese Deletion bei der Aufdeckung eines möglichen Transportmechanismus des Respondertranskripts oder -proteins hilfreich wäre. Im Hinblick auf *Smok1^{Tcr}*-Expression und -Lokalisation könnte das äußerst interessant sein, da erst in elongierten Spermien ein Protein im Flagellum nachweisbar war (Véron et al. 2009), wobei bisher nicht genau geklärt werden konnte, wie das Transkript beziehungsweise die erst spät translatierte Kinase an ihren Bestimmungsort gelangten. Zudem wäre die zusätzliche Abwesenheit der katalytischen Domäne im Konstrukt Tg11del2 ein Hinweis darauf, dass *Smok1^{Tcr}* möglicherweise an Zielproteine bindet und diese unzugänglich für andere Spermienmotilitätskinasen macht ohne selbst eine Reaktion zu katalysieren. Mit einem solchen Transgen könnte also auch geklärt werden, wie die Normalisierung der Motilität in *t*-Spermien realisiert wird. Dem Transgen Tg11del2 fehlte die

katalytische Domäne und somit wäre die Mauslinie *Tg11del2/0* im Falle von vorliegender haploidspezifischer Transkriptexpression, später Translation und wie für den Responder typischen, erhöhten Transmission des Transgens ein Hinweis für die Konkurrenzsituation um Zielproteine zwischen *Smok1^{Tcr}* und der Wildtypvariante *Smok1*.

Leider ließen die Ergebnisse des Verpaarungstest unter anderem aufgrund unvorhersehbarer Sterilitätsproblematik sowie dem anscheinend vorliegenden, negativen Einfluss des Integrationsortes der Transgene keine eindeutige Aussage zu, inwiefern die Kinaseuntereinheiten für Phänomen TRD notwendig waren (Tab. 5.2). Die Expressionsanalyse auf Transkriptions- und Translationsebene zeigten dagegen eine bisher nicht in Erwägung gezogene Funktion der codierenden Region in der Translationskontrolle und der Stabilisierung der mRNA des Respondergens.

Auf Proteinebene konnte zumindest vermutet werden, dass durch die eher punktförmige Signalakkumulation für das Protein in der Immunfluoreszenz der Spermien der Linie *TgKS11/0* nicht die durchgehenden Mikrotubulistrukturen des Flagellums, sondern in regelmäßigen Abständen auftretende Bausteine des Flagellums als Interaktionspartner von *Tcr* in Frage kommen. Ein solche mit Tubulin assoziierte Proteingruppe sind die erstmals 1965 beschriebenen Dyneine (Gibbons et al. 1965). Diese in Flagellen und Zilien vorkommende Motorproteine vermitteln unter anderem auch Transportvorgänge und damit könnten sie ein ideales Zielprotein für Spermienmotilitätskinasen darstellen (Kobayashi et al. 2012; Mohri et al. 2012; Scholey 2008).

Tabelle 5.2: Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen auf *Tcr* basierenden Transgene auf Transkript- und Proteinebene inklusive der Daten aus dem Vererbungstests (✓/× = erfolgreicher/erfolgloser Expressionsnachweis, Farbtintensität des Symbols deutet Expressionslevel an)

Mauslinie (Integration)	Transkription		Translation Zeitpunkt und Lokalisation		Vererbungstest	
	Transkript	Lokalisation	Protein	Lokalisation	Transmission	Fertilität
<i>TgNV11/0</i> (zufällig)	✓	in 50% der runden Spermatischen haploidspezifisch	✓	spät im Flagellum	71,1 % bei Distorterhintergrund 66,4 % bei Wildtyphintergrund Transgen besitzt Responderaktivität → TRD (Veron 2008)	keine Angaben
<i>TgKS11/0</i> (ColA1-Locus)	✓	in 50% der runden Spermatischen haploidspezifisch	✓	spät im Flagellum	45,5 % bei Distorterhintergrund → mäßig 39,9 % bei Wildtyphintergrund → normal Transgen besitzt geringe Responderaktivität	
<i>Tg11del1/0</i> (ColA1-Locus)	✓	in ≤ 50% der runden Spermatischen haploidspezifisch	✓	spät im Flagellum	39,7 % bei Distorterhintergrund → z.T. steril 48,8 % bei Wildtyphintergrund → normal Transgen besitzt sehr geringe Responderaktivität	
<i>Tg11del2/0</i> (ColA1-Locus)	✓	in ≤ 50% der runden Spermatischen haploidspezifisch	×		52,6 % bei Distorterhintergrund → z.T. steril 39,4 % bei Wildtyphintergrund → normal keine Responderaktivität	

5.2.1 Translationelle Regulation durch die codierende Region von *Smok1^{Tcr}*

Die in der histologischen Analyse dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der in Tabelle 5.2 zusammengefassten Deletionskonstrukte lassen den Schluss zu, dass die *Smok1^{Tcr}*-Expression von komplexen translationellen Regulationsmechanismen kontrolliert wurde, in denen auch die codierende Region des Gens eine Rolle spielen könnte. Das Vorhandensein der vollständigen CDS und vermutlich auch die Interaktion dieser Region mit anderen regulatorischen Elementen in der 5'-UTR des Transkripts schienen entscheidend für die Bildung einer stabilen, in der Translation reprimierten mRNA sowie deren subzelluläre Lokalisation zu sein (siehe Punkt 5.1). Die Beteiligung der codierenden Region an translationellen Regulationsmechanismen wurde bereits von Lee's Arbeitsgruppe für andere Gene gezeigt und anhand der in dieser Arbeit erzielten Resultate wurde vermutet, dass ein ähnlicher Prozess auch bei *Smok1^{Tcr}*-Transkripten vorliegen könnte (Lee et al. 2011).

Die Expressionsergebnisse der *Tcr*-Deletionskonstrukte könnten dahingehend interpretiert werden, dass Anteile der codierenden Region bei der Transkriptstabilität behilflich waren. Außerdem führte ihr Fehlen dazu, dass die Translation wie in der Mauslinie *Tg11del1/0* auf reduziertem Niveau erfolgte beziehungsweise wie bei der Mauslinie *Tg11del2/0* gar nicht mehr realisierbar war, obwohl mRNA bei beiden Linien in respondertypischer, haploidspezifischer Form vorlag (Tab. 5.2, vorletzte und letzte Reihe). Ein Zusammenspiel mit 5'-UTR-Elementen insbesondere der BRE-ähnlichen Sequenz im letzten Drittel dieser Region, wie bereits in Punkt 5.1.2 genauer diskutiert wurde, könnte die Bedeutung der codierenden Region in translationeller Repression mit Transkriptstabilisierung und später Translationsinitiation unterstreichen. Die negativen Ergebnisse der Linie *Tg11deltaU/0* in der histologischen Analyse zeigten außerdem, dass eine Interaktion mit der 5'-UTR sogar notwendig war, denn ohne diese fand trotz vorhandener codierender Region keine Transkriptstabilisierung mehr statt (siehe Tab. 5.1, vorletzte Reihe).

Unter Umständen sind auch autoregulatorische Prozesse zwischen dem Protein und dem Transkript von *Smok1^{Tcr}* beziehungsweise Wildtyp-Spermienmotilitätskinasen beteiligt, wie sie schon für andere Gene beschrieben wurden (Tai et al. 2004; Lin et al. 2000). Dies wäre insofern interessant, da Spermienmotilitätskinasen wie auch der Responder zu einer Genfamilie gehören, somit also gewisse Ähnlichkeiten in der Sequenz sowie dem Kinaseaufbau aufweisen (Herrmann et al. 1999). Es wäre durchaus möglich, dass durch Interaktion des Transkripts eines Familienmitglieds mit dem Protein eines anderen Mitglieds neben einer Autoregulation auch eine gegenseitige Expressionsbeeinflussung vorliegt. Durch die in dieser Arbeit verwendeten Deletionen konnte allerdings nicht eindeutig geklärt werden, in welchem Bereich ein möglicherweise regulatorisches Element in der CDS liegt, es entstand jedoch verstärkt der Eindruck, dass nur ein Vorhandensein der gesamten codierenden Region in jeder Fragestellung die überzeugendsten Ergebnisse lieferte.

Außerdem wurden keine Deletionen sowohl in der 5'-UTR als auch in der CDS miteinander kombiniert, die in dieser Arbeit genutzten Deletionen in der codierenden Region generell sehr groß angelegt und die Expression scheinbar sogar von hemmenden Einflüssen des Integrationsortes der Transgene beeinträchtigt. Wie in

Punkt 5.3 weiter erörtert, könnten viele, nicht durch das Transgen selbst bestimmte Faktoren seine Expression verhindert oder vermindert haben, so dass eine kritische Betrachtung der histologischen Ergebnisse nötig war. Insbesondere eine fehlende Expression auf Transkript- oder Proteinebene konnte nicht ausschließlich auf die im entsprechenden Fall vorliegende Deletion im Transgen zurückgeführt werden. Wurde den positiven Expressionsergebnissen Glauben geschenkt, konnte man zumindest schlussfolgern, dass eine translationelle Regulation durch das letzte Drittel der 5'-UTR und den darin enthaltenen Elementen in Kombination mit der gesamten codierenden Region des Respondergens hinreichend waren, um die für das Gen typische Expression zu zeigen. Inwiefern diese Elemente ausreichend sind, um auch einer erhöhte Vererbung des Transgens an die Nachkommen zu realisieren, bleibt noch zu klären. Eine Übertragung der Prinzipien der Responderexpression auf andere Mausgene oder sogar auf andere Spezies würde sich allerdings durch die scheinbar notwendige Anwesenheit der CDS von *Tcr* recht schwierig gestalten.

Die Beteiligung der codierenden Region von *Smok1^{Tcr}* an der translationellen Regulation führte auch dazu, dass durch Deletionen in diesem Sequenzbereich nicht nur die Kinasefunktion beeinflusst wurde sondern auch die Proteinsynthese selbst. Somit konnte die Rolle der Kinaseuntereinheiten an dem Phänomen TRD durch die *Tcr*-Deletionstransgene nicht genau geklärt werden, da bereits die translationelle Regulation durch das Fehlen bestimmter Sequenzabschnitte in der CDS empfindlich gestört wurde und die erzielten Ergebnisse im Transmissionstest nicht ausschließlich auf die Responderaktivität des jeweiligen Transgens zurückzuführen waren.

5.2.2 Transmission der Transgene im Vererbungstest

Grundsätzlich muss festgehalten werden, dass die Vererbungsdaten, die mit den Linien *TgKS11/0*, *Tg11del1/0* und *Tg11del2/0* in dieser Arbeit erzielt wurden, deutlich hinter den Erwartungen zurückgeblieben waren (Tab. 5.2). Dies konnte einerseits auf die im Voraus nicht absehbare Sterilitätssituation einiger Testmännchen vor allem im Distorterhintergrund zurückgeführt werden, wodurch in der veranschlagten Zeit nicht die gewünschten Nachkommenszahlen erreicht wurden, die für eine statistisch signifikante Aussage nötig gewesen wären, andererseits schien auch der unter Punkt 5.3.1 diskutierte Einfluss des Integrationsortes der Transgene eine nicht unwesentliche Rolle beim Verlauf des Transmissionstests einzunehmen. Die in dieser Arbeit erzielten Vererbungsdaten waren also wahrscheinlich nicht nur als Folge der mehr oder weniger guten Responderaktivität des jeweiligen Transgens zu verstehen, sondern vermutlich auch durch verminderte Expressionslevel der Transgene insgesamt zu werten. In diesem Zusammenhang durfte bei der Interpretation der Vererbungsdaten nicht vernachlässigt werden, dass Deletionen durch eine mögliche Beteiligung der codierenden Region von *Smok1^{Tcr}* an translationellen Regulationsmechanismen in diesem Bereich ebenfalls Einfluss auf die Expression des jeweiligen transgenen Konstruktes hatten, die nicht ausschließlich als Folge der verminderten Responderfunktionalität des jeweiligen Transgens gesehen werden konnten.

Das Phänomen TRD ist darauf angewiesen, dass die Wirkung von Distortern auf alle Spermien und vom Responder auf die *t*-Spermien die Vererbung des responder-

tragenden Chromosoms an die Nachkommen fördert. Durch auf dem Respondergen basierende Deletionstransgene sollte nun ermittelt werden, inwiefern bestimmte Subdomänen von *Smok1^{Tcr}* ausreichend sind, um eine ausreichende Responderaktivität zu entfalten. Wenn aber Zellen in der Spermatogenese das Transgen aus unterschiedlichen Gründen nicht exprimierten, obwohl sie es trugen, konnte davon ausgegangen werden, dass der TRD-Mechanismus empfindlich gestört war oder sogar zugunsten der Distorteraktivität verschoben wurde. Diese Entwicklung war nach den zuvor durchgeführten Keimbahntransmissionstests für einzelne Tiere der untersuchten Mauslinien, in denen der Fokus eigentlich auf der Keimbahngängigkeit der Transgene lag, nicht zu erwarten. Die Verpaarung der aus der diploiden Aggregation hervorgegangenen Chimären mit NMRI-Weibchen entsprach im Grunde den Verhältnissen der Testgruppen der untersuchten Transgene im Wildtyphintergrund im eigentlichen Transmissionstest. Die ersten Ergebnisse der Linie *TgKS11/0* im Wildtyphintergrund, die mit einer Reduktion unter die Mendelsche Vererbungsrate von 50 % einherging, wurde sogar als Anzeichen dafür gesehen, dass dieses Transgen zu einem *t-low* ähnlichen Effekt in Abwesenheit von Distortern fähig war, also auch gute Responderaktivität an seinem spezifische Integrationsort, dem *ColA1*-Locus, entfalten konnte (vgl. Tab. 5.2, zweite Reihe). Da sich im Wildtyphintergrund alle untersuchten Linien im Transmissionstest auf ähnlich niedriger Vererbungsrate bewegten beziehungsweise annähernd Mendelsche Verhältnisse zeigten, wurden große Erwartungen in die Transmissionsraten in Anwesenheit von Distortern gesetzt. Veranlasst durch die guten Erfahrungen, die von einer Mauslinie *TgNV11/0* mit dem selben, allerdings zufällig integrierten Transgen Tg11 vorlagen (Véron 2008), waren die Fruchtbarkeitsprobleme bei den in dieser Arbeit erzeugten Testtieren der Linie *TgKS11/0* mit Distorterhintergrund vollkommen unerwartet eingetreten. In diesem genetischen Hintergrund wurde von den eingesetzten Männchen dieser Linie ohne Deletionen im *Tcr*-Konstrukt aufgrund der für den Responder typischen Expression in der histologischen Analyse auch eine verstärkte Transmission erwartet, wie sie in Anwesenheit von Distortern bei der Linie *TgNV11/0* mit 71,1 % erreicht wurde (Véron 2008). Allerdings zeigte die Linie *TgKS11/0* nur eine geringfügige Steigerung der Vererbungsrate im Vergleich zur Gruppe mit Wildtyphintergrund, obwohl das Vorhandensein von Distortern eigentlich förderlich für die Transmissionsrate sein sollte (Tab. 5.2, zweite Reihe). Somit waren bereits die Ergebnisse dieser als Referenz vorgesehenen Linie ein Hinweis darauf, dass noch andere Aspekte nicht nur zur Sterilität sondern auch zur verminderten Vererbungsrate beigetragen hatten. Die Resultate der beiden Deletionslinien *Tg11del1/0* und *Tg11del2/0* waren deshalb nur eingeschränkt im Hinblick auf die Fragestellung, welche Anteile der codierenden Region ausreichend für eine starke Responderaktivität sind, auswertbar. Bei diesen beiden Linien zeigte sich neben der Fruchtbarkeitsproblematik in den parallel durchgeführten Expressionsanalysen auf Transkript- und Proteinebene bereits, dass die Ergebnisse in den Verpaarungstests nicht nur auf die Responderaktivität des jeweiligen Deletionskonstrukts zurückzuführen waren (Tab. 5.2, vorletzte und letzte Reihe). Vielmehr konnte bei der Linie *Tg11del2/0* schon keine Proteinexpression mehr nachgewiesen werden, somit war die Vererbungsrate von Testern dieser Linie gänzlich ohne Beteiligung des Transgens zustande gekommen. Die geringfügige Steigerung der Transmissionsrate des Transgens Tg11del2 in Anwesenheit von

Distortern musste außerdem mit besonderer Vorsicht betrachtet werden, da hier nur sehr geringe Nachkommenzahlen mit Testieren im Distorterhintergrund erzeugt und ausgewertet wurden. Hinzu kommt, dass sich erst im Verlauf dieser Arbeit abzeichnete, dass die Translation eines *Tcr*-Transkripts komplexen translationellen Regulationsmechanismen unterworfen war. Scheinbar ist das Zusammenspiel von 5'-UTR-Elementen in Kombination mit der codierenden Region notwendig und dies wurde durch Deletionen in dieser Region derart gestört, dass die Expression generell negativ beeinflusst wurde und unter Umständen keine Vererbung im Sinne von TRD in Testverpaarungen mehr stattfinden konnte. Unter diesem Aspekten war demzufolge auch die Verminderung der Transmissionsrate des Transgens Tg11del1 in Anwesenheit von Distortern im Vergleich zur Gruppe mit Wildtyp-Hintergrund zu sehen. Die mögliche Interpretation wäre, dass durch das Fehlen der katalytischen Domäne bei der Deletion 1 verminderte Responderaktivität vorlag und somit nur noch Mendelsche Vererbung in der Gruppe ohne Distorter erzielt wurde. Die verminderte Responderaktivität des Transgens Tg11del1 wäre dann in Anwesenheit von Distortern auch nicht mehr ausreichend, um die Transmission über 50 % zu steigern. Durch verschiedene, hier aufgeführte Gründe war also bereits die Transgenexpression derart herabgesetzt, dass die *Tcr*-Deletionskonstrukte im Mausmodell nicht mehr in der Lage waren eine Verschiebung der Vererbung zugunsten des Respondergens zu bewirken. Die verminderte Expression führte statt dessen dazu, dass die Funktionalität des jeweiligen Transgens durch die Fähigkeit gekennzeichnet war, die durch Distorter ausgelöste Infertilität zu normalisieren. Diese Fähigkeit nahm allerdings mit zunehmenden Deletionsumfang innerhalb der codierenden Region des Respondergens ab.

5.2.3 Sterilität beim Transmissionstest

Im Zuge der Durchführung des Transmissionstests fielen einige Testtiere durch zum Teil erhebliche Einschränkungen in der Fruchtbarkeit auf, die so in ähnlich angelegten Vererbungstests nicht aufgetreten waren (Véron 2008; Véron et al. 2009). Eine Ursache für diese Sterilitätsproblematik lag unter Umständen bei der Mauslinie mit dem partiellen *t*-Haplotyp $t^{h51}t^{h18}/+$, die zur Erzeugung der Testtiere die für TRD benötigten Distorter liefern sollte. In Abwesenheit eines Responders zeigten Mauslinien mit partiellem *t*-Haplotyp bereits verstärkt mit Sterilität assoziierte Phänomene (Lyon et al. 1964), die mit der negativen Wirkung der Distorter auf die Spermienmotilität erklärt wurde. Somit könnten die an TRD beteiligten Distorterloci auch Träger der sogenannten Sterilitätsfaktoren des *t*-Komplexes sein. Ob Distortergene und Sterilitätsfaktoren identisch sind, muss allerdings für einige Kandidaten noch geklärt werden. Männchen sind dabei auffallend oft steril, wenn sie mehrere solcher Sterilitätsfaktoren aufweisen und während für verschiedene Sterilitätsfaktoren heterozygote Tiere noch eine relativ gute Fruchtbarkeit zeigen, sind homozygote Sterilitätsfaktoren oft eine Ursachen für Unfruchtbarkeit der Männchen (Olds-Clarke 1997; Lyon 1986). Diesen Tieren fehlte unter anderem vermutlich die Responderaktivität, die zumindest für einen Teil der Spermien die Motilitätsverhältnisse wieder normalisiert und damit befruchtungsfähige Spermienproduktion

ermöglicht.

Leider wurden in dem Vererbungstest dieser Arbeit keine Kontrolltiere eingesetzt, die nur den partiellen t -Haplotyp $t^{h51}t^{h18}/+$ trugen. Die Vererbungsdaten einer solchen Kontrollgruppe hätten wahrscheinlich geholfen, die erzielten Ergebnisse der transgenen Testgruppen mit oder ohne Distorterhintergrund besser bewerten zu können. Die Erfahrungswerte aus der Erhaltungszucht der distortertragenden Linie in der Tierhaltung waren dabei nur bedingt hilfreich, da lediglich erfolgreiche Verpaarungen und Würfe dokumentiert wurden, somit konnte auf diese Daten nicht zurückgegriffen werden. In einem anderen Zusammenhang erfolgte Testverpaarungen mit $t^{h51}t^{h18}/+$ Mäusen zeigten allerdings normale Fruchtbarkeit sowie Mendelsche Vererbungsdaten (Lyon 1986). Es wurde eigentlich angenommen, dass bei der im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin gehaltenen Linie ähnliche Verhältnisse vorlagen, obwohl dies anhand der Fruchtbarkeitsdaten dieser Arbeit nun bezweifelt werden muss.

Bereits im Verlauf dieser Arbeit hatten sich erste Erhaltungszuchtprobleme in der Linie mit partiellen t -Haplotyp gezeigt, was auf den genetischen Hintergrund der Tiere zurückgeführt wurde (persönliche Mitteilung H. Bauer am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin). Die Beteiligung des genetischen Hintergrundes sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren auf Sterilitätserscheinungen wurde dabei schon recht früh vermutet oder gezeigt (Bennett et al. 1983; Lyon 1987; Safronova et al. 2001) und könnte wahrscheinlich auch bei der Linie $t^{h51}t^{h18}/+$ eine Rolle spielen.

Erste Anzeichen lieferte bereits die Kreuzungszucht von Chimären der transgenen Mauslinien dieser Arbeit mit $t^{h51}t^{h18}/+$, um entsprechende Testgruppen mit oder ohne Distorterhintergrund für den Transmissionstest zu erhalten. Nach anfänglich guten Fortschritten gestaltete sich diese Zucht mitunter schwierig oder war zum Teil erfolglos. Dies konnte als erster Hinweis gedeutet werden, dass sich die distortertragende Linie $t^{h51}t^{h18}/+$ auch negativ auf den Erfolg des Transmissionstests auswirken würde. Grundsätzlich war für Testtiere, bei denen das responderbasierte Deletionstransgen keine Responderaktivität zeigte, eine Normalisierung der Vererbung auf 50 % zu erwarten. Die zusätzlich auftretenden Fruchtbarkeitsprobleme waren überraschend, schließlich trugen sie die Distorterloci und damit mögliche Sterilitätsfaktoren lediglich heterozygot.

Ein anderer, nicht zu vernachlässigender Aspekt ist allerdings im Hinblick auf die Sterilitätsproblematik auch die Expression der Transgene am gewählten Integrationsort. Sollten, wie schon in vorangegangenen Punkten diskutiert, transgenetrische Zellen dieses Transgens aufgrund limitierender Effekte des *ColA1*-Locus nicht exprimieren, trägt das dazu bei, dass in den Testtieren lediglich in einer begrenzten Zahl an Spermien das Zusammenspiel von Distortern und dem Responder erfolgt, während in anderen nur die Distorterwirkung aktiv ist. Neben den Auswirkungen auf die Transmissionsrate des responderbasierten Transgens könnte dies auch mit Fruchtbarkeitsproblemen einhergehen, wofür die zum Teil besonders hohen Zahlen erfolgloser Verpaarungen aller Testtiere mit Distorterhintergrund sprachen. Natürlich lag die selbe Situation vor, wenn durch Deletionen in der codierenden Region nicht etwa die Responderaktivität sondern dessen translationelle Regulation derart gestört war, dass kein Protein mehr synthetisiert werden kann, welches Responder-

aktivität entfalten könnte.

Zusammenfassend musste also festgehalten werden, dass durch den Einfluss der Linie $th^{51}th^{18}/+$, dem Integrationsort der *Tcr*-Deletionstransgene und vermutlich auch durch die Störung der translationellen Regulation mit Deletionen in der codierenden Region verschiedene Faktoren zu erhöhter Sterilitätsproblematik in den Testtieren geführt haben. Trotz hohem Verwandtschaftsgrad schienen sich diese genannten Faktoren in jedem Individuum unterschiedlich stark auszuprägen, so dass einige Tiere stärker und andere geringer in ihrer Fruchtbarkeit eingeschränkt waren. Das hieß letztendlich, dass die *Tcr*-Deletionstransgene lediglich zur Normalisierung der Fruchtbarkeit fähig waren, was allerdings nicht bei allen Individuen gleich gut erzielt wurde. Eine Auswertung des Vererbungstest anhand der Transmissionsraten konnte somit nicht abschließend erfolgen.

5.3 Einflüsse auf die Transgenexpression

Zur Erzeugung transgener Mauslinien gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Möglichkeiten mit ihren Vor- und Nachteilen für das jeweilige Untersuchungsziel. Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene Konstrukte durch Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch in einen spezifischen Locus von ES-Zellen integriert (unveröffentlichte Methode der Abteilung Entwicklungsgenetik am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin) und diese zur Generierung von Mauslinien durch diploide Aggregation herangezogen (Turan et al. 2011).

Diese Strategie zur Untersuchung verschiedener Deletionskonstrukte *in vivo* wurde gewählt, weil aufgrund der Konzipierung der Transgene und der Eigenschaften des Integrationslocus *ColA1* vergleichbare Ergebnisse in der Expressionsanalyse erwartet wurden, die auch eindeutige Aussagen bezüglich regulatorischer Elemente der Translation des Respondergens zulassen würden. Bei Zufallsintegrationsstrategien werden dagegen in der Regel mehrfache Kopien des Transgens unter Umständen an einen für die Expression ungünstigen Genort eingebaut, so dass die Untersuchungsergebnisse sehr variabel ausfallen können und nicht ausschließlich auf das eingesetzte Transgen zurückzuführen sind (Garrick et al. 1998; Robertson et al. 1995; Allen et al. 1988).

Die Wahl einer gezielten Integrationsstrategie wurde zudem durch die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe, die sie etabliert hat, sowie durch die erst kürzlich guten Erfahrungen anderer Gruppen bei der Nutzung dieses Konzepts unterstützt und gerechtfertigt (Beard et al. 2006; Premisrut et al. 2011), wenngleich die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode in wesentlichen Aspekten modifiziert war. In der Expressionsanalyse der in dieser Arbeit untersuchten Transgene fielen allerdings deutliche Unterschiede zur verwendeten Kontrolle *TgNV11/0* mit zufällig integriertem, gut exprimiertem Respondertransgen auf, die nicht allein auf die Deletionen zurückzuführen sein konnten und wahrscheinlich auch die Ergebnisse des Transmissionstests beeinflusst haben könnten.

5.3.1 Einfluss des Integrationslocus *ColA1*

Der Integrationslocus *ColA1* trug vermutlich durch Positionseffekte dazu bei, dass nicht alle transgentragenden Zellen im Maushoden dieses auch exprimierten. Solche auch als Variegation bezeichnete Variabilität der Transgenexpression ist häufig auf den Integrationsort und seine Chromatinstruktur zurückzuführen, die mit einer Einschränkung der Expressionshöhe, ektopischer Expression in nicht erwarteten Geweben oder gänzlicher Stilllegung der Transgenexpression einhergehen kann (Martin et al. 1996; Kioussis et al. 1997). Insbesondere heterochromatische DNA-Bereiche wirken in der Regel hemmend auf die Transkription eines Transgens. Der gewählte *ColA1*-Locus befindet sich auf dem Mausechromosom 11, codiert das Protein Kollagen Typ 1, und Untersuchungen haben gezeigt, dass in diesem Genlocus integrierte Transgene eine hohe Expression zeigen, auch wenn das *ColA1*-Gen in dem untersuchten Gewebe nicht transkribiert wird (Beard et al. 2006). Vielversprechend sind zudem die Erfahrungen, die in anderen Spezies, wie dem Schaf, gewonnen wurden, bei dem sich der *ColA1*-Locus als Integrationsort zur Generierung transgener Tiere als erfolgreich erwiesen hatte (McCreath et al. 2000).

Die untersuchten Mauslinien dieser Arbeit zeigten zunächst, dass der gewählte Integrationslocus grundsätzlich zur Überexpression von Transgenen im Hoden geeignet ist, da sowohl Transkription als auch Translation für diverse Deletionskonstrukte erfolgreich nachgewiesen werden konnten (Tab. 5.1). In der *in situ* Hybridisierung wurden die Transkripte direkt gezeigt, während die RT-PCR ausgewählter Mauslinien indirekt demonstrierte, dass die mRNA einer für die Translation erforderlichen Prozessierung, wie dem Spleißen, unterzogen wurde. Aber auch auf der mRNA-Ebene konnte schon nicht für alle diese Konstrukte, sofern sie in der *in situ* Hybridisierung nachweisbar waren, eine überzeugende haploidspezifische Expression in der Hälfte der runden Spermatozoen gezeigt werden, wie das bei der Kontrolle *TgNV11/0* der Fall war. Zwar wurde bei einer geeigneten Auflösung deutlich, dass nicht alle runden Spermatozoen das Transkript des jeweiligen Transgens exprimieren, jedoch war nicht immer eindeutig ersichtlich, dass nur circa 50 % der Zellen ein Signal trugen. Im Gegenteil, bei einigen Linien schienen sogar weniger als die Hälfte der runden Spermatozoen ein Transkript aufzuweisen und dies wurde nicht als Folge der jeweiligen Deletion im Transgen gedeutet. Es könnte statt dessen infolge von bisher in der Literatur nicht erwähnten Positionseffekten des Integrationsortes eine verminderte Transgenexpression vorliegen, die unter Umständen auch ein rein hodenspezifisches Phänomen darstellt.

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt ist allerdings, dass eine erfolgreiche Nutzung des *ColA1*-Locus als Integrationsort bisher vor allem mit induzierbaren transgenen Konstrukten erfolgte, was den entscheidenden Unterschied zu der Überexpressionsstrategie in dieser Arbeit darstellen könnte (Beard et al. 2006; Premisrut et al. 2011). Grundsätzlich schienen die Autoren aber optimistisch, dass verschiedenste Fragestellungen mit dieser Integrationsstrategie geklärt werden könnten und die Art der integrierten Transgene vielfältig sein kann. Erst im Laufe dieser Arbeit im Max-Planck-Institut für molekulare Genetik gewonnene, zum Teil unveröffentlichte Erfahrungen mit dem *ColA1*-Locus offenbarten allerdings eine andere Situation. Neben ektopischer Transgenexpression konventioneller Transgene trat auch mit in-

duzierbaren transgenen Konstrukten relativ häufig eine lückenhafte Expression von GFP-Signalen in verschiedenen Geweben wie der Haut oder dem Darm transgener Mäuse auf und es schien sich bei dieser fleckigen Expression auch nicht um eine Folge von verminderter Zugänglichkeit der jeweiligen Zellen zum verwendeten Doxzyklin zu handeln, welches zur Induktion der Transgenexpression eingesetzt wurde (Reinke 2012). Vielmehr wurde in Rahmen von Reinkes Arbeit angenommen, dass bestimmte Zellen vermutlich bereits im Stammzellstadium das Transgen bedingt durch Effekte des *ColA1*-Locus nicht exprimiert haben und diese Eigenschaft auch an Tochterzellen weitergaben. Es konnte in diesem Zusammenhang und auch aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht genau geklärt werden, nach welchem Prinzip die Hemmung der Transgenexpression in einigen Zellen erfolgte, während sie offensichtlich in anderen ohne weiteres möglich war. Es ist aber nicht von der Hand zu weisen, dass eine solche verminderte Transgenexpression die Resultate in der Expressionsanalyse sowie einen Vererbungstest erheblich beeinflussen kann.

5.3.2 Einfluss von Transgenbestandteilen auf die Expression

Die Bestandteile eines Transgens und die Effektivität seiner regulatorischen Elemente stellen ebenfalls ein entscheidendes Kriterium für sein Expressionslevel *in vivo* dar. Um die Expression eines Transgens in der Maus zu steigern bietet sich der Einsatz von starken, gewebsspezifischen Promotern an (Haruyama et al. 2009). Dieses Konzept wurde bei der Verwendung des erfahrungsgemäß äußerst starken, testis-spezifischen und postmeiotisch aktiven *Protamin 1*-Promoters in der Linie *Tg11-P1P/0* verfolgt und konnte auch als erfolgreiche Variation der Transgens Tg11 sowohl auf Transkript- als auch Proteinlevel gewertet werden (Zambrowicz et al. 1993; Peschon et al. 1989). Mit diesem Transgen wurde nur durch den Austausch des Promoters bereits ein deutlich verbessertes Expressionslevel im Vergleich zur Linie *TgKS11/0* erzielt, die mit dem *Tcr*-Promoter vor allem auf der Transkriptebene schlechter abschnitt. Im Hinblick auf die Eignung des *Protamin 1*-Promoters für die Expressionssteigerung eines responderbasierten Transgens wäre allerdings zu klären, ob auch die Transmission in einem Verpaarungstest in Anwesenheit von Distortern respondertypisch hoch ausfällt, was im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. Die Verschiebung der Transmission konnte nämlich mit der Linie *TgKS11/0* nicht überzeugend gezeigt werden, obwohl dasselbe Transgen bei zufälliger Integration in der Linie *TgNV11/0* dazu durchaus in der Lage war (Tab. 5.2. Eine Vermutung wäre, dass der *Tcr*-Promoter nur zu einer geringen Expression im *ColA1*-Locus fähig war. Die 5'-UTR-Deletionskonstrukte ohne codierende Region des Respondergens wiesen ebenfalls den *Protamin 1*-Promoter auf und auch dort schien sich dieser hilfreich auf die Transkriptexpressionslevel auszuwirken. Bei den vergleichbaren 5'-UTR-Deletionskonstrukten B, C und deltaU mit CDS des Respondergens könnte das Fehlen eines starken *Protamin 1*-Promoters dagegen auch eine Ursache für die nicht vorhandene Transkription darstellen.

Sollten dennoch weitere Einflüsse eines Integrationsortes hemmend auf die Transgenexpression einwirken, bietet sich der Einsatz von abschirmenden Isolatoren an, die das Transgen vor dem Effekten umliegender regulatorischer Elemente wie *Enhanc-*

cern oder *Silencern* aber auch vor unvorteilhaften Chromatinstrukturen schützen können (Bushey et al. 2008). Zwar wurde in allen in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten ein *Chicken β -globin* Isolator zwischen dem eigentlichen Transgen und der Selektionskassette eingefügt, dies sollte allerdings vor allem die Effekte der beiden Transgenbestandteile untereinander unterbinden (Moltó et al. 2009). Um das Transgen vor der umgebenen Chromatinstruktur zu schützen, wäre die Lokalisation von Isolatoren auf beiden Seiten des eigentlichen Transgens sinnvoller gewesen, wie sie bei der Verwendung des *Chicken β -globin* Isolators bereits erfolgreich war (Chung et al. 1993; Goetze et al. 2005).

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt sind die weit verbreiteten epigenetischen Prozesse, die durch Methylierung oder Histonmodifikationen erheblich zur Regulation der Genexpressionen beitragen (Jaenisch et al. 2003). Relativ häufig konnte bereits von Jaenisch und Bird gezeigt werden, dass sich die Integration von prokaryotischen Vektoranteilen in das Mausgenom negativ auf die Expression des Transgens auswirken kann, da sie Ausgangspunkt für Methylierungen sind, wodurch eine DNA-Region für die Transkription unzugänglich wird. Die in dieser Arbeit verwendete Integrationsstrategie führte ausschließlich zur Integration einer Kopie des jeweiligen Transgens inklusive einer Selektionskassette ohne weitere Vektorbestandteile. Es wurde also versucht die prokaryotischen Sequenzabschnitte im Mausgenom so gering wie möglich zu halten, um die Transgenexpression nicht durch Methylierungsprozesse einzuschränken. Dennoch muss festgehalten werden, dass die Expressionsmuster der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte in der Regel weniger überzeugend waren, als bei der genutzten Kontrolllinie *TgNV11/0*. Mit der zufälligen Integration eines responderbasierten Transgens durch Pronukleusinjektion konnte deutlich eine haploidspezifische Transkriptexpression und späte Translation gezeigt werden, ohne dass besondere regulatorische Transgenelemente eingesetzt wurden (Véron 2008). Die Linie *TgNV11/0* hatte aufgrund ihrer Generierungsart aber auch gewisse Nachteile, das heißt, es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Expression durch mehrfache Transgenkopien oder durch Zerstörung eines wichtigen Gens am zufälligen Integrationsort zustande kommt (Gama Sosa et al. 2010). Des weiteren mussten diverse Foundertiere dieser Linie untersucht werden, um eine verallgemeinernde Aussage zur Responderexpression treffen zu können. Die reproduzierbaren Ergebnisse vor allem im Zusammenhang mit erhöhten Vererbungs-raten dieser Mauslinie im Transmissionstest wiesen allerdings verstärkt daraufhin, dass die beobachtete Expression durch das Respondertransgen ausgelöst wurden. Diese Kontrollmauslinie zeigte also, dass für eine erfolgreiche Expression eines Transgens nicht immer eine Optimierung des Konstruktes mit regulatorischen Elementen erforderlich ist.

5.3.3 Bedeutung der embryonalen Stammzellen bei der Generierung von transgenen Mauslinien

Natürlich darf bei der Generierung von transgenen Mauslinien auch die Wahl einer geeigneten ES-Zelllinie nicht vernachlässigt werden. Diese embryonalen Stammzellen sollten zur Erzeugung transgener Mäuse, die das Transgen auch keimbahngängig

weitervererben, geeignet sein. Die in Rahmen dieser Arbeit verwendeten und bereits zuvor erfolgreich eingesetzten C2-Zellen sind ein hybride ES-Zelllinie aus 129/SV und C57BL/6, zwei regelmäßig zur Generierung von transgenen Mäusen verwendeten Mauslinien (Ledermann et al. 1991; Evans et al. 1981; Eggan et al. 2001). Darüber hinaus konnte mit den für diese Arbeit generierten Mauslinien in Keimbahntransmissionstest gezeigt werden, dass die Transgene keimbahngängig sind. Zudem zeichneten sich diese Zellen durch eine besondere Robustheit in der Zellkultur aus und der Rekombinase-vermittelte Kassettenaustausch im modifizierten *ColA1*-Locus stellte sich als einfache und effektive Methode dar, um die Zellen gezielt genetisch zu verändern, was auch die Erfahrung anderer Arbeitsgruppen mit diesen Zellen widerspiegelt (Premisrut et al. 2011). Bei der diploiden Aggregation konnten überdurchschnittlich viele chimäre Mäuse mit einem ES-Zell-Klon erzeugt werden. An der Bildung der Chimären waren die ES-Zellen bereits augenscheinlich zu 100 % Prozent beteiligt und dies konnte durch die Keimbahntransmissionstests mit ausgewählten Linien auch bestätigt werden. Die meist erfolgreiche Expressionsanalyse vor allem im Hoden der erzeugten Mauslinien konnte ebenfalls im weitesten Sinne auch auf die förderlichen Eigenschaften der herangezogenen ES-Zellen gewertet werden.

Ein entscheidender Nachteil der verwendeten ES-Zellen war allerdings, dass sie keine Distorterloci trugen. Im Hinblick auf einen Transmissionstest der *Tcr*-Deletions-transgene war es somit erforderlich, dass die generierten chimären Mäuse zunächst auf eine partielle *t*-Haplotyplinie gekreuzt werden mussten, um geeignete Testtiere mit Distorterhintergrund zu erhalten. Obwohl versucht wurde die Variationen bei den im Vererbungstest eingesetzten Tieren so gering wie möglich zu halten, indem möglichst auf Brüder und Halbbrüder zurückgegriffen wurde, kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass mit Einkreuzung eines anderen genetischen Hintergrundes Einfluss auf die Transgenexpression genommen wurde. Für die Untersuchung von auf den *t*-Komplex Responder basierenden Transgenen wäre es also im Hinblick auf Reduktion der expressionshemmenden Einflüsse, die durch Einkreuzung eines weiteren genetischen Hintergrundes hervorgerufen werden können, wünschenswert, wenn die ES-Zellen bereits Träger verschiedener Distorter-Loci wären. Dieser Ansatz würde auch deutliche Zeitersparnis bedeuten, da die Generationszeiten zur Erzeugung von Testtieren für einen Verpaarungstest entfallen würden.

6 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Haploidspezifität des *t*-Komplex Responders bei der nicht-Mendelschen Vererbung in der Maus

Die nicht-Mendelsche Vererbung des *t*-Haplotyps von heterozygoten Mausmännchen an ihre Nachkommen ist unter der Bezeichnung *Transmission Ratio Distortion* bekannt. Der *t*-Haplotyp, eine abweichende Form des *t*-Komplexes, erstreckt sich über fast ein Drittel des Mauschromosoms 17 und codiert mehrere Distortergene und ein Respondergen, die in der Spermatogenese zur Ausbildung von zwei verschiedenen Spermienpopulationen führen. Die früh exprimierten Distorter wirken auf Signalkaskaden einer Spermienmotilitätskinase, Smok1, und haben eine negative Wirkung auf die Motilität aller Spermien, während der Responder diese Situation nur in Spermien, die das Respondergen tragen, wieder ausgleicht. Dies verschafft den sogenannten *t*-Spermien einen Vorteil bei der Befruchtung und führt zu der ungewöhnlich hohen Vererbung. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass ein responderbasiertes Transgen haploidspezifische Transkriptexpression aufweist, das heißt, die mRNA ist haploidspezifisch auf die Hälfte der runden Spermatiden begrenzt, obwohl diese Zellen durch Zellbrücken miteinander verbunden sind und ein Austausch von Genprodukten stattfinden kann. Außerdem ist das Responderprotein nur im Flagellum elongierter Spermien detektierbar, das heißt, die Translation findet erst in späten Spermatogenesestadien statt. Dies zeigt, dass translationelle Regulation in der Expression des Respondergens involviert ist und eine datenbankbasierte Analyse konnte bereits mögliche, regulatorische Elemente der translationellen Kontrolle in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) des Respondertranskripts aufdecken.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene, responderbasierte Transgene kloniert, aus denen transgene Mäuse generiert wurden, um die Haploidspezifität der *t*-Komplex Responders *in vivo* auf Transkript- und Proteinebene durch *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie sowie funktionell in einem Vererbungstest zu untersuchen. Um die Bedeutung von regulatorischen Elementen der 5'-UTR für die Responderexpression zu klären, wurden unterschiedliche Deletionskonstrukte generiert und die Expressionsanalyse *in vivo* zeigte, dass die 5'-UTR tatsächlich in der Transkriptlokalisierung involviert war. Sobald die selben 5'-UTR-Deletionen in Kombination mit der codierenden Region des Responders verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass die codierende Sequenz für die Transkriptstabilität und erfolgreiche Translation wichtig war, allerdings nur zusammen mit mindestens dem letzten Drittel der 5'-UTR. Schließlich konnte bei Untersuchungen der spezifischen

Subdomänen innerhalb der codierenden Region des Responders durch Verwendung von Deletionskonstrukten in dieser Region verdeutlicht werden, dass eine erfolgreiche Translation des Gens von dem Vorhandensein der regulatorischen Subdomäne in der codierenden Sequenz abhängig war. Um das Ergebnis der Deletionsuntersuchungen auch funktionell zu bestätigen, wurden transgene Mäuse mit den Deletionen in der codierenden Region in einem Transmissionstest eingesetzt, bei dem die jeweilige Vererbungsrate des Transgens in Anwesenheit von Distortern erfasst wurde. Im Hinblick auf *Transmission Ratio Distortion* war dieser Vererbungstest nicht sehr aussagekräftig und damit nicht ausreichend, um zu beantworten, welche Responderuntereinheit allein ausreichende Responderaktivität hat. Zusätzlich offenbarte der Test, dass die gewählte Integrationsstrategie für Transgene möglicherweise Defizite aufweist. Zur Generierung von transgenen Mäusen wurde ein Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch transgener Konstrukte als Einzelkopie in den *ColA1*-Locus von embryonalen Stammzellen verwendet, aber der Integrationsort selbst zeigte im Verlauf dieser Arbeit jedoch unerwartete Positionseffekte, die zu niedriger oder komplett abwesender Expression der Transgene führten und die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung, der Immunhistochemie und des Transmissionstests beeinflussten.

Das Vorhaben der Arbeit war die regulatorischen Elemente des Respondertranskripts zu identifizieren, die bedeutsam für die spezielle Expression dieses Gens sind, um diese bei der Manipulation der Expression anderer Gene in der Maus oder anderen Spezies einsetzen zu können. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die 5'-UTR des Respondergens in der Transkriptlokalisierung involviert ist, während die codierende Region, allerdings nur in Kombination mit der 5'-UTR, die Transkriptstabilität und Translation kontrolliert. Somit verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die posttranskriptionelle Regulation des Responders sehr komplex ist und auf verschiedene regulatorische Elemente innerhalb des Transkripts angewiesen ist und dies erschwert eine mögliche Anwendung deutlich.

7 Summary

Investigations on the haploid specificity of the *t*-complex responder in non-Mendelian inheritance in the mouse

Karina Schöfisch

Non-Mendelian inheritance of the *t*-haplotype from heterozygous male mice to their offspring is also known as transmission ratio distortion. The *t*-haplotype, a variant form of the *t*-complex, spans nearly one third of mouse chromosome 17 and encodes several distorter genes and one responder gene, which lead to formation of two different sperm populations during spermatogenesis. Early expressed distorters activate signalling cascades of the sperm motility kinase, *smok1*, resulting in a negative effect on the motility of all sperm, while the responder counterbalances this situation only in sperm carrying the responder gene. This gives these so-called *t*-sperm an advantage during fertilisation, and leads to an abnormally high inheritance. Previous work has demonstrated that a responder-based transgene shows haploid-specific transcript expression, which means that the mRNA is restricted to only half of all round spermatids, although these cells are connected via cellular bridges and thus exchange of gene products can occur. Furthermore, the responder protein is detectable only in the flagellum of elongated sperm, which means its translation takes place during late stages of spermatogenesis. This shows that translational regulation might be involved in responder gene expression and *in silico* analysis revealed already possible regulatory elements for translational control of the responder within the 5'-untranslated region (5'UTR) of the responder transcript.

In the context of this work different responder-based transgenes were cloned to generate transgenic mice and to investigate the haploid specificity of the *t*-complex responder *in vivo* on transcript and protein level by using *in situ* hybridisation and immunohistochemistry and functionally in a transmission ratio distortion test. In order to address the importance of regulatory elements of the 5'-UTR in responder expression several deletion constructs were generated and expression analyses *in vivo* revealed that the 5'-UTR was indeed involved in transcript localisation. When the same 5'-UTR deletions were examined in combination with the responder coding sequence, it was demonstrated that the coding region was necessary for transcript stability and successful translation, along with at least the last third of the 5'-UTR region. Additionally, analysis of specific subdomains within the coding region of the responder using deletion constructs within this region, revealed that successful translation of this gene was dependent on the presence of at least the

regulatory subdomain in the coding sequence. In order to functionally verify observations from the deletion studies, transgenic mice harbouring the coding region deletions were used in a transmission ratio distortion test, which measured the rate of transgene inheritance in the presence of distorters. In terms of transmission ratio distortion this test was inconclusive, and was thus insufficient to answer the question of which responder subdomain has adequate responder activity. The test further revealed possible shortfalls in the transgene integration strategy chosen. A strategy using recombinase-mediated cassette exchange of transgenic constructs integrated as a single copy in the ColA1 locus was used to generate mice, but within this work the locus itself revealed some unexpected positional effects resulting in low or completely absent expression, thereby impacting the outcome of in situ hybridisation analyses, immunohistochemistry, and of the transmission test.

The intention of this work was to identify regulatory elements in the responder transcript which are important for the special expression of this gene and which might be used to manipulate other genes in the mouse or in other species. This work demonstrated that the 5'-UTR of the responder is involved in transcript localisation while the coding region only in combination with the 5'-UTR is controlling transcript stability and translation. Therefore the results of this work revealed that post-transcriptional regulation of the responder is quite complex and depends on different regulatory elements within the transcript and this makes a possible application significantly difficult.

Abbildungsverzeichnis

3.1	Aufbau des Kapillarblots für die <i>Southern Blot</i> -Analyse	39
4.1	Aufbau der FRT Erkennungssequenz	52
4.2	Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch im <i>ColA1</i> -Locus	53
4.3	<i>Southern Blot</i> transgener ES-Zell-Klone	54
4.4	<i>Tcr</i> -Deletionskonstrukte schematisch	55
4.5	RT-PCR der <i>Tcr</i> -Deletionskonstrukte	56
4.6	<i>In Situ</i> Hybridisierung Mauslinie <i>TgNV11/0</i> und Wildtyplinie	58
4.7	A <i>In situ</i> Hybridisierung <i>TgKS11/0</i>	59
4.8	B <i>In situ</i> Hybridisierung <i>TgKS11/0</i>	59
4.9	Immunhistochemie Mauslinie <i>TgNV11/0</i> und Wildtyplinie	60
4.10	Immunhistochemie Mauslinie <i>TgKS11/0</i>	61
4.11	Immunfluoreszenz-Co-Färbung von Spermien <i>TgKS11/0</i>	62
4.12	A <i>In situ</i> Hybridisierung <i>Tg11del1/0</i> und <i>Tg11del2/0</i>	63
4.13	B <i>In situ</i> Hybridisierung <i>Tg11del1/0</i> und <i>Tg11del2/0</i>	64
4.14	Immunhistochemie <i>Tcr</i> -Deletionskonstrukte	65
4.15	5'-UTR-Deletionskonstrukte schematisch	67
4.16	A <i>In Situ</i> Hybridisierung 5'-UTR-Deletionslinien	68
4.17	B <i>In Situ</i> Hybridisierung 5'-UTR-Deletionslinien	69
4.18	<i>In Situ</i> Hybridisierung <i>TgdeltaU/0</i>	70
4.19	Immunhistochemie der 5'-UTR-Deletionslinien	71
4.20	Immunhistochemie <i>TgdeltaU/0</i>	72
4.21	<i>Tcr</i> -Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen schematisch	74
4.22	<i>In situ</i> Hybridisierung <i>Tcr</i> -Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen	75
4.23	<i>In situ</i> Hybridisierung <i>Tg11-5'-UTR-A/0</i>	76
4.24	Immunhistochemie <i>Tcr</i> -Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen	77
4.25	Das <i>Tcr</i> -Konstrukt mit <i>Protamin 1</i> -Promoter schematisch	79
4.26	A <i>In situ</i> Hybridisierung <i>Tg11-P1P/0</i>	80
4.27	B <i>In situ</i> Hybridisierung <i>tg11-P1P/0</i>	80
4.28	Immunhistochemie <i>Tg11-P1P/0</i>	81
4.29	Genotypisierung DotBlot Hygro-Sonde	83
4.30	Genotypisierung DotBlot ColA1-Sonde	84

Tabellenverzeichnis

3.1	PCR-Mastermix für DNA-Polymerase <i>Taq</i>	21
3.2	Standard PCR-Programme	21
3.3	Standard PCR-Mix für DNA-Polymerase PrimeSTAR HS	22
3.4	Primer mit ihrer Sequenz und ihrem Verwendungszweck	23
3.5	Standard-Restriktionsenzymverdau	24
3.6	Spezifikationen für die PCR der <i>Tcr</i> -Deletionsfragmente	28
3.7	Spezifikationen für die PCR der 5'-UTR-Deletionsfragmente	29
3.8	Verwendete <i>in situ</i> -Sonden	32
3.9	<i>In vitro</i> Transkription	32
3.10	verwendete Sonden für <i>Southern-</i> und <i>Dot Blot</i>	33
3.11	Zusammensetzung von Zellkulturmedien	34
3.12	Verwendete, embryonale Fibroblasten und Stammzellen	36
3.13	<i>Southern Blot</i> -Verdau	38
3.14	Verwendete Mauslinien	42
3.15	PCR-Protokoll für die Genotypisierung von transgenen Mauslinien	44
3.16	PCR-Protokoll für die Genotypisierung der Mäusen mit dem partiellen <i>t</i> -Haplotyp $t^{h51}t^{h18}/+$	44
3.17	Fixierung von Gefrierschnitten für die <i>in situ</i> Hybridisierung	46
3.18	Tabellarisches Protokoll <i>in situ</i> Hybridisierung	47
3.19	Bei den histologischen Methoden verwendete Antikörper	48
4.1	Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen <i>Tcr</i> -Deletions-transgene inklusive der Positivkontrolle <i>TgNV11/0</i> auf Transkript- und Proteinebene	66
4.2	Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen 5'-UTR-Deletionstransgene auf Transkript- und Proteinebene	73
4.3	Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen <i>Tcr</i> -Konstrukte mit 5'-UTR-Deletionen auf Transkript- und Proteinebene	78
4.4	Vererbungstest der <i>Tcr</i> -Deletionsmauslinien mit und ohne Distorterhintergrund	85
4.5	Fruchtbarkeitsdaten der Einzelindividuen mit Distorterhintergrund	87
4.6	Durchschnittliche Fruchtbarkeitsdaten der Testgruppen mit Distorterhintergrund	88
4.7	Fruchtbarkeitsdaten der Einzelindividuen mit Wildtyphintergrund	89
4.8	Durchschnittliche Fruchtbarkeitsdaten der Testgruppen mit Wildtyphintergrund	90

4.9	Zusammenfassende Übersicht der Transmissions- und Fertilitätsdaten der einzelnen auf <i>Tcr</i> basierenden Transgene inklusive der Daten der Positivkontrolle <i>TgNV11/0</i>	91
5.1	Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen Transgene auf Transkript- und Proteinebene	95
5.2	Zusammenfassende Expressionsübersicht der einzelnen auf <i>Tcr</i> basierenden Transgene auf Transkript- und Proteinebene inklusive der Daten aus dem Vererbungstests	103

Literatur

- Abu Hassan Abu, D., Franken, D. R., Hoffman, B. und Henkel, R. „Accurate sperm morphology assessment predicts sperm function.“ In: *Andrologia* 44 Suppl 1 (Mai 2012), S. 571–577.
- Adler, I.-D. „Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans.“ In: *Mutation Research* 352.1-2 (1996), S. 169–172.
- Ajay, S. S., Athey, B. D. und Lee, I. „Unified translation repression mechanism for microRNAs and upstream AUGs.“ In: *BMC Genomics* 11.1 (Jan. 2010), S. 1–11.
- Allen, N., Cran, D., Barton, S., Hettle, S., Reik, W. und Surani, M. A. „Transgenes as probes for active chromosomal domains in mouse development.“ In: *Nature* 333.6176 (1988), S. 852–855.
- Artzt, K., Shin, H. S. und Bennett, D. „Gene Mapping within the T/t Complex of the Mouse. II. Anomalous Position of the H-2 Complex in t Haplotypes.“ In: *Cell* 28.3 (1982), S. 471–476.
- Balhorn, R. „The protamine family of sperm nuclear proteins.“ In: *Genome Biology* 8.9 (Jan. 2007), S. 227.1–227.8.
- Baltzer, F. „Theodor Boveri und die Entwicklung der Chromosomentheorie der Vererbung (Zu Boveris 100. Geburtstag am 12. Oktober 1962)“. In: *Naturwissenschaften* 50.1 (1963), S. 141–146.
- Bartel, D. P., Lee, R. und Feinbaum, R. „MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function“. In: *Cell* 116.2 (2004), S. 281–297.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R. L. und Lipshitz, H. D. „Spatial and temporal control of RNA stability.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.13 (2001), S. 7025–7028.
- Bauer, H., Schindler, S., Charron, Y., Willert, J., Kusecek, B. und Herrmann, B. G. „The Nucleoside Diphosphate Kinase Gene Nme3 Acts as Quantitative Trait Locus Promoting Non-Mendelian Inheritance.“ In: *PLoS Genetics* 8.3 (März 2012). Hrsg. von J. Forejt, e1002567.
- Bauer, H., Willert, J., Koschorz, B. und Herrmann, B. G. „The t complex-encoded GTPase-activating protein Tagap1 acts as a transmission ratio distorter in mice.“ In: *Nature Genetics* 37.9 (Sep. 2005), S. 969–973.
- Bauer, H., Véron, N., Willert, J. und Herrmann, B. G. „The t-complex-encoded guanine nucleotide exchange factor Fgd2 reveals that two opposing signaling pathways promote transmission ratio distortion in the mouse.“ In: *Genes & Development* 21.2 (Jan. 2007), S. 143–147.
- Beard, C., Hochedlinger, K., Plath, K., Wutz, A. und Jaenisch, R. „Efficient Method to Generate Single-Copy Transgenic Mice by Site-Specific Integration in Embryonic Stem Cells.“ In: *Genesis* 44.1 (Jan. 2006), S. 23–28.
- Bennett, D. „The T-Locus of the Mouse“. In: *Cell* 6.4 (1975), S. 441–454.

- Bennett, D., Alton, A. und Artzt, K. „Genetic analysis of transmission ratio distortion by t-haplotypes in the mouse.“ In: *Genetical Research* 41.1 (Feb. 1983), S. 29–45.
- Braun, R. E., Behringer, R. R., Peschon, J. J., Brinster, R. L. und Palmiter, R. D. „Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid.“ In: *Nature* 337.6205 (1989), S. 373–376.
- Buchholz, F., Angrand, P.-O. und Stewart, A. F. „Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis.“ In: *Nature Biotechnology* 16.7 (1998), S. 657–662.
- Bushey, A. M., Dorman, E. R. und Corces, V. G. „Chromatin Insulators: Regulatory Mechanisms and Epigenetic Inheritance.“ In: *Molecular Cell* 32.1 (Okt. 2008), S. 1–9.
- Castagnetti, S., Hentze, M. W., Ephrussi, A. und Gebauer, F. „Control of oskar mRNA translation by Bruno in a novel cell-free system from Drosophila ovaries.“ In: *Development* 127.5 (März 2000), S. 1063–1068.
- Chabanon, H., Mickleburgh, I. und Hesketh, J. „Zipcodes and postage stamps: mRNA localisation signals and their trans-acting binding proteins.“ In: *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 3.3 (Nov. 2004), S. 240–256.
- Chekulaeva, M., Hentze, M. W. und Ephrussi, A. „Bruno Acts as a Dual Repressor of Oskar Translation, Promoting mRNA Oligomerization and Formation of Silencing Particles.“ In: *Cell* 124.3 (Feb. 2006), S. 521–533.
- Chesley, P. und Dunn, L. C. „The Inheritance of Taillessness (Anury) in the House Mouse.“ In: *Genetics* 21 (1936), S. 525–536.
- Chung, J. H., Whiteley, M. und Felsenfeld, G. „A 5' Element of the Chicken β -Globin Domain Serves as an Insulator in Human Erythroid Cells and Protects Against Position Effect in Drosophila.“ In: *Cell* 74.3 (Aug. 1993), S. 505–514.
- Clermont, Y. „Kinetics of Spermatogenesis in Mammals: Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonial Renewal.“ In: *Physiological Reviews* 52.1 (Jan. 1972), S. 198–236.
- Cooke, H. J. und Saunders, P. T. K. „Mouse Models of Male Infertility.“ In: *Nature Reviews Genetics* 3.10 (Okt. 2002), S. 790–801.
- Créancier, L., Morello, D., Mercier, P. und Prats, A.-C. „Fibroblast Growth Factor 2 Internal Ribosome Entry Site (IRES) Activity Ex Vivo and in Transgenic Mice Reveals a Stringent Tissue-specific Regulation.“ In: *The Journal of Cell Biology* 150.1 (Juli 2000), S. 275–281.
- Cremer, T. *Von der Zellenlehre zur Chromosomentheorie : Naturwissenschaftliche Erkenntnisse und Theorienwechsel in der frühen Zell- und Vererbungs-forschung.* Springer Berlin Heidelberg, 1985, S. 27–231.
- Dev, A., Nayernia, K., Meins, M., Adham, I., Lacone, F. und Engel, W. „Mice Deficient for RNA-Binding Protein Brunol1 Show Reduction of Spermatogenesis But Are Fertile.“ In: *Molecular Reproduction and Development* 74.11 (2007), S. 1456–1464.
- Dobson, T., Minic, A., Nielsen, K., Amiott, E. und Krushel, L. „Internal initiation of translation of the TrkB mRNA is mediated by multiple regions within the 5' leader.“ In: *Nucleic Acids Research* 33.9 (Jan. 2005), S. 2929–2941.

- Dores, C., Alpaugh, W. und Dobrinski, I. „From in vitro culture to in vivo models to study testis development and spermatogenesis“. In: *Cell and Tissue Research* 349.3 (2012), S. 691–702.
- Drewes, G., Ebneith, A., Preuss, U., Mandelkow, E.-M. und Mandelkow, E. „MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption.“ In: *Cell* 89.2 (Apr. 1997), S. 297–308.
- Eddy, E. M. „Regulation of gene expression during spermatogenesis.“ In: *Seminars in Cell & Developmental Biology* 9.4 (Aug. 1998), S. 451–7.
- Eggan, K., Akutsu, H., Loring, J., Jackson-Grusby, L., Klemm, M., Rideout, W. M., Yanagimachi, R. und Jaenisch, R. „Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98.11 (Mai 2001), S. 6209–6214.
- Elliott, D. J. und Grellscheid, S. N. „Alternative RNA splicing regulation in the testis.“ In: *Reproduction* 132.6 (Dez. 2006), S. 811–819.
- Eulalio, A., Triteschler, F. und Izaurralde, E. „The GW182 protein family in animal cells: New insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing.“ In: *RNA* 15.8 (Aug. 2009), S. 1433–1442.
- Evans, M. J. und Kaufman, M. H. „Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.“ In: *Nature* 292.5819 (1981), S. 154–156.
- Fabian, M. R., Sonenberg, N. und Filipowicz, W. „Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs.“ In: *Annual Review of Biochemistry* 79 (Jan. 2010), S. 351–379.
- Fajardo, M. A., Butner, K. A., Braun, R. E. und Lee, K. „Germ Cell-Specific Proteins Interact with the 3' Untranslated Regions of Prm-1 and Prm-2 mRNA.“ In: *Developmental Biology* 166.2 (1994), S. 643–653.
- Fasken, M. B. und Corbett, A. H. „Process or perish: quality control in mRNA biogenesis.“ In: *Nature Structural & Molecular Biology* 12.6 (Juni 2005), S. 482–488.
- Fawcett, D. W., Ito, S. und Slautterback, D. „The Occurrence of Intercellular Bridges in Groups of Cells Exhibiting Synchronous Differentiation.“ In: *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 5.3 (Mai 1959), S. 453–460.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. und Sonenberg, N. „Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?“ In: *Nature Reviews Genetics* 9.2 (Feb. 2008), S. 102–114.
- Foley, G. L. „Overview of Male Reproductive Pathology“. In: *Toxicologic Pathology* 29.1 (Jan. 2001), S. 49–63.
- Gama Sosa, M. A., De Gasperi, R. und Elder, G. A. „Animal transgenesis: an overview.“ In: *Brain Structure & Function* 214.2-3 (März 2010), S. 91–109.
- Garrick, D., Fiering, S., Martin, D. und Whitelaw, E. „Repeat-induced gene silencing in mammals.“ In: *Nature Genetics* 18.1 (1998), S. 56–59.
- Gibbons, I. und Rowe, A. „Dynein: A Protein with Adenosine Triphosphatase Activity from Cilia.“ In: *Science* 149.3682 (1965), S. 424–426.

- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. und Dreyfuss, G. „RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation.“ In: *FEBS Letters* 582.14 (Juni 2008), S. 1977–1986.
- Goetze, S., Baer, A., Winkelmann, S., Nehlsen, K., Seibler, J. und Maass, K. „Performance of Genomic Bordering Elements at Predefined Genomic Loci.“ In: *Molecular and Cellular Biology* 25.6 (2005), S. 2260–2272.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S. und Khochbin, S. „The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis.“ In: *European Journal of Biochemistry* 271.17 (Sep. 2004), S. 3459–3469.
- Grzybowska, E. A., Wilczynska, A. und Siedlecki, J. A. „Regulatory Functions of 3'UTRs.“ In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288.2 (Okt. 2001), S. 291–295.
- Guhaniyogi, J. und Brewer, G. „Regulation of mRNA stability in mammalian cells.“ In: *Gene* 265.1-2 (März 2001), S. 11–23.
- Gunkel, N., Yano, T., Markussen, F.-H., Olsen, L. C. und Ephrussi, A. „Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA.“ In: *Genes & Development* 12.11 (Juni 1998), S. 1652–1664.
- Hammer, M. F., Schimenti, J. und Silver, L. M. „Evolution of mouse chromosome 17 and the origin of inversions associated with t haplotypes.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86.9 (1989), S. 3261–3265.
- Hanks, S. K. und Hunter, T. „The eukaryotic protein kinase superfamily : (catalytic) domain structure and classification.“ In: *The FASEB Journal* 9.8 (1995), S. 576–596.
- Haruyama, N., Cho, A. und Kulkarni, A. B. „Overview: engineering transgenic constructs and mice.“ In: *Current Protocols in Cell Biology* 19.10 (2009), S. 1–12.
- Hellen, C. U. und Sarnow, P. „Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules.“ In: *Genes & Development* 15.13 (Juli 2001), S. 1593–1612.
- Hendriksen, P. J., Hoogerbrugge, J. W., Themmen, A. P., Koken, M. H., Hoeijmakers, J. H., Oostra, B. A., Van Der Lende, T. und Grootegoed, J. A. „Postmeiotic Transcription of X and Y Chromosomal Genes during Spermatogenesis in the Mouse.“ In: *Developmental Biology* 170.2 (1995), S. 730–733.
- Hentze, M. und Kühn, L. „Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93.16 (1996), S. 8175–8182.
- Herrmann, B. G., Koschorz, B., Wertz, K., McLaughlin, K. J. und Kispert, A. „A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance.“ In: *Nature* 402.6758 (Nov. 1999), S. 141–146.
- Herrmann, B. G., Bućan, M., Mains, P. E., Frischauf, a. M., Silver, L. M. und Lehrach, H. „Genetic Analysis of the Proximal Portion of the Mouse t Complex: Evidence for a Second Inversion within t Haplotypes.“ In: *Cell* 44.3 (Feb. 1986), S. 469–476.
- Hess, R. A. „Spermatogenesis, Overview.“ In: *Encyclopedia of Reproduction* 4.1970 (1999), S. 539–545.

- Hess, R. A. und Renato De Franca, L. „Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium.“ In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 636 (2008). Hrsg. von C. Y. Cheng, S. 1–15.
- Hieronymus, H. und Silver, P. A. „A systems view of mRNP biology.“ In: *Genes & Development* 18.23 (Dez. 2004), S. 2845–2860.
- Hunter, D., Anand-ivell, R., Danner, S. und Ivell, R. „Models of in vitro spermatogenesis.“ In: *Spermatogenesis* 2.1 (2012), S. 1–12.
- Iacono, M., Mignone, F. und Pesole, G. „uAUG and uORFs in human and rodent 5'untranslated mRNAs.“ In: *Gene* 349 (Apr. 2005), S. 97–105.
- Jaenisch, R. und Bird, A. „Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.“ In: *Nature Genetics* 33 Suppl.march (März 2003), S. 245–254.
- Jambhekar, A. und DeRisi, J. L. J. „Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport.“ In: *RNA* 13.5 (2007), S. 625–642.
- Jansen, R.-P. „mRNA Localization: Message On The Move.“ In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2.4 (2001), S. 247–256.
- John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C. und Marks, D. S. „Human MicroRNA Targets.“ In: *PLoS Biology* 2.11 (Nov. 2004), e363.
- Kapp, L. D. und Lorsch, J. R. „The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation.“ In: *Annual Review of Biochemistry* 73 (Jan. 2004), S. 657–704.
- Katz, D. F., Erickson, R. P. und Nathanson, M. „Beat frequency is bimodally distributed in spermatozoa from T/t12 mice.“ In: *The Journal of Experimental Zoology* 210.3 (1979), S. 529–535.
- Kierszenbaum, A. L. und Tres, L. L. „RNA transcription and chromatin structure during meiotic and postmeiotic stages of spermatogenesis.“ In: *Federation Proceedings* 37.11 (1978), S. 2512–2516.
- Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G. D., Kosik, K. S., Church, G. M. und Ruvkun, G. „Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.1 (Jan. 2004), S. 360–365.
- Kim-Ha, J., Kerr, K. und Macdonald, P. M. „Translational Regulation of oskar mRNA by Bruno, an Ovarian RNA-Binding Protein, Is Essential.“ In: *Cell* 81.3 (Mai 1995), S. 403–412.
- Kioussis, D. und Festenstein, R. „Locus control regions: overcoming heterochromatin-induced gene inactivation in mammals.“ In: *Current Opinion in Genetics & Development* 7.5 (1997), S. 614–619.
- Kislauskis, E. H. und Singer, R. H. „Determinants of mRNA localization.“ In: *Current Opinion in Cell Biology* 4.6 (Dez. 1992), S. 975–978.
- Kleene, K. C. „A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells.“ In: *Mechanisms of Development* 106.1-2 (Aug. 2001), S. 3–23.
- „Patterns, mechanisms, and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells.“ In: *Cytogenetic and Genome Research* 103.3-4 (2003), S. 217–224.

- Kleene, K. C. „Sexual selection, genetic conflict, selfish genes, and the atypical patterns of gene expression in spermatogenic cells.“ In: *Developmental Biology* 277.1 (Jan. 2005), S. 16–26.
- Kobayashi, D. und Takeda, H. „Ciliary motility: The components and cytoplasmic preassembly mechanisms of the axonemal dyneins.“ In: *Differentiation* 83.2 (Feb. 2012), S23–S29.
- Korzh, V. und Grunwald, D. „Nadine Dobrovolskaïa-Zavadskaïa and the dawn of developmental genetics.“ In: *BioEssays* 23.4 (2001), S. 365–371.
- Kotaja, N., Bhattacharyya, S. N., Jaskiewicz, L., Kimmins, S., Parvinen, M., Filipowicz, W. und Sassone-Corsi, P. „The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.8 (Feb. 2006), S. 2647–2652.
- Kozak, M. „An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.“ In: *Nucleic Acids Research* 15.20 (1987), S. 8125–8148.
- „How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs?“ In: *Gene* 343.1 (Dez. 2004), S. 41–54.
 - „Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation.“ In: *Gene* 299.1-2 (Okt. 2002), S. 1–34.
 - „Structural Features in Eukaryotic mRNAs That Modulate the Initiation of Translation.“ In: *The Journal of Biological Chemistry* 266.30 (1991), S. 19867–19870.
- Kress, C., Gautier-Courteille, C., Osborne, H. B., Babinet, C. und Paillard, L. „Inactivation of CUG-BP1/CELF1 Causes Growth, Viability, and Spermatogenesis Defects in Mice.“ In: *Molecular and Cellular Biology* 27.3 (Feb. 2007), S. 1146–1157.
- Kulkarni, M., Ozgur, S. und Stoecklin, G. „On track with P-bodies.“ In: *Biochemical Society Transactions* 38.Pt 1 (Feb. 2010), S. 242–251.
- Le, S. Y. und Maizel, J. V. „A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs.“ In: *Nucleic Acids Research* 25.2 (Jan. 1997), S. 362–369.
- Ledermann, B. und Bürki, K. „Establishment of a Germ-Line Competent C57BL/6 Embryonic Stem Cell Line.“ In: *Experimental Cell Research* 197.2 (Dez. 1991), S. 254–258.
- Lee, E. K. und Gorospe, M. „Coding region: The neglected post-transcriptional code.“ In: *RNA Biology* 8.1 (Jan. 2011), S. 44–48.
- Lee, I., Ajay, S. S., Yook, J. I., Kim, H. S., Hong, S. H., Kim, N. H., Dhanasekaran, S. M., Chinnaiyan, A. M. und Athey, B. D. „New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites.“ In: *Genome Research* 19.7 (2009), S. 1175–1183.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. und Ambros, V. „The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*.“ In: *Cell* 75.5 (Dez. 1993), S. 843–854.
- Lie, Y. S. und Macdonald, P. M. „Aponic binds the translational repressor Bruno and is implicated in regulation of oskar mRNA translation.“ In: *Development* 126.6 (März 1999), S. 1129–1138.

- Lin, X., Parsels, L. A., Voeller, D. M., Allegra, C. J., Maley, G. F., Maley, F. und Chu, E. „Characterization of a cis-acting regulatory element in the protein coding region of thymidylate synthase mRNA.“ In: *Nucleic Acids Research* 28.6 (März 2000), S. 1381–1389.
- Lyon, M. F. „Distorter genes of the mouse t-complex impair male fertility when heterozygous.“ In: *Genetical Research* 49.1 (Feb. 1987), S. 57–60.
- „Male Sterility of the Mouse t-Complex Is Due to Homozygosity of the Distorter Genes.“ In: *Cell* 44.1978 (1986), S. 357–363.
- „Transmission Ratio Distortion in Mice.“ In: *Annual Review of Genetics* 37 (Jan. 2003), S. 393–408.
- „Transmission Ratio Distortion in Mouse t-Haplotypes Is Due to Multiple Distorter Genes Acting on a Responder Locus.“ In: *Cell* 37.2 (Juni 1984), S. 621–628.
- Lyon, M. F. und Mason, I. „Information on the nature of t-haplotypes from the interaction of mutant haplotypes in male fertility and segregation ratio.“ In: *Genetical Research* 2.29 (1977), S. 255–266.
- Lyon, M. F. und Meredith, R. „Investigations of the Nature of t-Alleles in the Mouse I-III.“ In: *Heredity* 19 (1964), S. 301–330.
- Lytle, J. R., Yario, T. A. und Steitz, J. A. „Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104.23 (Juni 2007), S. 9667–9672.
- Lytte, T. W. „Cheaters sometimes prosper: distortion of mendelian segregation by meiotic drive.“ In: *Trends in Genetics* 9.6 (1993), S. 205–210.
- „Segregation Distorters.“ In: *Annual Review of Genetics* 25 (1991), S. 511–557.
- Mahmoud, H. „Spermatogenesis in an Artificial Three-Dimensional System.“ In: *Stem Cells* (2012), S. 1–12.
- Mandelkow, E.-M., Thies, E., Trinczek, B., Biernat, J. und Mandelkow, E. „MARK/ PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons.“ In: *The Journal of Cell Biology* 167.1 (Okt. 2004), S. 99–110.
- Martin, D. I. und Whitelaw, E. „The vagaries of variegating transgenes.“ In: *BioEssays* 18.11 (1996), S. 919–923.
- Martin, K. C. und Ephrussi, A. „mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension.“ In: *Cell* 136.4 (Feb. 2009), S. 719–730.
- Marzi, S., Myasnikov, A. G., Serganov, A., Ehresmann, C., Romby, P., Yusupov, M. und Klaholz, B. P. „Structured mRNAs Regulate Translation Initiation by Binding to the Platform of the Ribosome.“ In: *Cell* 130.6 (Sep. 2007), S. 1019–1031.
- McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H. S., Colman, A., Schnieke, A. E. und Kind, A. J. „Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells.“ In: *Nature* 405.6790 (Juni 2000), S. 1066–1069.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. und Pesole, G. „Untranslated regions of mRNAs.“ In: *Genome Biology* 3.3 (2002), S. 1–10.
- Millar, A. A. und Waterhouse, P. M. „Plant and animal microRNAs: similarities and differences.“ In: *Functional & Integrative Genomics* 5.3 (Juli 2005), S. 129–135.

- Mohri, H., Inaba, K., Ishijima, S. und Baba, S. A. „Tubulin-dynein system in flagellar and ciliary movement“. In: *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 88.8 (2012), S. 397–415.
- Moltó, E., Fernández, A. und Montoliu, L. „Boundaries in vertebrate genomes: different solutions to adequately insulate gene expression domains.“ In: *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* 8.4 (Juli 2009), S. 283–296.
- Moretti, F., Thermann, R. und Hentze, M. M. W. „Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame.“ In: *RNA* 16.12 (2010), S. 2493–2502.
- Nagamori, I. und Sassone-Corsi, P. „The chromatoid body of male germ cells: epigenetic control and miRNA pathway.“ In: *Cell Cycle* 7.22 (2008), S. 3503–3508.
- Nicklas, W., Baneux, P., Boot, R., Decelle, T., Deeny, A. A., Fumanelli, M. und Illgen-Wilcke, B. „Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units.“ In: *Laboratory Animals* 36.1 (2002), S. 20–42.
- Oakberg, E. „Duration of Spermatogenesis in the Mouse and Timing of Stages of the Cycle of the Seminiferous Epithelium“. In: *American Journal of Anatomy* 99.3 (1956), S. 507–516.
- Olds-Clarke, P. „Models for male infertility: the t haplotypes.“ In: *Reviews of Reproduction* 2.3 (1997), S. 157–164.
- Olds-Clarke, P. und Peitz, B. „Fertility of sperm from t/+ mice: evidence that +-bearing sperm are dysfunctional.“ In: *Genetical Research* 47.1 (Feb. 1985), S. 49–52.
- Olds-Clarke, P. und Johnson, L. „t Haplotypes in the Mouse Compromise Sperm Flagellar Function“. In: *Developmental Biology* 155.1 (1993), S. 14–25.
- Paronetto, M. P. und Sette, C. „Role of RNA-binding proteins in mammalian spermatogenesis.“ In: *International journal of andrology* 33.1 (Feb. 2010), S. 2–12.
- Parvinen, M. „The chromatoid body in spermatogenesis.“ In: *International Journal of Andrology* 28.4 (Aug. 2005), S. 189–201.
- Peschon, J. J., Behringer, R. R., Palmiter, R. D. und Brinster, R. L. „Expression of Mouse Protamine 1 Genes in Transgenic Mice.“ In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 564 (Jan. 1989), S. 186–197.
- Peters, L. und Meister, G. „Argonaute Proteins: Mediators of RNA Silencing.“ In: *Molecular Cell* 26.5 (Juni 2007), S. 611–623.
- Pillai, R. „MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA?“ In: *RNA* 11.12 (2005), S. 1753–1761.
- Planchart, A., You, Y. und Schimenti, J. C. „Physical Mapping of Male Fertility and Meiotic Drive Quantitative Trait Loci in the Mouse t Complex Using Chromosome Deficiencies.“ In: *Genetics* 155.2 (Juni 2000), S. 803–812.
- Premisrirut, P. K., Dow, L. E., Kim, S. Y., Camiolo, M., Malone, C. D., Miething, C., Scuppo, C., Zuber, J., Dickins, R. A., Kogan, S. C., Shroyer, K. R., Sordella, R., Hannon, G. J. und Lowe, S. W. „A Rapid and Scalable System for Studying Gene Function in Mice Using Conditional RNA Interference.“ In: *Cell* 145.1 (Apr. 2011), S. 145–158.
- Reinke, S. „Improvement of an inducible transgene system in mice“. Masterarbeit. Freie Universität, 2012.

- Reveal, B., Garcia, C., Ellington, A. und Macdonald, P. M. „Multiple RNA binding domains of Bruno confer recognition of diverse binding sites for translational repression.“ In: *RNA Biology* 8.6 (2011), S. 1047–1060.
- Rigoutsos, I. „New Tricks for Animal MicroRNAs: Targeting of Amino Acid Coding Regions at Conserved and Nonconserved Sites.“ In: *Cancer Research* 69.8 (Apr. 2009), S. 3245–3248.
- Robertson, G., Garrick, D., Wu, W., Kearns, M., Martin, D. und Whitelaw, E. „Position-dependent variegation of globin transgene expression in mice.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92.12 (Juni 1995), S. 5371–5375.
- Russell, L. D., Ettl, R. A., Hikim, A. P. S. und Clegg, E. D. „Histological and Histopathological Evaluation of the Testis“. In: *International Journal of Andrology* 16.1 (Feb. 1993), S. 83–83.
- Safronova, L. D. und Kudryavtsev, I. V. „Transmission Ratio Distortion , Sterility , and Control of the t -Complex Function in Sperm“. In: *Russian Journal of Genetics* 37.9 (2001), S. 1002–1008.
- Sassone-Corsi, P. „Transcriptional Checkpoint Determining the Fate of Male Germ Cells“. In: *Cell* 88.2 (1997), S. 163–166.
- Scholey, J. M. „Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell’s antenna.“ In: *The Journal of Cell Biology* 180.1 (Jan. 2008), S. 23–29.
- Sharp, P. A. „The discovery of split genes and RNA splicing“. In: *Trends in Biochemical Sciences* 30.6 (Juni 2005), S. 279–281.
- Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., Huse, W. D., Systems, S. C. und Jolla, L. „Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties.“ In: *Nucleic Acids Research* 16.15 (1988), S. 7583–7600.
- Silver, L. M. „Mouse t Haplotypes“. In: *Annual Review of Genetics* 19.34 (1985), S. 179–208.
- „The peculiar journey of a selfish chromosome: mouse t haplotypes and meiotic drive.“ In: *Trends in Genetics* 9.7 (1993), S. 250–254.
- Silver, L. M. und Olds-Clarke, P. „Transmission Ratio Distortion of Mouse t Haplotypes Is Not a Consequence of Wild-Type Sperm Degeneration.“ In: *Developmental Biology* 105.1 (Sep. 1984), S. 250–252.
- Smorag, L., Zheng, Y., Nolte, J., Zechner, U., Engel, W. und Pantakani, D. V. K. „MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: Evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203, and -34b-5p mediated spermatogenesis regulation.“ In: *Biology of the Cell* 104.11 (Aug. 2012), S. 677–692.
- St Johnston, D. „The Intracellular Localization of Messenger RNAs.“ In: *Cell* 81.2 (Apr. 1995), S. 161–170.
- Steel, L. F., Telly, D. L., Leonard, J., Rice, B. A., Monks, B., Sawicki, J. A., Steel, F. und Rice, A. „Elements in the Murine c-mos Messenger RNA 5’-Untranslated Region Repress Translation of Downstream Coding Sequences.“ In: *Cell Growth & Differentiation* 7.10 (1996), S. 1415–1424.
- Stoneley, M. und Willis, A. E. „Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression.“ In: *Oncogene* 23.18 (Apr. 2004), S. 3200–3207.

- Tafari, S. R., Familiar, M. und Wolffe, A. P. „A Mouse Y Box Protein, MSY1, Is Associated with Paternal mRNA in Spermatocytes.“ In: *The Journal of Biological Chemistry* 268.16 (Juni 1993), S. 12213–12220.
- Tai, N., Schmitz, J. C., Chen, T. und Chu, E. „Characterization of a cis-acting regulatory element in the protein-coding region of human dihydrofolate reductase mRNA.“ In: *The Biochemical Journal* 378.Pt 3 (März 2004), S. 999–1006.
- Tucker, K. L., Wang, Y., Dausman, J. und Jaenisch, R. „A transgenic mouse strain expressing four drug-selectable marker genes.“ In: *Nucleic Acids Research* 25.18 (Sep. 1997), S. 3745–3746.
- Turan, S., Galla, M., Ernst, E., Qiao, J., Voelkel, C., Schiedlmeier, B., Zehe, C. und Bode, J. „Recombinase-Mediated Cassette Exchange (RMCE): Traditional Concepts and Current Challenges.“ In: *Journal of Molecular Biology* 407.2 (März 2011), S. 193–221.
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J. und Parker, R. „Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs.“ In: *Genes & Development* 20.5 (März 2006), S. 515–524.
- Varani, G. „A cap for all occasions.“ In: *Structure* 5.7 (Juli 1997), S. 855–858.
- Vasudevan, S. „Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs.“ In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 3.3 (2012), S. 311–30.
- Velden, A. W. van der und Thomas, A. A. M. „The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development.“ In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31.1 (Jan. 1999), S. 87–106.
- Ventelä, S., Toppari, J. und Parvinen, M. „Intercellular Organelle Traffic through Cytoplasmic Bridges in Early Spermatids of the Rat: Mechanisms of Haploid Gene Product Sharing.“ In: *Molecular Biology of the Cell* 14.7 (2003). Hrsg. von R. Schekman, S. 2768–2780.
- Véron, N. „Untersuchungen zu den molekularen Grundlagen der nicht-mendelschen Vererbung in der Maus“. Dissertation. Freie Universität Berlin, 2008.
- Véron, N., Bauer, H., Weisse, A. Y., Lüder, G., Werber, M. und Herrmann, B. G. „Retention of gene products in syncytial spermatids promotes non-Mendelian inheritance as revealed by the t complex responder.“ In: *Genes & Development* 23.23 (Dez. 2009), S. 2705–2710.
- Véron, N., Bauer, H. und Herrmann, B. G. „Spermien - Ein Wettlauf der Gene“. In: *GENOMXPress* 4.05 (2005), S. 10–12.
- Weber, M. J. „New human and mouse microRNA genes found by homology search.“ In: *The FEBS Journal* 272.1 (Jan. 2005), S. 59–73.
- Webster, P. J., Liang, L. L., Berg, C. A., Lasko, P. und Macdonald, P. M. „Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved“. In: *Genes & Development* 11.19 (Okt. 1997), S. 2510–2521.
- Weiling, F. „J.G. MENDELs Versuche über Pflanzen-Hybriden und ihre Würdigung in der Zeit bis zu ihrer Wiederentdeckung“. In: *Der Züchter* 36.6 (1966), S. 273–282.
- Wood, S. A., Allen, N. D., Rossant, J., Auerbach, A. und Nagy, A. „Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras.“ In: *Nature* 365.6441 (1993), S. 87–89.

- Yaman, I., Fernandez, J., Liu, H., Caprara, M., Komar, A. A., Koromilas, A. E., Zhou, L., Snider, M. D., Scheuner, D., Kaufman, R. J. und Hatzoglou, M. „The Zipper Model of Translational Control: A Small Upstream ORF is the Switch that Controls Structural Remodeling of an mRNA Leader.“ In: *Cell* 113.4 (Mai 2003), S. 519–531.
- Yu, Z., Raabe, T. und Hecht, N. B. „MicroRNA Mirn122a Reduces Expression of the Posttranscriptionally Regulated Germ Cell Transition Protein 2 (Tnp2) Messenger RNA (mRNA) by mRNA Cleavage.“ In: *Biology of Reproduction* 73.3 (Sep. 2005), S. 427–433.
- Zambrowicz, B. P., Harendza, C. J., Zimmermann, J. W., Brinster, R. L. und Palmiter, R. D. „Analysis of the mouse protamine 1 promoter in transgenic mice.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90.11 (Juni 1993), S. 5071–5075.
- Zeng, H.-T. und Tulsiani, D. R. P. „Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components.“ In: *Journal of Cell Science* 116.Pt 10 (Mai 2003), S. 1981–1989.

Vorab veröffentlichte Ergebnisse

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Form eines Posters auf dem institutsinternen Day of Science des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik 2012 präsentiert.

Dissection of the molecular properties of the t-complex responder in transgenic mice.
Karina Schöfisch, Nathalie Véron, Hermann Bauer and Bernhard G. Herrmann
Day of Science des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik in Berlin
14. Mai 2012, Seminaris CampusHotel Berlin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit wahrnehmen und mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Bernhard G. Herrmann, der mir mit Bereitstellung eines Themas die Anfertigung dieser Arbeit in seiner Abteilung am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik Berlin ermöglicht hat. Vielen Dank für die gute wissenschaftliche Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere den Wissenschaftlern Nathalie Véron, Yves Charron und Hermann Bauer, durch die ich an mir vollkommen neue Methoden und Arbeitsweisen herangeführt und eingeführt wurde und die mir immer mit Rat und Tat zu Seite standen. Natürlich möchte ich an dieser Stelle auch die große Hilfsbereitschaft aller weiteren Mitglieder der Abteilung für Entwicklungsbiologie hervorheben, besonders Sandra Währisch, Manuela Scholze, Gaby Bläß und viele andere hatten für Probleme immer ein offenes Ohr. Außerdem möchte ich an dieser Stelle Dr. Tracy Pennimpede erwähnen, die mir zu wichtigen Ergebnissen verhalf, als technische Probleme kein Ende nehmen wollten. Des Weiteren ist es mir ein besonderes Bedürfnis meinem Dank gegenüber dem Tierhaus und der Transgenen Einheit auszusprechen. Ohne die Erfahrung der Mitarbeiter wie Karol Macura wäre das Vorhaben transgene Mauslinien zu etablieren in so kurzer Zeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank an die Tierpfleger wie Carolin Wilke, die eine exzellente Arbeit bei der Betreuung der Tiere absolvierten. Insbesondere der Leiter des Tierhauses Dr. Ludger Hartmann ist zu erwähnen, der mein Interesse für die Versuchstierkunde geweckt hat und mich ermutigte, im Max-Planck-Institut tätig zu werden.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht und mich bisher in jeder Lebenslage moralisch unterstützt haben. Auch meiner Schwester und ihrer kleinen Familie gilt besonderer Dank, da sie mir willkommene Abwechslung und Erholung boten und meinen Fokus im Leben wieder zurecht gerückt haben.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen zu haben.

Die Arbeit wurde vom September 2009 bis Juni 2012 im Labor von Prof. Dr. Bernhard G. Herrmann angefertigt.

Berlin 2013

Ort, Jahr

Karina Schöfisch