

**FARINELLI: ein testisspezifisches VAP-Protein und seine Funktion in der  
*Drosophila*-Spermatogenese**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Ute Renner  
aus Bad Lauterberg

Göttingen 2001

D7

Referentin: Frau Prof. Dr. M. A. Schäfer

Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2002

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>I.</u></b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b><u>II.</u></b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b><u>2.1</u></b>	Phänotyp der P-Element-Insertionslinie <i>fan<sup>P</sup></i> und der Remobilisierungslinien <i>fan<sup>Jo2</sup></i> und <i>fan<sup>Jo6</sup></i> : Homozygote Männchen dieser Linien zeigen degenerierende Spermatidenbündel und sind steril.....	9
<b><u>2.2</u></b>	Die P-Element-Insertionslinie zeigt $\beta$ -Galaktosidase-Expression in den männlichen Keimzellen .....	12
<b><u>2.3</u></b>	Der Insertionsort des P-Elements liegt in Region 66C.....	13
<b><u>2.4</u></b>	Klonierung der das P-Element flankierenden genomischen Bereiche: Die Insertionsstelle liegt 8 nt stromaufwärts vom offenen Leseraster eines neuen Gens .....	14
<b><u>2.5</u></b>	Analyse von cDNA-Klonen: Das <i>farinelli</i> -Gen enthält keine Introns.....	15
<b><u>2.6</u></b>	Northern Blot-Analyse: <i>farinelli</i> wird ausschließlich in den männlichen Gonaden von <i>Drosophila</i> transkribiert .....	16
<b><u>2.7</u></b>	<i>In situ</i> -Hybridisierung: <i>fan</i> -mRNA akkumuliert im Cytoplasma primärer Spermatozyten .....	18
<b><u>2.8</u></b>	Während in Linie <i>fan<sup>Jo6</sup></i> P-Element-Reste zurückgeblieben sind, wurden in Linie <i>fan<sup>Jo2</sup></i> benachbarte genomische Bereiche zusätzlich deletiert .....	19
<b><u>2.9</u></b>	Der aus einer Phagenbank isolierte genomische Klon 33 bietet die Grundlage für die Klonierung von <i>farinelli</i> -Sequenzen in verschiedene P-Vektoren.....	21
<b><u>2.10</u></b>	Analyse von Promotor- <i>lacZ</i> -Fusionen: 762 nt aus dem 5' flankierenden Bereich von <i>farinelli</i> bewirken eine testisspezifische Expression des Reportergens .....	22
<b><u>2.11</u></b>	Die Fertilität von <i>fan</i> -mutanten Männchen kann durch Einkreuzen eines Rettungskonstruktes wiederhergestellt werden .....	25
<b><u>2.12</u></b>	<i>farinelli</i> kodiert ein 24,6 kDa integrales Membranprotein (FAN) .....	26
<b><u>2.13</u></b>	Das FAN-Protein weist Ähnlichkeiten zu VAP- und MSP-Proteinen auf.....	28
<b><u>2.14</u></b>	Der EST-Klon LD20208 aus <i>Drosophila</i> kodiert ein Protein, das deutlich größere Ähnlichkeit mit VAP zeigt als FAN.....	30
<b><u>2.15</u></b>	FAN ist mit Strukturen des endoplasmatischen Retikulums assoziiert.....	38

<a href="#"><u>2.15.1</u></a>	Untersuchung der subzellulären Verteilung anhand eines FAN-GFP-Fusionsproteins .....	38
<a href="#"><u>2.15.2</u></a>	Untersuchung der subzellulären Verteilung von FAN mit Hilfe eines Anti-Peptid-Antikörpers .....	41
<a href="#"><u>2.16</u></a>	Das FAN-GFP-Fusionsprotein kann die Sterilität der P-Element-Insertionslinie und der beiden Remobilisierungslinien nicht effizient retten.....	46
<a href="#"><u>2.17</u></a>	Das FAN-Protein ist innerhalb von <i>Drosophila</i> -Arten konserviert, deren evolutive Abspaltung nicht mehr als 17 Millionen Jahre zurückliegt.....	48
<a href="#"><u>2.18</u></a>	In unmittelbarer Nachbarschaft zu <i>farinelli</i> liegt ein weiteres unbekanntes Gen, das eine gonadenspezifische Funktion ausüben könnte: <i>neighbor of farinelli (nof)</i> .....	50
<a href="#"><u>III.</u></a>	<b>Diskussion</b> .....	56
<a href="#"><u>IV.</u></a>	<b>Zusammenfassung</b> .....	64
<a href="#"><u>V.</u></a>	<b>Material und Methoden</b>	
<a href="#"><u>5.1</u></a>	Fliegenzucht	
<a href="#"><u>5.1.1</u></a>	Fliegenstämme .....	66
<a href="#"><u>5.1.2</u></a>	Zuchtbedingungen und Herstellung des Fliegennährbreis .....	66
<a href="#"><u>5.1.3</u></a>	Ernte von Embryonen .....	66
<a href="#"><u>5.1.4</u></a>	Präparation von Organen .....	67
<a href="#"><u>5.1.5</u></a>	Fertilitätstests .....	67
<a href="#"><u>5.1.6</u></a>	Überprüfung der Spermienmotilität.....	67
<a href="#"><u>5.2</u></a>	Methoden zur RNA Analyse	
<a href="#"><u>5.2.1</u></a>	Isolierung von poly(A)-mRNA.....	68
<a href="#"><u>5.2.2</u></a>	Auftrennung von RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen.....	69
<a href="#"><u>5.2.3</u></a>	Transfer von RNA auf Nylonmembran .....	70
<a href="#"><u>5.2.4</u></a>	<i>In vitro</i> -Transkription .....	70
<a href="#"><u>5.2.5</u></a>	Northern Blot-Hybridisierung .....	71
<a href="#"><u>5.3</u></a>	DNA-Klonierungstechniken	
<a href="#"><u>5.3.1</u></a>	Verwendete Vektoren .....	72
<a href="#"><u>5.3.2</u></a>	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA .....	73
<a href="#"><u>5.3.3</u></a>	Auffüllen von „sticky ends“ mit Klenow-Fragment.....	73
<a href="#"><u>5.3.4</u></a>	Alkalische Phosphatase-Behandlung von Plasmiden .....	73
<a href="#"><u>5.3.5</u></a>	Ligation.....	74
<a href="#"><u>5.3.6</u></a>	Herstellung kompetenter Zellen .....	74
<a href="#"><u>5.3.7</u></a>	Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	75

<a href="#"><u>5.3.8</u></a>	Blau-Weiß-Selektion .....	75
<a href="#"><u>5.3.9</u></a>	Plasmid-Minipräparation .....	76
<a href="#"><u>5.3.10</u></a>	Plasmid-Midipräparation .....	77
<a href="#"><u>5.3.11</u></a>	Isolierung genomischer DNA aus ganzen Fliegen .....	77
<a href="#"><u>5.3.12</u></a>	Restriktionsverdau genomischer DNA .....	78
<a href="#"><u>5.3.13</u></a>	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen .....	78
<a href="#"><u>5.3.14</u></a>	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	78
<a href="#"><u>5.3.15</u></a>	Transfer von DNA auf Nylonmembran .....	79
<a href="#"><u>5.3.16</u></a>	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	79
<a href="#"><u>5.3.17</u></a>	Southern Blot-Hybridisierung .....	79
<a href="#"><u>5.3.18</u></a>	„Screening“ von Phagenbanken.....	80
<a href="#"><u>5.3.19</u></a>	PCR-Techniken.....	83
<a href="#"><u>5.3.20</u></a>	DNA-Sequenzierung.....	87
<a href="#"><u>5.4</u></a>	P-Element-vermittelte Keimbahntransformation	
<a href="#"><u>5.4.1</u></a>	Vorbereitung der Embryonen .....	89
<a href="#"><u>5.4.2</u></a>	Vorbereitung der DNA und Injektion.....	90
<a href="#"><u>5.4.3</u></a>	Etablierung transgener Linien.....	90
<a href="#"><u>5.5</u></a>	Proteinchemische Methoden	
<a href="#"><u>5.5.1</u></a>	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	91
<a href="#"><u>5.5.2</u></a>	Coomassie-Färbung .....	93
<a href="#"><u>5.5.3</u></a>	„Semidry“-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran .....	93
<a href="#"><u>5.5.4</u></a>	Ponceau S-Färbung .....	94
<a href="#"><u>5.5.5</u></a>	Immunnachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen .....	94
<a href="#"><u>5.5.6</u></a>	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> .....	95
<a href="#"><u>5.5.7</u></a>	Kupferchlorid-Färbung .....	95
<a href="#"><u>5.5.8</u></a>	Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgel.....	95
<a href="#"><u>5.5.9</u></a>	Herstellung eines polyklonalen anti-Peptid-Antikörpers .....	96
<a href="#"><u>5.6</u></a>	Histochemische Nachweismethoden	
<a href="#"><u>5.6.1</u></a>	X-Gal-Färbung von Organen .....	97
<a href="#"><u>5.6.2</u></a>	<i>In situ</i> -Hybridisierungen .....	97
<a href="#"><u>5.6.3</u></a>	Fixierung von GFP-Präparaten .....	102
<a href="#"><u>5.6.4</u></a>	Immunfluoreszenz an ganzen Organen.....	102
<a href="#"><u>5.6.5</u></a>	Immunfluoreszenz an Hodenquetschpräparaten.....	102
<a href="#"><u>VI.</u></a>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	104
<a href="#"><u>VII.</u></a>	<b>Anhang</b> .....	115

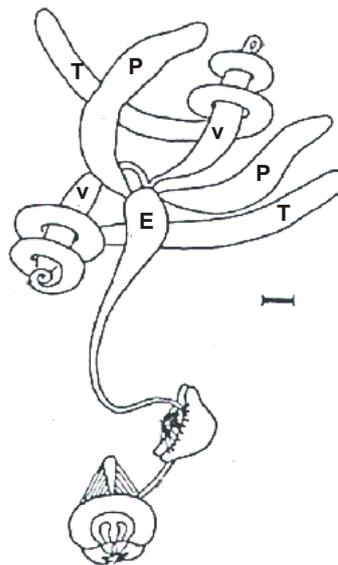
## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	counts per minute
CTG	Cytidin-Triphosphat
DAPI	4, 6-Diamino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DIG	Digoxigenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxy-Ribonukleosid-Triphosphate
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Dinatriumsalz
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG30	endoplasmic reticulum and Golgi 30-kDa protein
EST	expressed sequence tag
g	Erdbeschleunigung
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
IS	Imaginalscheibe(n)
kb	Kilobasen
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MSP	major sperm protein
NBT	Nitro-blaues Tetrazoliumchlorid

NGS	Ziegenserum
NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor
nt	Nukleotid(e)
NTP	Ribonukleosid-Triphosphate
OD	Optische Dichte
PAA-Gel	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
pfu	plaque forming unit
rEK	rekombinante Enterokinase
rpm	rotations per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNAP	soluble NSF attachment protein
SNAP-25	synaptosome-associated protein of 25 kDa
SNARE	soluble <i>N</i> -ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptor
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTP	Uridin-Triphosphat
VAMP	vesicle-associated membrane protein/Synaptobrevin
VAP	vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

## I. Einleitung

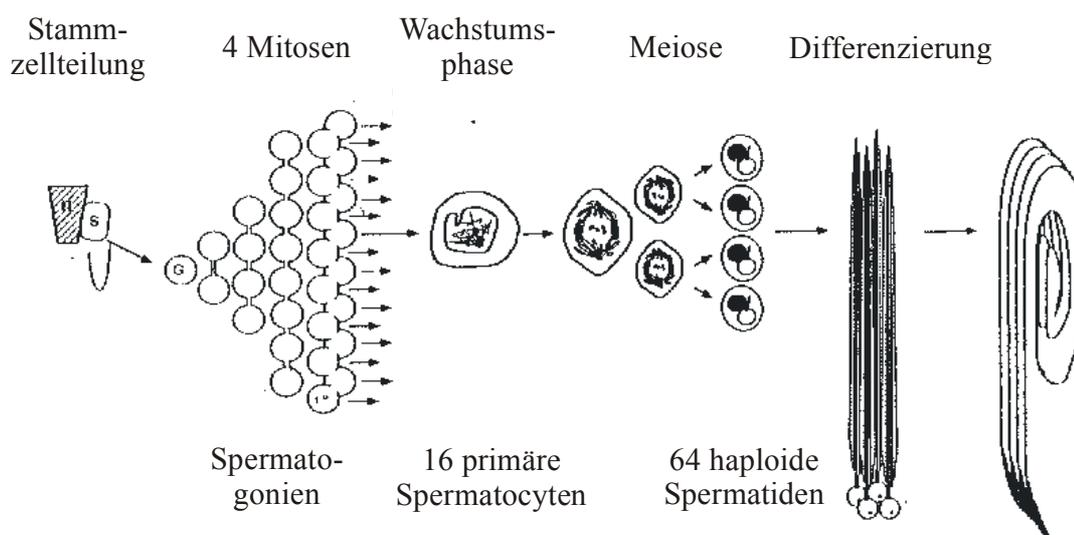
Die Aufklärung von Differenzierungsprozessen ist ein zentraler Aspekt der Entwicklungsbiologie. Ein ideales Modell, um die Differenzierung von Zellen auf der cytologischen, genetischen und molekularen Ebene zu untersuchen, bietet die Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*. Die Entstehung eines in Form und Funktion hochspezialisierten Spermiums aus einer undifferenzierten Urkeimzelle stellt ein eindrucksvolles Beispiel für morphologische Veränderungen einer Zelle dar. Der männliche Reproduktionsapparat von *Drosophila* ist paarig angelegt. Er besteht aus zwei Hodenschläuchen und den beiden Anhangsdrüsen, den Paragonien (Abb. 1). Die Hodenschläuche enden jeweils in einer Samenblase, in die die reifen Spermien abgegeben werden und die ihrerseits in den Ausführungsgang mündet.



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

Die beiden Paragonien liefern ein Sekret, das zusammen mit den Spermien bei der Kopulation abgegeben wird und zur Fertilität des Männchens beiträgt. Im Sekret enthaltene Proteine erhöhen z.B. die Haltbarkeit der Spermien in den Spermien Speicherorganen des Weibchens, dem *Receptaculum seminis* und den Spermatheken. Das Weibchen wird außerdem zur erhöhten Eiablage angeregt und seine

Bereitschaft, sich erneut zu paaren, wird gehemmt (Wolfner, 1997). Die Spermatogenese beginnt in der Spitze des Hodenschlauchs; dort sind die Stammzellen, jeweils umschlossen von zwei Cystenvorläuferzellen, um eine Nabe aus somatischen Zellen („hub“) herum angeordnet (Hardy *et al.*, 1979). Aus der Teilung der Stammzelle geht ein Spermatogonium hervor (Abb. 2), das von zwei somatischen Cystenzellen umschlossen wird. Diese resultieren aus der Teilung der beiden Cystenvorläuferzellen, die ebenfalls Stammzellcharakter haben. In der so gebildeten Cyste entstehen aus dem Spermatogonium durch vier aufeinanderfolgende Mitosen 16 primäre Spermatocyten (zusammengefaßt in Fuller, 1993). Sowohl die vier mitotischen als auch die meiotischen Teilungen sind durch unvollständige Cytokinese gekennzeichnet; d.h., die Keimzellen stehen innerhalb der Cyste über Cytoplasmabrücken miteinander in Kontakt (Lindsley und Tokuyasu, 1980). Die einzelnen Cysten bewegen sich im Laufe ihrer Reifung allmählich in Richtung Samenblase.



**Abb. 2: Schematisierte Darstellung der Spermatogenese von *Drosophila*** (aus Fuller, 1993, verändert). H = somatische Zelle in der Testisspitze (sie ist Teil des sog. „hub“, um den herum die Stammzellen angeordnet sind), S = Stammzelle, G = Spermatogonium.

Die primären Spermatocyten durchlaufen eine 90 h dauernde Wachstumsphase und vergrößern ihr Volumen auf das 25fache (Lindsley und Tokuyasu, 1980). Diese Phase zeichnet sich durch höchste Transkriptions- und Translationsaktivität aus. Da die Transkription während der *Drosophila*-Spermatogenese auf prämeiotische Stadien beschränkt ist

(Gould-Somero & Holland, 1974), müssen Gene, deren Produkte für die nach der Meiose erfolgenden morphologischen Veränderungen der Keimzellen erforderlich sind, bereits zu diesem Zeitpunkt transkribiert werden. Bei der einzigen bekannten Ausnahme postmeiotischer Transkription handelt es sich um das *hsr-omega*-Gen. Das Produkt ist eine mRNA, die nicht translatiert wird (Bendena *et al.*, 1991).

Nach der Meiose liegen 64 haploide Spermatiden vor. Damit aus diesen runden Zellen reife Spermien entstehen, sind komplexe morphologische Veränderungen notwendig (zusammengefaßt in Fuller, 1993). Sie schließen den Umbau fast jeder Zellorganelle und die Bildung eines Flagellums ein. Die Kerne der frühen Spermatiden weisen eine Doppelmembran auf. Die äußere der beiden Membranen ist teilweise unterbrochen und besteht aus endoplasmatischem Retikulum (Lindsley & Tokuyasu, 1980). Eine der ersten sichtbaren Veränderungen ist die Aggregation der Mitochondrien an der Seite des Kerns, an der sich auch die Centriole befindet (Tates, 1971). Sie bildet den Basalkörper und damit den Ausgangspunkt für den Aufbau des Axonems der Flagelle. Die Mitochondrien sammeln sich zu einer halbmondförmigen Masse, die dann eine globuläre Gestalt annimmt. Dabei fusionieren die einzelnen Mitochondrien zu zwei großen Organellen, die schichtweise ineinandergelagert werden, so daß die entstehende Struktur im Querschnitt zwiebelähnlich aufgebaut wirkt. Sie wird als Nebenkern bezeichnet und hat einen Durchmesser, der mit dem des Zellkerns in etwa vergleichbar ist. Das wachsende Axonem wird von einer Membran aus endoplasmatischem Retikulum, der axonemalen Scheide, umgeben (Lindsley & Tokuyasu, 1980). Mit dem Wachstum des Axonems erhält die Zelle eine zunehmend länglichere Form. Gleichzeitig verändert sich die Morphologie des mitochondrialen Aggregats, das zunächst eine kegelförmige Gestalt annimmt und dann in zwei gleich große Teile aufgeteilt wird. Die beiden mitochondrialen Derivate verlängern sich entlang des Axonems, wobei ihr Durchmesser immer mehr reduziert wird (Tates, 1971). Da eines der beiden Derivate im Laufe der Elongation im Vergleich zum anderen deutlich an Masse verliert, unterscheidet man zwischen großem und kleinem mitochondrialen Derivat. Im reifen Spermium sind später nur noch Rudimente des kleinen Derivats vorhanden, während das große Derivat parallel zum Spermischwanz liegt (Tokuyasu, 1974 a).

Einige Zeit nachdem das Wachstum des Axonems begonnen hat, setzen tiefgreifende Veränderungen der Kernmorphologie ein (Lindsley & Tokuyasu, 1980). Der Zellkern flacht an einer Stelle ab und wölbt sich nach innen, so daß im Querschnitt zwischen einer

konkaven und einer konvexen Seite unterschieden werden kann. Innerhalb der entstandenen Wölbung werden Mikrotubuli angereichert und parallel zur zukünftigen Längsachse des Zellkerns ausgerichtet (Tokuyasu, 1974 b). In der Folge verlängert sich der Kern, die Mikrotubuli-Anordnung verschwindet und die Einwölbung bildet sich allmählich zurück. Der Vorgang der Chromatinkondensation beginnt zuerst an der Peripherie der konvexen Seite des Zellkerns und weitet sich von dort bis zur anderen Seite des Kerns aus, die zu diesem Zeitpunkt bereits nicht länger konkav ist. Wenn der Prozeß der Kernverlängerung und -kondensation abgeschlossen ist, hat der Zellkern eine nadelförmige Morphologie angenommen; das Kernvolumen wurde im Vergleich zur frühen Spermatide um das zweihundertfache reduziert (Tates, 1971).

Cysten, die elongierte Spermatiden enthalten, sind lichtmikroskopisch gut als bündelartige Strukturen erkennbar, die sich je nach Länge über einen mehr oder weniger großen Abschnitt des Hodenschlauchs erstrecken. In der reifen Keimzelle hat das Flagellum eine Länge von etwa 1,8 mm erreicht (Lindsley & Tokuyasu, 1980). Ist die Elongation des Axonems weit fortgeschritten, kann das Schwanzende eines Spermatidenbündels fast bis in die Hodenspitze hinein reichen. Das Kopfende des Bündels mit den Zellkernen ist dagegen in Richtung Hodenschlauchbasis orientiert. Eine der beiden somatischen Cystenzellen hat ihren Zellkörper während der Elongation der 64 Spermatiden ausgedehnt und umgibt die Spermatidenschwänze, während die zweite Cystenzelle die Köpfe umschließt.

In der letzten Phase der Spermatogenese werden die zwischen den Spermatiden bestehenden cytoplasmatischen Brücken geschlossen und jede Keimzelle von einer kompletten Cytoplasmamembran umhüllt. Dies geschieht im sog. Individualisierungs-komplex, der aus Membran- und Cytoskelettkomponenten besteht und am Kopfende des Bündels zusammengesetzt wird (Fabrizio *et al.*, 1998, Hicks *et al.*, 1999). Er wandert an den Flagellen entlang und schiebt dabei überschüssiges Cytoplasma bzw. Zellorganellen vor sich her. Dabei wird auch ein Großteil der axonemalen Scheide entfernt (Lindsley & Tokuyasu, 1980). Der Fortschritt dieses Vorgangs läßt sich verfolgen, da das Spermatidenbündel an dieser Stelle eine Ausdehnung („cystic bulge“) aufweist. Die überflüssigen Spermatidenkomponenten werden schließlich über die Flagellenenden hinaus in eine taschenartige Ausstülpung der Schwanzcystenzelle befördert, die als „waste bag“ bezeichnet wird (Lindsley & Tokuyasu, 1980). Die Entfernung der Cystenzellen und die Freisetzung der differenzierten Keimzellen wird dadurch eingeleitet, daß die Kopfcystenzelle von einer Terminalepithelzelle an der Hodenschlauchbasis umschlossen

wird (Tokuyasu *et al.*, 1972). Dies ermöglicht eine Verankerung der Spermienköpfe. Wenn sich die Flagellen der Keimzellen anschließend aufwinden, wird die Schwanzcystenzelle entfernt und die reifen Spermien gelangen in die Samenblase. Die Cystenzellen und der Inhalt des „waste bags“ wird von den Zellen des Terminalepithels aufgenommen und abgebaut.

Der gesamte Prozeß, von der Stammzellteilung bis zur Differenzierung der Zellen zu reifen Spermien nimmt etwa 10,5 Tage in Anspruch. Bereits im ersten larvalen Stadium liegen mehr als 30 Spermatogonien in der Gonadenanlage vor (Bodenstein, 1950). Im adulten Wildtypen sind ständig alle verschiedenen Spermatogenesestadien vertreten, dabei sind manche aufgrund ihrer kürzeren Dauer allerdings weniger zahlreich als andere (Fuller, 1993).

Die Spermatogenese von *Drosophila* wurde zwar bereits vor mehr als 20 Jahren auf morphologischer Ebene detailliert beschrieben, hierbei sind die bereits zitierten ultrastrukturellen Studien von Lindsley und Tokuyasu (1980) besonders hervorzuheben, dennoch ist relativ wenig über die genetische Kontrolle der Keimzellendifferenzierung bekannt. Nach Auswertung der Daten des *Drosophila*-Genom-Projektes geht man davon aus, daß die Taufliege über etwa 13.600 Gene verfügt (Adams *et al.*, 2000); die Anzahl derer, die zu männchensterilen Allelen mutiert werden können, wird dabei auf ca. 1500 geschätzt (Hackstein *et al.*, 2000). Mit der fast vollständigen Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms wurden lediglich Rohdaten für die Genanalyse gewonnen. Nach wie vor bleibt die Mutagenese ein unverzichtbares Werkzeug für die Analyse der Funktion von Genen. Hierfür bedient man sich der ursprünglich auf ein Transposon zurückgehenden P-Element-induzierten Mutagenese.

Das natürlicherweise in *Drosophila* auftretende P-Element ist etwa 2,9 kb groß (O'Hare & Rubin, 1983) und besteht aus dem für das Enzym Transposase kodierenden Gen, das am 5'- und am 3'-Ende eine jeweils 31 bp umfassende invertierte Wiederholung („inverted repeats“) aufweist. Die Transposase ermöglicht das Herausspringen bzw. die Insertion des P-Elementes an beliebigen Stellen im *Drosophila*-Genom, was das Auftreten von Mutationen zur Folge haben kann. Die P-Sequenzen werden sowohl in Keimbahn- als auch Somazellen transkribiert, die Transposition von natürlichen P-Elementen ist jedoch strikt auf die Keimbahn begrenzt, da nur dort das korrekte Spleißen der Transposase-mRNA möglich ist (Laski *et al.*, 1986). Bei der künstlich induzierten P-Element-Mutagenese wird

ein verändertes Transposase-Gen verwendet, das in allen Zelltypen funktionstüchtige Transposase bilden kann (Robertson *et al.*, 1988). Die eingesetzten P-Vektoren bestehen im allgemeinen aus einem bakteriellen Plasmid, dem mini-*white*<sup>+</sup>-Gen (Pirota, 1988) und dem für die  $\beta$ -Galaktosidase von *E. coli* kodierenden *lacZ*-Gen (Abb. 3). Die Enden des P-Vektors weisen die invertierten Wiederholungen des ursprünglichen P-Elementes auf, die von der Transposase erkannt werden und deren Gegenwart Voraussetzung für die Insertion bzw. Transposition ist. Das *white*-Gen kodiert ein Protein, das im Wildtyp an der Einlagerung der Farbpigmente in die Ommatidien beteiligt ist (Ewart *et al.*, 1994). Ausgangspunkt für das Mutagenese-Experiment bilden bereits bestehende P-Insertionslinien, die durch Keimbahn-transformation (Rubin & Spradling 1982; Spradling & Rubin, 1982) eines *white*-defekten Stammes erzeugt worden sind.



**Abb. 3: Aufbau von *P{lwB}* (Klemenz *et al.* 1987), einem für die P-Element-Mutagenese/„enhancer trap“-Methode geeigneten P-Vektor.**

grün: invertierte Wiederholungen, weiß: Bluescript-Vektor, rot: *white*<sup>+</sup>-Gen von *Drosophila*, blau: für die  $\beta$ -Galaktosidase von *E. coli* kodierendes Gen unter Kontrolle eines Minimalpromotors. Am 5'-Ende des Bluescript-Vektors befinden sich mehrere singuläre Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen: PI = *Pst*I, SI = *Sal*I, XI = *Xho*I, SII = *Sac*II. Weitere Schnittstellen werden nicht berücksichtigt.

Auf diese Weise kann die Gegenwart eines im Genom integrierten P-Elementes anhand der roten Augenfarbe indirekt nachgewiesen werden. Die zur Entstehung von Mutationen führende Transposase-Aktivität wird durch Einkreuzen eines „jump starter“-Chromosoms (Robertson *et al.*, 1988) bereitgestellt. Dieses trägt ein defektes P-Element, das konstitutiv Transposase exprimiert. Da ihm ein Teil der invertierten Wiederholungen fehlt, ist es selbst unbeweglich und kann nach der Erzeugung neuer Mutanten durch Kreuzung wieder entfernt werden.

In der Praxis werden Weibchen von X-chromosomalen Insertionslinien mit Männchen gekreuzt, die das „jump starter“-Chromosom aufweisen. Innerhalb der Keimbahn

derjenigen F1-Männchen, die sowohl den P-Vektor als auch das defekte P-Element enthalten, werden Transpositionen ausgelöst. Diese Tiere werden mit weißäugigen Weibchen gepaart. Aus dieser Kreuzung hervorgehende rotäugige Männchen müssen eine autosomale P-Element-Integration aufweisen, da der X-chromosomale P-Vektor beim Ausbleiben der Transposition an die Töchter vererbt wird. Das Anlegen von Einzelpaarzuchten führt dann zur Etablierung von neuen P-Element-Insertionslinien, die auf bestimmte Phänotypen wie etwa männliche Sterilität überprüft werden können.

Das im P-Vektor enthaltene *lacZ*-Gen wird dazu genutzt, Hinweise über das Expressionsmuster des durch die Insertion betroffenen Gens zu gewinnen. In diesem Zusammenhang spricht man von den P-Element-Insertionslinien auch als „enhancer trap“-Linien. Für diesen Zweck wurde das *lacZ*-Gen mit dem Minimal-Promotor des Transposase-Gens fusioniert (Bellen *et al.*, 1989, Bier *et al.*, 1989). Da es sich dabei um einen relativ schwachen Promotor handelt, kann das *lacZ*-Gen nur aktiviert werden, wenn es von auf die Insertionsstelle wirkenden Promotor- oder Enhancer-Elementen beeinflusst wird. Sollte dies der Fall sein, wird das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase synthetisiert, das durch eine Färbemethode im Gewebe nachgewiesen werden kann (Glaser *et al.*, 1986).

Im Gegensatz zur chemischen Mutagenisierung mit Ethylmethylsulfonat ermöglichen P-Vektoren eine relativ unkomplizierte Lokalisierung des Mutationsortes. Der Plasmidanteil im P-Vektor wird auf der 5'-Seite von Schnittstellen spezifischer Restriktionsendonukleasen begrenzt, die innerhalb der Plasmidsequenz kein weiteres Mal vorhanden sind (Abb. 3). Dies erlaubt die Klonierung 5'-flankierender genomischer Regionen durch „plasmid rescue“ (Hamilton *et al.*, 1991, Bellen *et al.*, 1988), andererseits können sowohl 5' als auch 3' angrenzende Sequenzen durch PCR-Techniken isoliert werden (Rudenko *et al.*, 1993, Sentry & Kaiser, 1994).

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe männchensteriler P-Element-Insertionslinien mit dem Ziel der Identifizierung weiterer Gene untersucht, die für die männliche Fertilität von *Drosophila* notwendig sind und die spermatogenesespezifisch exprimiert werden. Dies beinhaltete neben der Analyse des Phänotyps und des „enhancer trap“-Musters die Klonierung und Sequenzierung der benachbart zum P-Element liegenden genomischen Sequenzen. Diese Arbeit befaßt sich mit der eingehenden Untersuchung einer Linie, bei der die P-Element-Insertion ein unbekanntes Gen betrifft, das hodenspezifisch exprimiert wird. Der Phänotyp der sterilen Männchen deutete auf eine Aufgabe des Gens

während der postmeiotischen Differenzierungsprozesse hin. Es sollte der Nachweis erbracht werden, daß das betroffene Gen für die Produktion von funktionstüchtigen Spermien erforderlich ist. Um Rückschlüsse auf die Rolle des Gens ziehen zu können, sollte seine zeitliche und räumliche Expression, mit Schwerpunkt auf der Aufklärung der subzellulären Verteilung des kodierten Proteins, anhand verschiedener Methoden detailliert analysiert werden.

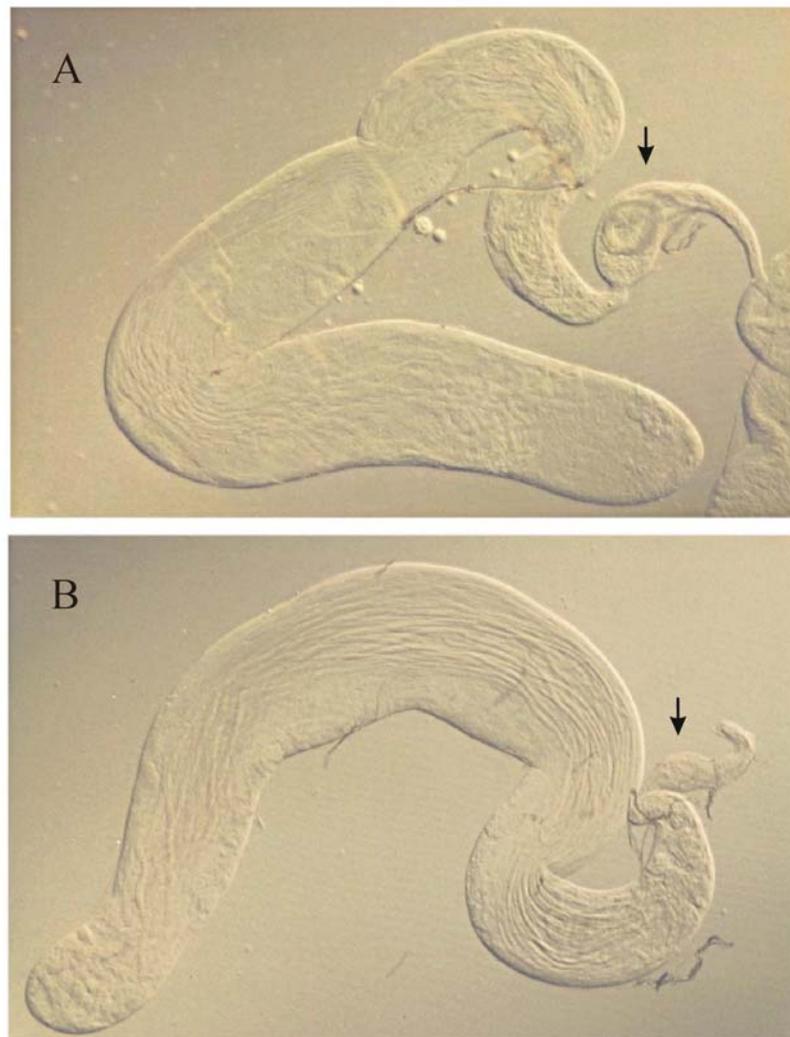
## II. Ergebnisse

### 2.1 Phänotyp der P-Element-Insertionslinie $fan^P$ und der Remobilisierungslinien $fan^{Jo2}$ und $fan^{Jo6}$ : Homozygote Männchen dieser Linien zeigen degenerierende Spermatidenbündel und sind steril

Neben der P-Element-Insertionslinie  $fan^P$  standen zwei davon abgeleitete Linien für die Analyse zur Verfügung:  $fan^{Jo2}$  und  $fan^{Jo6}$ . Sie waren durch Remobilisierung des P-Elementes in einem „Jump out“-Experiment erzeugt worden (M. Hollmann, unpubl.) und sind wie die Insertionslinie männchensteril. Die Remobilisierung führte außerdem zum Auftreten von Revertanten (M. Hollmann, persönl. Mitt.), was Integration des Transposons und Sterilität in ursächlichen Zusammenhang stellt. Da sich die Mutation durch Kreuzung von P-Element-Insertionslinie und Remobilisierungslinien nicht komplementieren läßt, sind die Linien zueinander allel.

Beim lichtmikroskopischen Vergleich zwischen Testes von frischgeschlüpften Wildtyp-Männchen und homozygoten Männchen der drei mutierten Linien können zunächst keine Unterschiede festgestellt werden. Die Hodenmorphologie der Mutanten ist völlig normal. Die Verteilung der Cysten von runden, prämeiotischen Stadien an der Spitze bis zu elongierten postmeiotischen Stadien im Hodenlumen entspricht der Wildtyp-Situation. Einige Tage nach dem Schlüpfen sind die Samenblasen von Wildtyp-Männchen angefüllt mit reifen Spermien, deren Flagellen in der Nomarski-Optik als fädige Strukturen zu erkennen sind (Abb. 4A, Pfeil).

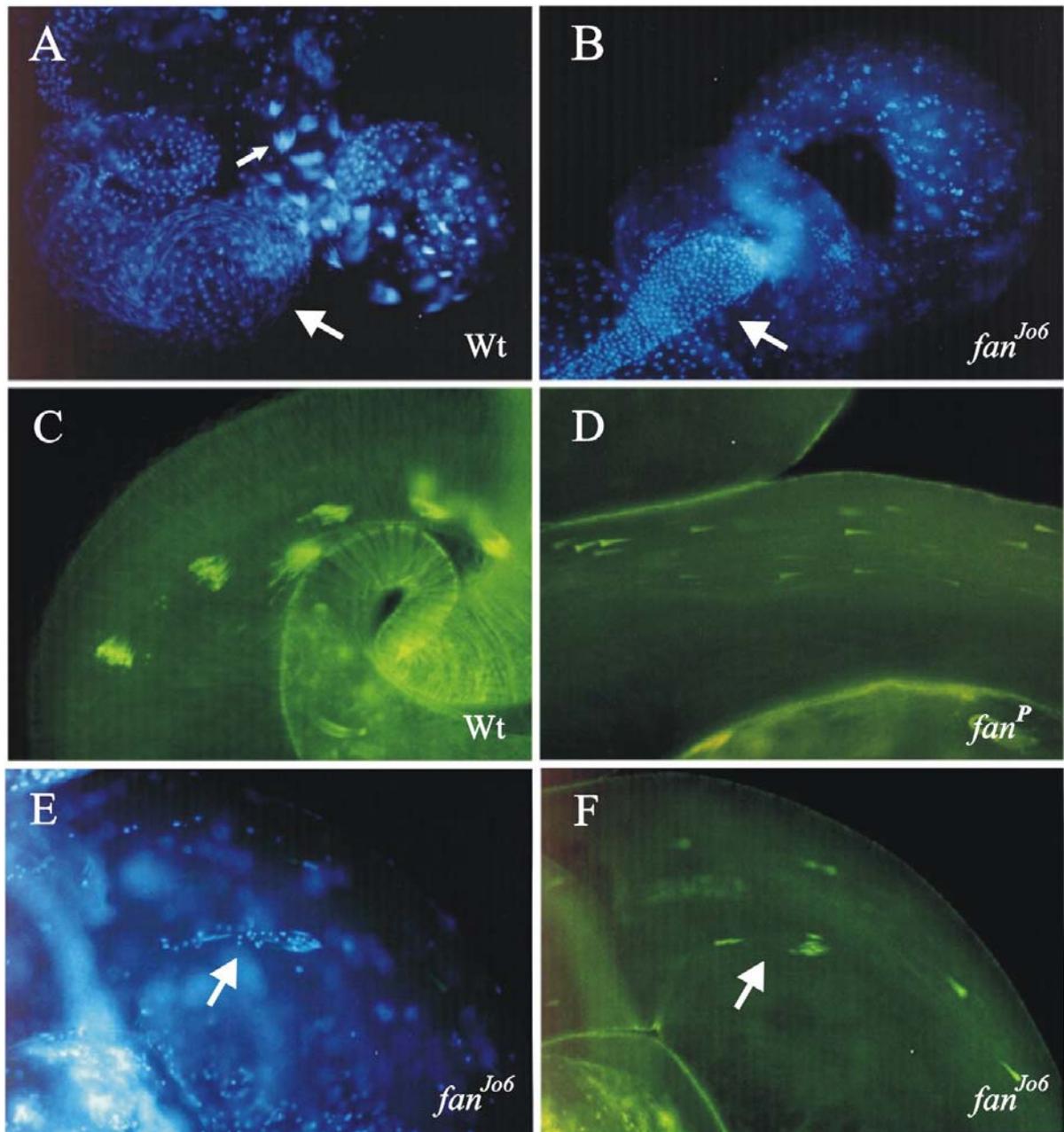
Durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258, der DNA nachweist, werden die gleichmäßig verteilten strichförmigen Kerne der Spermien sichtbar (Abb. 5A, gr. Pfeil). Die Samenblasen der P-Element-Insertionslinie und der beiden Remobilisierungslinien bleiben dagegen leer (Abb. 4B). Die elongierten Stadien im Lumen des Hodenschlauches sind sowohl beim Wildtyp als auch bei der P-Element-Insertionslinie deutlich zu erkennen (Abb. 4A und B). Im unteren Teil des Hodenschlauches, im Bereich vor dem Terminalepithel, häufen sich bei den drei mutierten Linien mit zunehmendem Alter der Männchen degenerierende Spermatidenbündel an. Lichtmikroskopisch sichtbare Beeinträchtigungen der Keimzellen können also erst deutlich nach der Meiose beobachtet werden.



**Abb. 4: Nomarski-Aufnahme eines Wildtyp-Hodenschlauchs (A) im Vergleich zu einem Hodenschlauch der P-Element-Insertionslinie (B).**

Im Gegensatz zu der Mutante ist die Samenblase des Wildtyps mit reifen und beweglichen Spermien gefüllt.

Die Hoechstfärbung zeigt, daß im Fall der P-Element-Insertionslinie und der Remobilisierungslinien nur ein Teil der 64 Zellkerne jedes Spermatidenbündels elongiert, während der andere Teil eine kompakte, runde Kernform aufweist (Abb. 5E). Im Wildtyp liegen die nadelförmigen Kerne eines Bündels parallel nebeneinander und erscheinen in der Hoechstfärbung als quastenförmige Anordnung (Abb. 5A, kl. Pfeil). Mit Hilfe von FITC-gekoppeltem Phalloidin, welches F-Aktin nachweist, kann ein Teil des Individualisierungskomplexes, der „investment cone“ (Fabrizio *et al.*, 1998), sichtbar gemacht werden. Normalerweise wird pro Spermatide ein „investment cone“ gebildet, der den Zellkern anfänglich wie ein Trichter umschließt.



**Abb. 5: DNA- bzw. Aktinnachweis in männlichen Gonaden des Wildtyps und der Mutanten.**  
 A, B und E: Der DNA-Nachweis mit Hoechst 33258 macht die Zellkerne sichtbar. C, D und F: Anfärbung der aktinhaltigen „investment cones“ mit Hilfe von FITC-gekoppeltem Phalloidin. A und B zeigen jeweils den unteren Abschnitt eines Hodenschlauchs mit der daran anschließenden Samenblase, die im Wildtyp (A) mit beweglichen Spermien gefüllt ist. C-F stellen Detailaufnahmen aus Hodenschläuchen dar: Wt = Wildtyp,  $fan^P$  = P-Element-Insertionslinie,  $fan^{Jo6}$  = Remobilisierungslinie 6.

Das Fortschreiten der Individualisierung kann anhand der Wanderung der Kegel verfolgt werden, die sich in Richtung Flagellenenden bewegen. Im Gegensatz zu den parallel angeordneten Strukturen im Wildtyp Hoden (Abb. 5C) finden sich bei der P-Element-Insertionslinie und den Remobilisierungslinien ausnahmslos verstreut liegende oder degenerierte „investment cones“ (Abb. 5D und F). Den in Abb. 5D gezeigten „investment cones“ konnten in der Gegenfärbung mit Hoechst keine Zellkerne zugeordnet werden, d.h., sie sind bereits von ihnen entfernt. Außerdem ist ihre Anzahl pro Spermatidenbündel reduziert. Diejenigen Kerne, die nicht nadelförmig sind, haben keine „investment cones“ erhalten (vergl. Abb. 5E und F).

## **2.2 Die P-Element-Insertionslinie zeigt $\beta$ -Galaktosidase-Expression in den männlichen Keimzellen**

Das für die Mutagenese verwendete P-Element, *P{IwB}* (Klemenz, 1987), enthält das *lacZ*-Gen, welches in diesem Fall unter der Kontrolle des Transposase-Minimalpromotors (O’Kane & Gehring, 1987) liegt. Damit kann seine Transkription erst durch den Einfluß von Promotor- oder Enhancer-Elementen aktiviert werden, die sich in der Nähe der Insertionsstelle befinden. Durch den Nachweis des vom *lacZ*-Gen kodierten Enzyms, der  $\beta$ -Galaktosidase, kann ein Hinweis über die Expression des durch die Insertion betroffenen Gens gewonnen werden. Dabei sorgt ein aus der Fusion mit dem Transposase-Promotor resultierendes Signalpeptid dafür, daß die  $\beta$ -Galaktosidase in den Kern der jeweiligen Zellen transportiert wird (O’Kane & Gehring, 1987). Larvale und adulte Hoden der P-Element-Insertionslinie wurden auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität überprüft. Verteilung und Größe der gefärbten Kerne im adulten Hoden lassen darauf schließen, daß das Reportergen in den Keimzellen und nicht den somatischen Cystenzellen oder Zellen der Hodenhülle exprimiert wird (Abb. 6B). Im adulten Hodenschlauch sind alle verschiedenen Spermatogenesestadien vertreten. Im Gegensatz zu den Kernen somatischer Zellen ändern sich Form und Durchmesser der Kerne reifender Keimzellen auf charakteristische Weise. Die apikalen Enden der Hodenschläuche, die die Stammzellen und die somatischen Zellen des „hub“ enthalten, zeigen keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Dies gilt auch für den entsprechenden Bereich im larvalen Hoden (Pfeil in Abb. 6A). Auch frühe Cysten, die Spermatogonien enthalten und sich im Bereich nahe der Hodenspitze befinden, weisen meistens noch keine Färbung auf (Abb. 6B). Eine starke  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wird dagegen in Cysten festgestellt, die primäre bzw. sekundäre Spermatocyten enthalten

(letztere gehen aus der Meiose I hervor). Durch Abzählen können benachbarte gleichgeformte Kerne dabei zum Teil einzelnen Cysten zugeordnet werden: Cysten mit 16 Zellen repräsentieren primäre Spermatocyten, 32-Zell-Cysten dagegen sekundäre Spermatocyten. Mit zunehmender Färbungsdauer kann auch in postmeiotischen Stadien  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität beobachtet werden. Die Diffusion des Farbstoffes führt schließlich dazu, daß der gesamte Hodenschlauch mit Ausnahme der Spitze gefärbt wird.

Im Gegensatz zum adulten Organ weist das larvale Organ nur prämeiotische Spermatogenesestadien auf, daher ist die beobachtete Färbung wohl auf  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Cysten, die Spermatogonien und primäre Spermatocyten enthalten, zurückzuführen.



**Abb. 6:  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis im larvalen (A) und adulten (B) Hoden der P-Element-Insertionslinie.**

Das im P-Vektor enthaltene *lacZ*-Gen kann durch Promotor-/Enhancer-Elemente aktiviert werden, die in der Nähe der Insertionsstelle liegen. Im Fall der P-Element-Insertionslinie *fan<sup>P</sup>* wird  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in den Keimzellen festgestellt.

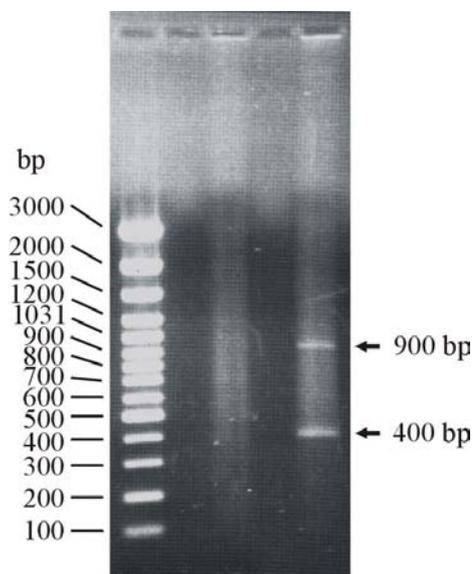
### 2.3 Der Insertionsort des P-Elements liegt in Region 66C

Die Insertionsstelle des P-Elementes und damit die Lage des betroffenen Gens wurde durch *in situ*-Hybridisierung auf Polytäanchrosomen der Speicheldrüsen bestimmt. Da das verwendete P-Element, *P{lwB}* (Klemenz, 1987), neben dem *lacZ*-Gen eine Kopie des *mini-white<sup>+</sup>*-Gens (Pirota, 1988) enthält, das für die rote Augenfarbe der transgenen Tiere verantwortlich ist, wurde hierfür eine Digoxigenin-markierte *white*-Sonde verwendet. Dadurch ist auch eine Positiv-Kontrolle über die Hybridisierung mit dem auf dem X-Chromosom befindlichen *white*-Gen möglich. Die Insertionsstelle befindet sich auf dem

ritten Chromosom in der Region 66. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde die P-Element-Insertionslinie mit den Defizienzstämmen Df(3L)66C-G28 und Df(3L)pbl-X1 gekreuzt, die chromosomale Deletionen zwischen 66B8-9 und 66C9-10 bzw. 65F3 und 66B10 (Coyne, 1996, Deak *et al.*, 1997) aufweisen. Im Fall von Df(3L)66C-G28 konnte dabei keine Komplementation erzielt werden, was den Integrationsort des P-Elementes in Region 66C bestätigt.

#### 2.4 Klonierung der das P-Element flankierenden genomischen Bereiche: Die Insertionsstelle liegt 8 nt stromaufwärts vom offenen Leseraster eines neuen Gens

Die Klonierung der an das P-Element angrenzenden genomischen Sequenzen wurde mittels „supported-PCR“ (sPCR, Rudenko *et al.*, 1993) durchgeführt. Als Matrize diente DNA, die aus homozygoten Tieren der P-Element-Insertionslinie isoliert und anschließend mit der Restriktionsendonuklease *DraI* gespalten worden war. Auf diese Weise wurden zwei Fragmente, etwa 0,4 kb (5'-Seite) bzw. 0,9 kb (3'-Seite) groß (Abb. 7), amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert (sPCR-Klon 52, *DraI* groß und 38, *DraI* klein).



**Abb. 7: Auftrennung der sPCR-Produkte im Agarosegel.**

Die sPCR auf *DraI*-geschnittener DNA aus Männchen der P-Element-Insertionslinie führte zu zwei Produkten mit einer Größe von 400 bp bzw. 900 bp (rechte Spur). Als Längenstandard wurde die 100 bp-Leiter verwendet (linke Spur). Die mittlere Spur zeigt unspezifische PCR-Produkte, die bei Verwendung einer höheren  $MgCl_2$ -Konzentration im Reaktionsansatz entstanden.

Die Sequenzierung dieser beiden Klone zeigte, daß das größere Fragment ein offenes Leseraster von 654 nt aufweist. Die P-Element-Insertionsstelle befindet sich in

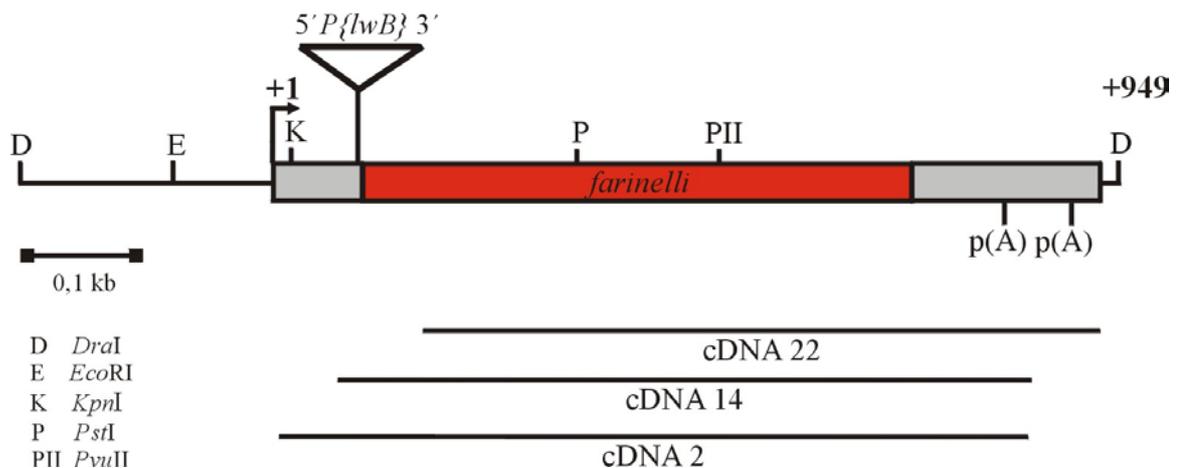
unmittelbarer Nähe eines Translationsstarts: Das 3'-Ende des P-Elementes liegt acht Nukleotide stromaufwärts vom ATG-Codon (Abb. 8). 71 bzw. 135 nt stromabwärts vom Stop-Codon folgen zwei mögliche Polyadenylierungssignale.

Ein Vergleich der genomischen Sequenz mit den Daten aus der NCBI (National Center of Biotechnology Information)- sowie der BDGP (Berkeley *Drosophila* Genome Project)-Datenbank (Altschul *et al.*, 1990, Adams *et al.*, 2000) ergab zunächst keinerlei Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen. Das betroffene Gen war demnach noch unbekannt und wurde *farinelli* (*fan*) getauft. Seit Januar 2000 ist die Sequenz eines Celera-Klons zugänglich, der *farinelli* enthält (AC020539, GI: 6664358). Im August 2000 wurde *farinelli* unter der Nummer AF280798 in der NCBI-Datenbank eingetragen.

## 2.5 Analyse von cDNA-Klonen: Das *farinelli*-Gen enthält keine Introns

Die sPCR-Klone 52 und 38 wurden als Sonden eingesetzt, um Klone aus zwei verschiedenen Testis-cDNA-Banken zu isolieren: einer Lambda ZAP II-Bank (Herstellung unter Verwendung von „random primers“ und oligo-(dT)-Primer) und einer  $\lambda$  pSCREEN-1b-Bank (mit Hilfe von oligo(dT)-(dN)<sub>3</sub>-Primern hergestellt). Es konnten insgesamt drei Klone identifiziert werden, die Sequenzidentität mit den genomischen Klonen aufweisen: cDNA 14 und 22 aus der Lambda ZAP II-Bank und cDNA 2 aus der  $\lambda$  pSCREEN-1b-Bank. Aufgrund der unterschiedlichen Länge der cDNAs und dem Fehlen eines poly(A)-Schwanzes läßt sich schließen, daß kein Klon dem Vollängen-Transkript entspricht.

Die cDNA 2 endet von allen Klonen am weitesten stromaufwärts vom Translationsstart und deckt einen 5'-UTR-Bereich von 123 nt ab. An den Positionen +857 bis +862 und +921 bis +926 (relativ zum durch den Beginn von cDNA 2 festgesetzten Transkriptionsstart) befinden sich Polyadenylierungssignale. Die cDNA 22 erstreckt sich 23 nt über das zweite Polyadenylierungssignal hinaus, dadurch ergibt sich ein 3'-UTR-Bereich von 167 nt. Der Abstand zwischen den Enden der cDNAs 14 und 22 und dem ersten bzw. zweiten Polyadenylierungssignal ist vereinbar mit dem allgemein ermittelten Abstand zwischen dem Polyadenylierungssignal und der Stelle, an der die poly(A)-Polymerase mit dem Ansynthetisieren der Adenosinreste beginnt (Proudfoot & Brownlee, 1976). Dies spricht dafür, daß diese Polyadenylierungssignale tatsächlich genutzt werden könnten.



**Abb. 8: Schematische Darstellung der durch Hybridisierung mit den sPCR-Klonen isolierten cDNAs.**

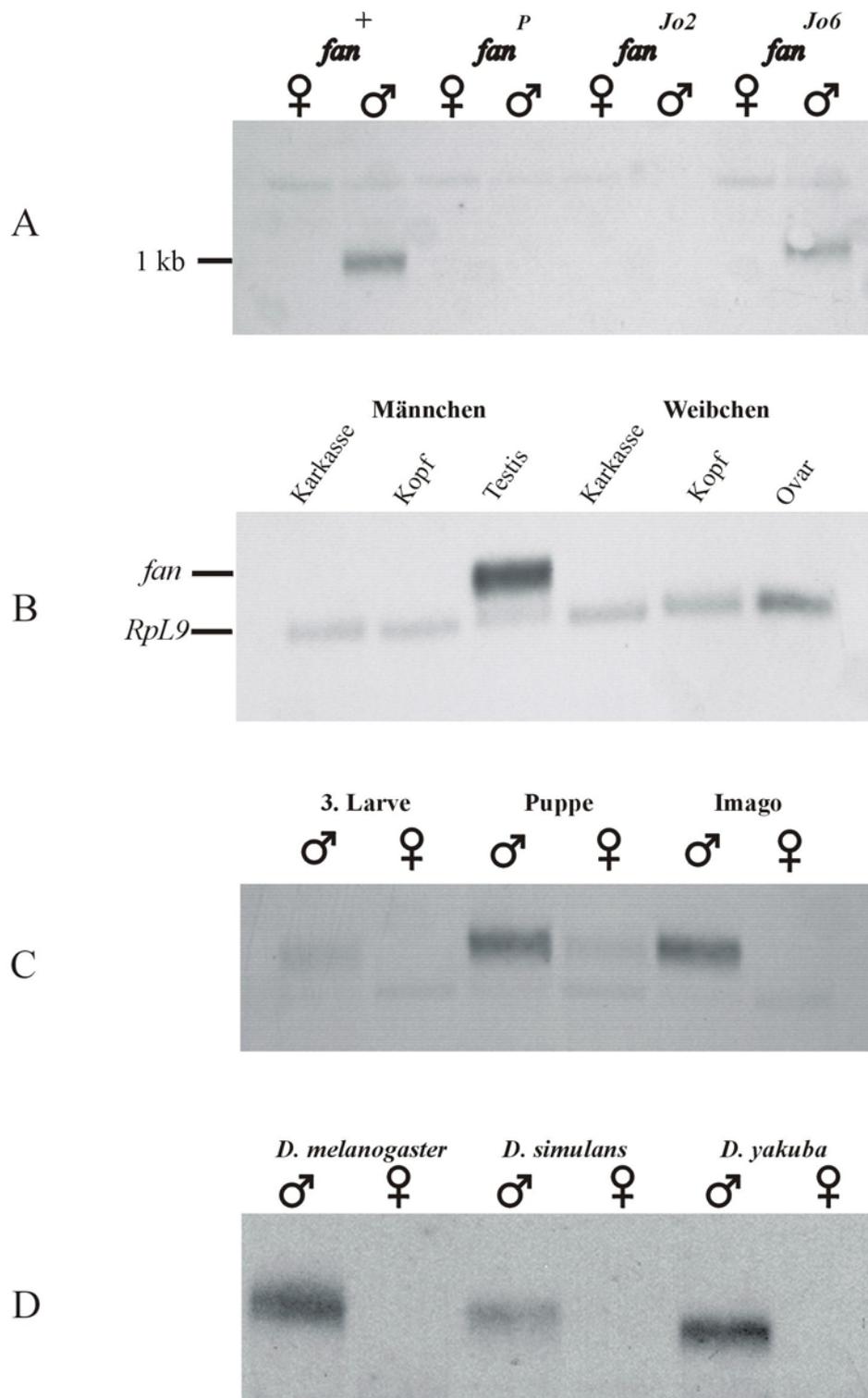
Der offene Leserahmen des *farinelli*-Gens ist als roter Balken wiedergegeben, die untranslatierten Regionen sind grau gekennzeichnet. p(A) gibt die Position eines möglichen Polyadenylierungssignals wieder.

Insgesamt umfassen die cDNA-Klone einen Bereich von 949 nt. Da die durch Northern Blots nachgewiesene mRNA etwa 1 kb groß ist (Abb. 9), sollte diese Sequenz nahezu der des Vollängen-Transkripts entsprechen. Der Vergleich der cDNAs mit der genomischen Sequenz zeigt, daß das kodierte Gen nur aus einem Exon besteht.

## 2.6 Northern Blot-Analyse: *farinelli* wird ausschließlich in den männlichen Gonaden von *Drosophila* transkribiert

Der 0,9 kb sPCR-Klon wurde als Sonde für eine Northern Blot-Analyse mit poly(A)-mRNA eingesetzt. Im Wildtyp konnte eine männchenspezifische, ca. 1 kb große mRNA nachgewiesen werden (Abb. 9A). Homozygote Männchen der Remobilisierungslinie *fan*<sup>Jo6</sup> zeigen eine geringfügig größere mRNA-Species, die auch von etwas geringerer Abundanz ist. Im Fall von homozygoten Männchen der P-Element-Insertionslinie *fan*<sup>P</sup> und der Linie *fan*<sup>Jo2</sup> tritt die entsprechende mRNA nicht auf (Abb. 9A).

Für weitere Northern Blot-Hybridisierungen wurde die cDNA 14 verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, daß die *fan*-mRNA testisspezifisch exprimiert wird (Abb. 9B). Geringe Mengen an *fan*-mRNA sind bereits in männlichen Larven des dritten Stadiums nachweisbar.



**Abb. 9: Northern Blot-Hybridisierungen zur Analyse der *fan*-Expression.**

**A:** Hybridisierung mit sPCR-Klon 52, *Dra*I groß, auf poly(A)-mRNA aus dem Wildtyp und aus den mutanten Linien. **B:** Hybridisierung mit cDNA 14 auf Gesamt-mRNA aus verschiedenen Geweben. Anschließend wurde zur Beladungskontrolle eine Hybridisierung mit einer Sonde für das ribosomale Protein RpL9 (Schmidt *et al.*, 1996) durchgeführt.

**C:** Hybridisierung mit cDNA 14 auf poly(A)-mRNA aus dem 3. Larvenstadium, Puppe und Imago. **D:** Hybridisierung mit sPCR-Klon 52, *Dra*I groß, auf poly(A) mRNA aus *D. melanogaster*, *D. simulans* und *D. yakuba* Imagines.

Puppen und adulte Männchen enthalten deutlich größere Mengen an *fan*-Transkripten (Abb. 9C).

*fan*-mRNA konnte durch Northern Blots außerdem in Männchen der beiden *Drosophila*-Species *D. simulans* und *D. yakuba* nachgewiesen werden (siehe Abb. 9D). Die mit der Sonde hybridisierenden Transkripte unterscheiden sich dabei geringfügig in ihrer Länge: *Drosophila melanogaster* weist die längste *fan*-mRNA auf, *Drosophila yakuba* die kürzeste.

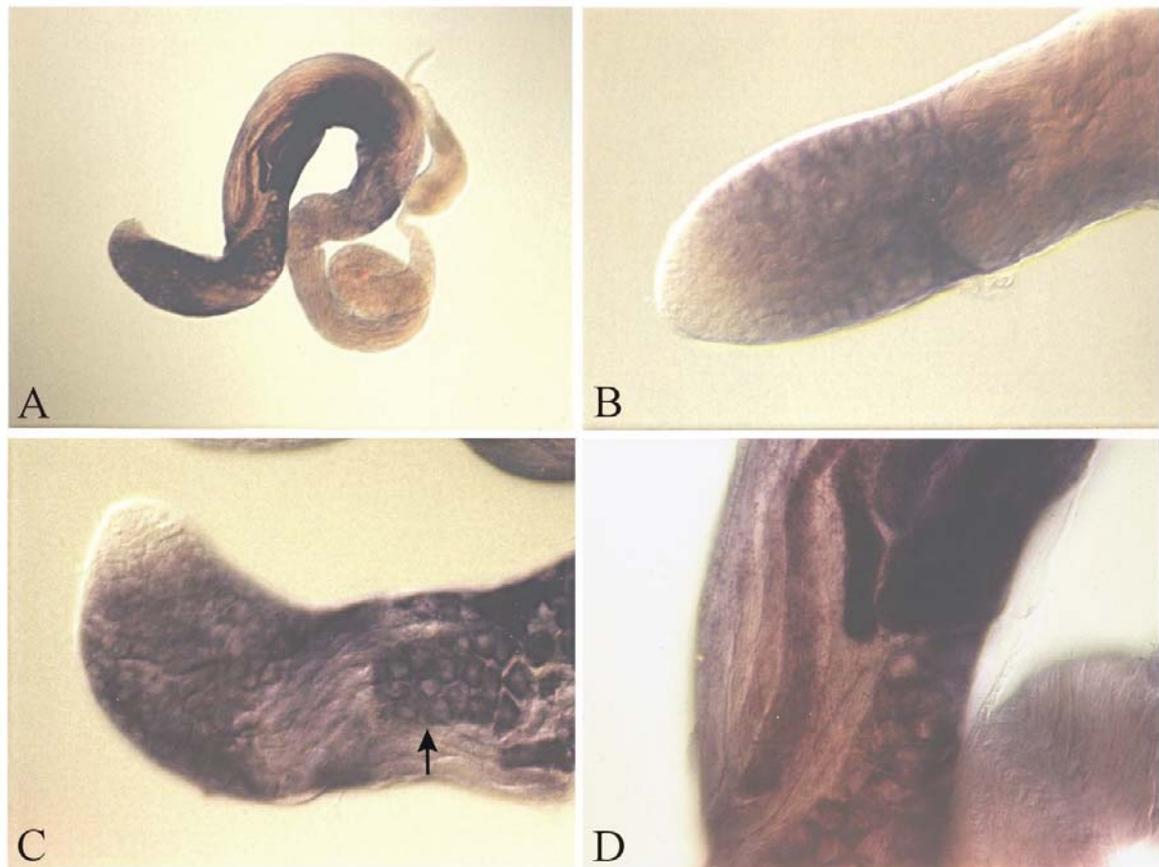
Man schätzt, daß *D. melanogaster* und *D. simulans* vor ca. 2,5 Millionen aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgegangen sind; die Abspaltung von *Drosophila yakuba* liegt dagegen weiter zurück und wird auf einen Zeitpunkt vor ca. 10 Millionen Jahren datiert (Schmid & Tautz, 1997). Im Fall von weiter entfernt verwandten Arten wie *D. erecta*, *D. eohydei*, *D. hydei* und *D. virilis* konnte durch Northern Blot-Hybridisierung kein Hinweis auf Expression und damit Existenz des *fan*-Gens gewonnen werden.

Die Analyse von RNA aus verschiedenen Mausgeweben (P. Burfeind, persönl. Mitt.) sowie die Hybridisierung eines Southern Blots, der *Eco*RI gespaltene DNA aus Mensch, Rhesusaffe, Huhn und *Caenorhabditis* aufwies, führten zu keinen positiven Ergebnissen.

### **2.7 In situ-Hybridisierung: *fan*-mRNA akkumuliert im Cytoplasma primärer Spermatozyten**

Die Expression der *fan*-mRNA im Wildtyphoden wurde mit Hilfe einer Digoxigeninmarkierten Sonde untersucht, für deren Herstellung cDNA 14 als Matrize verwendet worden war. Das beobachtete Muster entspricht im Wesentlichen dem der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität der Enhancer-Trap-Linie: So konnte in den Stammzellen und den Zellen des „hub“ keine Färbung beobachtet werden (Abb. 10A, B und C). *fan*-mRNA wird zuerst in den Spermatogonien nachgewiesen, die unterhalb der Stammzellen, nahe der Hodenspitze, lokalisiert sind (Abb. 10B).

Im Cytoplasma primärer Spermatozyten, die von allen Spermatogenesestadien das größte Volumen aufweisen und hochaktiv Transkription und Translation betreiben, ist die Akkumulation der *fan*-mRNA besonders gut erkennbar (Abb. 10C). Das Transkript scheint bald nach Beendigung der Meiose zu degradieren, denn es wiesen nur wenige Spermatischenbündel eine Färbung auf (Abb. 10D).



**Abb. 10: *In situ*-Hybridisierung an ganzen Hodenschläuchen von Wildtyp-Männchen.**

**A:** Gesamtansicht Hodenschlauch. **B:** Beginnende Akkumulation von *fan*-mRNA in Spermatogonien. **C:** Starke Akkumulation von *fan*-mRNA in einer Cyste mit primären Spermatocyten (Pfeil). **D:** Nur wenige Spermatidenbündel weisen zu Beginn der Elongationsphase *fan*-Transkripte auf.

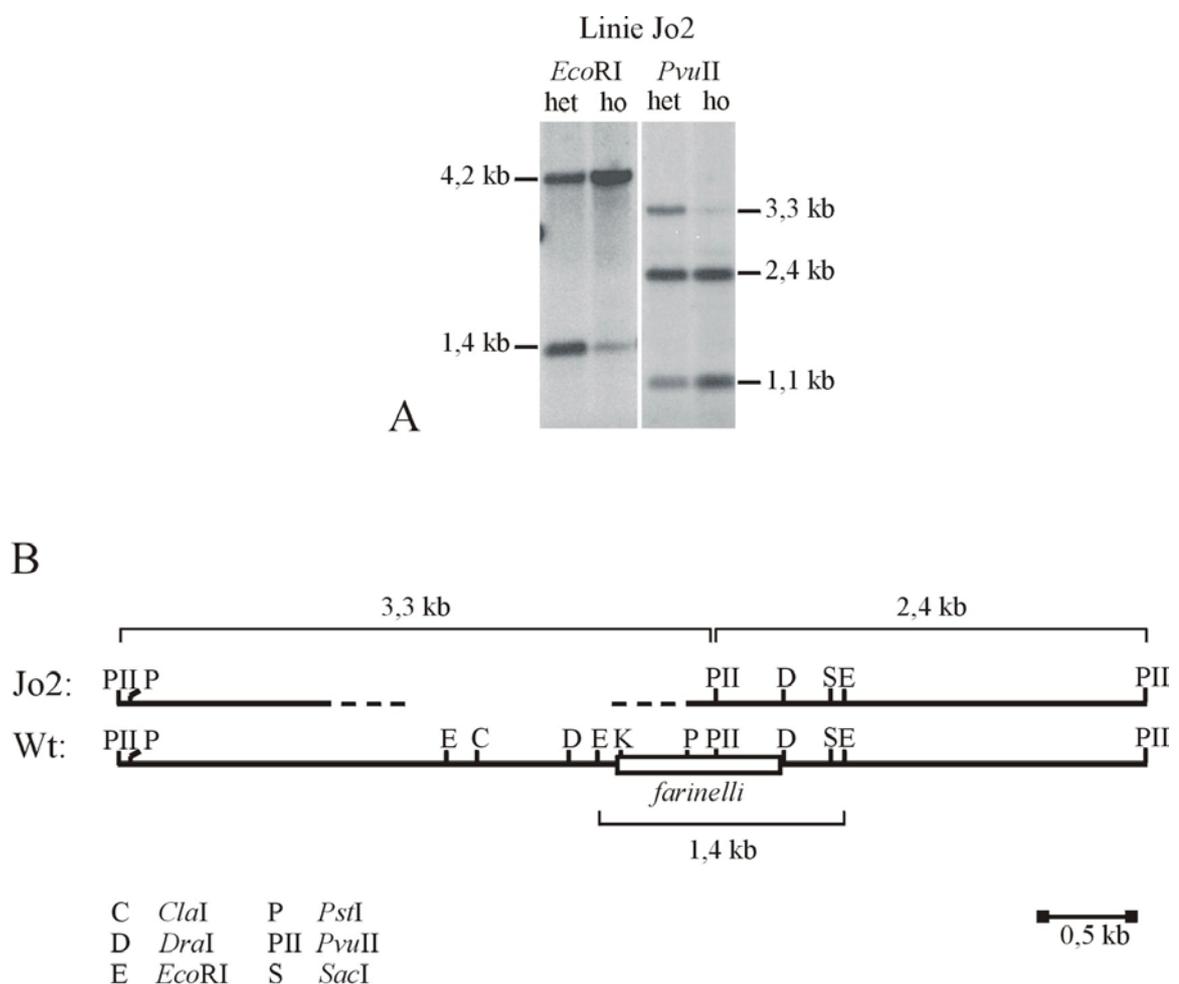
## 2.8 Während in Linie *fan*<sup>Jo6</sup> P-Element-Reste zurückgeblieben sind, wurden in Linie *fan*<sup>Jo2</sup> benachbarte genomische Bereiche zusätzlich deletiert

Wie zuvor durch einen Northern Blot gezeigt werden konnte, weisen homozygote *fan*<sup>Jo6</sup>-Männchen eine mRNA-Species auf, die im Vergleich zum Wildtyp-*fan*-Transkript geringfügig länger erscheint. Dies legt die Vermutung nahe, daß durch unsaubere Reparatur der Exzisionsstelle P-Element-Sequenzen an der Insertionsstelle zurückgeblieben sind. Um dies genauer überprüfen zu können, wurde der betroffene Abschnitt kloniert. Hierfür wurde eine PCR auf genomischer DNA aus homozygoten *fan*<sup>Jo6</sup>-Tieren durchgeführt. Das verwendete Primerpaar (5' fus primer / MH3.3, siehe 7.1) umfaßt im Wildtyp einen Bereich von etwa 930 nt. Er repräsentiert, abgesehen von 58 Nukleotiden, stromaufwärts vom offenen Leseraster liegende Sequenzen.

Die Sequenzierung des resultierenden PCR-Produktes ergab, daß an der ehemaligen Insertionsstelle tatsächlich 40 Nukleotide aufzufinden sind, die größtenteils Reste der invertierten Wiederholungen des P-Elements (fett gedruckt) darstellen und von der acht Basenpaare umfassenden „target site duplication“ (unterstrichen) flankiert werden:

5´-GTACAAAT**CATGATGAGATAACATAACATAACATGTTATTTTCATCATG**GTACAAAT-3´.

Da bei homozygoten Männchen von Linie *fan*<sup>Jo2</sup> keine *fan*-mRNA nachgewiesen werden konnte, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt, um zu klären, ob bei der Remobilisierung des P-Elementes flankierende genomische Bereiche entfernt wurden.



**Abb. 11: Kartierung der Deletion in Remobilisierungslinie *fan*<sup>Jo2</sup>.**

**A:** Southern Blot-Hybridisierung: Genomische DNA aus hetero- (het) bzw. homozygoten (ho) *fan*<sup>Jo2</sup>-Tieren wurde mit *Eco*RI und *Pvu*II geschnitten und mit sPCR-Klon 52, *Dra*I groß, hybridisiert. **B:** Ungefähre Lage der Bruchpunkte in Linie *fan*<sup>Jo2</sup> verglichen mit der Wildtypsituation (Wt). Es wurden nur die beiden relevanten *Dra*I-Schnittstellen berücksichtigt. Zum besseren Vergleich wurden die Größen der Wildtyp-Fragmente angegeben.

Zu diesem Zweck wurde genomische DNA homo- bzw. heterozygoter *fan<sup>102</sup>*-Tiere mit den Enzymen *EcoRI* und *PvuII* gedaut. Der resultierende Southern Blot wurde mit dem sPCR-Klon 52, der das vollständige offene Leseraster von *farinelli* enthält, hybridisiert (Abb. 11A). Die Größe der hybridisierenden Fragmente deutet daraufhin, daß mindestens 2 kb genomische Sequenzen fehlen, und zwar stromaufwärts der *PvuII*-Schnittstelle, die in dem offenen Leseraster von *farinelli* liegt (Abb. 11B).

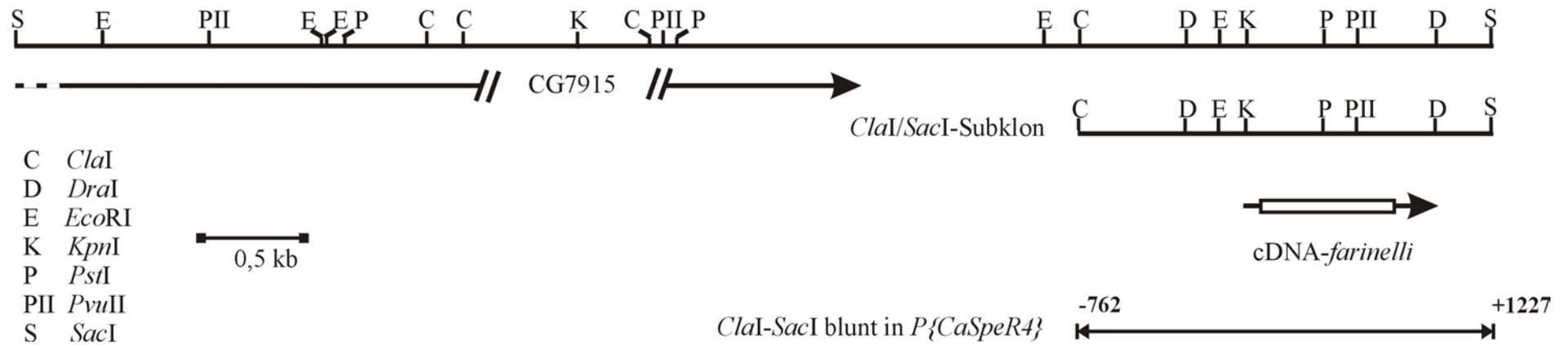
### **2.9 Der aus einer Phagenbank isolierte genomische Klon 33 bietet die Grundlage für die Klonierung von *farinelli*-Sequenzen in verschiedene P-Vektoren**

Die Anwendung P-Element-vermittelter Transformation beschränkt sich nicht auf die Erzeugung von mutierten Linien, sondern stellt ein vielfältiges Instrument für die Genanalyse dar. P-Vektoren können z.B. gezielt dazu eingesetzt werden, die zeitliche und räumliche Expression eines Gens zu untersuchen, indem man den entsprechenden Promotor mit dem *lacZ*-Gen fusioniert. Dazu verwendet man Vektoren, die das *lacZ*-Gen bereits enthalten und mit Schnittstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen ausgestattet sind (Kuhn *et al.*, 1988, Pirota, 1989). Diese erlauben das Einfügen regulatorischer Sequenzen zur Steuerung des *lacZ*-Reportergens. Außerdem ist es mit Hilfe von P-Element-Konstrukten möglich, zusätzliche Kopien eines Gens in die Fliege einzuschleusen. Auf diese Weise kann der Verlust einer Genfunktion in einer mutierten Linie mit einem entsprechenden „mutant rescue“-Konstrukt ausgeglichen werden (Montell *et al.*, 1985). Die P-Vektoren werden durch Keimbahntransformation (Spradling & Rubin, 1982, Rubin & Spradling, 1982) ins Genom der Fliege integriert. Hierfür wird das P-Konstrukt zusammen mit einem Hilfskonstrukt, welches das Gen für die Transposase enthält, in den Hinterpol von frühen *Drosophila*-Embryonen injiziert. Dort gelangt das Konstrukt-Gemisch in die sich abschnürenden Urkeimzellen. Das Hilfskonstrukt ermöglicht dann die Insertion des Konstruktes, ist jedoch selbst nicht fähig zu integrieren, da ihm eine der beiden invertierten Wiederholungen fehlt. Die meisten P-Vektoren enthalten ein Derivat des *white*-Gens als Marker, d.h., man injiziert Embryonen eines weißäugigen Stammes, in diesem Fall *w<sup>118</sup>*. Die aus den injizierten Embryonen hervorgegangenen adulten Tiere werden mit *w<sup>118</sup>*-Tieren gepaart. Unter den Nachkommen auftretende transgene Tiere können anhand der rötlichen Augenfarbe erkannt werden.

Um die transgenen Linien zu stabilisieren, werden Balancerchromosomen eingekreuzt, die chromosomale Inversionen aufweisen und daher Rekombinationsereignisse verhindern. Mit dem Ziel, Sequenzen für die Konstruktion verschiedener Transformationsklone zu gewinnen, die zur weiteren Analyse des *farinelli*-Gens beitragen sollten, wurde eine genomische Phagenbank (Lambda Fix II Bank, Stratagene) durch Hybridisierung mit dem Insert aus sPCR-Klon 52, *DraI* groß, durchsucht. Es wurden zwei positive Phagen, 2.1 und 1.2 identifiziert. Zunächst wurde die genomische DNA aus Phage 2.1 isoliert und in den Vektor pZErO-1 eingefügt. Der Klon 2.1 enthält ein >12 kb genomisches Fragment, das durch Restriktion mit *NotI* erhalten wurde; davon wurden zwei Subklone erzeugt: ein 2 kb *EcoRI*-Subklon und ein 5 kb *HindIII*-Subklon. Die Sequenzierung ergab jedoch, daß der Phage 2.1 im Gegensatz zum Phagen 1.2 nicht das vollständige *fan*-Gen enthält, sondern nur die hintere Hälfte sowie den 3' gelegenen Bereich. Die Isolierung von genomischen Fragmenten aus Phage 1.2 führte zu Klon 33, der einen etwa 7 kb großen genomischen *SacI*-Abschnitt (in pBS KS) umfaßt (Abb. 12). Von diesem Klon leitet sich ein 2 kb großer *ClaI*-*SacI*-Subklon ab, der für die Klonierung verschiedener Konstrukte genutzt wurde (Abb. 12). Klon 33 enthält stromaufwärts von *farinelli* mehrere Exons, die dem vorhergesagten Gen CG7915 zugeordnet werden.

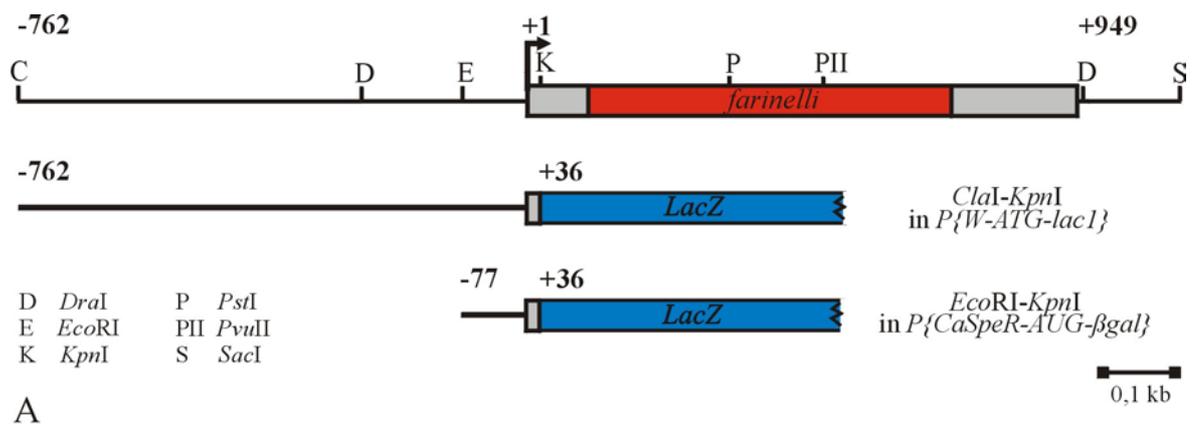
#### **2.10 Analyse von Promotor-*lacZ*-Fusionen: 762 nt aus dem 5' flankierenden Bereich von *farinelli* bewirken eine testisspezifische Expression des Reportergens**

Die Verknüpfung von Promotorsequenzen mit dem Reportergen *lacZ* erlaubt die indirekte Analyse der zeitlichen und räumlichen Expression eines Gens. Es wurden zwei verschiedene Promotor-*lacZ*-Fusionen getestet (Abb. 13A). Beide tragen einen künstlichen Translationsstart. Das erste Konstrukt beinhaltet die zwischen den Positionen -762 bis +36 gelegene Region in *P{W-ATG-lacI}* (Kuhn *et al.*, 1988). Sie erstreckt sich von der *ClaI*-Schnittstelle bis zur *KpnI*-Schnittstelle. Das zweite Konstrukt enthält dagegen nur 119 Nukleotide, nämlich von der *EcoRI*-Schnittstelle an Position -77 bis zur *KpnI*-Schnittstelle an Position +36 in *P{CaSpeR-AUG-βgal}* (Pirota, 1989). Die Konstrukte wurden durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation in den *w<sup>1118</sup>*-Stamm eingebracht. Pro Konstrukt wurden 10 transgene Linien etabliert und auf β-Galaktosidaseaktivität in den männlichen Gonaden getestet.



**Abb. 12: Restriktionskarte des genomischen *SacI*-Klons 33 und des *ClaI-SacI*-Subklons.**

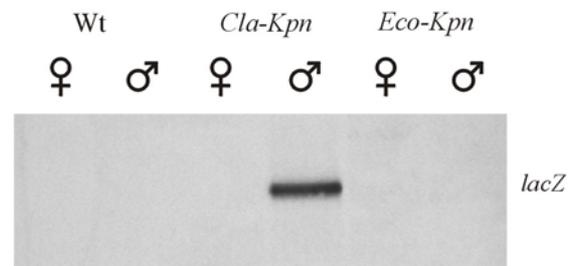
Klon 33 weist 5' von *farinelli* mehrere Exons des vorhergesagten Gens CG7915 auf. Durch Restriktion von Klon 33 mit *ClaI* wurde ein 2 kb großer *ClaI-SacI*-Subklon erzeugt, der für die Klonierung verschiedener Konstrukte eingesetzt wurde. Darunter befand sich auch ein P-Vektor, der für das Einführen einer *fan*-Kopie in die P-Element-Insertionslinie und die beiden Remobilisierungslinien konstruiert wurde (siehe 2.11). Dieser enthält das gesamte *ClaI-SacI*-Fragment in  $P\{CaSpeR4\}$  (Pirota, 1989).



A



B



C

### Abb. 13: Promotor-lacZ Konstrukte.

**A:** Schematische Darstellung der Fusionen. Die 5' bzw. 3' untranslatierten Bereiche von *farinelli* sind grau abgesetzt. Der *fan*-ORF ist rot gekennzeichnet. **B:** Die *lacZ*-Färbung eines Hodens aus der Linie 2 zeigt, daß die *ClaI-KpnI*-Fusion zu  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in elongierten Spermatiden führt. **C:** Northern Blot-Hybridisierung mit poly(A)-mRNA aus dem Wildtyp und aus Linien, die mit den *lacZ*-Fusionen transformiert worden waren. Im Fall der *ClaI-KpnI*-Fusion wurden zur mRNA-Gewinnung Tiere aus der Linie 2 eingesetzt, bei der *EcoRI-KpnI*-Fusion dagegen Tiere aus der Linie 19. Als Sonde wurde das *HpaI*-Fragment des *lacZ*-Gens verwendet.

Hoden transgener Männchen, die das *EcoRI-KpnI*-Konstrukt tragen, zeigen keine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität, was darauf zurückzuführen ist, daß keine Transkription der *lacZ*-Fusion stattfindet, wie sich durch die Northern Blot-Hybridisierung mit einer *lacZ*-Sonde erwies (Abb. 13C). Im Fall des *ClaI-KpnI*-Konstruktes wurde eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Spermatidenbündeln beobachtet (Abb. 13B), prämeiotische Stadien und runde Spermatiden färbten sich dagegen nicht. Da die *ClaI-KpnI*-Fusionstranskripte nicht in transgenen Weibchen, sondern nur in den entsprechenden Männchen nachgewiesen werden konnten, enthält der 804 Nukleotide umfassende Bereich

alle regulatorischen Elemente, um eine männchenspezifische Expression des Reportergens zu bewirken (Abb. 13C).

### 2.11 Die Fertilität von *fan*-mutanten Männchen kann durch Einkreuzen eines Rettungskonstruktes wiederhergestellt werden

Um den ursächlichen Zusammenhang zwischen der P-Integration und der auftretenden Sterilität weiter zu untermauern, wurde das 2 kb genomische Insert aus dem *ClaI-SacI*-Subklon durch Restriktion mit *ClaI* und *Ecl136II* (*SacI* blunt) isoliert und in *P{CaSpeR4}* (Pirota, 1989) integriert. Das verwendete genomische Fragment umfaßt das gesamte *fan*-Gen sowie 762 nt 5'-flankierende und 279 nt 3'-flankierende Sequenzen (Abb. 12, siehe auch 7.1). Das Konstrukt wurde durch P-Element-vermittelte Keimbahntransformation zunächst in den *w<sup>118</sup>*-Stamm eingebracht und dann in die P-Element-Insertionslinie und die beiden Remobilisierungslinien *fan<sup>Jo2</sup>* und *fan<sup>Jo6</sup>* eingekreuzt. Da das *farinelli*-Gen auf dem dritten Chromosom liegt, wurden hierfür aus den 10 vorhandenen transgenen Linien diejenigen ausgewählt, die das Rettungskonstrukt auf dem zweiten Chromosom tragen (*fr8*, *fr12*, *fr13*, *fr23*). Es wurden folgende Kreuzungsschritte durchgeführt (hier beispielhaft anhand der Linien *fr8* und *fan<sup>Jo2</sup>* dargestellt):

Generation 1	$\frac{\text{fr8}}{\text{fr8}}$ ;	$\frac{\pm}{+}$	x	$\frac{\pm}{+}$ ;	$\frac{TM3 Ser}{TM3 Sb}$
Generation 2	$\frac{\pm}{+}$ ;	$\frac{fan^{Jo2}}{fan^{Jo2}}$	x	$\frac{\text{fr8}}{+}$ ;	$\frac{TM3 Ser}{+}$
Generation 3	$\frac{\text{fr8}}{+}$ ;	$\frac{TM3 Ser}{fan^{Jo2}}$	x	$\frac{\text{fr8}}{+}$ ;	$\frac{TM3 Ser}{fan^{Jo2}}$

Das hier verwendete Balancerchromosom *TM3* trägt mit *Ser* einen dominanten Marker, der zu geschlitzten Flügeln führt. Aus der letzten Kreuzung resultieren u.a. homozygote *fan<sup>Jo2</sup>*-Männchen, die über eine oder zwei Kopien des Rettungskonstruktes verfügen. Diese sind erkennbar an der rötlichen Augenfarbe, die von dem *mini-white<sup>+</sup>*-Gen des Konstruktes herrührt, und an normalen Flügeln. Diese Männchen wurden mit Jungfrauen gepaart, um ihre Fertilität zu testen. Da die Original-P-Element-Insertionslinie durch die im P-Vektor enthaltene Kopie des *white*-Gens von vorneherein rote Augen zeigt, wurde im Falle dieser Kreuzung erwartet, daß statistisch gesehen mindestens die Hälfte der auf Fertilität überprüften Tiere das Rettungskonstrukt gar nicht enthielt und somit steril blieb. Diese

Erwartung bestätigte sich. Tabelle 1 gibt die Anzahl der angesetzten Tests an und wieviele Männchen fertil waren.

**Tab. 1: Statistische Auswertung des „mutant rescue“-Experimentes.**

Angegeben ist die Anzahl der positiven Fertilitätstests im Vergleich zur Gesamtzahl der angesetzten Tests.  $fan^P$  = P-Element-Insertionslinie,  $fan^{Jo2}$  und  $fan^{Jo6}$  = Remobilisierungslinien.

	fr8	fr12	fr13	fr23
$fan^P$	4/14	7/20	6/15	0/15
$fan^{Jo2}$	14/15	5/15	0/15	-
$fan^{Jo6}$	13/14	14/16	14/15	-

Im Fall der Kreuzung von Linie fr23 mit den beiden Remobilisierungslinien konnten unter den Nachkommen der zweiten Generation keine Tiere gefunden werden, die sowohl das Balancerchromosom trugen als auch rotäugig waren. Da durch Einkreuzen von fr23 auch keine einzige Rettung der P-Insertionslinie erfolgte, ist davon auszugehen, daß hier ebenfalls die entsprechenden Tiere unter den Nachkommen der zweiten Kreuzung fehlten. Das könnte bedeuten, daß das gleichzeitige Auftreten von Balancerchromosom und der P-Element-Insertion fr23 in diesem Fall letal ist.

Es kann festgehalten werden, daß die verschiedenen, das Rettungskonstrukt tragenden Linien nicht mit derselben Effizienz retten. Zumindest mit Linie fr8 konnte jedoch die Fertilität in den beiden Remobilisierungslinien zu über 90% wiederhergestellt werden.

## 2.12 *farinelli* kodiert ein 24,6 kDa integrales Membranprotein (FAN)

Der offene Leserahmen von *farinelli* kodiert ein aus 218 Aminosäureresten bestehendes Protein (FAN, Abb. 14) mit einem errechneten Molekulargewicht von 24,6 kDa. Die Aminosäuresequenz wurde zur Identifizierung von Lokalisierungssignalen mit Hilfe des Programms PSORT (GenomeNet, Japan) analysiert. FAN weist am C-terminalen Ende an den Positionen 164-185 einen Leucin-Zipper und an den Positionen 194-210 eine einzelne Transmembrandomäne auf. Im Gegensatz zur Klasse DNA-bindender Proteine mit amphiphilem Helixmotiv wird der Leucin-Zipper in diesem Fall nicht von einem Abschnitt

FAN	MSDNT-ESKLALDPCDVIVFEGPFNR-SVSRKLVIKNTSKTQRMFAFKMKTTPKLFYVRPNIGVLGPEQKVSVDIFMQPIL	79
DmVAP	MSKSLFDLPLTIEPEHELRFVGPFFTRPVVTI-MTLRNNALSPLV-FKIKTTAPKRYCVRPNIGKIPFRSTQVEICLQPFV	79
AcVAP	MASH--EQALILEPAGELRFKGPFTD-VVTADLKLSNPTDRRIC-FKVKTAPKRYCVRPNISGILEPKTSI AVAVMLQPFN	77
HsVAP-A	MAND--EQILVLDPPTDLKFKGPFTD-VVTNLKLRNPSDRKVC-FKVKTAPRRYCVRPNISGIIIDPGSTVTVSVMLQPFN	77
ERG30	MAKV--EQVLSLEPQHELKFRGPFTD-VVTNLKLRNPTDRNVC-FKVKTAPRRYCVRPNISGVIDAGASLNVSVMLQPFN	77
consMSP	GDIQTQPGTKIVFNAPYDD-KHTYHIKVTNTSARRIGYG-IKTTNPKRLNMDPPCGVLGPKESVNVAVSCDAFD	72
FAN	Q-EQIKKRHKFLLLA AEVTGDI--SDVQEFWKMQNPNETRETKIKCELV-PSKEDDFRQA-GGSAVI-STDNKDGEV----	150
DmVAP	YDQQEKKNKHKFMVQSVLAPMDADLSDLNKLWKDLEPEQLMDAKLKC VFEMPTAEANAENTS GGGAVGGGTGAAGGGSAGAN	160
AcVAP	YDPNEKNKHKFMVQSMYAPDHVVES-QELLWKDAPPELMDTKL-CVFEMPDGSHQAPASDASRATDAG--AHFSESALED	154
HsVAP-A	YDPNEKSKHKFMVQTI FAPPNT--SDMEAVWKEAKPDELMDSKLRCVFEMPNENDKLNDMEPSKAVPLN--ASKQDGPMPK	154
ERG30	YDPNEKSKHKFMVQSMFAPPDT--SDMEAVWKEAKPEDLMDSKLRCVFELPAENAKPHDVEINKIMPTS--ASKTEAPVAA	154
consMSP	PSS EDTNDRITVEWCNTPDPAKQ-FRREWF	103
FAN	-HFD AQEVSEPM AKLLKQVSMLEDEHMALTDQIDGLRDQAI-----	190
DmVAP	TSSASAEALESKPKLSSDKFKPSNLLETSESLDLLSGEIKALRECNIELRRENLHL-KDQITRFRSSPAVKQVNEPYAPV	240
AcVAP	PTVASRKTE TQSPKRVGAVGSAGEDVKKLQHELKKAQSEITSLKGENSQLKDEGIRLRKVAMTDTVSP TPLNPS PAAAAV	235
HsVAP-A	PH-SVSLNDETRKLMEECKRLQGEEMMKLSEENRHLRDE-----GLRLRKVAHSD---KPGSTSTASFRDN	216
ERG30	KPLTSPLDDAEVKKVMEECRRLQGEVQRLREESRQLKEE-----DGLRARK-ALP-----SNSPMAALAASG	215
FAN	---GRFFYMAAIVIIILSAVAGAYYGKTRL	218
DmVAP	LAE--KQIPVFYIAVAIAAAIVSLLL GKFFL	269
AcVAP	RA-----FPPVVYVVAAILGLIIGKFFL	260
HsVAP-A	-----VTSPLPSLLVVIAAIFIGFFLGKFFL	242
ERG30	KEE--GLSAGLLALVVL F-FIVGVIIIGKIAL	243

Abb. 14: Aminosäuresequenzvergleich zwischen FAN und den VAP-Proteinen verschiedener Organismen sowie der Konsensus-Sequenz der MSP-Familie. FAN: FARINELLI-Protein, DmVAP: potentielles *Drosophila melanogaster* VAP, AcVAP: *Aplysia californica* VAP, HsVAP-A: menschliches VAP-A, RnERG30: VAP-B der Ratte, consMSP: Konsensus der Major sperm protein-Familie der Nematoden. Identische Aminosäurereste sind rot, konservative Austausche rosa abgebildet.

basischer Aminosäuren begleitet. Das Motiv könnte demnach zwar an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein wie z.B. Dimerisierung, ist aber nicht Teil einer DNA-Bindungsdomäne. Das Programm gibt außerdem die Aminosäureabfolge GKTR (Positionen 214-217) am C-Terminus als mögliches ER-Rückhalte-Signal an. Dabei könnte es sich um eine mit dem Di-Lysin-Motiv verwandte Abfolge handeln.

Das Di-Lysin-Motiv tritt im C-Terminus einer Reihe ER-lokalisierter Membranproteine auf. Es bindet an die „coatamer“-Proteine auf der Oberfläche von COPI-Vesikeln, woraufhin die Proteine über retrograden Transport vom Golgi-Kompartiment zurück zum ER gelangen (Teasdale & Jackson, 1996).

Das PSORT-Programm sagt voraus, daß das FAN-Protein mit 26,1% Wahrscheinlichkeit im Cytoplasma lokalisiert ist (21,7% Vesikel des sekretorischen Systems, 13% Kern, 13% Mitochondrien, 8,7% Plasmamembran, 4,3% Cytoskelett, 4,3% ER, 4,3%, Golgi-Apparat).

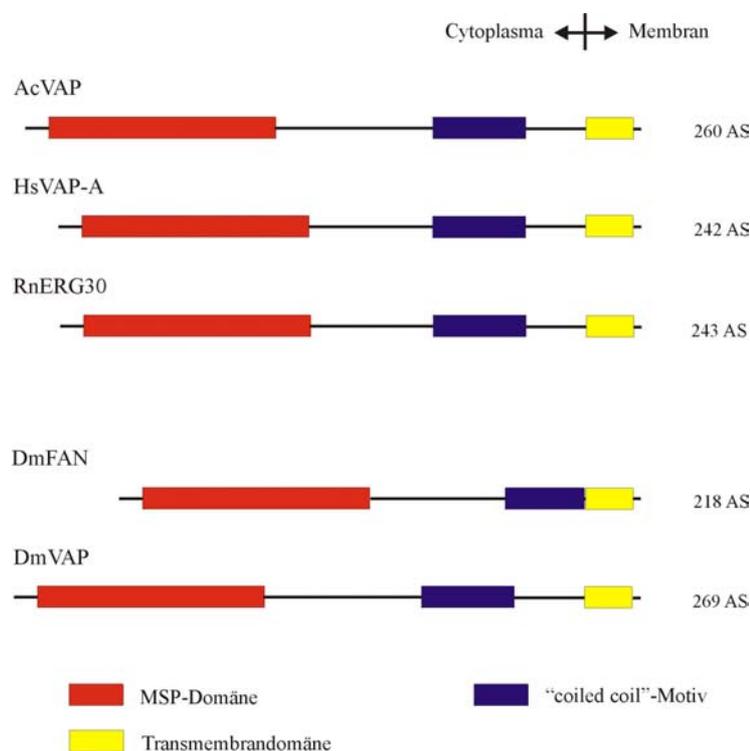
### **2.13 Das FAN-Protein weist Ähnlichkeiten zu VAP- und MSP-Proteinen auf**

Um Ähnlichkeiten von *farinelli* mit bereits bekannten Genen aufzudecken, wurde das BLAST-Programm des NCBI (Altschul *et al.*, 1997) genutzt. Dabei wurden auf Basis der Aminosäuresequenz Ähnlichkeiten zu VAP („vesicle-associated membrane protein-associated protein“-)Proteinen von Wirbeltieren und zu den MSP („major sperm proteins“-)Proteinen der Nematoden festgestellt (Abb. 14).

VAP-Proteine zeichnen sich ebenso wie FAN durch einen dreiteiligen Aufbau aus. Sie weisen

- im N-terminalen Teil einen etwa 100 Aminosäurereste langen Abschnitt auf, der Ähnlichkeit mit den „major sperm proteins“ von Nematoden zeigt und daher auch als MSP-Domäne bezeichnet wird, sowie
- eine „coiled-coil“-Region, die fast unmittelbar gefolgt wird von
- einer Transmembrandomäne am C-Terminus (Abb. 15).

Bei der *MSP*-Genfamilie handelt es sich um eine Gruppe von etwa 60 Genen (Scott *et al.*, 1989), die für basische Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 12-14 kDa kodieren. Die *MSP*-Proteine werden spezifisch in den männlichen Keimzellen der Nematoden exprimiert, wo sie in den postmeiotischen Stadien Aktin ersetzen (Roberts & Stewart, 1995, 1997). Im Gegensatz zu den Spermien von *Drosophila* und der Mehrheit der anderen Organismen zeichnen sich die männlichen Keimzellen der Nematoden durch eine amöboide Fortbewegungsweise aus: sie bilden ein Pseudopodium, das den Zellkörper hinter sich herzieht. Bei Nematoden findet die Befruchtung im Ovar statt, das dicht mit Oocyten gefüllt ist. Die amöboide Fortbewegung erscheint hier gegenüber der schwimmenden vorteilhafter. Aufgrund der Unterschiede in Expressionsmuster und intrazellulärer Verteilung von „major sperm proteins“ und VAP-ähnlichen Proteinen wird eine funktionelle Homologie dieser beiden Proteingruppen nicht in Erwägung gezogen. VAP wurde erstmals bei der Schnecke *Aplysia californica* beschrieben (Skehel *et al.*, 1995).



**Abb. 15: Schematische Darstellung VAP-ähnlicher Proteine mit ihren Domänen.**

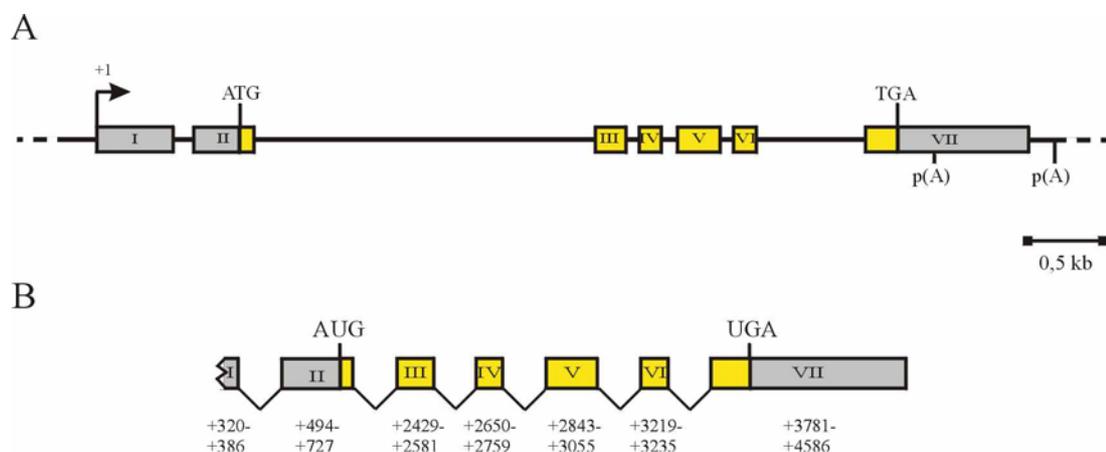
**AcVAP:** *Aplysia californica* VAP, **HsVAP-A:** menschliches VAP-A, **RnERG30:** VAP-B der Ratte, **FAN:** FARINELLI-Protein, **DmVAP:** potentielles *Drosophila melanogaster* VAP. Der N-Terminus liegt jeweils auf der linken Seite.

Es handelt sich um ein 33 kDa großes Membranprotein, das im Nervensystem und den stark innervierten Kiemen exprimiert wird. VAP wurde mit Hilfe des Hefe „two hybrid“-Systems als direkter Interaktionspartner von VAMP („vesicle-associated membrane protein“/Synaptobrevin) identifiziert, welches in der Membran synaptischer Vesikel verankert ist und eine Rolle bei der Fusion der Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran spielt. Bei der Immunlokalisierung des *Aplysia*-VAPs in Neuronen wurde festgestellt, daß es in allen Neuriten nachweisbar ist, sich dieses Muster jedoch von dem des Synaptobrevins unterscheidet. Da die Injektion von anti-VAP-Antikörpern die synaptische Transmission verhindert, wurde zunächst die These aufgestellt, daß VAP für die Exocytose von Neurotransmittern benötigt wird (Skehel *et al.*, 1995). Northern Blot-Analysen zeigten inzwischen, daß sich die Expression von *VAP*-Genen bei Maus, Ratte und Mensch nicht auf Zellen des Nervensystems beschränkt, sondern in allen getesteten Geweben nachgewiesen werden kann (Weir *et al.*, 1998; Nishimura *et al.*, 1999). Säugetiere weisen drei VAP-Proteine auf: VAP-A, -B und -C. Während die beiden ersten durch unterschiedliche Gene kodiert werden und zueinander etwa 60% homolog sind, stellt VAP-C eine Spleißvariante von VAP-B dar, der sowohl das „coiled coil“-Motiv als auch die Transmembrandomäne fehlen (Nishimura *et al.*, 1999). VAP-A und VAP-B wurden mit Hilfe von Antikörpern im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, und zwar in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen (Soussan *et al.*, 1998, Skehel *et al.*, 1999).

#### **2.14 Der EST-Klon LD20208 aus *Drosophila* kodiert ein Protein, das deutlich größere Ähnlichkeit mit VAP zeigt als FAN**

Da das FAN-Protein Ähnlichkeiten mit VAP-Proteinen aufweist, galt es festzustellen, ob *Drosophila* über Proteine verfügt, die eine noch größere Ähnlichkeit zeigen und somit als VAP-Homologe in Frage kommen. Aus diesem Grund wurde anhand der Aminosäuresequenzen der VAP-Proteine von *Aplysia*, Ratte und Mensch ein BLAST-Search in der EST („expressed sequence tag“-Datenbank (Rubin *et al.*, 2000) des BDGP unternommen. Dies führte zu einem Clot von insgesamt 18 EST-Klonen: 8 davon stammen aus dem Embryo, 6 aus Schneider L2-Zellen, 2 aus dem Ovar, 2 aus dem Kopf. Die vollständigen Sequenzen der EST-Klone waren nicht bekannt, sondern lediglich wenige hundert Nukleotide der 5' Bereiche. Klon LD20208 wurde zur genaueren Analyse angefordert und komplett sequenziert (siehe 7.2).

Dieser EST-Klon stammt aus einer embryonalen cDNA-Bank (0-24 h alte Embryonen) und umfaßt 1696 bp, die über die Schnittstellen *Eco*RI (5') und *Xho*I (3') in pBluescript SK (Stratagene) inkloniert worden waren. Er enthält das komplette offene Leseraster eines Proteins mit dem bereits beschriebenen dreiteiligen Aufbau, das aus 269 Aminosäureresten besteht (siehe Abb. 13 und 14). Inzwischen konnte durch die vom *Drosophila*-Genom-Projekt veröffentlichten Daten (Adams *et al.*, 2000) auch die genomische Organisation des Gens geklärt werden, und zwar mit Hilfe eines genomischen Klons, dessen Sequenz unter den Nummern AE003429, GI: 7290438 zugänglich ist. Das Gen befindet sich auf dem X-Chromosom und wurde in der Bande 4A3 lokalisiert. Im Folgenden wird es als *DmVAP* bezeichnet. In Abbildung 16 wird der Aufbau des *DmVAP*-Gens sowie des EST-Klons LD20208 schematisch dargestellt. Das Gen weist 6 Introns auf. Das durch Überlappung der übrigen EST-Klone ermittelte 5'-Ende des Clots liegt 319 Nukleotide vor dem 5'-Ende von LD20208 und wird als Position +1 definiert (Abb. 16A). Das Vollängen-Transkript sollte daher ohne poly(A)-Schwanz eine Mindestgröße von 2 kb erreichen.



**Abb. 16: Organisation des *DmVAP*-Gens (A) und der cDNA LD20208 (B).**

Der offene Leseraster ist gelb hervorgehoben. Die untranslatierten Regionen sind grau gekennzeichnet. Die Exon-Intron-Grenzen wurden aus der Sequenzierung von LD20208 abgeleitet. p(A) markiert die Position eines Polyadenylierungssignals. Aus der Überlappung weiterer EST-Klone wurde geschlossen, daß LD20208 nur einen Teil des ersten Exons aufweist. In B sind die relativen Positionen der Exongrenzen angegeben, die Introns sind in diesem Fall formal mit gleicher Länge dargestellt.

Der Vergleich der absoluten Aminosäuresequenzidentitäten bzw. -ähnlichkeiten zwischen FAN bzw. DmVAP und den VAP-Proteinen von *Aplysia*, Ratte und Mensch, verdeutlicht, daß DmVAP eine stärkere Ähnlichkeit zu VAP-Proteinen zeigt und damit einen geeigneteren Kandidaten für ein *Drosophila*-VAP darstellt als FAN (Tab. 2).

**Tab. 2: Prozentuale Aminosäuresequenzidentität bzw. -ähnlichkeit.**

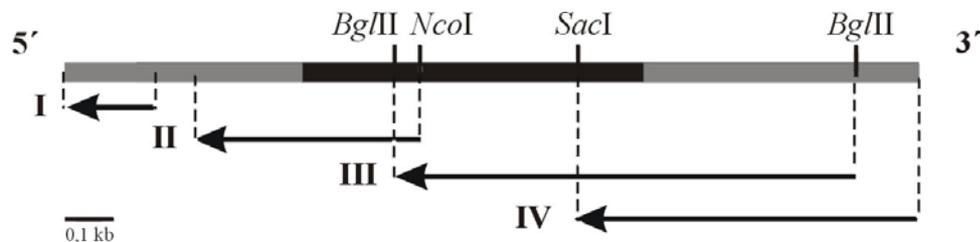
**AcVAP:** *Aplysia californica* VAP, **HsVAP-A:** menschliches VAP-A, **RnERG30:** VAP-B der Ratte, **FAN:** FARINELLI-Protein, **DmVAP:** potentiell *Drosophila melanogaster* VAP.

	FAN		Dm-VAP	
Dm-VAP	25%	(43%)	-	
Ac-VAP	22%	(37%)	40%	(54%)
Hs-VAP-A	27%	(44%)	37%	(52%)
RnERG30	23%	(43%)	35%	(54%)
cons MSP	19%	(29%)	23%	(36%)

Handelt es sich bei *DmVAP* um ein *VAP*-Homolog, so ist im Hinblick auf die Expression der VAP-Proteine bei Säugetieren mit großer Wahrscheinlichkeit zu erwarten, daß das Protein in vielen Geweben, wenn nicht sogar ubiquitär, exprimiert wird. Im Hinblick darauf wurden verschiedene Methoden angewandt, wie Northern Blot-, *in situ*-Hybridisierung und die Injektion eines Promotor-*lacZ*-Konstruktes, um die Expression von *DmVAP* zu untersuchen.

Für die Northern Blot-Hybridisierungen wurden drei verschiedene Sonden eingesetzt (Abb. 17). Die Hybridisierungen erfolgten nacheinander auf derselben Membran, wobei jeweils darauf geachtet wurde, daß keine Restradioaktivität mehr vorhanden war, die die Ergebnisse verfälschen könnte. Es handelte sich um einen Gewebe-Blot mit poly(A)-mRNA, die aus Köpfen, Karkassen und Gonaden von Wildtyp-Weibchen bzw. Männchen stammte. Sonde I leitet sich von dem genomischen Fragment ab, das für die Herstellung des Promotor-*lacZ*-Konstruktes eingesetzt worden war. Sie umfaßt 200 Nukleotide, und repräsentiert den äußersten Bereich der 5'-untranslatierten Region, wie sie durch den EST-

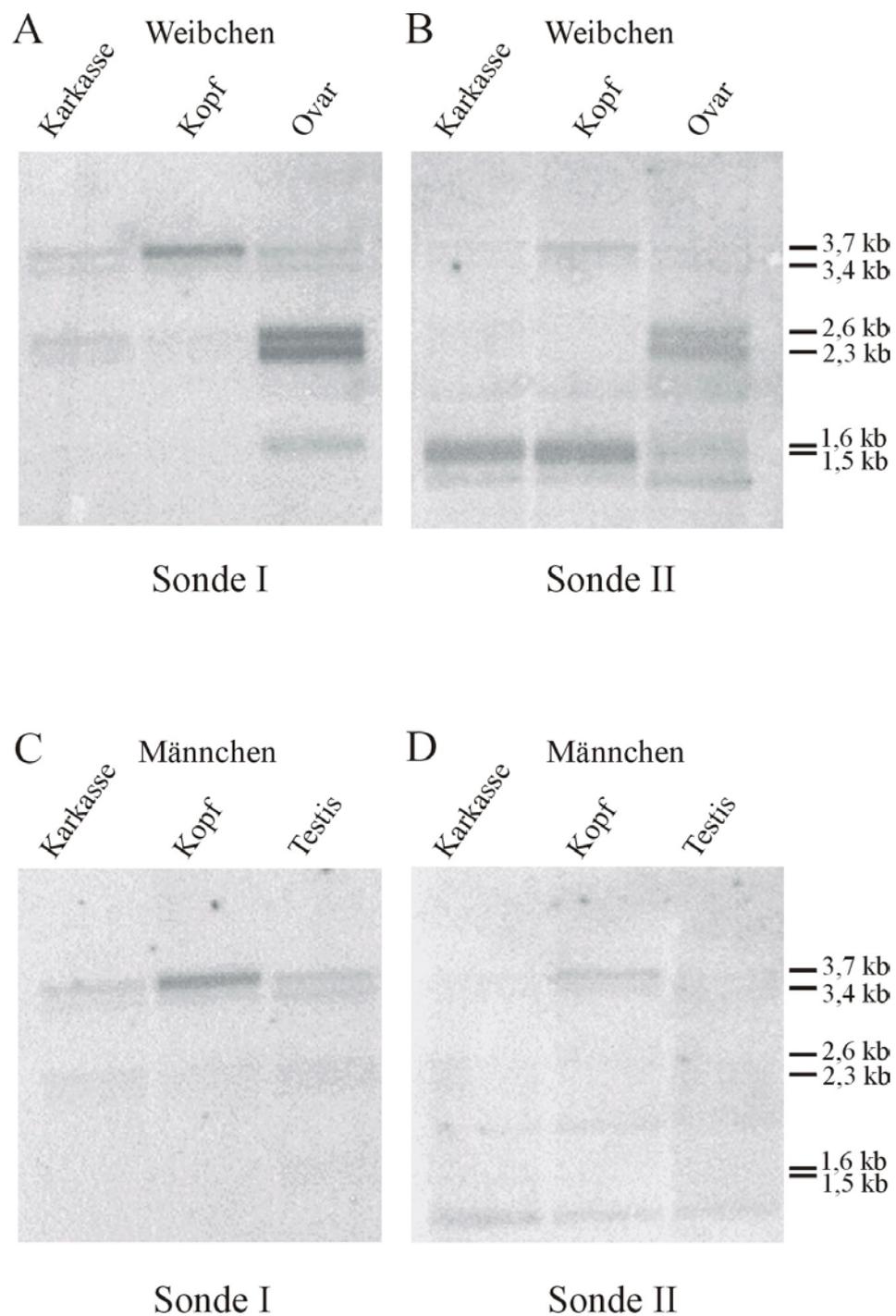
Clot vorgegeben wurde. Sonde II entspricht in etwa den ersten 530 Nukleotiden des EST-Klons LD20208. Sie besteht also fast zu gleichen Teilen aus Sequenzen des 5'-untranslatierten Bereiches sowie des offenen Leserasters.



**Abb. 17: Schematische Darstellung derjenigen Transkriptbereiche von *DmVAP*, die als Sonden für die Northern Blot- bzw. *in situ*-Hybridisierung verwendet wurden.**

Der offene Leserahmen ist als schwarzer Balken wiedergegeben, die untranslatierten Regionen dagegen schraffiert.

Abbildung 18 zeigt die durch Hybridisierung mit den Sonden I und II erhaltenen Daten. Zum besseren Vergleich wurden die entsprechenden Spuren der Autoradiografien nebeneinander gestellt, d.h., Abb. 18A und C resultieren aus der Verwendung von Sonde I, Abb. 18B und D dagegen aus der von Sonde II. Die dritte Sonde (in Abbildung 17 mit der Ziffer IV gekennzeichnet) repräsentiert größtenteils den 3'-untranslatierten Bereich von LD20208 und umfaßt 780 Nukleotide. Diese Sonde verursachte bei drei verschiedenen Northern Blot-Hybridisierungen eine Vielzahl von über den gesamten Blot verstreuten Signalen, daher wurde auf die Abbildung der entsprechenden Autoradiografie verzichtet. Die BDGP-Datenbank liefert keine Hinweise auf ein in dieser Region enthaltenes konserviertes Element, das zu Kreuzhybridisierungen führen und dieses Ergebnis erklären könnte. Bei Verwendung von Sonde I und II wurden fünf mRNA-Species übereinstimmend nachgewiesen, die zum Teil gewebespezifisch gebildet werden. Das längste Transkript ist im Kopf angereichert und hat eine Größe von 3,7 kb. Es kommt in geringeren Mengen neben einer 3,4 kb großen mRNA auch in Karkassen und Gonaden beiderlei Geschlechts vor. Besonders abundant sind jedoch zwei Transkripte mit einer Länge von 2,6 und 2,3 kb, die vornehmlich im Ovar auftreten und dort von einer etwa 1,6 kb großen mRNA begleitet werden.

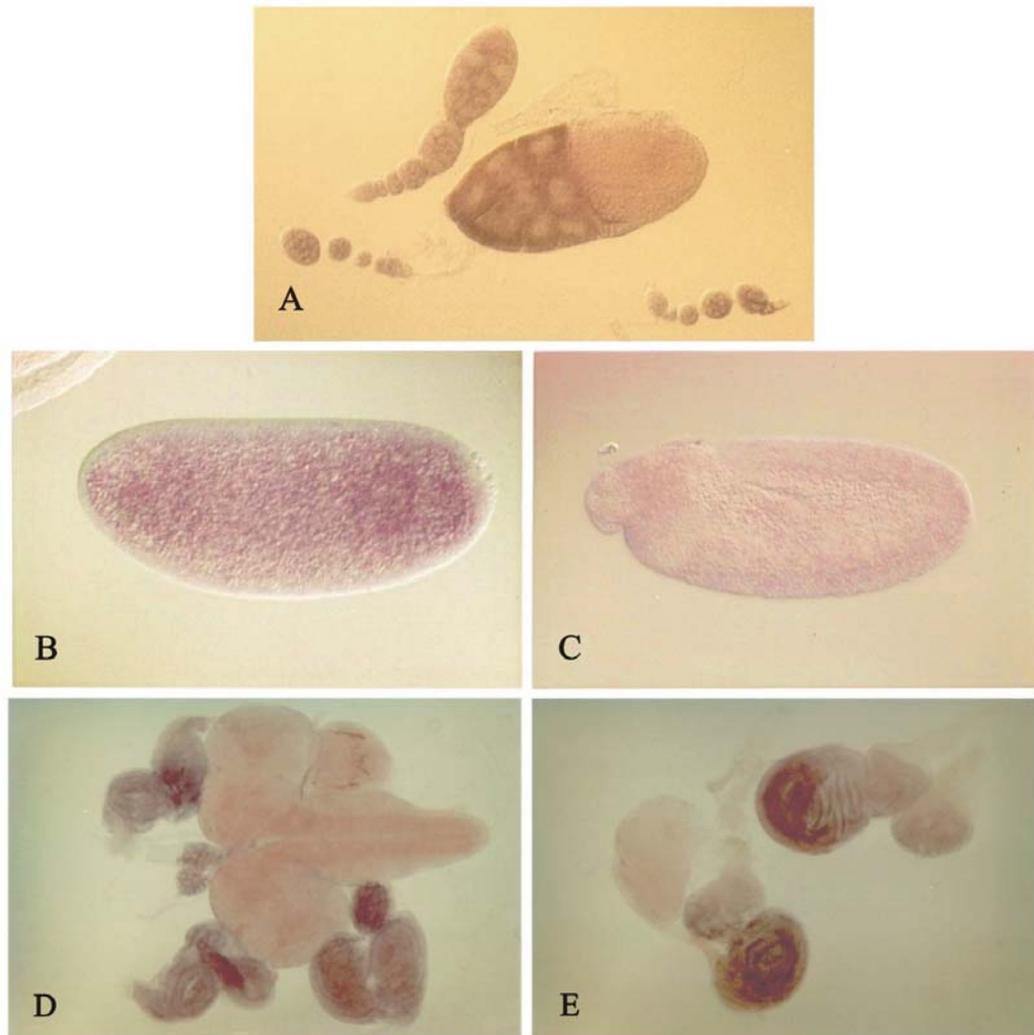


**Abb. 18: Northern Blot-Analyse von *DmVAP*.**

Aus verschiedenen Geweben von Weibchen bzw. Männchen stammende poly(A)-mRNA wurde mit Sonde I (A und C) und Sonde II (B und D) hybridisiert. Zum besseren Vergleich werden die Größen der relevanten mRNAs auch in C und D wiedergegeben, obwohl dort nicht alle Transkripte vertreten sind. Schwache Banden, die nur bei Verwendung jeweils einer Sonde auftreten, beruhen vermutlich auf Kreuzhybridisierungen und werden daher nicht berücksichtigt.

Sonde II hybridisierte außerdem mit einem in Karkassen und Köpfen der Weibchen angereicherten Transkript, das ca. 1,5 kb groß ist und in den Männchen nicht vorzukommen scheint. Ein Abgleich mit der BDGP-Datenbank (Rubin *et al.*, 2000) ergab, daß ein EST-Klon larvaler Abstammung über einen kurzen Abschnitt von etwa 100 Nukleotiden 63% Sequenzähnlichkeit zu Sonde II zeigt. Der Klon repräsentiert das Gen CG6271, welches möglicherweise eine Triacylglycerin-Lipase kodiert. Die entsprechende mRNA hat eine Länge von 1 kb und ist damit kürzer als das abundante Transkript in den Karkassen und Köpfen der Weibchen. Es ist jedoch fraglich, ob eine Kreuzhybridisierung über einen Abschnitt von 100 Nukleotiden zu einem solch kräftigen Signal führen kann. Da Sonde I und II nicht überlappen, könnte diese mRNA möglicherweise aus einem anderen, weiter stromabwärts gelegenen Transkriptionsstart des *DmVAP*-Genes resultieren. Zusammengefaßt gibt es also Hinweise auf die Existenz von insgesamt sechs verschiedenen *DmVAP*-Transkripten.

Da die beiden 2,6 und 2,3 kb großen, ovarienspezifisch gebildeten Transkripte auf eine maternale Expression von *DmVAP* hindeuteten, wurden *in situ*-Hybridisierungen auf Ovarien und Embryonen vorgenommen. Für die *in situ*-Hybridisierung auf Ovarien wurde ein DIG-markiertes DNA-Fragment verwendet, das dieselbe Region abdeckt wie die Sonde I aus der Northern Blot-Hybridisierung. Frühe Follikel zeigten eine mäßige, gleichförmig wirkende Färbung. Bei den mittleren Oogenese-Stadien, bei denen die Oocyte durch ihr zunehmendes Wachstum bereits deutlich von den Zellen des Nährfachs unterschieden werden kann, wurde eine Akkumulation von *DmVAP*-mRNA im Cytoplasma der Nährzellen festgestellt (Abb. 19A). Eine Anreicherung der Transkripte innerhalb der Oocyte konnte nicht beobachtet werden. Dennoch ergab die *in situ*-Hybridisierung auf Embryonen Hinweise auf eine maternale Speicherung, da eine Färbung früher Embryonalstadien auftrat (Abb. 19B), in denen noch keine zygotische Transkription stattfindet. In diesem Fall wurde das 1,1 kb *BgIII*-Fragment aus dem EST-Klon LD20208 verwendet, das fast den gesamten offenen Leserahmen sowie die 3'-nichtranslatierte Region abdeckt (Sonde III, Abb. 17). Es wäre z.B. möglich, daß die mRNA in der reifenden Oocyte mit Komponenten assoziiert ist, die eine Hybridisierung verhindern, und daß diese Komplexbildung nach der Befruchtung aufgehoben wird. Das Signal wird mit dem Einsetzen der Gastrulation schwächer und verschwindet schließlich ganz, was auf den Abbau der maternalen Transkripte zurückzuführen sein könnte (Abb. 19C). Andererseits könnte die Sonde aber auch mit Bestandteilen des Dotters reagiert haben.



**Abb. 19: *In situ*-Hybridisierung zur Analyse der gewebsspezifischen Expression von *DmVAP*.**

Die Hybridisierungen erfolgten mit DIG-markierten Sonden. **A:** Ovariolschläuche eines adulten Weibchens. Frühe Follikel zeigen eine gleichmäßige Verteilung von *DmVAP*-mRNA. Die Kerne der Nährzellen erscheinen als runde, hellabgesetzte Bereiche. Der größte Follikel weist eine Akkumulation von *DmVAP*-Transkripten im Nährzellfach auf. Die wachsende Oocyte, die inzwischen die Hälfte des Follikels einnimmt, und die sie umgebenden somatischen Follikelzellen bleiben dagegen frei von Färbung.

**B:** Embryo des Blastodermstadiums, der eine starke Färbung im Bereich des Dotters zeigt. **C:** Embryo, bei dem die Gastrulation bereits fortgeschritten ist. Er weist eine Färbung im Keimstreifen auf. **D:** Larvales Gehirn mit assoziierten Augen-/Antennen-IS und Bein-IS. Die beiden Gehirnloben und das Ventralganglion zeigen im Gegensatz zu den IS keine Akkumulation von *DmVAP*-mRNA. **E:** Die Hybridisierung führt zu einem starken Signal in den beiden Flügel-IS.

Die schwindende Färbung in älteren Embryonalstadien würde dann aus dem zunehmenden Verbrauch des Dotters während der Embryonalentwicklung resultieren. Eine Northern Blot-Analyse mit mRNA aus unbefruchteten Eiern sowie Embryonalstadien verschiedenen Alters könnte einen Beitrag zur Klärung der Frage liefern, ob *DmVAP* eine Rolle bei der Nährzellfunktion spielt oder als maternale Komponente in die Oocyte eingelagert wird.

Sonde III wurde außerdem dazu eingesetzt, die Verteilung von *DmVAP*-mRNA in larvalem Gewebe zu untersuchen. Dabei wurde eine Färbung in verschiedenen Imaginalscheiben (IS) festgestellt (Abb. 19D und E), die am intensivsten in den Flügel-IS ist (Abb. 19E). Sie betrifft den Bereich, aus dem die ventrale Flügeloberfläche hervorgeht (Cohen, 1993). Im larvalen Gehirn konnte keine Akkumulation von *DmVAP*-Transkripten beobachtet werden (Abb. 19 D). Weiterhin konnten mit den verwendeten Sonden auch keine Anzeichen für eine Expression von *DmVAP* in larvalen und adulten Hoden festgestellt werden.

Für die Herstellung eines Promotor-*lacZ*-Konstruktes wurde mittels PCR ein 1,5 kb Fragment aus genomischer DNA amplifiziert und in *P{W-ATG-lacI}* (Kuhn *et al.*, 1988) inkloniert. Dabei handelte es sich um einen stromaufwärts von *DmVAP* liegenden Bereich, der 202 nt der aus dem EST-Clot bekannten 5'-UTR-Sequenz beinhaltet, jedoch nicht mit der Sequenz von LD20208 überlappt. Er enthält außerdem zwei Exons eines vorhergesagten Gens, das in gleicher Orientierung vor *DmVAP* liegt. Das genomische Fragment wurde über *KpnI/XbaI* in *P{W-ATG-lacI}* ligiert.

Aus der Keimbahn-Injektion gingen sieben transgene Linien hervor. Die anschließende *lacZ*-Färbung von Embryonen dieser Linien führte allerdings zu keinem positiven Ergebnis. Bei der Überprüfung der Transkription des *lacZ*-Konstruktes anhand einer Northern Blot-Hybridisierung konnten nur sehr geringe *lacZ*-mRNA-Mengen nachgewiesen werden. Somit genügen die im Konstrukt verwendeten genomischen Sequenzen nicht, um die  $\beta$ -Galaktosidase-Expression zu steuern.

Eine *DmVAP* betreffende „enhancer trap“-Linie, die während einer P-Element-Mutagenese erzeugt (Peter *et al.*, 2002) worden war, zeigt aber  $\beta$ -Galaktosidase-Expression im embryonalen Nervensystem.

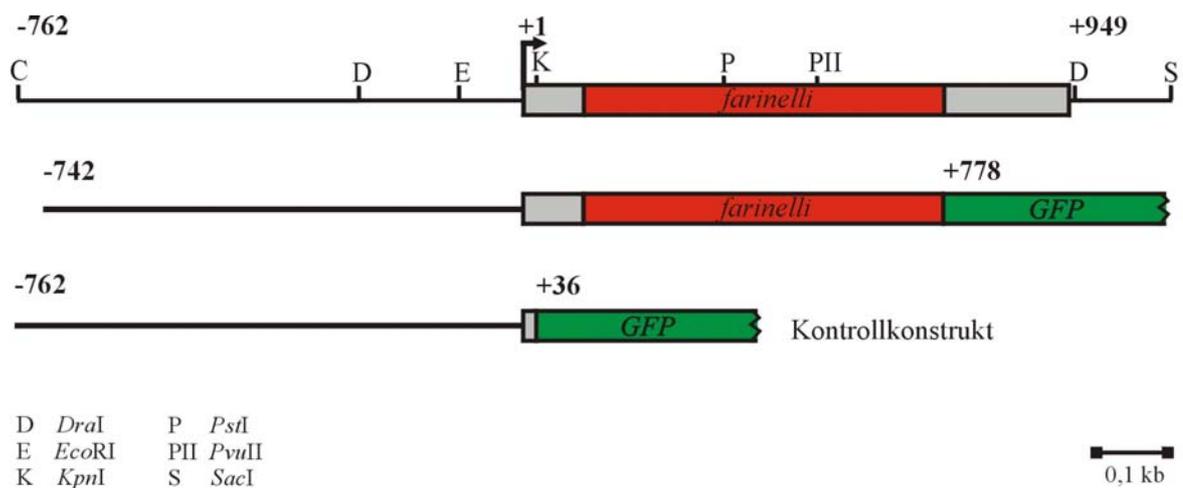
Es bleibt festzuhalten, daß sich die Expressionsmuster von *DmVAP* und *fan* deutlich unterscheiden: Im Gegensatz zum testisspezifisch exprimierten *fan* liefert *DmVAP* mehrere Transkripte, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich vertreten sind.

## 2.15 FAN ist mit Strukturen des endoplasmatischen Retikulums assoziiert

Die intrazelluläre Lokalisierung von FAN wurde anhand von zwei verschiedenen Methoden geklärt: Durch die Fusion von FAN mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* und durch den Nachweis mit Hilfe eines spezifischen Anti-FAN-Antikörpers.

### 2.15.1 Untersuchung der subzellulären Verteilung anhand eines FAN-GFP-Fusionsproteins

Die Herstellung des *GFP*-Konstruktes erfolgte in mehreren Schritten. Zunächst wurde die *GFP*-Kassette durch PCR mit spezifischen Primern aus dem Vektor pEGFP-N1 (CLONTECH) herausamplifiziert und über *Bgl*III/*Xba*I in *P{UAST}* (Brand & Perrimon, 1993) integriert. Der so erhaltene P-Vektor wurde „*P{UAST}* green“ genannt. Im nächsten Schritt wurde das (abgesehen von der letzten Aminosäure) komplette offene Leseraster von *fan* sowie 742 nt 5'-flankierende Sequenz mit Hilfe spezifischer Primer aus dem genomischen *Cl*aI-*Sac*I-Klon gewonnen und über *Bgl*III/*Age*I in „*P{UAST}* green“ kloniert. Damit besteht die N-terminale Hälfte des resultierenden Proteins aus FAN und die C-terminale Hälfte aus GFP (Abb. 20).

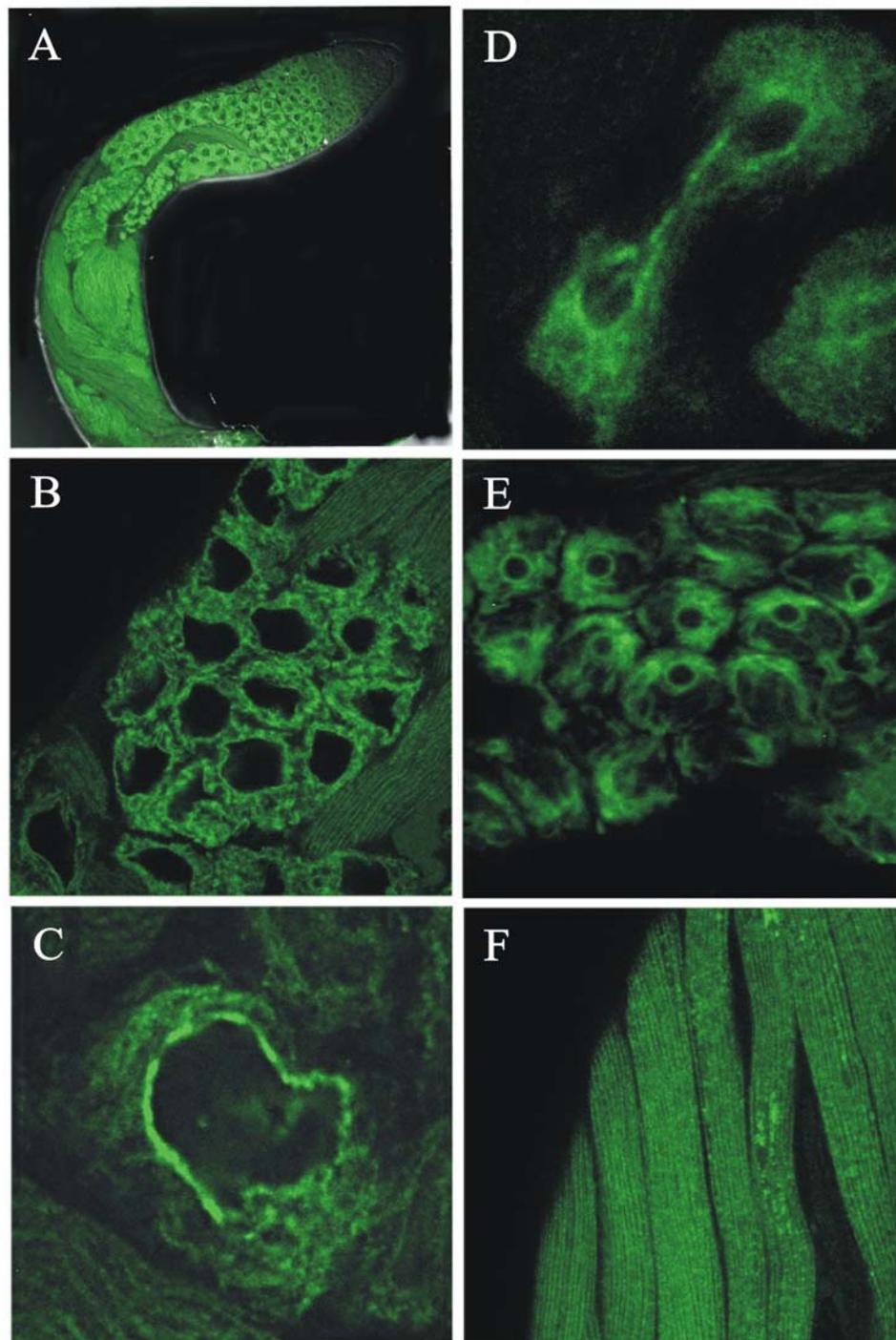


**Abb. 20:** Schematische Darstellung der genomischen Bereiche, die für die Konstruktion einer *fan*-GFP-Fusion und einer Promotor-GFP-Fusion verwendet wurden.

Dieses Konstrukt wurde dazu verwendet,  $w^{118}$ -Tiere zu transformieren. Die Gegenwart des FAN-GFP-Fusionsproteins wirkte sich in keiner Weise auf die Fertilität der transgenen Männchen aus, obwohl dadurch die Menge an vorhandenem FAN in den sich entwickelnden Keimzellen erhöht wurde. Hoden von Männchen der etablierten Linien wurden herauspräpariert, fixiert und im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Die Expression des Fusionsproteins beginnt in den frühen primären Spermatocyten. Stammzellen und Spermatogonien zeigen noch keine Fluoreszenz (siehe Abb. 21A). In frühen primären Spermatocyten liegt das FAN-GFP-Protein im Cytoplasma sowie in der Kernperipherie angereichert vor (Abb. 21B). Der Kern zeigt noch eine globuläre Morphologie und grenzt sich deutlich vom umliegenden Cytoplasma ab, da er kein FAN-GFP-Protein enthält. Die Verteilung im Cytoplasma wirkt nicht diffus, sondern als ob sie mit Strukturen assoziiert ist, die sich relativ gleichmäßig über das Cytoplasma verteilen. Bei diesen Strukturen handelt es sich offensichtlich um das ER, denn die Lokalisierung des Fusionsproteins folgt den morphologischen Veränderungen, denen das ER-Kompartiment bzw. dessen Derivate in männlichen Keimzellen unterliegen und die in den von Lindsley und Tokuyasu (1980) veröffentlichten ultrastrukturellen Studien u.a. beschrieben werden: Mit zunehmendem Wachstum der Spermatocyte wird der Kern immer größer und erhält eine zweite, unregelmäßige Membran, die aus dem ER hervorgeht und eng an der ersten Kernmembran anliegt. Der zunächst runde Kern nimmt allmählich eine unregelmäßige Form an (Abb. 21C). In derselben Phase gewinnt das ER an Volumen und breitet sich über das Cytoplasma aus.

Während der Meiose bildet das ER die sogenannten „astral“ und „parafusorial membranes“. An den beiden Polen der Zelle ordnen sich die astralen Membranen wie Schirme an, die zur Zellmitte hin geöffnet sind. Die „parafusorial membranes“ umgeben dagegen den Kern. In der Metaphase werden beide Membransysteme von den Mikrotubuli des Spindelapparates durchzogen. In der frühen Telophase liegen die astralen Membranen jeweils über einem künftigen Tochterkern, während die „parafusorial membranes“ beide Kerne umschließen (Abb. 21D). In der späten Telophase sind die astralen Membranen noch intakt, wohingegen die „parafusorial membranes“ fusionieren und die Tochterkerne umhüllen (Abb. 21E). Diese Vorgänge wiederholen sich in der Meiose II.

In postmeiotischen elongierenden Stadien wird das Axonem von einer ER-Schicht, der axonemalen Scheide umschlossen. Die Mehrheit der Spermatidenbündel zeigt eine gleichförmige Verteilung des FAN-GFP-Proteins.



**Abb. 21: Lokalisierung des FAN-GFP-Fusionsproteins im endoplasmatischen Retikulum verschiedener Keimzellstadien.**

**A:** Hodenschlauchansicht, **B:** Eine Cyste mit primären Spermatocyten, deren große Zellkerne eine globuläre Morphologie aufweisen. **C:** Eine einzelne späte primäre Spermatocyte. **D:** Frühe Telophase I, **E:** Späte Telophase I, **F:** Teilansicht von mehreren nebeneinanderliegenden Spermatidenbündeln.

In einigen Fällen kann man zusätzlich eine Art Plättchen erkennen, die stark fluoreszieren und ebenfalls über die gesamte Länge des Bündels verstreut liegen (Abb. 21F). Andere Bündel zeigen lokale Anhäufungen dieser Plättchen und manchmal weichen die Flagellen in diesen Bereichen auseinander. Es ist jedoch unklar, ob es sich dabei um degenerierende Zellen handelt oder ob das Muster mit dem Individualisierungsprozeß zusammenhängt. Zwei Drittel der axonemalen Scheide, longitudinal gesehen, werden beim Individualisierungsprozeß entfernt, bei dem die bis dahin über Cytoplasmabrücken verbundenen Spermatiden eine vollständige Plasmamembran erhalten. Die Individualisierung findet im sog. „cystic bulge“ statt, der sich vom Kopf beginnend das Bündel hinauf bewegt. Der überwiegende Teil des Cytoplasmas sowie überflüssige Organellen werden dabei in den „waste bag“ am Ende des Bündels befördert. Da die reifen Spermien keine Fluoreszenz aufweisen, werden die retikulären Strukturen, die das Fusionsprotein enthalten, vermutlich abgestreift.

Um zu testen, ob das GFP allein in der Lage ist, in Membranen zu integrieren und die Lokalisierung des FAN-GFP-Proteins dadurch möglicherweise allein bestimmt, wurde ein Kontrollkonstrukt erzeugt. Hierzu wurde das *Clal-KpnI*-Fragment, das schon für die *lacZ*-Fusionen eingesetzt worden war (siehe 2.10), als Promotor vor die *GFP*-Kassette kloniert. Da „*P{UAST} green*“ keine *Clal*-Schnittstelle aufweist, wurde die benachbarte *XhoI*-Schnittstelle gewählt, um die Promotorsequenzen aus dem genomischen *Clal-SacI* Subklon zu isolieren und über *XhoI/KpnI* in „*P{UAST} green*“ einzuklonieren. Die Hoden der aus der Keimbahntransformation hervorgegangenen homozygoten Männchen zeigten eine mäßige, diffus verteilte Fluoreszenz. Es konnte keine Assoziation des GFP mit dem endoplasmatischen Retikulum der verschiedenen Spermatogenese-Stadien festgestellt werden. Demnach trägt der GFP-Anteil nicht zur ER-spezifischen Lokalisierung des FAN-GFP-Proteins bei.

#### 2.15.2 Untersuchung der subzellulären Verteilung von FAN mit Hilfe eines Anti-Peptid-Antikörpers

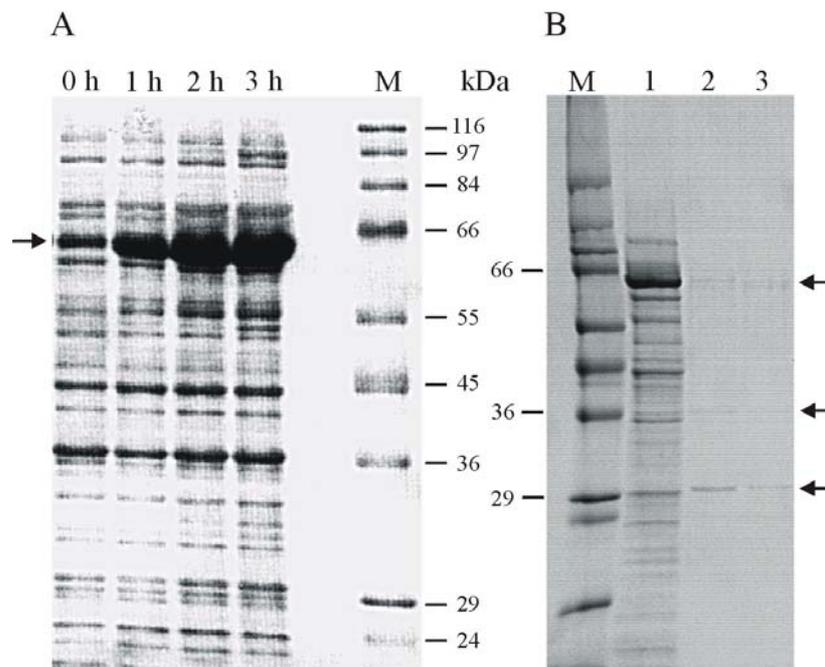
Um Peptid für die Herstellung eines Anti-FAN-Antikörpers zu gewinnen, wurde der für die Aminosäuren 1-193 kodierende Teil des *farinelli*-Gens (d.h., ohne den für die Transmembrandomäne kodierenden C-terminalen Abschnitt, siehe Abb. 15) in den Vektor pSCREEN-1b (Novagen) integriert. Dieser Vektor ist so konzipiert, daß ein Fusionsprotein

entsteht, dessen N-terminaler Bereich verschiedene Aminosäureabfolgen enthält, die die Aufreinigung aus dem bakteriellen Zellextrakt erleichtern sollten. Darunter befindet sich die 15 Aminosäuren-Abfolge des S-Peptids. Daher sollte zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem bakteriellen Zellextrakt das S-Tag rEK Aufreinigungs-Kit (Novagen) verwendet werden. In diesem Fall macht man sich die Interaktion zwischen dem 15 Aminosäuren langen S-Peptid und dem S-Protein zunutze, deren Komplexbildung *in vivo* zur Entstehung einer aktiven Form der pankreatischen Ribonuklease A führt. Das mit dem S-Peptid ausgestattete Fusionsprotein sollte durch Inkubation mit S-Protein-gekoppelter Agarose aus dem Zellextrakt isoliert werden. In einem zweiten Schritt sollte das Fusionsproteins mittels rekombinanter Enterokinase (rEK) geschnitten werden, so daß der erwünschte C-terminale Teil in den Überstand gelangt. Anschließend sollte das Enzym durch Zugabe einer speziellen Agarose, die rEK-bindende Eigenschaften aufweist, entfernt werden. Durch Zentrifugation sollten die Agarose und das im Überstand befindliche gereinigte Protein schließlich voneinander getrennt werden.

Abb. 22A zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamtproteine, die vor bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion der Expression aus den Bakterien gewonnen wurden. Für das Expressionsprodukt wurde ein Molekulargewicht von 57,3 kDa berechnet, seine Laufhöhe im 10%igen SDS-PAGE-Trenngel liegt bei 62-64 kDa (Abb. 22A, Pfeil). Im Vergleich zu den anderen Proteinen steigt der Gehalt an rekombinantem Protein mit zunehmender Expressionsdauer.

Die Herstellung eines Proteinextraktes wurde gemäß der Anweisung des S-Tag rEK Purification Kits (Novagen) durchgeführt. Da sich das Fusionsprotein in der unlöslichen Zellfraktion befand, wurde diese in Puffer gelöst, der 6 M Harnstoff enthielt. Die Lösung wurde anschließend auf einen Harnstoffgehalt von 2 M verdünnt. Laut Hersteller ist die rEK bis zu einer Harnstoffkonzentration von maximal 2 M aktiv. Die Bindungskapazität der S-Protein-Agarose sollte pro ml bei mindestens 0,5 mg Fusionsprotein liegen. Das Kontrollgel zeigte, daß das rekombinante Protein nicht vollständig an die S-Protein-Agarose gebunden wurde. Nach der Inkubation befanden sich noch signifikante Mengen im Überstand (Abb. 22B, Spur 1, Pfeil oben).

Es wurde festgestellt, daß sich während der Enterokinase-Behandlung neben dem erwünschten C-terminalen Peptid (ca. 29 kDa) auch geringe Mengen des vollständigen Proteins sowie des N-terminalen Peptides (ca. 36 kDa) von der S-Tag-Agarose ablösen (Abb. 22B, Spur 2, Pfeile).



**Abb. 22 A: Bakterielle Expression eines rekombinanten FAN-Proteins.**

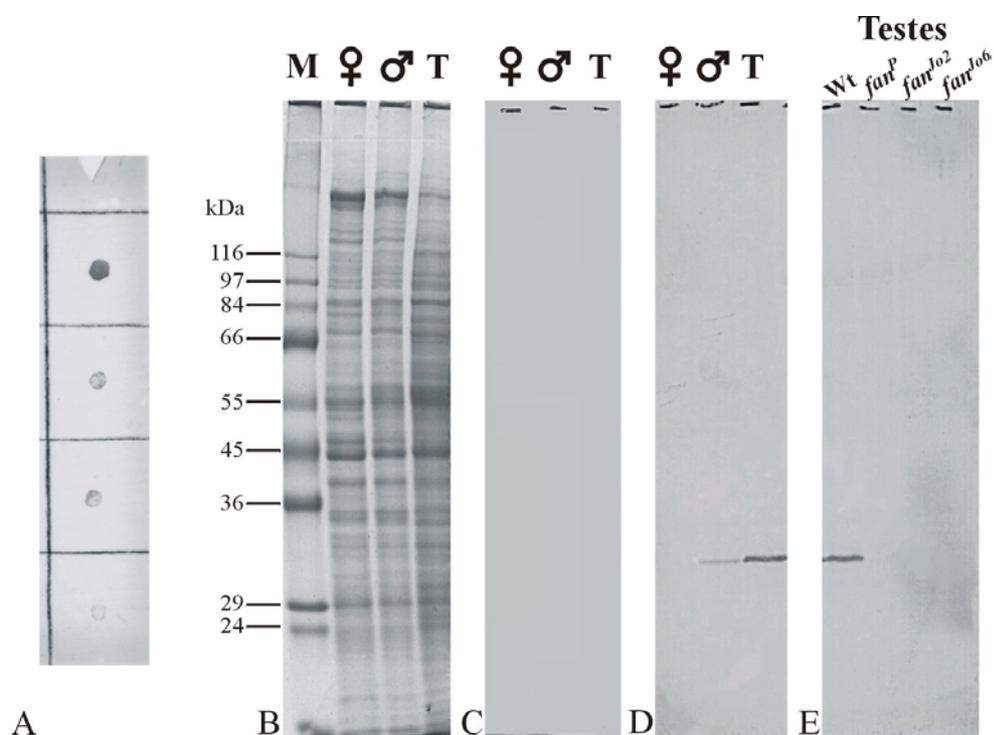
0 h: Gesamtproteine aus nicht induzierten Bakterien. 1 h, 2 h und 3 h: Gesamtproteine aus Bakterien ein, zwei und drei Stunden nach erfolgter Induktion, M: Molekulargewichtsstandard.

**B: Spaltung des rekombinanten Proteins durch Enterokinase.** Spur 1: 10  $\mu$ l Proteinextrakt nach der Inkubation mit S-Tag-Agarose. Spur 2: 5  $\mu$ l Proteinlösung nach Inkubation mit rEK. Spur 3: 5  $\mu$ l Proteinlösung nach der Verringerung des Volumens durch Mikrokonzentrierungsfilter.

Das Reduzieren des Probenvolumens mit Hilfe von Mikrokonzentrierungsfiltern führte zu weiterem Materialverlust. Obwohl das Volumen um den Faktor 5 verringert wurde, enthielt ein gleichgroßes Aliquot Lösung weniger Protein (Abb. 22B, vergleiche Spuren 2 und 3). Nach der rEK-Behandlung konnten aus dem von einer 100 ml Kultur gewonnenen Proteinextrakt lediglich weniger als 40  $\mu$ g FAN-Peptid pro ml S-Protein-Agarose erzielt werden. Nachdem die Menge an eingesetzter S-Protein-Agarose verdoppelt wurde, konnte zwar mehr Fusionsprotein gebunden werden, dies wurde dann aber unvollständig gedaut. Unter den vorliegenden Bedingungen wurden 4-6  $\mu$ g Fusionsprotein pro Einheit Enterokinase geschnitten, der vom Hersteller angegebene Wert liegt bei 50  $\mu$ g Fusionsprotein pro Enzym-Einheit. Da die im Puffer enthaltene Harnstoffkonzentration die Aktivität der rEK beeinträchtigte, wurde die Probe in einem weiteren Ansatz vor dem Dau gegen Puffer ohne Harnstoff dialysiert. Zwar erhöhte dies die Aktivität des Enzyms erheblich, bewirkte jedoch die Entstehung unspezifischer Produkte.

Aufgrund der dargelegten Problematik konnte auf diesem Weg nicht genügend Peptid für die Immunisierung eines Kaninchens gewonnen werden. Daher wurde die Firma Charles River mit der Synthese eines Peptids, das sich über die Aminosäurenreste 141 bis 160 von FAN erstreckt, und mit der anschließenden Antikörperherstellung beauftragt.

Die Spezifität des erhaltenen  $\alpha$ -FAN-Antiserums wurde anhand von Western Blots getestet (Abb. 23). Der Antikörper reagiert sowohl auf das rekombinante, aus dem Bakterien-Gesamtextrakt isolierte FAN-Protein als auch auf das natürliche, aus dem Testis von *Drosophila melanogaster* stammende Protein (Abb. 23A, D und E).

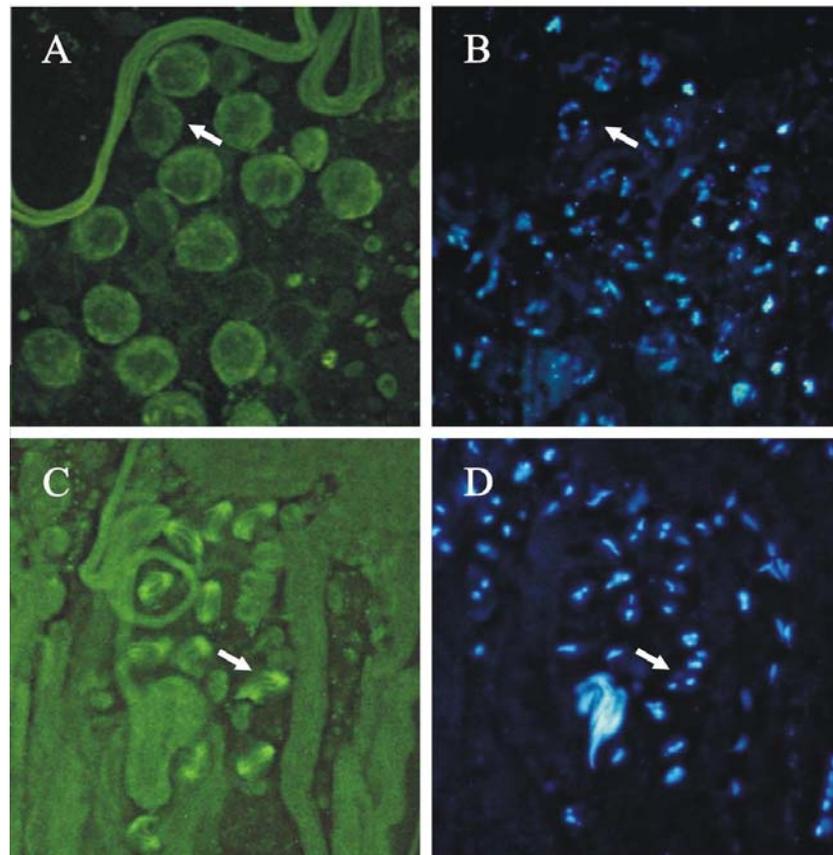


**Abb. 23: Überprüfung der Spezifität des  $\alpha$ -FAN-Antiserums.**

**A:** „Dot Blot“ mit rekombinantem FAN-Protein. Je 2  $\mu$ l einer Verdünnungsreihe von in  $dH_2O$  gelöstem Protein (entsprechend 80 ng, 8 ng, 1,6 ng und 0,8 ng) wurden auf Nitrozellulose-Membran pipettiert und mit  $\alpha$ -FAN-Antiserum (1:10000) inkubiert. **B:** Mit Coomassie angefärbte Proteine aus ganzen Tieren bzw. Testes (T) (SDS-PAA-Gel). Pro Spur wurde die Proteinmenge von zwei Weibchen, vier Männchen bzw. 20 Hoden eingesetzt. M: Molekulargewichtsstandard. **C:** Dem Gel entsprechender Blot, inkubiert mit Präimmunsereum (1:5000). **D:** Dem Gel entsprechender Blot, inkubiert mit  $\alpha$ -FAN-Antiserum (1:10000). **E:** Blot mit Proteinen aus Wildtyp-Hoden (Wt) bzw. Hoden der P-Element-Insertionslinie (*fan<sup>P</sup>*) und der Remobilisierungslinien (*fan<sup>Jo2</sup>* und *fan<sup>Jo6</sup>*), inkubiert mit  $\alpha$ -FAN-Antiserum (1:10000). Pro Spur wurde die Proteinmenge aus 20 Hoden verwendet.

Der Antikörper weist unter den aus Männchen bzw. Testes gewonnenen Proteinen jeweils eine einzelne Proteinbande nach, und zwar auf der Höhe von 29 kDa (Abb. 23D). Weibchen enthalten dieses Protein nicht. Das auf einem entsprechenden Blot getestete Präimmunsereum (1:5000 verdünnt) führt dagegen nicht zur Anfärbung von Banden (Abb. 23C). Diese Beobachtungen belegen, daß der Antikörper das FAN-Protein selektiv erkennt. Durch die vorangegangenen Northern Blot-Untersuchungen war bereits gezeigt worden, daß weder die P-Element-Insertions-Linie *fan<sup>P</sup>* noch die Remobilisierungslinie *fan<sup>Jo2</sup>* in der Lage ist, *fan* zu exprimieren (siehe 2.6). Dies konnte nun durch den Immunnachweis auch für Linie *fan<sup>Jo6</sup>* bestätigt werden. Im Fall dieser Linie wird ein *fan*-Transkript gebildet, das 8 nt stromaufwärts vom AUG-Codon 48 vom P-Element abgeleitete Nukleotide enthält. Dies scheint die Translation der mRNA zu verhindern, denn in Testes aus Männchen dieser Linie konnte kein FAN-Protein nachgewiesen werden (Abb. 23E).

Da das  $\alpha$ -FAN-Antiserum auf Testes-„whole mounts“ eine starke unspezifische Reaktion mit der Hodenhülle zeigte, die die eigentlichen Signale überlagerten, wurden Quetschpräparate angefertigt. Das bedingt allerdings, daß in die räumliche Struktur der Zellen eingegriffen wurde und die Zellen auch nicht mehr in ihrem natürlichen Verband vorliegend untersucht werden konnten. Das beobachtete Muster stimmte jedoch in den wesentlichen Punkten mit der Verteilung des FAN-GFP-Fusionsproteins überein. So wurde FAN in primären Spermatocyten und den darauffolgenden Spermatogenesestadien nachgewiesen, und zwar innerhalb von im Cytoplasma liegenden membranartigen Strukturen, bei denen es sich vermutlich um das ER bzw. um ER-Derivate handelt. Abbildung 24A zeigt die Immunlokalisierung von FAN in reifen primären Spermatocyten. In dieser Phase erscheinen das Geschlechtschromosomenpaar und die Chromosomen 2 und 3 innerhalb des großen Kerns als drei „Cluster“ Hoechst 33258-gefärbten Materials (vergleiche Pfeile in Abb. 24A und B). Im Gegensatz zur Verteilung des FAN-GFP-Fusionsproteins konnte in den primären Spermatocyten allerdings keine verstärkte Akkumulation von FAN an der Kernperipherie festgestellt werden (vergleiche Abb. 21), was möglicherweise auf die Präparation zurückzuführen ist. Jedoch konnte auch in den Quetschpräparaten, wie in Abbildung 24C wiedergegeben, eine Anfärbung der „astral“ und „parafusorial membranes“ während der meiotischen Teilungen beobachtet werden. Sie umgrenzen in diesem Fall den Bereich, innerhalb dessen die Zellkerne der künftigen Tochterzellen liegen (vergleiche Pfeile in Abb. 24C und D).



**Abb. 24: Immunlokalisierung von FAN in Hoden-Quetschpräparaten.**

A und C:  $\alpha$ -FAN-Antiserum (1:100). B und D: DNA-Nachweis mit Hoechst 33258. Die Pfeile in A und B weisen auf eine primäre Spermatocyte, in der die drei Chromosomen-„Cluster“ innerhalb des großen Kerns deutlich zu erkennen sind. Die Pfeile in C und D deuten auf eine Spermatocyte, die sich in der Telophase II befindet. Die DNA-Gegenfärbung zeigt, daß die beiden Tochterkerne bereits ausgebildet sind.

In elongierten Spermatischen weist der Antikörper FAN über die gesamte Bündellänge verteilt nach, wie dies bereits im Fall des FAN-GFP-Fusionsproteins beobachtet wurde.

### **2.16 Das FAN-GFP-Fusionsprotein kann die Sterilität der P-Element-Insertionslinie und der beiden Remobilisierungslinien nicht effizient retten**

Da die subzelluläre Lokalisierung des GFP-Fusionsproteins der Verteilung des FAN-Anteils zu entsprechen scheint, sollte geprüft werden, ob es die Funktion des FAN-Proteins übernehmen kann. Daher wurde das *fan-GFP*-Konstrukt in die P-Element-Insertionslinie

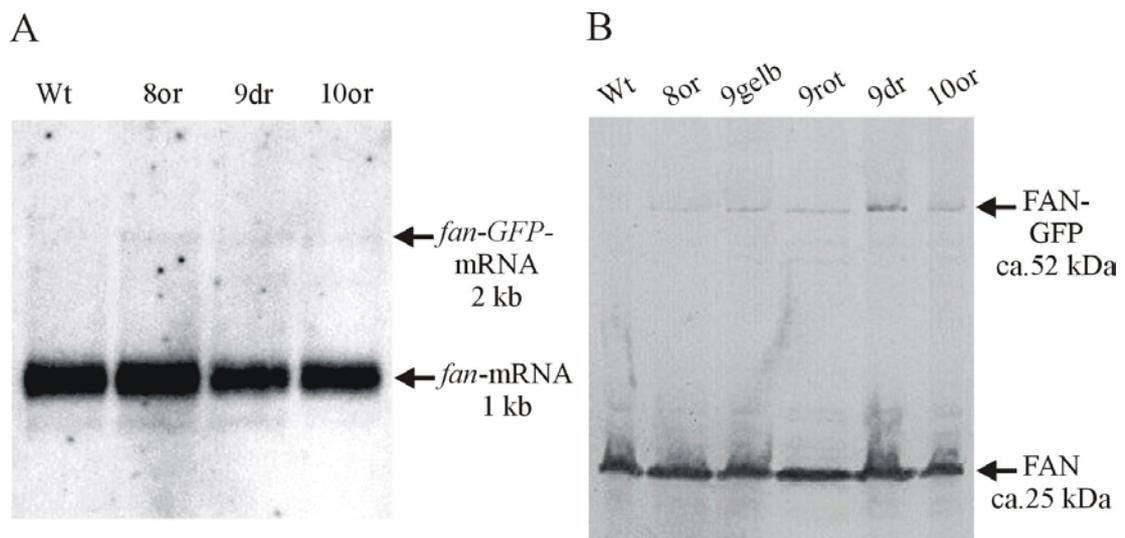
$fan^P$  und die Remobilisierungslinien  $fan^{Jo2}$  und  $fan^{Jo6}$  eingekreuzt. Unter den 12 vorhandenen transgenen Linien wurden hierfür die Linien GFP8or, GFP9gelb, GFP9dr und GFP10or ausgewählt, die das Konstrukt auf dem zweiten Chromosom tragen. Die Kreuzungsschritte erfolgten auf die bereits im Fall des „mutant rescue“-Experiments erläuterte Weise (siehe 2.11). Ein Teil der resultierenden homozygoten  $fan$ -Männchen, die über ein oder zwei Kopien des  $fan$ -GFP-Konstruktes verfügten, wurde mit Jungfrauen gepaart, um ihre Fertilität zu testen (Tab. 3). Ein anderer Teil wurde präpariert und die Hoden mikroskopisch auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Da die P-Element-Insertionslinie einen  $white^+$ -Phänotyp aufweist und die Gegenwart des  $fan$ -GFP-Konstruktes nicht an der Augenfarbe erkannt werden konnte, wurden die für die Fertilitätstests verwendeten Tiere zuvor mit einem Fluoreszenzbinokular auf das Vorkommen von GFP im Hoden untersucht. Tabelle 3 gibt die Anzahl der angesetzten Tests (drei Jungfrauen auf ein Männchen) an und wieviele davon positiv waren.

**Tab. 3: Statistische Auswertung der Rettung von Mutanten durch Einkreuzung des  $fan$ -GFP-Konstruktes.**

Angegeben ist die Anzahl der positiven Fertilitätstests im Vergleich zur Gesamtzahl der angesetzten Tests.  $fan^P$  = P-Element-Insertionslinie,  $fan^{Jo2}$  und  $fan^{Jo6}$  = Remobilisierungslinien.

	GFP8or	GFP9gelb	GFP9dr	GFP10or
$fan^P$	1/21	2/20	3/10	3/20
$fan^{Jo2}$	0/9	5/15	0/10	0/15
$fan^{Jo6}$	0/15	7/15	0/10	5/15

Von insgesamt 175 Fertilitätstests sind nur 26, das entspricht 15%, positiv ausgefallen, d.h., man kann nur von einer partiellen Rettung sprechen. Die subzelluläre Verteilung des GFP-Fusionsproteins in den Nullmutanten unterscheidet sich nicht von der in Männchen, die zusätzlich über endogenes FAN verfügen. Northern Blot- und Western Blot-Analysen zeigten allerdings, daß das  $fan$ -GFP-Konstrukt im Vergleich zum Wildtyp- $fan$  in wesentlich geringeren Mengen exprimiert wird (Abb. 25). Die Expression des Konstruktes ist gegenüber dem endogenen  $fan$  mindestens um den Faktor 10 reduziert. Angesichts der niedrigen Mengen an FAN-GFP-Fusionsprotein ist es weder erstaunlich, daß die Fertilität von transgenen Männchen nicht negativ beeinflusst wird, noch daß der Phänotyp der Nullmutanten nicht gerettet werden kann.



**Abb. 25: Das FAN-GFP-Protein wird in deutlich geringerem Maße exprimiert als das endogene FAN-Protein.**

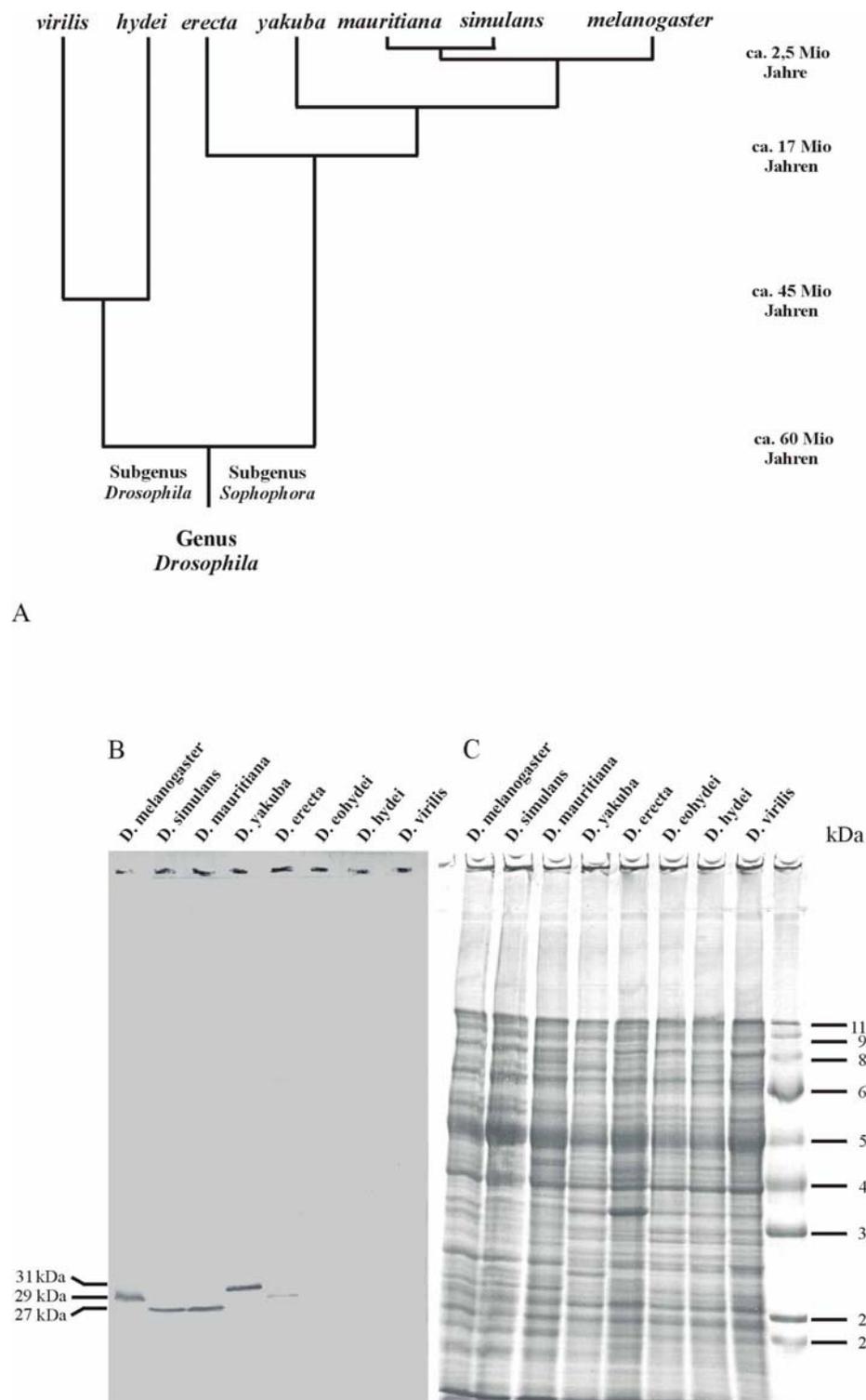
Die verwendeten Männchen trugen im Fall der Linien 9rot und 9dr nur eine Kopie des *fan-GFP*-Konstruktes, die der Linien 8or, 9gelb und 10or dagegen zwei Kopien. **A: Northern Blot-Hybridisierung.** Poly(A)-mRNA, die aus Männchen eines Wildtypstamms (Wt) bzw. aus mit dem GFP-Konstrukt transformierten Männchen stammt, wurde mit dem Gegenstrang von *fan*-cDNA 14 hybridisiert. **B: Western Blot.** Das endogene FAN-Protein und das FAN-GFP-Fusionsprotein wurden mit Hilfe eines gegen FAN gerichteten Antikörpers (Siehe 2.14.3) in Proteinextrakten aus Testes nachgewiesen.

Die Ergebnisse erlauben demnach zwei Interpretationen:

- Das Fusionsprotein ist funktionstüchtig, aber eine für die umfassende Rettung ausreichende Expression wurde nicht erreicht.
- Das Fusionsprotein ist nicht funktionstüchtig, aber die Menge, in der es vorliegt, reicht nicht aus, um mit endogenem FAN zu kompetieren und dessen Funktion zu behindern.

### 2.17 Das FAN-Protein ist innerhalb von *Drosophila*-Arten konserviert, deren evolutive Abspaltung nicht mehr als 17 Millionen Jahre zurückliegt

Das  $\alpha$ -FAN-Antiserum wurde weiterhin dafür genutzt, das Vorkommen des FAN-Proteins innerhalb verschiedener *Drosophila* Species zu untersuchen. Hierfür wurde ein Western Blot mit Proteinen aus Testes der Arten *D. melanogaster*, *D. mauritiana*, *D. simulans*, *D. yakuba*, *D. erecta*, *D. eohydei*, *D. hydei* und *D. virilis* angefertigt.



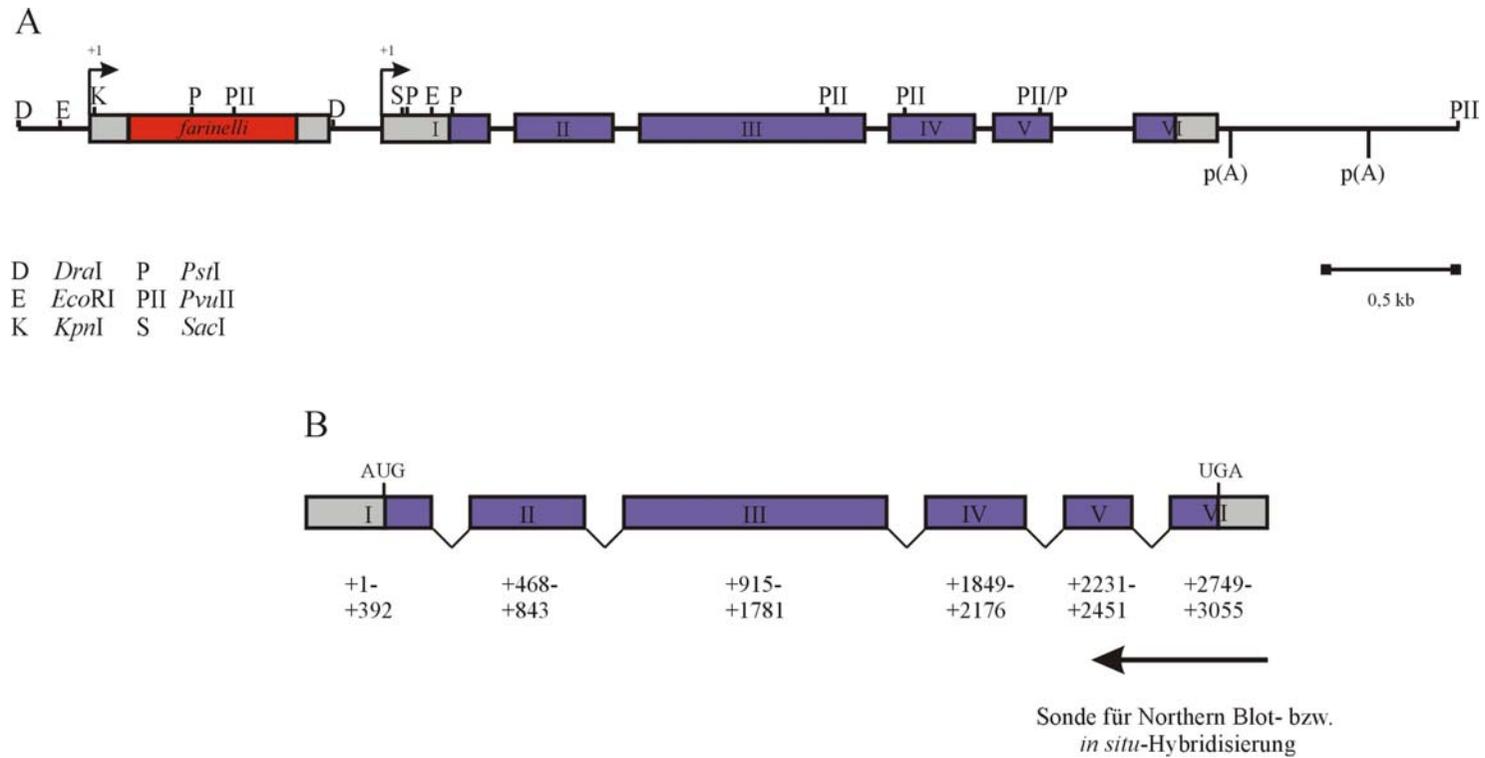
**Abb. 26: Verbreitung des FAN-Proteins in unterschiedlichen *Drosophila*-Arten.**

**A:** Phylogenetische Beziehungen der verwendeten Species (nach O'Neil & Belote, 1992, modifiziert) **B:** Western Blot inkubiert mit  $\alpha$ -FAN-Antiserum (1:10000). Die in der *D. melanogaster*-Spur eingesetzte Proteinmenge stammt aus 20 Testes, alle anderen Spuren wurden entsprechend angeglichen. **C:** Coomassie-gefärbtes Proteingel, das unter denselben Bedingungen hergestellt wurde wie das für den Blot verwendete Gel.

Die verwandtschaftlichen Beziehungen der getesteten Arten werden in Abb. 26A wiedergegeben. Da die Größe der Gonaden zwischen den einzelnen Arten stark variiert, wurden die eingesetzten Proteinmengen angeglichen. Abb. 26C zeigt ein Coomassiegefärbtes Gel, das unter den gleichen Bedingungen erstellt wurde wie das für den Transfer verwendete Gel. Mit Hilfe des Antikörpers konnte FAN-Protein über die Ergebnisse der Northern Blot-Analyse hinaus nicht nur in *D. simulans* und *D. yakuba*, sondern auch in *D. erecta* nachgewiesen werden (Abb. 26B). Dabei stellte sich heraus, daß sich die vom Antikörper erkannten Proteine in ihrer Größe geringfügig unterscheiden. Die Gründe hierfür sind unbekannt. Die weniger eng verwandten Arten *D. eohydei*, *D. hydei* und *D. virilis* verfügen vermutlich nicht über das *fan*-Gen, zumindest wird in den Hoden kein (durch den Antikörper nachweisbares) FAN-Protein gebildet .

### **2.18 In unmittelbarer Nachbarschaft zu *farinelli* liegt ein weiteres unbekanntes Gen, das eine gonadenspezifische Funktion ausüben könnte: *neighbor of farinelli* (*nof*)**

Im Abstand von 561 Nukleotiden nach dem Stop-Codon von *fan* folgt das nächste offene Leseraster. Mit Hilfe der EST-Datenbank des BDGP (Rubin *et al.*, 2000) konnte ein EST-Klon ermittelt werden, der Sequenzidentität mit dem Leseraster aufweist: GH11023. Dieser Klon wurde ursprünglich aus einer cDNA-Bank isoliert, die aus Köpfen hergestellt worden war. Er ist Mitglied einer Gruppe von ESTs, die aus 21 Klonen besteht, davon stammen 17 aus embryonalem, zwei aus Kopf- sowie je einer aus larvalem Material bzw. Schneiderzellen. Nach der vollständigen Sequenzierung von GH11023 konnte die genomische Organisation des Gens geklärt werden (Abb. 27, siehe auch 7.3). Es enthält fünf Introns. Da es keine Daten über seine Funktion gab, wurde es aufgrund seiner Lage *neighbor of fan* (*nof*) genannt. Die cDNA GH11023 umfaßt 2491 nt (*EcoRI/XhoI* in pOT2), davon repräsentieren 236 Nukleotide 5'untranslatierte Sequenz und 149 Nukleotide 3'untranslatierte Sequenz. Die Übereinstimmung des ESTs mit der genomischen Sequenz beginnt 326 nt nach dem Stop-Codon von *fan*. Im Oktober 2000 wurde *nof* unter der Nummer AJ297734 in die EMBL-GenBank eingetragen. *nof* kodiert ein aus 702 Aminosäureresten bestehendes Protein (NOF, Abb. 28). Die Programme PSORT (GenomeNet, Japan) und PROSITE (Hofmann *et al.*, 1999) erkennen im N-terminalen Bereich des Proteins eine zweigeteilte Kernlokalisierungssequenz und berechnen eine 78%ige Wahrscheinlichkeit der Kernlokalisierung.



**Abb. 27: Organisation von *neighbor of farinelli* (*nof*) (A) und der cDNA GH11023 (B).**

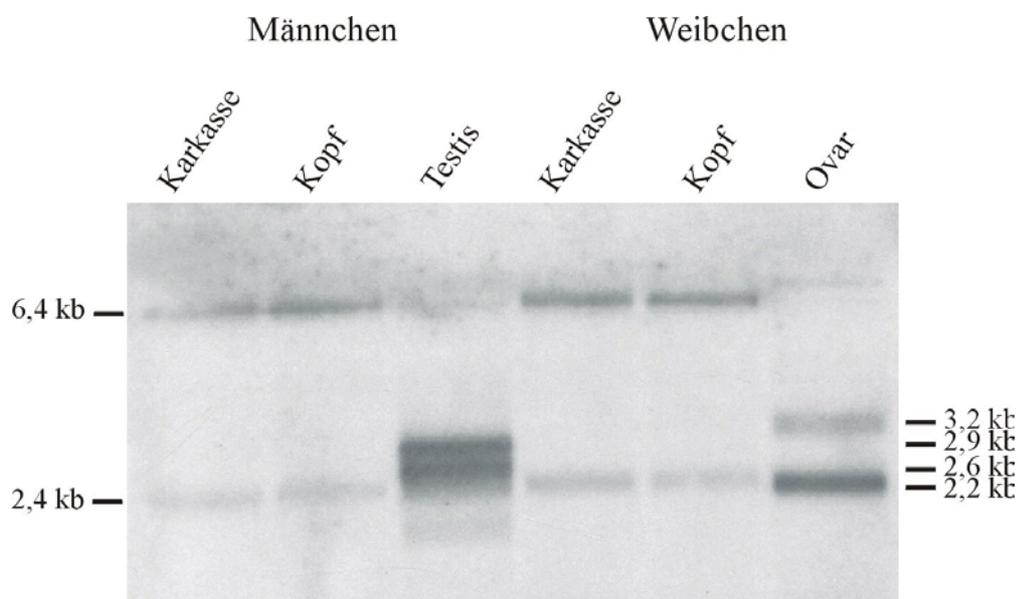
Der offene Leserahmen ist blau hervorgehoben. Die untranslatierten Regionen sind grau gekennzeichnet. Die Exon-Intron-Grenzen wurden aus der Sequenzierung des EST-Klons abgeleitet. p(A) markiert die Position eines Polyadenylierungssignals. In B sind die relativen Positionen der Exongrenzen angegeben, die Introns sind in diesem Fall formal mit gleicher Länge dargestellt.

NOF	1	MSARMLKKLQGDADKLA P P P D E D C E E L S D N D E L E D S D M Q R --- Y R K S H L N P F D L L N Q A
NULP1	1	MSRRALRRRLRGEQRGQEP L G P D A L K F V L L D D D D A E E E G P K P G L G G R R P P G G A G K E G V R V N N
hsKIAA	1	MSRRALRRRLRGEQRGQEP L G P G A L H F D L R D D D D A E E E G P K R E L G V R R P P G G A G K E G V R V N N
NOF	57	GLSLSESEFKEDD--NETEHPSAALPNATASAAAKKKKKRKKKAKSSGNHISSEDNE---
NULP1	61	RFELINTEDEDDLVVNGERSDCTLPDSVSSGNKGRAKHGNAETKQDGGATKAGSSEQSN
hsKIAA	61	RFELINIDLEDDPVVNGERSGCAITDAVAPGNKGRGQRGNTESKTDGDDTETVPSQSH
NOF	112	-----RQDK-----YFEKVDPLGKVYDAVPRQSAKQLVS--AATGTTATKKLLAV
NULP1	121	ASGKLRKKKKKQKNKKSCTGSESENGLEDIDRILERIEDSSGFSSHPGPPPLSSRKLVLYV
hsKIAA	121	ASGKLRKKKKKQKNKKSSTGEASENGLEDIDRILERIEDSTGLNRPGPAPLSSRKHVLYV
NOF	156	ELRHLNPQNEMRRTFGKRVVVKVETK-RGROKPTLKSTYMTAKDSWPALTKNTITMKLLP
NULP1	181	EHRHLNPDPTELKRYFGARAVLGEERPRQRORVYPKCTWLTPKSTWPRYSKPGLSMRLLP
hsKIAA	181	EHRHLNPDPTELKRYFGARAVLGEQRPRQRORVYPKCTWLTPKSTWPRYSKPGLSMRLLP
NOF	215	APDSPSVSSKSITDNGADVQWFAFEHSQYQGVQOMFLSALERIDSEFLITLIKRCPYHV
NULP1	241	SKKG-----LSFFAFDHNEEYQQAQHKFLVAVESMEPNIVVLLQTSPIYHV
hsKIAA	241	SKKG-----LSFFAFEHSEYQQAQHKFLVAVESMEPNIVVLLQTSPIYHV
NOF	275	DSLVLQSEVCKMTEDFSLSAELLERALLLESLSLHINFSLTSGNCRLDYRRQENRSFYIV
NULP1	287	DSLLQLSDACRFQEDQEMARDLTERALYSMECAFHPLFSLTSGTCRLDYRRPENRSFYLT
hsKIAA	287	DSLLQLSDACRFQEDQEMARDLVERALYSMECAFHPLFSLTSGACRLDYRRPENRSFYLA
NOF	335	LFKHAQVLEERACSRFAFEISKLLLSLQPDTPPLAMILVIDYVALRSKQFEWLVFEYEKY
NULP1	347	LYQMSFLEKRGCPRTALEYCKLTLSELPDEDPLCMLLLIDHLALRARNYEYLIRLFQEW
hsKIAA	347	LYQMSFLEKRGCPRTALEYCKLTLSELPDEDPLCMLLLIDHLALRARNYEYLIRLFQEW
NOF	395	NAARNLNQLPNMAYSALALHTLYG-----ACERSNQALQYALLMFPQVLRPLL
NULP1	407	VAHRNLSQLPNFAFSVPLAYFLLSQQTDLPEHELSARQASLLIQQTLTMFPQVLMPLL
hsKIAA	407	EAHRNLSQLPNFAFSVPLAYFLLSQQTDLPECEQSSARQASLLIQQALTMFPQVLLPLL
NOF	444	DEMSVQTDKRVLASSYFADVSGNOSPALHOLVCLYVCRARVVWRQNEVLPWLESNVNIV
NULP1	467	EYCSVRPDATVSNHRFFGPDAEISQPPALGQLVSLYLGRSHFLWKEPAIMSWLEENVHEV
hsKIAA	467	ESCSVRPDASVSSHRRFFGPNAEISQPPALSQLVNLYLGRSHFLWKEPATMSWLEENVHEV
NOF	504	LDRIESKDPLVNEYKEKRSRVSSTPPTLRHVILSDYKEKVPPLAVFVSKEKQAIMTYD
NULP1	527	LQAVDAGDPAVEACENRRKVLQYQAP-RNIHRHVMLSEIKEAV-AALPSDVTTSQSVMGFD
hsKIAA	527	LQAVDAGDPAVEACENRRKVLQYQAP-RNIHRHVILSEIKEAV-AALPPDVTTSQSVMGFD
NOF	564	PLPPNSVNCYHRKSSSSSPTTNTNNSVSMFFQSLLPSFNINLAANAQLQEGAAPAAG
NULP1	585	PLPPLDTIYSYVRPERLSP---VSHGNTIALFFRSLLPNYTMEL
hsKIAA	585	PLPPSDTIYSYVRPERLSP---ISHGNTIALFFRSLLPNYTMEL-----
NOF	624	AGAAAGDANIEVGIHQGAAGVAGEGEEAGLQOSTLMMDDAMRDFLQNERIAEHLRSPETA
NULP1	625	-----GERPEEGVAGG---LNRNQGILNRLMLAVRDMMANFHLNDLEAPHEDD
hsKIAA	625	-----GERPEEGVAGG---LNRNQGILNRLMLAVRDMMANFHLNDLEAPHEDD
NOF	684	AAQSTSSNDEEEGSSDYID
NULP1	669	AEGEGEWD-----
hsKIAA	669	AEGEGEWD-----

Abb. 28: Aminosäuresequenzvergleich zwischen NOF und den homologen Proteinen von Maus (Nulp1) und Mensch (hsKIAA). Das mögliche Kernlokalisierungssignal ist durch Umrahmung gekennzeichnet.

Abgesehen davon weist das Protein keine weiteren bekannten Motive auf. Mit Hilfe des BLAST-Programmes der NCBI-Datenbank (Altschul *et al.*, 1997) konnten aber ähnliche Proteine beim Menschen (KIAA1049) und bei der Maus (Nulp1) ermittelt werden (Abb. 28). Es handelt sich dabei um EST-Klone, die im Vergleich zu *nof* etwas kürzere Proteine kodieren. KIAA1049 und Nulp1 sind untereinander stark konserviert, die Aminosäuresequenzübereinstimmung mit NOF liegt im Fall des menschlichen Proteins aber nur bei etwa 45% und beim Protein der Maus bei etwa 46%.

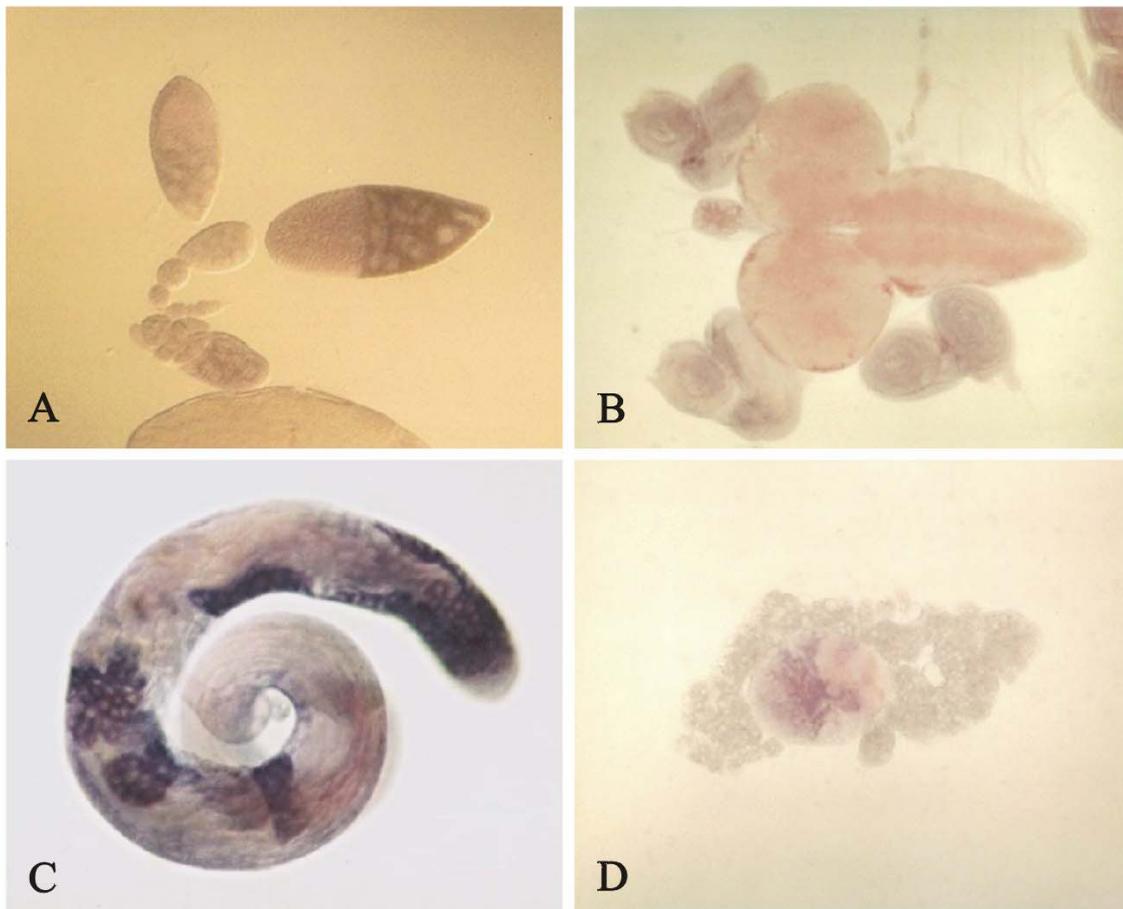
Der EST-Klon GH11023 wurde dazu genutzt, eine Sonde für Northern Blot- und *in situ*-Hybridisierungen zu gewinnen. Durch die Linearisierung mit *Pst*I wurde ein *in vitro*-Transkript erzeugt, das etwa 380 Nukleotide abdeckt (Abb. 27B). Es konnten mindestens fünf mRNA-Species nachgewiesen werden, die zum Teil eine geschlechtsspezifische Verteilung zeigen (Abb. 29). Das größte Transkript umfaßt mehr als 6 kb. Es kommt gemeinsam mit einer 2,4 kb mRNA vor allem in Karkassen und Köpfen vor. Während die Testes-Spur zwei abundante Transkripte mit einer Größe von 2,9 bzw. 2,6 kb zeigt, liegen in den Ovarien zwei mRNA-Species von etwa 3,2 kb und 2,2 kb Länge vor.



**Abb. 29: Northern Blot-Analyse von *neighbor of farinelli (nof)*.**

Poly(A)-mRNA aus verschiedenen Geweben von Wildtyp-Männchen und -Weibchen. Als Sonde wurde ein Gegenstrang-Transkript eingesetzt, das sich vom 3'-Ende des EST-Klons GH11023 ableitet (siehe Abb. 27B).

Für die *in situ*-Hybridisierung wurde ein markiertes Fragment verwendet, das sich über den gleichen Bereich des EST-Klons erstreckt wie die Sonde aus dem Northern-Experiment. *nof*-mRNA konnte im Cytoplasma von Spermatogonien und primären Spermatozyten nachgewiesen werden (Abb. 30C).



**Abb. 30: Analyse der Expression von *neighbor of farinelli* (*nof*) durch *in situ*-Hybridisierungen auf verschiedenen Geweben.**

Für die Hybridisierungen wurde eine DIG-markierte Oligonukleotid-Sonde eingesetzt. **A:** Ovariolen eines adulten Weibchens. Im ältesten Follikel ist eine Anreicherung von *nof*-mRNA im Cytoplasma der Nährzellen zu erkennen. Frühe Follikel zeigen eine wesentlich weniger intensive Färbung. **D:** Während das larvale Gehirn ungefärbt bleibt, kann *nof*-mRNA in den anhängenden Imaginalscheiben nachgewiesen werden. **C:** Hodenschlauch eines adulten Männchens. Auffällig ist die starke Akkumulation von Transkripten in den primären Spermatozyten. **D:** Die Transkription von *nof* beginnt bereits im larvalen Hoden, der schon einige Cysten mit gefärbten primären Spermatozyten enthält.

In elongierten Stadien wurde keine Färbung mehr beobachtet, was für eine baldige Degradation der *nof*-Transkripte nach der Meiose spricht. Während der Oogenese wurde *nof*-mRNA vor allem im Cytoplasma der Nährzellen lokalisiert, dieses wird mit zunehmendem Alter der Follikel deutlich (Abb. 30A). Die Oocyte zeigt dagegen wenig Färbung, was gegen eine Einlagerung von *nof*-Transkripten und für eine Funktion von *nof* in den Nährzellen sprechen könnte. Unter den larvalen Geweben, die eine Färbung zeigten, befanden sich neben den Testesanlagen (Abb. 30D) auch die Imaginalscheiben (Abb. 30B).

### III. Diskussion

Die Analyse von P-Element-Insertionslinien hat sich bei *Drosophila* als erfolgreiche Methode bewährt, um systematisch nach Genen zu suchen, die an ausgewählten Entwicklungsprozessen beteiligt sind und dementsprechend ein spezifisches Expressionsmuster aufweisen. Im Laufe der Untersuchungen wurde bewiesen, daß die Sterilität der P-Element-Insertionslinie *fan<sup>P</sup>* und der beiden Remobilisierungslinien *fan<sup>Jo2</sup>* und *fan<sup>Jo6</sup>* auf dem Ausfall des *farinelli (fan)*-Gens beruht. Der Phänotyp der mutierten Linien konnte durch das Einbringen einer transgenen *fan*-Kopie gerettet werden. Um genauere Daten über die zeitliche Expression von *fan* zu gewinnen, waren zwei Promotor-*lacZ*-Fusionen konstruiert worden, die verschieden lange genomische Fragmente enthielten. Das kürzere Fragment, welches die Positionen  $-77$  bis  $+36$  (relativ zum Transkriptionsstart von *fan*) abdeckte, reichte nicht aus, um die Transkription des Reportergens zu treiben. Dagegen verursachte das größere Konstrukt (*Clal-KpnI-lacZ*), das den Abschnitt von Position  $-762$  bis  $+36$  enthielt, eine auf die elongierten Spermatozonen beschränkte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Dieses zeitliche Muster steht im Gegensatz zur Expression des FAN-GFP-Fusionsproteins, das bereits in wesentlich früheren Keimzellstadien, und zwar den sich noch mitotisch teilenden Spermatozyten, nachgewiesen wurde. Im Vergleich zum *lacZ*-Konstrukt erstreckte sich das bei der GFP-Fusion verwendete genomische Fragment über den Bereich von  $-742$  bis  $+778$  und schloß abgesehen vom letzten Codon den gesamten offenen Leseraster von *fan* ein. Dies könnte darauf hindeuten, daß innerhalb des kurzen Abschnitts zwischen der *KpnI*-Schnittstelle bei  $+36$  und dem ATG bei  $+128$  Sequenzelemente lokalisiert sind, die die zeitliche Expression regulieren. Zumindest befinden sich wenige Nukleotide vor dem ATG-Codon Sequenzen, die essentiell für die Translation der *fan*-mRNA sind, wie sich bei der Untersuchung der Remobilisierungslinie *fan<sup>Jo6</sup>* herausstellte. Andererseits ist auch nicht auszuschließen, daß die verantwortlichen Elemente innerhalb des offenen Leserasters selbst liegen.

Obwohl die Untersuchungen ergaben, daß *fan* bereits in relativ frühen Spermatozytostadien, den Spermatozyten, exprimiert wird, können durch seinen Ausfall verursachte Effekte lichtmikroskopisch erst relativ spät in der Keimzellentwicklung festgestellt werden, und zwar während der Differenzierung der Spermatozonen. Die Komplexität des Differenzierungsprozesses setzt die Beteiligung einer Vielzahl von Genprodukten voraus und läßt daher die Existenz einer entsprechend großen Zahl mutierbarer Loci erwarten. In der Tat wurde bei einer früheren auf P-Element-Mutagenese beruhenden Studie

festgestellt, daß die deutliche Mehrheit der erzeugten männchensterilen Linien Defekte in der postmeiotischen Differenzierung aufwies, nämlich in 46 von 58 Fällen (Castrillon *et al.*, 1993). Der Ausfall des *farinelli*-Gens hat Auswirkungen auf die Kondensation der Spermatischen Kerne sowie die Funktionalität des Individualisierungskomplexes. Die Anfärbung der Zellkerne mit Hoechst 33258 macht sichtbar, daß bei homozygoten *fan*-Männchen nur ein Teil der Spermatischen Kerne eines Bündels die für die reifen Keimzellen typische nadelförmige Struktur angenommen hat. Die anderen Zellkerne zeigen zwar auch eine Verminderung des Durchmessers, bleiben aber von rundlicher Gestalt. Es treten niemals Bündel auf, die vollzählig elongierte, parallel angeordnete Kerne enthalten, wie es im Wildtyp der Fall ist.

Die Kondensation der Zellkerne verläuft bei Wildtyp-Spermatischen wie folgt: Zeitgleich mit dem Beginn der Axonembildung erfolgt die Reduktion des Zellkerndurchmessers von 6 µm auf 4-5 µm. Der Kern flacht auf einer Seite ab, wobei an dieser Stelle eine Art Fenster in der Kernmembran entsteht. Mit der einsetzenden Elongation und der damit verbundenen Ausbildung einer Längsachse verliert der Kern zunehmend an Breite. Dabei entsteht an der durch das Fenster definierten Seite des Kerns eine längsgerichtete Furche, die mit elektronendichtem Cytoplasma und vielen parallel zur Längsachse ausgerichteten Mikrotubuli gefüllt wird. Offenbar wird die Veränderung der Kernmorphologie stark durch die Assoziation mit diesem sog. „dense complex“ beeinflusst. Wenn der Kern beinahe die endgültige Länge erreicht hat, ist das dichte Cytoplasma nicht länger sichtbar und die Mikrotubuli werden aus der Furche entfernt. An der konvexen Seite des Kerns angeordnete Mikrotubuli tragen, gemeinsam mit der den Kern umgebenden ER-Schicht, vermutlich zur Aufrechterhaltung der Kern-Asymmetrie bei. Am Ende des Elongationsprozesses wird die Furche zurückgebildet. Erst jetzt wird die Kondensation des Chromatins eingeleitet. Dadurch überflüssig gewordene Anteile der Kernhülle werden in Form von Vesikeln abgeschnürt. Im letzten Schritt spitzt sich das bis dahin breitere basale Ende des Kerns zu; er hat nun eine Länge von etwa 9 µm und eine Breite von 1,2 µm erreicht (Lindsley & Tokuyasu, 1980).

Abgesehen davon, daß im Fall von *fan*-Spermatischen nur die Hälfte der Kerne elongiert, liegen diese über einen relativ großen Bereich verstreut vor. Es ist unwahrscheinlich, daß die Zerstreung der Kerne durch ein Auseinanderziehen infolge der Wanderung des mißgebildeten Individualisierungskomplexes verursacht wird, da pro Bündel nur wenige „investment cones“ gebildet werden. Frühere Untersuchungen zeigten, daß bei einer Reihe von Mutationen, die zu einer fehlerhaften Kernmorphologie führen, zum Beispiel *thousand*

*points of light (tho)*, *crossbronx (cbx)* und *long island expressway (lie)*, auch die Individualisierung gestört ist (Fabrizio *et al.*, 1998). Daher geht man davon aus, daß die Anordnung der Kerne ein Gerüst für die Zusammenlagerung der Komponenten des Individualisierungskomplexes bietet (Fabrizio *et al.*, 1998). Der aus Cytoskelett- und Membran-Komponenten bestehende Individualisierungskomplex wird am Kopfende des Bündels zwischen den elongierten, im Wildtyp relativ parallel nebeneinander angeordneten Kernen zusammengesetzt (Hicks *et al.* 1999, Fabrizio *et al.*, 1998). Jeder Kern wird dabei von einem trichterförmigen „investment cone“ umschlossen. Im Verlauf der Individualisierung wandern die 64 „investment cones“ synchron an den Schwänzen entlang zum Bündelende. In einem *fan*-Bündel können nur denjenigen Kernen „investment cones“ zugeordnet werden, die eine längliche Form angenommen haben. Hin und wieder erscheinen sogar einzelne „investment cones“, die mit ihrem schmalen Ende in Richtung Testisspitze orientiert sind. Die Störung der Individualisierung bei *fan*-Männchen ist wahrscheinlich eine Konsequenz aus der unvollständigen Kernkondensation und der fehlenden Ausrichtung der Kerne, da die notwendigen Bedingungen für den korrekten Aufbau des Individualisierungskomplexes nicht gegeben sind.

Es ist bekannt, daß anormale Spermatiden nicht individualisiert, sondern, ohne Beeinträchtigung der restlichen Spermatiden des Bündels, in den „waste bag“ am caudalen Bündelende geschoben werden (Fuller, 1993, Fabrizio *et al.*, 1998). Man spricht in diesem Zusammenhang von einer „editing“-Funktion der Individualisierung (Fuller, 1993). Ein Beispiel hierfür bieten SD/SD<sup>+</sup>-Männchen, die heterozygot für das „segregation distorter“-Chromosom sind. Dadurch wird bewirkt, daß ein Teil der Kerne innerhalb einer Spermatidencyste nicht richtig kondensiert, was zur Degradation der jeweiligen Zellen führt, während die anderen Spermatiden die Individualisierung durchlaufen und zu Spermien reifen können (Tokuyasu *et al.*, 1977). Obwohl einige Spermatidenkerne möglicherweise eine korrekte Kernkondensation durchlaufen haben, wird von *fan*-mutanten Männchen jedoch nicht ein einziges reifes Spermium erzeugt. Dies deutet daraufhin, daß die Störung der Individualisierung ein sekundärer Effekt ist. Aus demselben Grund ist eine direkte Beteiligung von FAN an der Kondensation der Spermatidenkerne unwahrscheinlich. Dagegen spricht auch, daß FAN-Protein weder als GFP-Fusionsprotein noch mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers im Kern oder in Komponenten des Individualisierungskomplexes nachgewiesen werden konnte.

Auf Ebene der Aminosäuresequenz wurde eine etwa 40%ige Ähnlichkeit von FAN mit den VAP-Proteinen der Säugetiere festgestellt. Diese Ähnlichkeit ist nicht begrenzt auf

einzelne Abschnitte, sondern besteht über die gesamte Länge der Proteine. So zeigt FAN den typischen dreiteiligen Aufbau von VAP-Proteinen: eine N-terminale MSP-Domäne und am C-terminalen Ende ein „coiled coil“-Motiv sowie eine einzelne Transmembrandomäne. Im Gegensatz zu den *VAP*-Genen von Säugetieren, deren Expression auf Ebene der Transkription in jedem daraufhin getesteten Gewebe nachgewiesen werden konnte (Weir *et al.*, 1998, Nishimura *et al.*, 1999, Skehel *et al.*, 1999), ist die Expression von *farinelli* jedoch testisspezifisch. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, daß das *DmVAP*-Gen von *Drosophila melanogaster* ein Proteinprodukt kodiert, das eine um mindestens 10% größere Sequenzähnlichkeit mit VAP-Proteinen aufweist als FAN. Mit Hilfe eines EST-Klons konnte demonstriert werden, daß *DmVAP* in einem breiteren Gewebespektrum transkribiert wird. Das Gen scheint in dieser Hinsicht besser als *Drosophila-VAP*-Homolog geeignet zu sein als *farinelli*.

Dennoch wurde mit der subzellulären Lokalisierung von FAN im endoplasmatischen Retikulum durch das FAN-GFP-Fusionsprotein sowie durch den Antikörpernachweis eine weitere Gemeinsamkeit mit VAP-Proteinen aufgedeckt. Sowohl VAP-A als auch VAP-B der Säugetiere wurden mit Hilfe von Antikörpern im ER und in Prä-Golgi-Intermediaten nachgewiesen (Weir *et al.*, 2001, Skehel *et al.*, 1999, Soussan *et al.*, 1999). Das mögliche VAP-Homolog von *Saccharomyces cerevisiae*, Scs2p, stellt ebenfalls ein ER-Protein dar (Kagiwada *et al.*, 1998). Hinweise auf eine Lokalisierung des FAN-Proteins im endoplasmatischen Retikulum ergaben sich bereits aus seiner Aminosäuresequenz, zum einen durch die möglicherweise mit dem Di-Lysin-Motiv verwandte Aminosäureabfolge GKTR am C-terminalen Ende von FAN, zum anderen durch die nur 17 Aminosäuren umfassende Transmembrandomäne. Solch kurze, einzelne Domänen treten bei ER- oder Golgi-Proteinen auf und halten die Membranproteine im jeweiligen Kompartiment zurück (Pelham & Munro, 1993, Rayner & Pelham, 1997). Dagegen sind aufgrund einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Phospholipid-Doppelschicht durchschnittlich 21 Aminosäurereste erforderlich, um die Plasmamembran zu durchspannen (Bretscher & Munro, 1993, Pelham & Munro, 1993).

Innerhalb der N-terminalen Regionen ist eine Sequenz von 16 Aminosäureresten in den VAP-Proteinen verschiedener Species und in FAN hochkonserviert. Im Fall des Hefe Scs2p-Proteins, für das eine Beteiligung an der Regulation der Inositol-Biosynthese diskutiert wird, wurde gezeigt, daß eine verkürzte Form des Proteins, die diese Region nicht enthält, funktionsunfähig ist (Kagiwada *et al.*, 1998). Ein ähnliches Motiv ist außerdem in zwei weiteren, nicht mit VAP verwandten ER-Proteinen enthalten: Cdc48p

aus der Hefe (Latterich *et al.*, 1995) und TER ATPase aus der Ratte (Zhang *et al.*, 1994). Es wäre möglich, daß diese Region für die ER-Lokalisierung notwendig ist. Daten über die subzelluläre Verteilung der verkürzten Scs2p-Form liegen jedoch nicht vor.

Scs2p	37	<b>FKVKTTAPKFCVVRPN</b>	52
AcVAP	42	<b>FKVKTTAPKRYCVRPN</b>	57
ERG30	42	<b>FKVKTTAPRRYCVVRPN</b>	57
FAN	44	<b>FKMKTTTTPKLFYVVRPN</b>	59
TER ATPase	163	<b>FKVVE<del>T</del>DPSPYCVIVAP</b>	178
Cdc48p	174	<b>FKVVDVE<del>P</del>EEYAVVAQ</b>	189

Es stellt sich nun die Frage, wie die schon in den Spermatogonien nachweisbare, relativ frühe Expression des FAN-Proteins und seine subzelluläre Verteilung im endoplasmatischen Retikulum mit dem postmeiotischen Phänotyp der *fan*-Mutanten in Verbindung gebracht werden kann. Unter dem Gesichtspunkt, daß FAN ein testis-spezifisches VAP darstellen könnte, muß an dieser Stelle näher auf die Eigenschaften von VAP-Proteinen eingegangen werden. VAP-Proteinen wird eine Rolle beim intrazellulären Transport innerhalb des ER, des ERGIC („endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment“) und möglicherweise auch des Golgi-Apparates zugesprochen (Soussan *et al.*, 1999, Weir *et al.*, 2001). Es handelt sich um integrale Membranproteine mit SNARE-ähnlichem Aufbau („soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptor“). Durch *in vitro*-Experimente konnte die Orientierung des VAP-B der Ratte (ERG30) und des Hefe Scs2p in Relation zum Cytoplasma aufgeklärt werden (Soussan *et al.*, 1999, Kagiwada *et al.*, 1998). Demnach befindet sich der N-Terminus und damit der größte Teil eines VAP-Proteins auf der cytosolischen Seite, wie dies für ein mögliches SNARE erforderlich ist.

SNAREs repräsentieren generell integrale Membranproteine, die entweder mit Vesikel- (v-SNAREs) oder Zielmembranen (t-SNAREs) assoziiert und an der Erkennung und Fusion zwischen beiden beteiligt sind (Rothman, 1994, Mayer, 1999, Misura *et al.*, 2000). Die Mitglieder der SNARE-Familie werden in 3 Subfamilien unterteilt: VAMPs („vesicle-associated membrane protein“), Syntaxine und SNAP 25-Proteine („synaptosome-associated protein 25“), wobei erstere v-SNAREs und die beiden letzteren t-SNAREs

darstellen (Misura *et al.*, 2000). SNAREs zeichnen sich durch den Besitz von einer oder mehreren „coiled coil“-Regionen aus. Die Vertreter der Syntaxin- und VAMP-Familie enthalten außerdem einzelne Transmembrandomänen, die dann von einem kurzen C-terminalen Aminosäureschwanz gefolgt werden (Weimbs *et al.*, 1997). Strukturanalysen ergaben, daß sich unter Beteiligung je eines Mitgliedes aus den drei Subfamilien Komplexe zwischen Vesikel- und Zielmembran bilden. Diese Interaktion wird durch die „coiled coil“-Motive der Proteine vermittelt und bringt die beiden Membranen nahe zusammen (Mayer, 1999, Misura *et al.*, 2000). Man vermutet, daß die freie Energie des „coiled coil“-Arrangements der SNARE-Komplexe dann in die mechanische Arbeit, die für die Membranfusion geleistet werden muß, umgesetzt wird (Skehel & Wiley, 1998, Hanson *et al.*, 1997).

Aufgrund der anfänglichen Beobachtung, daß VAP *in vitro* mit VAMP (Synaptobrevin) interagiert (Skehel *et al.* 1995, Nishimura *et al.*, 1999), wurden verschiedene Bindungsstudien durchgeführt, um etwaige Beziehungen zu anderen SNARE-Proteinen aufzudecken. Dabei hat man einerseits festgestellt, daß VAP-Proteine fähig sind, mit sich selbst zu dimerisieren und andererseits, daß sie mit verschiedenen SNAREs und anderen, an der Vesikelfusion beteiligten Proteinen interagieren können. Die Transmembrandomäne und das MSP-Motiv von VAP sind sowohl für die Homo- als auch die Heterodimerisierung von entscheidender Bedeutung (Weir *et al.*, 1998, Soussan *et al.*, 1999, Weir *et al.*, 2001). *In vitro* bindet VAP neben verschiedenen VAMP-Proteinen auch einige Syntaxine sowie die cytosolischen Proteine NSF („N-ethylmaleimide sensitive factor“) und  $\alpha$ -SNAP („soluble NSF attachment protein“) (Weir *et al.*, 1998, Weir *et al.*, 2001). Letztere spielen eine Rolle bei der Auflösung von SNARE-Komplexen. Die ATPase NSF nutzt  $\alpha$ -SNAP als Adapter, um an den SNARE-Komplex zu binden. Durch die Hydrolyse von ATP werden beide Proteine wieder freigesetzt und der SNARE-Komplex löst sich auf (Misura *et al.*, 2000). Auf diese Weise können auf derselben Membran befindliche *cis*-SNARE-Komplexe getrennt und die SNAREs für *trans*-Komplexbildung mit auf einer Zielmembran vorliegenden SNAREs zugänglich gemacht werden (Mayer, 1999). Auch das Recycling der SNARE-Proteine nach erfolgter Fusion findet auf diesem Weg statt (Misura *et al.*, 2000).

Hinsichtlich der Funktion von VAP werden mehrere Hypothesen diskutiert: Skehel *et al.* (1999) halten eine Funktion von VAP als Chaperonin für möglich. So könnten Synaptobrevin und andere vesikuläre Proteine durch Interaktion mit VAP auf ihrem Transport durch das ER vor der Bildung unspezifischer Komplexe mit anderen SNAREs

abgeschirmt werden. Eine solche Rolle wird auch für das ERGIC-53-Protein postuliert (Vollenweider *et al.*, 1998). Andererseits könnte VAP direkt an der Insertion von Synaptobrevin in die ER-Membran mitwirken. Beide Möglichkeiten würden erklären, warum VAP nicht an der synaptischen Plasmamembran lokalisiert wird, anti-VAP-Antikörper aber trotzdem die Neurotransmitterfreisetzung vereiteln. Aufgrund der SNARE-ähnlichen Struktur von VAP und seiner Fähigkeit, NSF und  $\alpha$ -SNAP *in vitro* zu binden, ziehen Weir *et al.* (2001) als Alternative zur Chaperonin-Hypothese eine direkte Beteiligung von VAP an Fusionsprozessen in Betracht. Sie räumen jedoch ein, daß die zwischen VAP und an Fusionsvorgängen beteiligten Proteinen nachgewiesenen Interaktionen möglicherweise nicht die *in vivo*-Situation widerspiegeln. Innerhalb der Zelle könnte eine Bindungsspezifität allerdings durch räumliche Trennung der einzelnen Proteine erreicht werden. Die Beobachtung, daß gegen VAP-B gerichtete Antikörper *in vitro* eine Akkumulation von COPI-Vesikeln verursachen, führte zu der Überlegung, daß VAP entweder eine Rolle bei der Entfernung der „coat proteins“ auf der Vesikelloberfläche spielen könnte oder an der Zielfindung der COPI-Vesikel beteiligt ist (Soussan *et al.*, 1998). COPI-Vesikel betreiben intra-Golgi-Transport und retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER. Solange die „coat protein“-Hülle besteht, sind die Vesikel nicht fähig, mit der Zielmembran zu fusionieren. Das hätte *in vivo* zur Folge, daß das Recycling von Phospholipiden und ER-Proteinen verhindert wird und dadurch früher oder später nicht nur der retrograde, sondern auch der anterograde Transportweg zum Erliegen kommt. Wie bereits zu Beginn ausgeführt wurde, weisen die verschiedenen, durch den Ausfall von *fan* bewirkten Defekte eher auf eine grundsätzlich für das Überleben der Spermatiden wichtige Aufgabe des Gens hin als auf eine auf die Kernelongation beschränkte Rolle. Die komplexen Mechanismen der Differenzierung und Individualisierung von Spermatiden erfordern die spezifische Synthese und den zielgenauen Transport von Proteinen, die am Umbau der Zellorganellen, der Bildung des Axonems und der Plasmamembran mitwirken. Es ist denkbar, daß in Vorbereitung darauf auch spezifische Proteine synthetisiert werden, die zum intrazellulären Transport dieser Komponenten beitragen. Das ER-lokalisierte FAN-Protein könnte ein Kandidat für ein solches Protein sein. In Anlehnung an VAP-Proteine kommt für FAN eine Funktion als Chaperonin oder auch als SNARE-Interaktionspartner während der Fusion von Transport-Vesikeln in Betracht.

Im Gegensatz zum *DmVAP*-Gen weist das *fan*-Gen keine Introns auf. Dies könnte dafür sprechen, daß das Gen ursprünglich durch Retroposition aus einem gemeinsamen *DmVAP*-Vorläufer hervorgegangen ist. Der Nachweis von FAN unter den Testisproteinen der zur

Verfügung stehenden *Drosophila*-Species kann den Zeitpunkt seiner Entstehung nicht näher als vor 60-17 Millionen Jahren eingrenzen. Im Laufe der Evolution könnte dann mit *farinelli* ein VAP-Gen mit spezifischer Funktion innerhalb der männlichen Keimzellentwicklung entstanden sein.

Während der Untersuchungen wurde festgestellt, daß in der Nähe von *farinelli* ein weiteres unbekanntes Gen liegt, das in den männlichen Keimzellen exprimiert wird: *neighbor of farinelli (nof)*. Es ist knapp 160 Nukleotide stromabwärts von *fan* lokalisiert und kodiert vermutlich ein Kernprotein. Northern Blot-Hybridisierung und *in situ*-Hybridisierung zeigten, das *nof* in verschiedenen Geweben exprimiert wird, die abundantesten Transkripte jedoch in den männlichen und weiblichen Gonaden gebildet werden, und zwar in primären Spermatozyten bzw. den Nährzellen des Eifollikels. Ob sich die beiden Gene möglicherweise regulatorische Sequenzen teilen, was die Retropositions-These unterstützen könnte, wurde nicht untersucht.

Ausblick:

Mit den zur Verfügung stehenden Mitteln konnte nicht mit Sicherheit auf den frühesten Zeitpunkt der Spermatogenese geschlossen werden, bei dem Störungen durch den Verlust der *farinelli*-Funktion nachweisbar sind. Genauere Informationen könnten elektronenmikroskopische Untersuchungen der Testes von Nullmutanten im Vergleich zum Wildtyp liefern.

Da VAP-Proteine gegenüber SNARE-Proteinen in *in vitro*-Experimenten ein promiskuitives Bindungsverhalten zeigen, sollten verschiedene Techniken genutzt werden, um zu klären, ob FAN Interaktionspartner hat und welche das sind. In Betracht kommt neben dem „Yeast Two Hybrid“-System auch die Co-Immunpräzipitation. Befänden sich unter den dadurch ermittelten Proteinen bereits bekannte SNAREs, würde dies die Hypothese unterstützen, daß es sich bei FAN um ein testisspezifisches VAP-Protein handelt.

## IV. Zusammenfassung

Die molekulargenetische Untersuchung einer männchensterilen P-Element-Insertionslinie, *fan<sup>P</sup>*, führte zur Identifizierung eines neuen Gens, das für die männliche Fertilität von *Drosophila* notwendig ist. Dasselbe Gen ist auch in zwei Remobilisierungslinien (*fan<sup>Jo2</sup>* und *fan<sup>Jo6</sup>*) außer Funktion, die von der P-Element-Insertionslinie abstammen. Homozygote Männchen der drei Linien zeigen Defekte in der Keimzellendifferenzierung. Nur ein Teil der 64 Zellkerne eines Spermatidenbündels nimmt die für reife Spermien charakteristische nadelförmige Morphologie an. Außerdem wird die Individualisierung verhindert. Die Beeinträchtigungen führen schließlich zur Degeneration des gesamten Spermatidenbündels. Das betroffene Gen, *farinelli (fan)* genannt, wird hodenspezifisch exprimiert. Durch *in situ*-Hybridisierung wurde gezeigt, daß die *fan*-mRNA in den Keimzellen und nicht in somatischen Zellen des Hodens synthetisiert wird. Im Wildtyp wurde ein 1kb großes Transkript nachgewiesen, das in der Insertionslinie und der Linie *fan<sup>Jo2</sup>* fehlt. Im Fall von Linie *fan<sup>Jo2</sup>* ist das *fan*-Gen zum Teil deletiert. In Linie *fan<sup>Jo6</sup>* wirken sich dagegen an der Insertionsstelle verbliebene Reste des P-Elements hemmend auf die Translation aus. Die Fertilität der P-Element-Insertionslinie und der Remobilisierungslinien konnte durch das Einbringen einer intakten *fan*-Genkopie wiederhergestellt werden. Das *fan*-Gen kodiert ein aus 218 Aminosäuren bestehendes integrales Membranprotein, FAN, das mehr als 40% Sequenzähnlichkeit mit VAP-Proteinen aufweist. Wie diese enthält es eine N-terminale MSP-Domäne und ein „coiled coil“-Motiv sowie eine Transmembrandomäne am C-terminalen Ende. FAN konnte im ER der Keimzellen lokalisiert werden. Dieses stimmt mit der subzellulären Verteilung der VAP-Proteine von Säugetieren überein, allerdings werden diese ubiquitär exprimiert. Der Abgleich mit der BDGP-Datenbank führte zu einem Gen, in dieser Arbeit als *DmVAP* bezeichnet, dessen Proteinprodukt größere Sequenzübereinstimmung (ca. 50%) zu VAP-Proteinen zeigt als FAN. Seine Expression wurde mit Hilfe der cDNA LD20208 auf Ebene der Transkription untersucht. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß mindestens 5 verschiedene *DmVAP*-mRNAs existieren, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich vertreten sind. Die größere Ähnlichkeit und das weitläufigere Expressionsmuster sprechen dafür, daß *DmVAP* eher für ein VAP-Homolog in Frage kommt als *fan*. Die genaue Funktion von VAP-Proteinen ist bisher unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß sie am Proteintransport innerhalb von ER und prä-Golgi-Intermediaten beteiligt sind und dabei Interaktionen mit SNARE-Proteinen eingehen. Der durch den Verlust des *fan*-Gens

hervorgerufene Phänotyp und die Lokalisierung von FAN im ER deuten auf eine für das Überleben der Keimzellen allgemein wichtige Rolle hin. Möglicherweise stellt FAN ein hodenspezifisches VAP-Protein dar, das eine essentielle Rolle beim Transport von während der SpermatidenDifferenzierung benötigten Proteinen spielt.



zwei Tagen wurden die Tiere in leere, mit Luftlöchern versehene Zuchtflaschen geschüttelt und auf frisch hergestellte Apfelsaftagarplatten aufgesetzt. Die Eiablage findet bevorzugt im Dunkeln statt, daher wurden die Gefäße abgedeckt. Die folgenden Bestandteile ergeben etwa 20 Apfelsaftagarplatten (Durchmesser 6 cm): 200 ml dH<sub>2</sub>O, 7,2 g Bacto-Agar, 67 ml Apfelsaft und 3,2 g Zucker. Bacto-Agar und Wasser wurden zusammen aufgeköcht und der im angewärmten Apfelsaft gelöste Zucker untergerührt.

#### **5.1.4 Präparation von Organen**

Die geätherten Tiere wurden in PBS-Puffer im Blockschälchen präpariert. Die entfernten Organe wurden in einem mit PBS gefüllten, eisgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt.

PBS

140 mM NaCl  
10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4; autoklaviert

#### **5.1.5 Fertilitätstests**

Zur Untersuchung der Fertilität wurden die zu testenden Männchen mit jeweils drei Jungfrauen auf ein frisches Röhrchen gesetzt. Nach einer Woche wurden die Tiere abgeschüttelt und beobachtet, ob sich innerhalb der nächsten zwei Wochen Nachkommen aus den abgelegten Eiern entwickelten.

#### **5.1.6 Überprüfung der Spermienmotilität**

Die Hoden von 2-5 Tage alten Männchen wurden in *Drosophila*-Ringer herauspräpariert und in einen Tropfen Ringerlösung auf einem Objektträger überführt. Nach Auflegen eines Deckgläschens wurden die Organe durch leichtes Quetschen zum Aufplatzen gebracht. Dann wurden die Präparate unter dem Mikroskop auf das Vorkommen beweglicher Spermien überprüft.

*Drosophila*-Ringer

182 mM KCl  
46 mM NaCl  
3 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM Tris/HCl  
pH 7,2; autoklaviert

**5.2 Methoden zur RNA Analyse****5.2.1 Isolierung von poly(A)-mRNA**

Diese Methode beruht auf der Wechselwirkung zwischen dem poly(A)-Schwanz, den die meisten mRNA-Moleküle aufweisen, und oligo(dT)-Molekülen, die kovalent an Magnetpartikel (Novagen) gebunden wurden. Alle Lösungen wurden auf 4°C temperiert. Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurde mit Handschuhen gearbeitet.

Für die Isolierung von poly(A)-mRNA aus 30 Tieren oder 75 Testes/50 Ovarien wurden 200 µl Magnetpartikel eingesetzt. Diese wurden zunächst äquilibriert, indem sie in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl Lyse-/Bindungspuffer gemischt und mit Hilfe eines Magnethalter an der Gefäßwand konzentriert wurden, so daß der Überstand abgezogen werden konnte. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Das Ausgangsmaterial zur poly(A)-mRNA-Gewinnung (Gewebe oder ganze Fliegen) wurde mit Hilfe eines Pistills in 200-300 µl Lyse-/Bindungspuffer zerrieben und die Trümmer 1 min lang bei 12000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit den Magnetpartikeln gemischt und 5 min bei RT inkubiert, während dieser Zeit erfolgt die Bindung der poly(A)-Schwänze der mRNA an die oligo(dT)-Ketten. Die Partikel wurden wiederum im Magnethalter konzentriert und der Überstand abpipettiert. Es folgten jeweils zwei Waschschrte mit Waschpuffer, der LiDS enthält bzw. mit Waschpuffer ohne LiDS. Um die poly(A)-mRNA von den Magnetpartikeln abzulösen, wurden sie in 20 µl 2 mM EDTA (pH 8) aufgenommen und für 2 min bei 65°C in den Heizblock gestellt. Die Magnetpartikel wurden danach sofort konzentriert und die im Überstand vorliegende mRNA in ein vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

## Lyse-/Bindungspuffer

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

## Waschpuffer (mit LiDS)

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

**5.2.2 Auftrennung von RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen**

Abgesehen von der Denaturierung erfolgten alle Schritte auf Eis. Die Proben und der RNA-Längenstandard (0,2-10 kb, Novagen) wurden zunächst mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Dann wurden folgende Lösungen hinzupipettiert: 20 µl deionisiertes Formamid, 8 µl 37% Formaldehyd, 6 µl 10x MOPS und 4 µl EtBr (0,5µg/µl). Nach 5 min im Heizblock bei 65°C wurden die Proben sofort gekühlt und 6 µl RNA-Probenpuffer (70% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol FF) hinzugefügt.

Die elektrophoretische Auftrennung der RNA-Moleküle erfolgte in denaturierenden Formaldehyd-Agarosegelen. Es wurde eine Elektrophoresekammer (MWG-Biotech) für Agarosegele verwendet, die Pufferumwälzung gestattet. Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose in 85 ml dH<sub>2</sub>O und 10 ml 10x MOPS in der Mikrowelle bis zur Auflösung aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf 70°C wurden 5,5 ml 37% Formaldehyd hinzugefügt und die Flüssigkeit in einem mit der Wasserwaage nivellierten Gelschlitten gegossen. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS verwendet. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Taschen mit Puffer gespült. Die Elektrophorese wurde für etwa 3 h bei 120 V im Abzug durchgeführt.

## 10x MOPS

200 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure  
 50 mM Natriumacetat  
 10 mM EDTA  
 pH 7, autoklaviert

### 5.2.3 Transfer von RNA auf Nylonmembran

Um nach der Hybridisierung eine Größenordnung der nachgewiesenen Transkripte zu ermöglichen, wurde das Gel vor dem Transfer auf Nylonmembran mit Hilfe einer Gel-Dokumentationsanlage fotografiert. Anschließend wurde die den Längenstandard enthaltende Spur entfernt. Für den Transfer wurde eine rechteckige Schale 2-3 cm hoch mit 20x SSPE-Puffer gefüllt und mit einer Glasplatte bedeckt. Zwei aufeinanderliegende Whatman-Filterpapierstreifen wurden kurz in den Puffer getaucht und so über die Glasplatte gezogen, daß sie eng am Glas anlagen und mit den Enden in das Puffer-Reservoir eintauchten. Das Gel wurde luftblasenfrei auf das Filterpapier aufgebracht. An den Längsseiten überstehendes Filterpapier wurde mit Parafilmstreifen abgedeckt. Die Membran (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) wurde unter allmählichem Ansaugen auf das Gel appliziert. Es folgten zwei Lagen Filterpapier entsprechend der Gelgröße sowie ein Stapel saugfähiges Papier. Obenauf wurde ein Gewicht gelegt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Das Gel wurde mitsamt der daranhaftenden Membran umgedreht und die Taschen mit einem Bleistift durchstoßen, um die einzelnen Spuren zu markieren. Die mRNA wurde bei 254 nm mit 1200 J im Stratalinker (Stratagene) auf der Membran fixiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Filter in Frischhaltefolie gewickelt und bei 4°C gelagert.

20x SSPE

3,6 M NaCl  
0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,02 M EDTA  
pH 7,4 (NaOH)  
autoklaviert

### 5.2.4 *In vitro*-Transkription (Melton *et al.*, 1984)

Zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen wurde mit Handschuhen gearbeitet. Die jeweilige Template-DNA wurde zunächst durch Inkubation mit einem geeigneten Restriktions-enzym linearisiert, so daß die Transkriptlänge festgelegt war und die Sonde keine Vektorsequenzen enthalten konnte. Auf Eis wurde folgender Mix angesetzt:

- 0,5 – 1 µg linearisiertes Plasmid
- x µl dH<sub>2</sub>O
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 1 µl 0,2 M DTE
- 1 µl RNase-Inhibitor (25 u/µl)
- 3 µl ACG-Ribonukleotid-Mix (je 3,3 mM)
- 1 µl UTP (200 µM)
- 1 µl RNA-Polymerase (20 u)
- 1-3 µl α-<sup>32</sup>P-UTP (10 µCi/µl, Hartmann Analytic)
- ad 20 µl Gesamtvolumen

Je nachdem, welche Promotoren im Vektor vorhanden waren und in welcher Orientierung das Insert vorlag, wurde T3-, T7 oder SP6-RNA-Polymerase (Roche oder MBI Fermentas) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 1-1,5 h im Heizblock bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 170 µl dH<sub>2</sub>O und als Fällhilfe 20 µl Hefe-tRNA (1µg/µl) hinzugefügt und eine Phenol-Extraktion durchgeführt. Dann wurde das Transkript mit 80 µl Ammoniumacetat und 600 µl 96% Ethanol gemischt und für 10 min in Ethanol/Trockeneis oder für 2 h bei -20°C gefällt. Der Ansatz wurde 15 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet für 10 min bei 14000 rpm mit 70% Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde das Pellet in 100 - 200 µl dH<sub>2</sub>O gelöst. Die Markierung des Transkripts wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung überprüft. Die Werte lagen in Abhängigkeit von dem Kalibrierungsdatum des α-<sup>32</sup>P-UTP und der Reaktionseffizienz zwischen 1 bis 10x 10<sup>6</sup> cpm.

### 5.2.5 Northern Blot-Hybridisierung

Die Filter wurden mind. 2 h lang mit ca. 10 ml Prähybridisierungslösung im 62°C heißen Hybridisierungssofen inkubiert, um die allgemeine Bindungskapazität der Membran abzusättigen. Dazu wurden sie in verschließbare Glasröhrchen eingeführt (Biometra). Für die Hybridisierung wurde das radioaktiv markierte Transkript mit ca. 5 ml Hybridisierungslösung gemischt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 62°C. Bei dieser Temperatur sind die optimalen Bedingungen für die Bildung von spezifischen RNA/RNA-Hybriden in 50% Formamid gegeben. Es folgten Waschschrte: zweimal 15 min mit 2x SSPE, 0,1% SDS und einmal 30 min mit 0,1x SSPE, 0,1% SDS. Anschließend wurde

die Membran in Frischhaltefolie gewickelt und in eine mit einer Verstärkerfolie ausgestattete Kassette gelegt. Die Exposition des Röntgenfilms wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  durchgeführt.

#### Natriumphosphatpuffer

Mischung aus:

0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

bis zu pH 6,5; autoklaviert

#### Prähybridisierungslösung

0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 6,5

7% SDS

#### Hybridisierungslösung

50% deionisiertes Formamid

50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5

5x SSPE

## 5.3 DNA-Klonierungstechniken

### 5.3.1 Verwendete Vektoren

pGEM-1, pGEM-T, pGEM-T easy	Promega
pBS KS, pBS SK, pPCR-Script Amp	Stratagene
pZErO-1	Invitrogen
pSCREEN-1b	Novagen
p-EGFP-N1	Clontech

P-Vektoren:

<i>P{lwB}</i>	(Klemenz <i>et al.</i> 1987)
<i>P{W-ATG-lacI}</i>	(Kuhn <i>et al.</i> , 1988)
<i>P{CaSpeR-AUG-βgal}</i>	(Pirotta, 1989)
<i>P{CaSpeR-3}</i>	(Pirotta, 1989)
<i>P{CaSpeR-4}</i>	(Pirotta, 1989)

### 5.3.2 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Es wurden Enzyme der Firmen MBI Fermentas, New England BioLabs und Roche verwendet. Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten bzw. DNA-Matrizen für die Herstellung von Sonden wurden etwa 10 µg Plasmid-DNA aus einer Midi-Präparation (siehe 5.3.10) in einem Gesamtvolumen von 50 µl gedaut. Der Ansatz enthielt in dH<sub>2</sub>O verdünnten 10x Restriktionspuffer sowie 2,5 µl Restriktionsenzym (in der Regel 10 u/µl) und wurde für 1-3 h bei 37°C inkubiert.

### 5.3.3 Auffüllen von „sticky ends“ mit Klenow-Fragment

In einigen Fällen war das Auffüllen der „sticky ends“ von DNA-Molekülen für weitere Klonierungsschritte erforderlich. Diese Reaktion wurde mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase durchgeführt. Der Reaktionsansatz wies ein Gesamtvolumen von 10 µl auf und enthielt folgende Bestandteile:

x µl	DNA (0,1-4 µg)
1 µl	20 mM dNTP-Mix
2 µl	5x Reaktionspuffer
1 µl	Klenow-Fragment (10 u, MBI Fermentas)

### 5.3.4 Alkalische Phosphatase-Behandlung von Plasmiden

Um zu verhindern, daß geschnittene Vektoren bei der Ligation mit sich selbst verknüpft wurden anstatt mit dem Insert, wurden die 5'-Phosphatgruppen mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase (CIP, Roche) entfernt. Dazu wurden 6 µl Reaktionspuffer und

0,5 µl Alkalische Phosphatase nach der Restriktion direkt in den 50 µl Ansatz gegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte entweder die sofortige Extraktion und Fällung der Vektor-DNA unter Standardbedingungen oder die Aufreinigung über ein Agarosegel.

### 5.3.5 Ligation

Vektor und Insert wurden in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt. Die Konzentrationen von Vektor-DNA (ca. 40 ng) und Insert-DNA wurden gegebenenfalls abgeschätzt, indem Aliquots auf einem Agarosegel aufgetragen wurden. Die DNA-Mischung wurde auf 8 µl aufgefüllt und jeweils 1 µl 10x Ligasepuffer sowie Ligase (5 u, MBI Fermentas) hinzugefügt. Die Ligation fand in der Regel über Nacht bei 18°C statt.

### 5.3.6 Herstellung kompetenter Zellen

Für bakterielle Transformationen wurden die *Escherichia coli*-Stämme DH5α- bzw. BL21(DE3) verwendet. 20 ml LB-Medium in einem sterilen Erlenmeyerkolben wurden mit einer frischen Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von dieser Vorkultur wurden 5 ml zu 200 ml LB-Medium gegeben und die Kultur unter Schütteln bei 37°C bis zu einer  $OD_{550\text{ nm}} = 5,0$  herangezogen. Die Suspension wurde für 15 min in einem Eiswasserbad abgekühlt und anschließend in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 2500 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde so vollständig wie möglich entfernt, das Pellet in einem Drittel des Ausgangsvolumens RFI-Lösung aufgenommen und für 15 min eisgekühlt. Daraufhin wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt, das Pellet in 1/15 des Ausgangsvolumens RFII-Lösung resuspendiert und erneut für 15 min auf Eis gestellt. Je 200 µl Zellsuspension wurden auf vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

LB-Medium (bzw.-Platten)

10 g Pepton  
5 g NaCl  
5 g Hefe-Extrakt  
(17 g Bacto-Agar)  
mit dH<sub>2</sub>O ad 1l, autoklaviert

Die Zugabe von Antibiotika erfolgte, nachdem das Medium nach dem Autoklavieren auf eine Temperatur von ca. 50°C abgekühlt war, im Falle von LB<sup>Amp</sup> bis zu einer Konzentration von 100 µg Benzylpenicillin pro ml. Die Platten wurden unter sterilen Bedingungen gegossen und wie das Medium bei 4°C aufbewahrt.

RFI-Lösung:

100 mM RbCl  
 50 mM MnCl<sub>2</sub>  
 30 mM Kaliumacetat pH 7,5  
 10 mM CaCl<sub>2</sub>  
 15% Glycerin (w/v)  
 pH 5,8 (Essigsäure)  
 steril filtriert

RFII-Lösung:

10 mM MOPS  
 10 mM RbCl  
 10 mM CaCl<sub>2</sub>  
 15% Glycerin (w/v)  
 pH 6,8 (NaOH)  
 steril filtriert

### 5.3.7 Transformation von *E. coli*-Stämmen

Pro Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen, DH5α- bzw. BL21(DE3), benötigt. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Dann wurden sie mit 10 µl Ligationsansatz oder 10-100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis belassen. Die Aufnahme der DNA in die Zellen wurde durch einen Hitzeschock provoziert. Dazu wurden die Ansätze 90 s lang in ein auf 42°C geheiztes Wasserbad gestellt und anschließend sofort eisgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen für 40-60 min bei 37°C inkubiert, um die Ausprägung der durch die Plasmidaufnahme angeeigneten Antibiotikaresistenz zu ermöglichen. 200 µl und 700 µl der Ansätze wurden auf das entsprechende Antibiotikum enthaltende LB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht in den 37°C-Inkubator gestellt.

### 5.3.8 Blau-Weiß-Selektion

Einige der verwendeten Vektoren enthalten das *lacZ*-Gen. Es codiert für das Enzym β-Galaktosidase, welches in der Lage ist, das Substrat X-gal in ein farbiges Reaktionsprodukt umzusetzen. Die Expression des *lacZ*-Gens kann durch IPTG induziert werden. Durch die Insertion des zu klonierenden DNA-Fragmentes in die „multiple cloning site“ dieser Vektoren wird das *lacZ*-Gen unterbrochen. Zellen, die nach der Transformation nur Vektormoleküle ohne Insert enthalten, exprimieren unter entsprechen-

den Bedingungen  $\beta$ -Galaktosidase und wachsen auf der Platte zu blauen Kolonien heran. Im Gegensatz dazu bilden Zellen, die mit dem korrekt ligierten Konstrukt transformiert wurden, weiße Kolonien. Für eine Blau-Weiß-Selektion wurden die transformierten Zellen zusammen mit 50  $\mu$ l 2% X-Gal in DMF (Dimethylformamid) und 20  $\mu$ l 100 mM IPTG in dH<sub>2</sub>O ausplattiert.

### 5.3.9 Plasmid-Minipräparation (Birnboim & Doly, 1979)

2 ml LB<sup>Amp</sup> Medium wurden mit Zellen einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von jeder Kultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt und die Zellen bei 5000 rpm für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde so vollständig wie möglich entfernt und das Pellet in 100  $\mu$ l Lösung I resuspendiert. Dann wurden 200  $\mu$ l Lösung II hinzupipettiert und die Ansätze durch mehrmaliges Umdrehen vorsichtig gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT folgte die Zugabe von 150  $\mu$ l Lösung III. Die Ansätze wurden nun kräftig gemischt und für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Gefäße überführt, die darin enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol gefällt und durch zehnmünütige Zentrifugation bei 12000 rpm pelletiert. Die Pellets wurden bei 40°C getrocknet und in 30  $\mu$ l TE<sup>-4</sup> gelöst. Die Aufbewahrung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

#### Lösung I

100  $\mu$ g RNase A (10 mg/ml)  
50 mM Tris/HCl pH 8  
10 mM EDTA pH 8

#### Lösung II

0,2 M NaOH  
1% SDS

#### Lösung III

3 M Kaliumacetat pH 5,5

#### TE<sup>-4</sup>

10 mM Tris/HCl pH 8  
0,1 mM EDTA  
autoklaviert

### 5.3.10 Plasmid-Midipräparation

Zur Gewinnung größerer Plasmidmengen wurden über Nacht 50 ml Kulturen herangezogen. Die Isolierung erfolgte mit den Plasmid-Midi-Kits der Firmen Qiagen bzw. Genomed und wurde nach den entsprechenden Protokollen durchgeführt. Die gewonnenen DNA-Pellets wurden in 200  $\mu$ l TE<sup>-4</sup> gelöst und bei -20°C aufbewahrt. In der Regel lag die Konzentration der DNA-Lösung bei 0,7-1,5  $\mu$ g pro  $\mu$ l.

### 5.3.11 Isolierung genomischer DNA aus ganzen Fliegen (Rasmusson *et al.*, 1994)

Ca. 100 Fliegen wurden in 2 ml Puffer aufgenommen und im Dounce-Homogenisator erst mit einem L-, dann mit einem S-Pistill zerrieben. Das Homogenat wurde in ein 15 ml Corex-Röhrchen überführt und der Homogenisator mit 1 ml Puffer nachgespült. Die vereinigte Suspension wurde 20 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde 5 M Kaliumacetat bis zu einer Endkonzentration von 1 M zugegeben, die Flüssigkeit vorsichtig gemischt, für 15 min auf Eis gestellt und für 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und zur Fällung vorsichtig mit 0,5 Volumen Isopropanol gemischt. Die Nukleinsäuren wurden für 15 min bei 12000 rpm pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde vorsichtig in TE<sup>-4</sup> gelöst. Anschließend wurde RNase A-Lösung (10 mg/ml) bis zu einer Konzentration von 25  $\mu$ g/ml hinzugefügt. Der RNA-Abbau wurde für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die DNA wurde nach Zugabe von 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen 96% Ethanol gefällt, durch Zentrifugation pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 200  $\mu$ l TE<sup>-4</sup> gelöst und bei -20°C eingefroren. Um die Proben auf Degradation zu kontrollieren, wurde ein Aliquot auf ein 0,5% Agarosegel aufgetragen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

#### Puffer

100 mM Tris pH 9  
100 mM EDTA  
1% SDS

### 5.3.12 Restriktionsverdau genomischer DNA

10 µg genomische DNA wurden mit 4 µl Restriktionsenzym und 5 µl 10x Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl gedaut. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

### 5.3.13 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA-Moleküle erfolgte in 0,5%, 0,7% oder 1% Agarosegelen. Hierfür wurden vertikale Elektrophoresesysteme der Firma MWG-Biotech eingesetzt. Für die Herstellung eines Gels mit 13 cm Trennstrecke wurde die Agarose in 100 ml 1x TBE bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht und mit 5 µl EtBr-Lösung (10 mg/ml, Roth) gemischt. Für Minigele wurde entsprechend weniger Gelmatrix benötigt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Die Proben wurden mit 0,25 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 45 (kleine Gele) bis 100 mA (große Gele) in Richtung Anode durchgeführt.

#### DNA-Probenpuffer

0,1% Bromphenolblau (w/v)  
(bzw. Xylencyanol FF für Fragmente < 600 bp)  
50% Glycerin in 4x TBE

#### 10x TBE

890 mM Tris  
890 mM Borsäure  
20 mM EDTA  
pH 8,2; autoklaviert

### 5.3.14 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(Weichenhan, 1991)

Die im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Das Gelstückchen wurde in ein aus Filterpapier gefaltetes Tütchen geschoben, das in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß steckte, dessen Boden zuvor durchstoßen worden war. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde auf ein zweites Reaktionsgefäß aufgesetzt und 1 min lang bei 12000 rpm zentrifugiert. Die in dem

unteren Gefäß befindliche DNA-Lösung wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und anschließend gefällt.

### 5.3.15 Transfer von DNA auf Nylonmembran (Southern, 1975)

Nach der Fotodokumentation wurde das Agarosegel erst 30 min unter langsamem Schütteln in Denaturierungslösung, dann in Neutralisierungslösung inkubiert. Der Transfer und das UV-Crosslinking fand unter denselben Bedingungen statt wie beim RNA-Transfer (siehe 5.2.3).

#### Denaturierungslösung

1,5 M NaCl  
0,5 M NaOH

#### Neutralisierungslösung

1,5 M NaCl  
1 M Tris/HCl pH 7

### 5.3.16 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von Sonden, die für Southern Blot-Hybridisierungen eingesetzt wurden, wurde ein „Random Prime Labeling“-Kit (Prime-it II, Stratagene) verwendet. Die Markierung der aus Plasmiden isolierten DNA-Fragmente erfolgte mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP (Hartmann Analytic) nach den Angaben des Kit-Herstellers. Die markierte DNA wurde mit dH<sub>2</sub>O auf 100  $\mu$ l gebracht, mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und nach Zugabe von 10  $\mu$ l 3 M Natriumacetat und 200  $\mu$ l 96% Ethanol für 10 min in Ethanol/Trockeneis gefällt. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 200  $\mu$ l TE<sup>-4</sup> aufgenommen. Im Anschluß daran wurde die Cerenkov-Strahlung gemessen. Für Hybridisierungen wurden 2 bis 3x 10<sup>6</sup> cpm eingesetzt.

### 5.3.17. Southern Blot-Hybridisierung

Die Southern Blot-Hybridisierung wurde analog zur Northern Blot-Hybridisierung durchgeführt. Im Gegensatz zur Northern Blot-Hybridisierung erfolgten Prähybridisierung und Hybridisierung allerdings bei 42°C. Bei dieser Temperatur sind die optimalen Bedingungen für die Bildung von spezifischen DNA/DNA-Hybriden in 50% Formamid gegeben. Außerdem muß die radioaktiv markierte DNA-Sonde vor der Inkubation mit dem Southern Blot denaturiert werden. Hierfür wurde die Sonde für 5 min im Wasserbad gekocht und sofort auf Eis gekühlt.

### 5.3.18 „Screening“ von Phagenbanken

Für die Isolierung von cDNA-Klonen standen zwei cDNA-Banken zur Verfügung, die aus Hoden-poly(A)-mRNA konstruiert worden waren:

- Lambda ZAP II (Stratagene) -Bank
- pSCREEN-1b (Novagen) –Bank

Für die Klonierung genomischer Fragmente wurde eine Lambda Fix II-Bank (Stratagene) verwendet, die auf 0-12h CantonS-Embryonen zurückgeht.

Um cDNA-Klone bzw genomische Fragmente zu gewinnen, wurden Phagenbanken mit Hilfe von radioaktiven Sonden durchgemustert. Zuvor war der Titer der Banken durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen und anschließendem Auszählen der Plaques bestimmt worden. Für cDNA-Banken wurden XL1-Blue MRF'-Zellen, für genomische Banken SRB(P2)-Zellen verwendet. Die Bakterien wurden über Nacht bei 30°C in 50 ml LB-Medium herangezogen, dem 0,2% (v/v) Maltose und 5 µl 1 M MgSO<sub>4</sub> zugesetzt worden waren. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 rpm abzentrifugiert und mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,5 resuspendiert. LB-Platten wurden auf 40°C vorgewärmt. Sterile Reagenzgläser wurden mit 8 ml Top-Agarose gefüllt und ins 48°C heiße Wasserbad gestellt, um die Agarose flüssig zu halten. Je 1 µl in SM-Puffer verdünnte Phagensuspension (ca. 50.000 pfu) wurde zu 600 µl Zellen gegeben und zur Anheftung der Phagen 15 min bei 37°C unter sanftem Schütteln inkubiert, dann wurde der Ansatz mit der Top-Agarose gemischt und zügig auf einer 12x12 cm Platte verteilt (insgesamt 6 Stück). Für die Titerbestimmung und die Aufreinigung positiver Phagen wurden Standard-Platten (9,5 cm Durchmesser) verwendet: Es wurden dann nur 200 µl Zellen infiziert und mit 5 ml Top-Agarose auf runde Platten plattiert. Die Platten wurden zur Ausbildung von Plaques über Nacht bei 37°C inkubiert. Vor dem Transfer der Phagen auf Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) wurden die Platten 2 h im Kühlschrank gekühlt. Pro Platte wurden zwei Abdrücke mit entsprechend zugeschnittener und numerierter Membran vorgenommen. Die erste Membran wurde 30 s aufgelegt, die zweite 2 min lang. Membran und Agar wurden währenddessen an mehreren Stellen mit einer tintenbenetzten Nadel durchstoßen, um die Signale später eindeutig bestimmten Plaques zuordnen zu können. Bis zum Ausstechen der positiven Plaques wurden die Platten im Kühlschrank aufbewahrt. Die Membranen wurden für 1 min mit der beladenen Seite nach oben auf ein mit Denaturierungslösung getränktes Filterpapier gelegt, danach auf dieselbe Weise 5 min mit Neutralisierungslösung und zweimal 10 min mit 2x SSPE (Lösungen siehe

5.2.3 und 5.3.15) behandelt. Nach dem Trocknen wurde die DNA mit 1200 J bei einer UV-Strahlung von 254 nm (Stratalinker, Stratagene) an der Membran fixiert. Die Hybridisierung erfolgte wie unter 5.3.17 beschrieben. Die Sonde wurde mit dem Prime-It II-Kit (Stratagene) hergestellt (siehe 5.3.16). Es wurden nur Plaques ausgestochen, die auf beiden Membranen ein Signal zeigten. Die Elution der Phagen aus dem Agar erfolgte für einige Stunden in 300 µl SM-Puffer. Dieses „screening“ wurde 2 Mal wiederholt, und zwar mit 1 µl und 10 µl aus einer 1:100 bzw. 1:1000 Verdünnung des Phageneluats (9,5 cm Platten), um die positiven Phagen anzureichern, bis einzelne Plaques isoliert werden konnten. Die Eluate wurden auf eine Chloroformkonzentration von 5% gebracht und bei 4°C aufbewahrt. Zur Gewinnung größerer Mengen an Phagen-DNA wurden einzelne Phagen auf quadratischen Platten amplifiziert (10 µl aus 1:100 Verdünnung des Eluats). Um die Phagen zu eluieren wurden die Plaques mit 8-10 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und die Platten mit 2 ml SM-Puffer nachgespült. Die vereinigte Suspension wurde zur Abtötung der Bakterien auf eine Konzentration von 5% Chloroform gebracht. Die Zellüberreste wurden bei 5000 rpm abzentrifugiert. Zur längeren Aufbewahrung wurden Aliquots in 7% DMSO angelegt und bei -80°C gelagert.

#### Top-Agarose

LB-Medium mit 0,7 % (w/v) Agarose

#### SM-Puffer

50 mM Tris/HCl pH7,5

100 mM NaCl

10 mM MgSO<sub>4</sub>

0,01% (w/v) Gelatine

autoklaviert

#### *In vivo*-Exzision (automatisches Subklonieren von Phagen-Inserts)

Die cDNA-Phagenbank Lambda Zap II (Stratagene) erlaubt die Exzision des cDNA-Inserts samt der angrenzenden Sequenzen des Bluescript SK-Vektors, ihre Zirkularisierung und Verpackung als Phagemid. Der Vorgang wird durch Co-Infektion mit einem filamentösen Helferphagen ausgelöst. Nach Abtötung der restlichen Zellen durch Hitze werden mit den im Überstand befindlichen Phagemiden SOLR-Zellen infiziert. Der

Helferphage selbst wird in diesen Zellen nicht repliziert, außerdem können sie auch nicht von  $\lambda$ -Phagen infiziert werden. Die im Bluescript-Vektor enthaltene cDNA kann dann als doppel-strängiges Plasmid isoliert werden.

Zunächst wurden XL1-Blue MRF'-Zellen und SOLR-Zellen über Nacht bei 30°C in LB-Medium herangezogen. 0,5 ml der Vorkulturen wurden dazu verwendet, um 50 ml LB anzupflanzen. Die Kulturen wurden bei 37°C inkubiert. Die MRF'-Zellen wurden nach Erreichen von  $OD_{600\text{ nm}} = 0,2-0,5$  durch Zentrifugation bei 2000 rpm geerntet und in 10 mM  $MgSO_4$  auf einen Wert von  $OD_{600\text{ nm}} = 1,0$  gebracht. Die SOLR-Zellen wurden bis zu  $OD_{600\text{ nm}} = 0,5$  herangezogen und dann bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 200  $\mu$ l der MRF'-Zellen mit 250  $\mu$ l Phagenstock und 1  $\mu$ l Helferphagen (ExAssist, Stratagene,  $>10^6$  pfu/ml) infiziert und für 15 min bei 37°C inkubiert; danach wurden 3 ml LB-Medium hinzugefügt, und die Kultur wurde für weitere 2-2,5 h bei 37°C geschüttelt. Die Zelltrümmer wurden für 15 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, der Überstand in ein frisches Röhrchen überführt und für 15 min bei 70°C erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand bei 4°C gelagert. 10 und 100  $\mu$ l dieser Phagemidsuspension wurden verwendet, um jeweils 200  $\mu$ l der frischen SOLR-Zellen zu infizieren. Nach 15 min Inkubation bei 37°C wurden 10-50  $\mu$ l auf  $LB^{Amp}$ -Platten ausplattiert.

#### Klonierung von genomischen Fragmenten aus der genomischen Phagenbank

Mit Hilfe von Flüssiglysen wurde im großen Maßstab Phagen-DNA geerntet, hierfür wurde der Lambda-Midi-Kit von Qiagen verwendet. Ausgegangen wurde von  $10^6$  pfu/ $\mu$ l im Phageneluat. 3 ml SRB(P2)-Zellen (mit  $OD_{600\text{ nm}} = 1,0$  in 10 mM  $MgSO_4$ ) wurden mit 1  $\mu$ l Phageneluat infiziert und anschließend in 50 ml LB herangezogen. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Wenn kein Ausflocken von Zelltrümmern am Gefäßboden und gleichzeitige Klärung des Mediums zu beobachten war, wurden zusätzliche 10-20  $\mu$ l Phageneluat hinzupipettiert und die Inkubation fortgesetzt. Die Lyse wurde abgebrochen durch die Zugabe von Chloroform bis zu einer Konzentration von 5%. Nach weiteren 15 min Inkubation wurden die Zelltrümmer für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde nach den Angaben des Kit-Protokolls weiterbehandelt. Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 50  $\mu$ l  $TE^{-4}$  gelöst. Die genomische DNA wurde durch Restriktion mit *NotI* aus den Phagenarmen ausgeschnitten. Die Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung aus einem 0,5% Agarosegel isoliert und mit 1  $\mu$ l pZErO-

1-Vektor (50 ng/μl, Invitrogen) 30 min bei 16°C ligiert. Um Subklone zu erhalten, wurde eine „shot gun“-Klonierung mit *SacI*-Fragmenten angeschlossen.

### 5.3.19 PCR-Techniken

#### Verwendete Enzyme

Allgemein wurde *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen, 5 u/μl) benutzt. In Fällen, in denen das Leseraster des Templates unbedingt unverfälscht auf das PCR-Produkt übertragen werden mußte, so zum Beispiel bei der Klonierung des GFP-Fusionskonstruktes, wurde *Pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene, 2,5 u/μl) eingesetzt.

#### Standard-PCR-Protokoll

Für einen Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μl wurden folgende Komponenten gemischt und mit 4 Tropfen „Chill out“-Wachs (Biozym) überschichtet:

0,5 μl	Plasmid-DNA (ca. 25 ng)
x μl	dH <sub>2</sub> O
5 μl	10x Reaktionspuffer
1 μl	dNTP-Mix (je 25 mM)
1 μl	Primer A (100 ng/μl)
1 μl	Primer B (100 ng/μl)
0,5 μl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 u/μl)
(2 μl	MgCl <sub>2</sub> )

Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration beeinflußt vor allem die Aktivität und Spezifität der *Taq*-Polymerase. In der Regel lag die optimale Konzentration bei 15 mM MgCl<sub>2</sub> (wie durch den Reaktionspuffer vorgegeben). Der Ansatz wurde im PCR-Block (Omn-E, Hybaid) folgenden Zyklen - Wiederholungen von Denaturierung, Hybridisierung der Primer und Auffüllreaktion durch die *Taq*-Polymerase - unterworfen:

Zyklus 1:

92 °C	1 min
52-65 °C	2 min
72 °C	2-4 min

Zyklen 2-31:

92 °C	1 min
52-65 °C	2 min
72 °C	2-4 min

Zyklus 32:

92 °C	1 min
52-65 °C	2 min
72 °C	7-10 min

Die „annealing“-Temperatur variierte mit den Schmelzpunkten der Primer. Allgemein wurde eine Temperatur gewählt, die 2 °C unter dem niedrigeren der beiden Schmelzpunkte lag. Wenn Phagen als Template benutzt wurden, wurde die DNA im ersten Zyklus durch zehnminütiges Erhitzen bei 92°C zugänglich gemacht (Aufbrechen der Phagenköpfe). In diesem Fall wurde die *Taq*-Polymerase kurz vor dem Übergang in die „annealing“-Phase hinzugefügt.

„supported“-PCR (Rudenko *et al.*, 1993, modifiziert)

Die Klonierung der an das P-Element angrenzenden genomischen Sequenzen wurde mittels „supported-PCR“ durchgeführt. Als Template wurde aus homozygoten Tieren der P-Element-Insertionslinie isolierte, *DraI* geschnittene genomische DNA verwendet, als Primer wurde zunächst ein Oligonukleotid, das sich aus den invertierten Wiederholungen des P-Elementes (P-Primer: 5'-CGACGGGACCACCTTATGTTATTTTCATC-3') ableitet, eingesetzt. Der erste Schritt stellte keinen PCR-Zyklus dar, sondern nur eine Verlängerung des P-Primers in die genomische Sequenz. Die Verwendung von biotinyliertem dUTP erlaubte anschließend die Bindung des Hybridmoleküls an Streptavidin-gekoppelte Dynabeads sowie die Entfernung der unspezifischen *DraI*-Fragmente.

Daraufhin erfolgte die Ligation mit einem doppelsträngigen Linker-Molekül (Linker-Primer: 5'-ACCCGTGGATCAGTACCGCGACTTGT-3' und Linker-Primer short: 5'-CAAGTCGCGGT-3') und die Amplifikation des genomischen Fragmentes mit Hilfe des P-Primers und eines weiteren Primers, der sich sich aus der Sequenz des Linkers ergab. Für die Synthese des Biotin-markierten Stranges wurde folgende Komponenten gemischt:

10 µl gedaute DNA (10 µg)  
5 µl 10x PCR-Puffer  
1 µl P-Primer (20 ng)  
2 µl dNTP-Mix (je 1 mM A,C,G; 0,65 mM T und 0,35 mM Biotin-11-dUTP)  
0,3 µl *Taq*-Polymerase (5 u/µl)  
32 µl dH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde im PCR-Block folgendem Zyklus unterzogen:

92 °C      2 min  
50 °C      2 min  
72 °C      10 min

Anschließend wurde der Ansatz gefällt, um das nicht eingebaute Biotin-11-dUTP zu entfernen, und die DNA in 50µl Bindungspuffer gelöst. Dann wurden 5 µl mit Bindungspuffer äquilibrierte Streptavidin-gekoppelte Magnetpartikel zugegeben und die Ansätze für 30 min bei RT inkubiert. Die Partikel wurden dabei mehrmals aufgewirbelt. Mit Hilfe des Magnethalters wurde der Überstand entfernt, die gebundenen Moleküle zweimal mit 50 µl Bindungspuffer gewaschen und in 20 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Der Ligationsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

20 µl Magnetpartikel  
2,5 µl 10x Ligasepuffer  
0,5 µl Linker-Primer (500 ng)  
0,25µl Linker-Primer short (250ng)  
1 µl T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 12°C inkubiert. Dann wurden die Magnetpartikel über den Magnethalter isoliert, zweimal mit 1x PCR-Puffer gewaschen und in 18 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Der PCR-Ansatz zur Amplifikation des DNA-Fragmentes setzte sich wie folgt zusammen:

9 µl Magnetpartikel  
5 µl 10x PCR-Puffer  
2 µl P-Primer (40 ng)  
2 µl Linkerprimer (40 ng)  
1 µl dNTP-Mix  
0,5 µl *Taq*-Polymerase (5 u/µl)  
ggf. 2 µl 1 25 mM MgCl<sub>2</sub>  
*ad* 50 µl dH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde mit „Chill out“-Wachs überschichtet und folgenden PCR-Zyklen unterzogen:

Zyklus 1:

92 °C	1 min
50 °C	1 min
72 °C	5 min

Zyklen 2-31:

92 °C	30 s
50 °C	1 min
72 °C	5 min

Zyklus 32:

92 °C	30 s
50 °C	1 min
72 °C	10 min

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel isoliert (siehe 5.3.14).

### Klonierung von PCR-Produkten

Für das Integrieren von PCR-Produkten in Vektoren wurden folgende Kits verwendet: Bei PCR-Produkten mit A-Überhang das pGEM-T- oder pGEM-T easy Vektor System I (Promega), bei „blunt end“-Produkten (*Pfu*-Polymerase) das PCR-Script Amp Cloning Kit (Stratagene). Dabei wurde nach den Angaben der Hersteller vorgegangen.

### 5.3.20 DNA-Sequenzierung

Zur Analyse der Basenabfolge in klonierten DNA-Abschnitten wurde die Kettenabbruchmethode angewendet (Sanger *et al.*, 1977). Die elektrophoretische Auftrennung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente erfolgte im denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel.

#### Gießen des Sequenzgels

Die Glasplatten wurden gründlich mit Wasser und Seife gereinigt. Die größere der beiden Platten wurde auf der einen Seite mit einer Schicht überzogen, die das Gel kovalent bindet, die kleinere dagegen mit „Anti-Haft“-Silan. Eine Lösung aus 12,5 ml 96% Ethanol, 375 µl 10% HAc und 37,5 µl  $\gamma$ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan wurde auf der „Binde“-Platte verrieben. Nach 3 minütigem Trocknen wurde die Platte 10 min lang gewässert. Auf die „Anti-Haft“-Platte wurde gleichermaßen eine Lösung aus 10 ml Trichlorethan und 200 µl Dichlormethylsilan aufgebracht. Sie wurde für 10 min getrocknet und kurz gewässert. Die trockenen und staubfreien Platten wurden mit den beschichteten Seiten aufeinandergelegt. In einem Abstand von ca. 15,5 cm ausgerichtete „Spacer“ sorgten für einen Hohlraum, der mit Gelmatrix gefüllt wurde. Der Aufbau wurde an den Längsseiten durch Metallklammern fixiert, die die Platten auf Höhe der „Spacer“ zusammendrückten. 30 ml Sequenzgellösung wurden mit 55 µl 30% APS-Lösung und 30 µl TEMED gemischt und augenblicklich zwischen die Glasplatten gegossen. Nach dem Gießen wurde sofort der Kamm eingeführt.

#### Sequenzgel-Lösung

153 g Harnstoff  
19 g Acrylamid  
1 g Bisacrylamid

Die obigen Bestandteile wurden in 300 ml dH<sub>2</sub>O gelöst. Danach wurden 25 g Ionenaustauscherharz (AG 501-X8 (D) Resin, Amberlite) zugegeben und die Lösung 30 min lang gerührt. Die Harzkügelchen wurden mit Hilfe eines Faltenfilters entfernt. Anschließend wurden 50 ml 10x TBE hinzugefügt und die Lösung unter Verwendung von Vor- und Feinfilter (AP15, Millipore und 0,45 µm Cellulose-Nitrat-Filter, Sartorius) filtriert und entgast. Die fertige Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

#### Vorbereitung der Proben und Gelelektrophorese

Für die Sequenzierreaktionen wurden 2-3 µl (1-2 µg) DNA aus Midi-Plasmidpräparationen bzw. 8 µl aus Mini-Plasmidpräparationen verwendet. Letztere waren zuvor durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion mit anschließender Fällung gereinigt worden. Die DNA wurde mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 18 µl gebracht und mit 2 µl 2 M NaOH, 2mM EDTA 5 min bei RT denaturiert. Es folgte die Zugabe von 6 µl 3 M NaAc und 52 µl 96% Ethanol. Nach 10 min Fällung bei -80°C wurde die DNA 10 min bei 12000 rpm pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen.

Für die Sequenzierung wurde das T7-Sequenzierungskit der Firma USB eingesetzt.

Die DNA-Pellets wurden in 10 µl dH<sub>2</sub>O gelöst und je 2 µl „annealing“-Puffer und entsprechende Primer (5 pmol/µl) zugegeben. Für das „annealing“ wurden die Proben zuerst 5 min bei 65°C, dann 10 min bei 37°C und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 3 µl „Labeling“-Mix A sowie 2 µl (dem Protokoll entsprechend verdünnte) T7-DNA-Polymerase und 1 µl α-<sup>32</sup>P-ATP hinzupipettiert. Die Reaktionen wurden 5 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Aufteilung von jeweils 4,5 µl radioaktivem Ansatz auf vier verschiedene, bei 37°C vorgewärmte Eppendorf-Reaktionsgefäße, die 2,5 µl A-Mix, C-Mix, G-Mix bzw. T-Mix enthielten. Sie liefern die jeweiligen Didesoxyribonukleotide, die den Kettenabbruch erzeugen. Die Reaktion fand für 5 min bei 37°C statt und wurde durch Zugabe von 5 µl Stopplösung beendet. Die Proben wurden zur Denaturierung 3 min lang aufgeköcht und sofort auf Eis gestellt. Das Sequenzierungsgel wurde zusammen mit einer wärmeleitenden Metallplatte in eine vertikale Elektrophoreseapparatur (Renner GmbH) eingespannt. Die Pufferkammern wurden mit 1x TBE-Puffer gefüllt und die Geltaschen mit einer Spritze ausgespült. Vor dem Auftragen der Proben wurde ein mind. 30 minütiger Vorlauf bei 25 mA und 40 W durchgeführt. Die Geltaschen wurden vor jedem Auftrag erneut ausgespült. Von den Proben wurden je 1,5 µl in der Reihenfolge A, C, G, T aufgetragen. Der Lauf fand unter den gleichen Bedingungen wie der Vorlauf statt. Je nachdem, wie weit die zu lesende Region von dem Primerbereich entfernt war, erfolgte die

Elektrophorese für 45 oder 90 min. Anschließend wurden die Glasplatten mit einer Rasierklinge auseinandergehebelt und die gelbehaftete Platte zur Fixierung für 10 min in ein Bad aus 10% Essigsäure und 10% Methanol gelegt. Danach wurde das Gel 10 min gewässert und etwa 30 min im Trockenschrank getrocknet. Schließlich wurde die Platte in eine Röntgenkassette gelegt. Der Röntgenfilm wurde direkt auf das Gel aufgelegt und über Nacht bei RT exponiert. Um das Gel von der Glasplatte abzulösen, wurde diese für mehrere Tage in einem NaOH-Bad (0,5 M) eingeweicht.

#### **5.4 P-Element-vermittelte Keimbahntransformation** (Spradling & Rubin, 1982 und Rubin & Spradling, 1982)

Bei dieser Methode wird ein DNA-Gemisch aus P-Konstrukt und Helferplasmid in den Hinterpol von jungen Embryonen injiziert, die noch keine Polzellen abgeschnürt haben. Das Gemisch wird zufällig in die entstehenden Urkeimzellen eingeschlossen und das P-Konstrukt kann mit Hilfe des durch das Helferplasmid gelieferten Enzyms Transposase in die Chromosomen integrieren. Das Helferkonstrukt selbst ist dazu nicht in der Lage und wird im Laufe der Zellteilungen ausgedünnt.

##### **5.4.1 Vorbereitung der Embryonen**

Da die zu injizierenden Konstrukte als Marker das Wildtyp-*white*-Gen (Pirota, 1988) enthielten, wurden die Keimzellen von Embryonen eines weißäugigen Fliegenstammes transformiert. Um die Eiablage anzuregen, waren einige Tage alte *w<sup>118</sup>*-Tiere auf frische, reichlich mit Hefe bestreute Zuchtflaschen gesetzt worden. Nach zwei Tagen wurden die Tiere in leere, mit Luftlöchern versehene Zuchtflaschen geschüttelt und auf Apfelsaftagarplatten aufgesetzt (Siehe 5.1.3). Die Apfelsaftagarplatten wurden alle 15 min gewechselt. Die ersten drei Ernten wurden verworfen, weil sie mit älteren Embryonalstadien kontaminiert sind. Die Embryonen wurden von den Agarplatten abgeschabt und in 50% Klorix dechorionisiert. Nach mehrmaligem Spülen mit dH<sub>2</sub>O wurden sie auf einem Agarblöckchen, mit dem Hinterpol jeweils in dieselbe Richtung, ausgerichtet und durch Andrücken auf ein Deckgläschen übertragen, das zuvor mit einem speziellen Klebstoff (mit Hilfe von Heptan aus Paketklebeband extrahiert) bestrichen worden war. Um zu verhindern, daß die Embryonen bei der Injektion platzen, folgte ein kurzer Trocknungsschritt. Anschließend wurden sie mit einem Tropfen Voltalef 10S-Öl (elf atochem) beschichtet.

#### 5.4.2 Vorbereitung der DNA und Injektion

Das für die Transformation vorgesehene Konstrukt war zuvor durch eine Midi-Plasmidpräparation (Qiagen) vermehrt und gereinigt worden. 25 µg Konstrukt wurden mit 5 µg Hilfskonstrukt gemischt. Um etwaige Verunreinigungen zu entfernen, wurde der DNA-Mix einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung unterzogen. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 µl dH<sub>2</sub>O gelöst. Vor der Entnahme von DNA zum Befüllen der Nadel (Femtotips II, Eppendorf) wurde die Lösung für 30 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Mikroinjektion wurde mit einem Transjektor 5246 (Eppendorf) durchgeführt, dessen Pumpe mit einem Nadelhalter verbunden war. Die Nadel wurde mit ca. 5 µl DNA-Mix gefüllt und auf den Nadelhalter geschraubt. Das Deckgläschen mit den daranhaftenden Embryonen wurde auf einen Objektträger aufgebracht und dieser im Mikroskop eingespannt. Die DNA wurde, um Cytoplasmabewegungen zu vermeiden, in möglichst geringen Mengen in den äußersten Bereich des Hinterpols injiziert. Anschließend wurde das Deckgläschen in ein Wägeschälchen gelegt und mit Voltaef 3S Öl (elf atochem) überschichtet, bis die Embryonen gerade vollständig bedeckt waren. Die Wägeschälchen wurden in Feuchtkammern gestellt. Nach zwei Tagen bei 18°C konnten die geschlüpften Larven abgesammelt und in ein frisches Zuchtgefäß gesetzt werden. Sie wurden direkt in mit dH<sub>2</sub>O angerührte Hefe abgestreift.

#### 5.4.3 Etablierung transgener Linien

Von den geschlüpften Tieren (G<sub>0</sub>-Generation) wurden Einzelzuchten angesetzt, d.h. sie wurden je nach Geschlecht mit *w<sup>1118</sup>*-Männchen oder -Jungfrauen gepaart. Die unter den Nachkommen auftretenden transgenen Tiere konnten anhand der gelben bis roten Augenfarbe erkannt werden. Zur Aufrechterhaltung der einzelnen Insertionslinien wurden Balancerchromosomen eingekreuzt. Diese enthalten chromosomale Inversionen, wodurch Rekombinationsereignisse verhindert werden, und sind mit rezessiv (homozygot) letalen, phänotypisch dominanten Markergenen ausgestattet (siehe 5.1.1).

## 5.5 Proteinchemische Methoden

### 5.5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit einer Vertikal-Elektrophorese-Einheit (Hofer), die eine Trennstrecke von ca. 13 cm erlaubt. Die Glasplatten wurden vor der Benutzung zuerst mit Wasser, dann mit Methanol gründlich gereinigt. Die Geldicke betrug 1 mm, bei präparativen Gelen 1,5 mm.

Es wurde ein Polyacrylamidsystem mit 5% Sammelgel und 10% oder 12,5% Trenngel gewählt. Zur Herstellung des Trenngels wurden die entsprechenden Volumina an 40% Acrylamidlösung, Trenngelpuffer und TEMED gemischt (siehe unten). Zuletzt wurde die APS-Lösung hinzugefügt, um die Polymerisation zu starten. Nach dem Gießen wurde die Gelphase mit dH<sub>2</sub>O überschichtet und zum Polymerisieren für 25 min in den 37°C-Inkubator gestellt.

Das Sammelgel bestand aus 2,6 ml 40% Acrylamidlösung, 2 ml Sammelgelpuffer, 7,4 ml H<sub>2</sub>O, 3 µl TEMED und 20 µl 30% APS-Lösung. Der Kamm wurde so eingeführt, daß zwischen Taschenboden und Trenngelgrenze ein etwa 1 cm breites Sammelgel entstand. Das Sammelgel polymerisierte 30 min bei 37°C. Im Anschluß daran wurden die Taschen erst mit dH<sub>2</sub>O und dann mit Elektrophoresepuffer gespült.

Die aufzutragenden Proteinproben wurden in Probenpuffer aufgenommen, dem vor Gebrauch pro 100 µl Puffer 3 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) zugegeben worden war. Für die Gewinnung von Proteinen aus ganzen Fliegen wurden diese in 1x Probenpuffer/β-ME zerdrückt. Herauspräparierte Organe wurden in PBS auf Eis gesammelt und im Verhältnis 1:1 mit 2x Probenpuffer/β-ME gemischt. Bakterienpellets wurden ebenfalls in 1x Probenpuffer/β-ME aufgenommen. Die Proben wurden 3-5 min im Wasserbad aufgeköcht. Vor dem Auftragen wurden die abgekühlten Proben durch Zentrifugation von festen Bestandteilen befreit.

Das Einlaufen der Proteine ins Sammelgel erfolgte bei 25 mA, der Lauf im Trenngel bei 50 mA. Die Laufzeit betrug ca. 3 h bei einer Temperatur von 4°C. Alternativ wurde die Elektrophorese über Nacht bei einer Stromstärke von 8 mA durchgeführt.

Lösung	10% Trenngel	12,5% Trenngel
Acrylamidlösung	5,25 ml	6,6 ml
Trenngelpuffer	7 ml	7 ml
dH <sub>2</sub> O	8,75 ml	7,4 ml
TEMED	5,25 µl	5,25 µl
30% APS-Lösung	30 µl	30 µl

## 40% Acrylamidlösung

38,9% (w/v) Acrylamid

1,1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

## Trenngelpuffer

112 mM Tris  
10 mM SDS  
pH 8,8 (HCl)

## Sammelgelpuffer

375 mM Tris  
21 mM SDS  
pH 6,8 (HCl)

## 2x SDS-Probenpuffer

2 ml Sammelgelpuffer  
1 ml 50% (v/v) Glycerin  
0,12 g SDS  
0,2% Bromphenolblau

## Elektrophoresepuffer

200 mM Glycin  
25 mM Tris  
3,5 mM SDS  
(pH 8,3-8,6)

### 5.5.2 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 1-2 Stunden in Coomassie Brilliant Blue G250-Färbelösung (1 g Coomassie Blue G250, 150 ml Methanol, 375 ml H<sub>2</sub>O, 35 ml Eisessig) gelegt und bei geringer Geschwindigkeit geschüttelt.

Zum Entfärben wurde das Gel mehrmals mit einer Entfärbelösung (70 ml Eisessig, 300 ml Methanol und 630 ml H<sub>2</sub>O) gewaschen.

### 5.5.3 „Semidry“-Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran

Die Proteine wurden mittels „Semidry“-Verfahren aus dem Polyacrylamidgel auf Nitrozellulose-Membran übertragen (Optitran BA-S85, Schleicher & Schuell). Zunächst wurden 10 Whatman-Filterpapierstücke zurechtgeschnitten, in Länge und Breite 1 cm größer als das Proteingel. Die Graphitplatten der Blot-Apparatur (Fast Blot, Biometra) wurden mit dH<sub>2</sub>O befeuchtet. Auf die untere Platte (Anode) wurden 5 übereinandergeschichtete und mit Anodenpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere und dann die ebenfalls mit Anodenpuffer äquilibrierte Membran gelegt. Darauf wurde das Gel appliziert. Luftblasen wurden entfernt. Der Aufbau wurde schließlich mit den restlichen in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren ergänzt und die Apparatur geschlossen. Bei einer Leistung von 10 W wurden pro cm<sup>2</sup> Membran 0,8 mA angelegt. Der Transfer wurde nach 2-3 Stunden beendet.

Anodenpuffer

200 mM Tris/HCl pH 10,4

20% Methanol

Kathodenpuffer

25 mM Tris/HCl pH 9,4

40 mM  $\epsilon$ -Aminocapronsäure

20% Methanol

### 5.5.4 Ponceau S-Färbung

Um die Effektivität des Transfers zu überprüfen und mögliche Transferstörungen sichtbar zu machen, wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Die trockene Membran wurde kurz mit dH<sub>2</sub>O angefeuchtet, bevor sie für 2 min mit Ponceau-Lösung (5% (w/v) Ponceau S in 1% Essigsäure) auf dem Schüttler gefärbt wurde. Nach dem Abgießen der Färbelösung wurde die Membran mehrmals mit dH<sub>2</sub>O gespült, um den Hintergrund zu entfernen. Die Entfärbung erfolgte für wenige Minuten in 0,1 M NaOH.

### 5.5.5 Immunnachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Die Membran wurde kurz mit TBS-Puffer (2,4 g Tris und 8 g NaCl mit H<sub>2</sub>O *ad* 1 l, pH 7,6), gewaschen und dann mindestens 1 h lang mit 5% Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Danach wurde die Membran 2 h lang mit dem 1. Antikörper, verdünnt in 1% BSA, 0,05% Tween 20 in TBS-Puffer, inkubiert. Es folgten ein kurzes Spülen mit TBS-Puffer und 5 min, 7 min und 10 min dauernde Waschschriffe mit Waschpuffer (0,3% BSA, 0,05% Tween 20 in TBS-Puffer), bevor die Membran mit dem 2. AK (Ziege-anti-Kaninchen, Sigma), 1:10000 in 1% BSA, 0,05% Tween 20 in TBS-Puffer verdünnt, für 1,5 h inkubiert wurde. Im Anschluß daran wurde 2 min, 5 min und 7 min lang mit Waschlösung und 10 min lang mit TBS-Puffer gewaschen. Vor der Farbreaktion wurde die Membran 15 min in NBT-Puffer äquilibriert. Die Farbreaktion wurde nach dem Auswechseln des NBT-Puffers durch Zugabe von 4 µl Nitro-blauem Tetrazoliumchlorid (NBT; 50 mg/ml in 70% DMF) und 3 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP; 50 mg/ml in 100% DMF) pro ml NBT-Puffer ausgelöst. Das Abstoppen der Färbung erfolgte je nach Intensität nach 5-20 min durch Spülen mit dH<sub>2</sub>O. Die Membran wurde zwischen Whatman-Filterpapier getrocknet.

#### 10x TBS

1,4 M NaCl  
0,2 M Tris  
pH 7,6

#### NBT-Puffer

100 mM NaCl  
10 mM Tris  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 9,5

### 5.5.6 Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Für die Herstellung eines Antikörpers sollten Kaninchen mit einem durch bakterielle Expression gewonnenem rekombinanten Protein immunisiert werden. Als Expressionsvektor stand pSCREEN-1b (Novagen) zur Verfügung. Die für das Protein codierende Sequenz wurde so in den Vektor eingefügt, daß das Expressionsprodukt ein Fusionsprotein ergab, dessen N-terminaler Bereich Epitope für kommerziell erhältliche Antikörper sowie verschiedene Proteaseschnittstellen enthielt. Außerdem wies der N-terminale Bereich die 15 Aminosäuren-Abfolge des S-Peptids auf, was die Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus dem bakteriellen Zellextrakt durch das S-Tag rEK Purification Kit (Novagen) ermöglichen sollte. Die Expression erfolgte mit Hilfe von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die zuvor mit dem Expressionsvektor transformiert worden waren. Die Selektion von positiven Klonen wurde durch die vom Vektor erzeugte Ampicillin-Resistenz ermöglicht. 20 ml-Vorkulturen wurden mit frischen Einzelkolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C herangezogen. Für die Expression wurden 50 ml Medium mit 5 ml Vorkultur angeimpft. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid) bei einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,6 bis 0,8. Die Zellen wurden 3 h nach der Induktion geerntet. Der Zellextrakt wurde gemäß des Protokolls des S-Tag rEK Purification Kits (Novagen) hergestellt und behandelt. Alternativ wurde der Zellextrakt in einem präparativen SDS-Polyacrylamidgel (5.5.1) aufgetrennt, der das Fusionsprotein enthaltende Gelabschnitt nach einer CuCl<sub>2</sub>-Färbung ausgeschnitten und eine Elektroelution durchgeführt.

### 5.5.7 Kupferchlorid-Färbung (Lee *et al.*, 1987)

Die CuCl<sub>2</sub>-Färbung ist eine reversible Färbemethode, bei der diejenigen Bereiche des Polyacrylamidgels, die kein Protein enthalten, eine hellblaue Farbe annehmen, während die proteinhaltigen Bereiche farblos bleiben. Das Gel wurde für wenige Minuten auf dem Schüttler in 0,3 M CuCl<sub>2</sub> geschwenkt, bis die zu isolierende Bande von den anderen unterscheidbar war. Der ausgeschnittene Gelstreifen wurde sofort mit Entfärber (0,25 mM Tris/HCl pH 9, 0,25 mM EDTA) gewaschen, bis keine Färbung mehr sichtbar war.

### 5.5.8 Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgel (Leppard *et al.*, 1983)

Die mit Hilfe der CuCl<sub>2</sub>-Färbung isolierten Gelstreifen wurden in ca 5 mm breite Stückchen zerteilt und in einen Dialyseschlauch mit 1,5-3 nm Porengröße (16 mm Durchmesser, Serva) überführt. Dann wurden 1,5 ml Elutionspuffer eingefüllt, der

Schlauch verschlossen und in einer horizontalen Elektrophoresekammer quer zum elektrischen Feld plaziert. Die Pufferkammer wurde mit Laufpuffer aufgefüllt, bis der Dialyseschlauch bedeckt war. Die Elektroelution erfolgte für 5 h mit 80 V (100 mA) bei 4°C. Das Eluat wurde anschließend in einem frischen Dialyseschlauch gegen 25 mM Tris/HCl pH 7,4 dialysiert und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde bei -20°C aufbewahrt.

Elutionspuffer	Laufpuffer
200 mM Tris/Acetat pH 7,4	50 mM Tris/Acetat pH 7,4
100 mM DTT	0,1% SDS
1% SDS	

### 5.5.9 Herstellung eines polyklonalen anti-Peptid-Antikörpers

Das Peptid wurde nach folgenden Gesichtspunkten ausgesucht: Es sollte eine Länge von ca. 15 Aminosäuren aufweisen, darunter möglichst viele geladene Aminosäurereste und nicht mehr als sechs hydrophobe Aminosäurereste. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, daß die Sequenz im nativen Protein an der Oberfläche liegt und somit für den Antikörper zugänglich ist. Andererseits wird dadurch gewährleistet, daß das Peptid wasserlöslich ist und sich leicht an Carrier-Proteine, in diesem Fall KLH („Keyhole Limpet Hemocyanin“), koppeln läßt. Weiterhin wurde darauf geachtet, daß das Peptid einen Bereich des FAN-Proteins repräsentiert, der, um Kreuzreaktionen zu vermeiden, so wenig wie Ähnlichkeit mit dem möglicherweise verwandten DmVAP-Protein von *Drosophila* zeigt und außerdem nicht die Transmembrandomäne beinhaltet. Die Sequenz CSTDNKDGEVHFDAQEVSEP (Aminosäuren 142-160 im FAN-Protein) erfüllte diese Anforderungen; der Cystein-Rest kommt nicht im FAN-Protein vor, sondern wurde angefügt, um das Peptid ggf. zur Affinitätsreinigung des Antiserums an entsprechende Säulenmatrices koppeln zu können. Die Peptidsynthese, die Kopplung der Peptide an KLH und die Immunisierung des Kaninchens wurde von der Firma Charles River (Kisslegg) durchgeführt. Das Tier erhielt insgesamt vier Injektionen, wobei bei der ersten Injektion 0,4 mg, bei allen weiteren jeweils 0,2 mg KLH-gekoppeltes Peptid eingesetzt wurden.

## 5.6 Histochemische Nachweismethoden

### 5.6.1 X-Gal-Färbung von Organen (Glaser *et al.*, 1986)

Die Organe wurden in PBS herauspräpariert, in eine 20 Well-Zellkulturschale überführt und 15 min lang in Lösung I fixiert. Danach wurden sie kurz mit Lösung II gespült und dann lichtgeschützt für mehrere Stunden in Lösung III gefärbt. Zum Abstoppen der Färbung wurde mehrmals mit PBS gewaschen. Die Organe wurden in 50% Glycerin in PBS eingedeckelt.

PBS

150 mM NaCl  
10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 7,0

Lösung I

0,25% Glutaraldehyd in PBS

Lösung II

3,3 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]  
3,3 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]x 3H<sub>2</sub>O  
in PBS

Lösung III

3,3 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]  
3,3 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]x 3H<sub>2</sub>O  
0,2% X-Gal (in DMF gelöst)  
0,1% Triton X-100  
in PBS

### 5.6.2 *In situ*-Hybridisierungen

Es wurde ein auf Markierung mit Digoxigenin (DIG) beruhendes Nachweissystem verwendet. Digoxigenin, ein Cardenolid-Steroid, kommt nur im Fingerhut vor und eignet sich aufgrund geringer Hintergrundreaktionen besonders für die *in situ*-Hybridisierung. Als Matrize für die Herstellung der Sonden wurden isolierte DNA-Fragmente eingesetzt. Das Klenow-Enzym baut während der Neusynthese eines DNA-Stranges DIG-gekoppelte Nukleotide ein, diese werden nach der Hybridisierung mit den Nukleinsäuren im Gewebe

mit Hilfe eines Alkalische-Phosphatase-konjugierten-anti-Digoxigenin-Antikörpers nachgewiesen.

#### Markierung der Sonde

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

#### *In situ*-Hybridisierung an Polytänochrosomen (de Frutos *et al.*, 1990)

Zur Lokalisierung der P-Element-Insertionsstelle in Polytänochrosomen wurden Quetschpräparate aus Speicheldrüsen hergestellt. Dazu wurden die Speicheldrüsen von bei 18°C in dünn besiedelten Röhrchen herangezogenen Larven (3. Stadium) herauspräpariert. Die Präparation erfolgte in 10 µl 45% Essigsäure auf einem sauberen Objektträger, dessen Oberseite mit einem Glasritzer markiert wurde. An den Speicheldrüsen haftende Fettkörperreste wurden möglichst entfernt, sofort ein silanisiertes Deckgläschen aufgelegt und die Zellkerne durch kurzes, kräftiges Klopfen mit einer umgedrehten Pinzette aufgebrochen. Um die Chromosomen zu entknäueln, wurde der Objektträger mehrmals mit den Kanten auf die Tischplatte aufgeschlagen. Schließlich wurde das Deckgläschen mit einem darübergelegten Filterpapierstreifen fixiert und mit dem Daumen so fest wie möglich angedrückt. Der Objektträger wurde in flüssigen Stickstoff getaucht und das Deckgläschen mit einer Rasierklinge abgesprengt. Das Präparat wurde sofort für 10 min in 3:1 Ethanol/Eisessig fixiert. Es folgten mind. 10 min Entwässerung in 96% Ethanol. Anschließend wurden die Präparate luftgetrocknet und in einer Ethanolreihe, 70%, 50% und 30% in 2x SSC je 2 min, rehydriert. Dann wurden die Chromosomen bei 68°C in 2x SSC für mindestens 30 min hitzestabilisiert. Zur Denaturierung wurden die Präparate für 3s in kochendes 0,1x SSC getaucht. Nach dem Spülen mit 2x SSC bei RT wurden die Präparate durch eine Alkoholreihe, 30%, 50% bzw. 70% in 2x SSC und 100%, wieder dehydriert und 5 min getrocknet. Zur Hybridisierung (Matrize für die Sondenherstellung: P-Element, *Hind*III linearisiert) wurden pro Präparat 30 µl Hybridisierungslösung mit 25-50 µg Sonde in kochendem Wasser denaturiert und sofort in Eiswasser abgekühlt. Die Hybridisierung wurde in einer Feuchtkammer über Nacht bei 53°C durchgeführt. Im Anschluß daran wurden die Präparate zweimal 15 min in 2x SSC bei 53°C und dreimal 10 min in PBT (0,1% Triton X-100 in PBS) bei RT gewaschen. Für den DIG-Nachweis erfolgte eine einstündige Inkubation mit Alkalische Phosphatase-gekoppelten α-DIG-Fab-Fragmenten (Sigma, 1:200 in PBT verdünnt) bei RT. Danach wurden die Präparate je

dreimal 3 min in PBT und Färbepuffer gewaschen. Schließlich wurden 100 µl Färbelösung (20 µl NBT/BCIP-Lösung aus dem Kit in 1 ml Färbepuffer) aufpipettiert und die Präparate mind. 1 h bei RT inkubiert. Die Nachweisreaktion wurde durch Spülen mit PBS abgebrochen und eine DNA-Gegenfärbung mit DAPI (4, 6-Diamino-2-phenylindol Dihydrochlorid, Sigma) durchgeführt, dazu wurden die Präparate 5 min in 0,5 µg DAPI pro ml PBS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate in 50% Glycerin (in PBS) eingedeckelt.

PBS	20x SSC
140 mM NaCl	3 M NaCl
10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 M Na-Citrat
pH 7,4, autoklaviert	pH 7, autoklaviert

Hybridisierungslösung	Färbelösung
50% deionisiertes Formamid	100 mM NaCl
5x SSC	50 mM MgCl <sub>2</sub>
50 µg/ml Heparin	100 mM Tris/HCl pH 9,5
0,1% Tween 20	1 mM Levamisol
100 µg/ml Lachsspermien-DNA	0,1% Tween 20

#### Hybridisierung an Organen (Tautz und Pfeiffle, 1989)

Als Matrize für die Herstellung der Sonden wurden cDNAs verwendet. Die Organe wurden in PBS präpariert und 20 min in 4% Formaldehyd in PBS fixiert, dazu wurden sie auf dem Drehrad inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBT (0,1% Tween 20 in PBS) gespült, 5 min gewaschen und nochmals gespült. Um das Gewebe für die Sonde durchlässig zu machen, wurden die Organe 2-4 min einer Proteinase K-Behandlung unterzogen, es wurden dabei 2,5 µl Proteinase K (15,6 mg/ml, Roche) pro ml PBT eingesetzt. Die Inkubation wurde gestoppt, indem die Lösung je zweimal durch 1 ml Glycin in PBT (2 mg/ml) bzw. 1 ml PBT ausgetauscht wurde. Da das Gewebe durch die Proteinase-K sehr empfindlich wird, wurde nochmals mit Formaldehyd fixiert wie oben

beschrieben. Nach den Waschschrinen wurden die Organe in geringen Volumina auf Hybridisierungslösung umgepuffert. Sie wurden dafür zunächst für 5 min mit 50% Hybridisierungslösung in PBT gewaschen, dann zweimal mit Hybridisierungslösung gespült. Es folgte 1 h Prähybridisierung in 500 µl Hybridisierungslösung bei 50°C im Wasserbad. Die Hybridisierung wurde ebenfalls bei 50°C über Nacht durchgeführt. Pro Präparat wurden 4-8 µl (etwa 40 ng/µl) in TE<sup>-4</sup> gelöste Sonde in 30 µl Hybridisierungslösung 15 min lang aufgeköcht und sofort in Eiswasser abgekühlt. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde entfernt und für eine mögliche Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Die Präparate wurden 5 und 15 min lang mit vorgewärmter Hybridisierungslösung bei 50°C gewaschen und dann durch eine Verdünnungsreihe mit 70%, 50% und 30% Hybridisierungspuffer in PBT, jeweils 5 min Inkubation bei RT, umgepuffert. Es folgten zweimaliges Spülen und 5, 10 und 15 minütige Waschschrine mit PBT auf dem Drehrad. Für den DIG-Nachweis wurden die Organe 2 h bei RT mit 1:2000 in PBT verdünntem Alkalische Phosphatase gekoppelten  $\alpha$ -Digoxigenin-Fab-Fragmenten auf dem Drehrad inkubiert. Der Antikörper war zuvor zur Reinigung 2 h lang bei RT auf 50 fixierten Organen in 1:1000 Verdünnung präadsorbiert worden. Danach wurde wie zuvor mit PBT gewaschen. Nach zweimal 5 min Waschen in Färbepuffer wurden die Organe in Färbelösung überführt. Hierfür wurden 20 µl NBT/BCIP-Lösung aus dem Kit pro ml Färbepuffer eingesetzt. Die Färbung erfolgte lichtgeschützt bei 37 °C für 0,5 bis 2 h und wurde durch mehrmaliges Spülen mit PBT abgebrochen. Die Organe wurden in 50% Glycerin (in PBS) eingedeckelt.

#### Hybridisierungslösung

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

#### Hybridisierungspuffer

50% deionisiertes Formamid  
5x SSC

## Färbelösung

100 mM Tris/HCl pH 9,5

100 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM NaCl

0,1% Tween 20

## *In situ*-Hybridisierung an larvalem Gewebe

Das Protokoll entspricht im Wesentlichen dem für die *in situ*-Hybridisierung an Organen. Es wurden die gleichen Lösungen verwendet. Die Larven wurden vor der Fixierung am Vorder- oder Hinterende aufgerissen, damit die Organe zugänglich werden. Im Unterschied zu der Behandlung der Organe wurde das larvale Gewebe aufgrund seiner Empfindlichkeit nur 1-1,5 min mit Proteinase K inkubiert.

## *In situ*-Hybridisierung an Embryonen

Um eine *in situ*-Hybridisierung an Embryonen vornehmen zu können, müssen die beiden Eihüllen, das Chorion und die Vitellinmembran entfernt werden. Die Dechorionisierung wurde durch 3 minütige Inkubation in 50% Klorix durchgeführt. Danach wurden die Embryonen mehrmals mit 0,1% Triton X-100 gespült und 20-30 min in folgender Fixierungslösung unter heftigem Schütteln devitellinisiert: 3 ml Heptan, 1,89 ml PBS, 0,81 ml 37% Formaldehyd und 0,3 ml 0,5 M EGTA. Die Fixierungslösung bildet zwei Phasen. Nach dem Schütteln wurde die untere (wässrige) Phase und soviel wie möglich von der oberen (Heptan-)Phase entfernt. Nach der Zugabe von Methanol wurden die Embryonen mehrere Minuten lang heftig geschüttelt, dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die fixierten Embryonen sinken dadurch auf den Gefäßboden. Es folgte mehrmaliges Waschen mit 96% Ethanol. Die Embryonen können nach dieser Behandlung für einige Wochen bei -20°C aufbewahrt werden. Bevor sie für die *in situ*-Hybridisierung eingesetzt wurden, erfolgten mehrere Waschschrte mit PBT, um den Alkohol zu entfernen. Die *in situ*-Hybridisierung wurde genauso durchgeführt wie die an Organen, mit der Ausnahme, daß die Inkubationszeit bei der Proteinase K-Behandlung auf 4 min festgelegt wurde.

### 5.6.3. Fixierung von GFP-Präparaten

Um intakte Hoden transgener GFP-Linien mit dem konfokalen Lasermikroskop untersuchen zu können, wurden die Organe fixiert. Die Tiere wurden in PBS präpariert und die Hoden 5 min in 2% Paraformaldehydlösung inkubiert. Danach wurden sie mehrmals mit PBT gewaschen und in 50% Glycerin in PBS eingedeckelt.

Zur Herstellung der 2% Paraformaldehydlösung, wurden 0,4 g Paraformaldehyd in 7 ml dH<sub>2</sub>O unter Zutropfen von 200 µl 1 M NaOH unter dem Abzug gelöst. Dabei wurde die Lösung bis 40°C erhitzt, bis sie klar wurde. Dann wurden 200 µl 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 2,8 ml 5 M NaCl hinzupipettiert. Durch Zutropfen von 20-30 µl 1 M NaOH und unter Zuhilfenahme von pH-Papier wurde ein pH von 7,4 eingestellt. Schließlich wurde die Lösung mit dH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 ml gebracht.

### 5.6.4 Immunfluoreszenz an ganzen Organen (Gönczy & DiNardo, 1996)

Die Präparate wurden während aller Inkubations- und Waschschrte auf einem Drehrad durchmischt. Die Tiere wurden in PBS (siehe 5.1.4) präpariert und die Organe 40 min in 3,7% Formaldehyd in PBT (0,1% Triton X-100 in PBS) fixiert. Die Blockierung wurde über Nacht bei 4°C in 2% NGS (Ziegenserum, Sigma) in PBT durchgeführt. Die Antikörperinkubationen erfolgten für jeweils 90 min bei RT. Dazwischen und danach wurden die Präparate je dreimal 10 min in PBT gewaschen. Zum Eindeckeln wurde 50% Glycerin in PBS verwendet.

### 5.6.5 Immunfluoreszenz an Hodenquetschpräparaten (Glätzer & Kloetzel, 1986)

Die Hoden von 2-5 Tage alten Männchen wurden in *Drosophila*-Ringer herauspräpariert und in einen Tropfen Ringerlösung auf einen gereinigten Objektträger, dessen Oberseite mit einem Glasritzer markiert wurde, überführt. Nach Auflegen eines silanierten Deckgläschens wurde die überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier abgesaugt. Danach wurde das Präparat gequetscht, ohne daß das Deckgläschen verrutschte, und in flüssigen Stickstoff getaucht. Das Deckgläschen wurde mit einer Rasierklinge abgesprengt und das Präparat 2 min in 96% Ethanol und 5 min in 3,7% Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Präparate zweimal 10 min in PBS gewaschen.

Die Antikörper wurden in PBS verdünnt, das  $\alpha$ -FAN-Antiserum wurde 1:200, der FITC-gekoppelte zweite Antikörper (AlexaFluor, Ziege- $\alpha$ -Kaninchen) 1:400 eingesetzt. Die Inkubationen erfolgten für jeweils 90 min bei RT, und zwar lichtgeschützt und in Feuchtkammern. Dazwischen und danach wurden die Präparate je dreimal 10 min in PBS gewaschen.

Für die Aktin- bzw. DNA-Färbung wurden 60  $\mu$ l TRITC-gekoppeltes Phalloidin (Sigma), 0,25  $\mu$ g/ml in PBS verdünnt und/oder Hoechst 33258 (Sigma), 0,5  $\mu$ g/ml in PBS verdünnt, auf die Präparate pipettiert. Nach 5 min Inkubation wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Präparate dreimal 10 min in PBS gewaschen. Zum Eindeckeln wurde 50% Glycerin in PBS verwendet.

## VI. Literaturverzeichnis

- Adams M.A., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F., George R.A., Lewis S.E., Richards S., Ashburner M., Henderson S.N., Sutton G.G., Wortman J.R., Yandell M.D., Zhang Q., Chen L.X. *et al.* (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database research programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Ballinger D.G. & Benzer S. (1989): Targeted gene mutations in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (23): 9402-9406.
- Bellen H.J., Grossniklaus U., O'Kane C.J., Pearson R.K., Wilson C. & Gehring W.J. (1988): The little blue book. Biozentrum Basel.
- Bellen H.J., O'Kane C.J., Wilson C., Grossniklaus U., Pearson R.K & Gehring W.J. (1989): P-element mediated enhancer detection: A versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev.* 3: 1288-1300.
- Bendena W.G., Ayme-Southgate A., Garbe J.C & Pardue M.L. (1991): Expression of heat-shock locus *hsr-omega* in non-stressed cells during development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 144: 65-77.
- Bier E., Vaessin H., Shepherd S., Lee K., McCall K., Barbel S., Ackerman L., Caretto R., Uemura T., Grell E., Jan L.Y. & Jan Y.N. (1989): Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-*lacZ* vector. *Genes Dev.* 3: 1273-1287.

- Birnboim H.C. & Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Bodenstein D. (1950): The post embryonic development of *Drosophila*. In Demerec M. (Hrsg.): *The biology of Drosophila*, S. 275-376. John Wiley, New York.
- Brand A.H. & Perrimon N. (1993): Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
- Bretscher M.S. & Munro S. (1993): Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 216: 1280-1281.
- Castrillon D.H., Gönczy P., Alexander S., Rawson R., Eberhart C.G., Viswanathan S., DiNardo S. & Wasserman S.A. (1993): Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: Characterization of male-sterile mutants generated by single P-element mutagenesis. *Genetics* 135: 489-505.
- Cohen S.M. (1993): Imaginal disc development. In Bate M. & Martinez Arias A. (Hrsg.): *The development of Drosophila melanogaster*. Band 1, S. 71-147. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Coyne J.A. (1996): P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics* 147: 1697-1722.
- de Frutos R., Kimura K.I. & Peterson K. (1990): *In situ*-hybridization of *Drosophila* polytene chromosomes with digoxigenin-dUTP labeled probes. *Methods Molec. Cell. Biol.* 2: 32-36.

- Deak P., Omar M.M., Saunders R.D., Pal M., Komonyi O., Szidonya J., Maroy P., Zhang Y., Ashburner M., Benos P., Savakis C., Siden-Kiamos I., Louis C., Bolshakov V.N., Kafatos F.C., Madueno E., Modolell J. & Glover D.M. (1997): Genetics of differences in pheromonal hydrocarbons between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Genetics* 143: 353-364.
- Ewart G.D., Cannell D., Cox G.B. & Howells A.J. (1994): Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. *J. Biol. Chem.* 269: 10370-10377.
- Fabrizio J.J., Hime G., Lemmon S.K. & Bazinet C. (1988): Genetic dissection of sperm individualization in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125: 1833-1843.
- Fuller M.T. (1993): Spermatogenesis. In Bate M. & Martinez Arias A. (Hrsg.): The development of *Drosophila melanogaster*. Band 1, S. 71-147. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Glaser R.L., Wolfner M.F., & Lis J.T. (1986): Spatial and temporal pattern of *hsp26* expression during normal development. *EMBO J.* 5: 747-754.
- Glätzer K.H. & Klötzel P.M. (1986): Differential chromosomal distribution of ribonucleoprotein antigens in nuclei of *Drosophila* spermatocytes. *J. Cell Biol.* 103:2113-2119.
- Gönczy P. & DiNardo S., (1996): The germ line regulates somatic cyst cell proliferation and fate during *Drosophila* spermatogenesis. *Development* 122: 2437-2447.
- Gould-Somero M. & Holland L. (1974): The timing of RNA synthesis for spermiogenesis in organ cultures of *Drosophila melanogaster* testes. *Wilhelm Roux 's Arch. Dev. Biol.* 174: 133-148.

- Hackstein J.H.P., Hochstenbach R. & Pearson P.L. (2000): Towards an understanding of the genetics of human male infertility: lessons from flies. *Trends Genet.* 16: 565-572.
- Hamilton B.A., Palazzolo M.J., Chang J.H., VijayRaghavan K., Mayeda C.A., Whitney M.A. & Meyerowitz E.M. (1991): Large scale screen for transposon insertions into cloned genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2731-2735.
- Hanahan D. (1983): Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hanahan D. (1985): Techniques for transformation of *E. coli* . In Glover D.N. (Hrsg.): *DNA-Cloning I: a practical approach*. S. 109-135. IRL Press, Oxford.
- Hanson P.I., Roth R., Morisaki H., Jahn R. & Heuser J.E. (1997): Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90: 523-535.
- Hardy R.W., Tokuyasu K.T., Lindsley D.L. & Garavito M. (1979): The germinal proliferation center in the testis of *Drosophila melanogaster*. *J. Ultrastruct. Res.* 69: 180-190.
- Hess O. (1976): Genetics of *Drosophila hydei* Sturtevant. In Novitsky E. & Ashburner M. (Hrsg.): *The genetics and biology of Drosophila*. Band 1c, S. 1342-1363. Academic Press, New York.
- Hicks J.L., Deng W.-M., Rogat A.D., Miller K.G. & Bownes M. (1999): Class VI unconventional myosin is required for spermatogenesis in *Drosophila*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4341-4353.
- Hofmann K., Bucher P., Falquet L. & Bairoch A. (1999): The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* 27: 215-219.

- Italiano J.E., Roberts T.M., Stewart M. & Fontana C.A. (1996): Reconstitution *in vitro* of the motile apparatus from the amoeboid sperm of *Ascaris* shows that filament assembly and bundling move membranes. *Cell* 84: 105-114.
- Kagiwada S., Hosaka K., Murata M., Nikawa J.-I. & Takatsuki A. (1998): The *Saccharomyces cerevisiae* *SCS2* gene product, a homolog of a Synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for Inositol metabolism. *J. Bacteriol.* 180: 1700-1708.
- Klemenz R., Weber U. & Gehring W.J. (1987): The *white* gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 15: 3947-3959.
- Kuhn R., Schäfer U. & Schäfer M. (1988): pW-ATG-lac, P-element vectors for *lacZ* transcriptional gene fusions in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 16: 4163.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laski F.A., Rio D.C. & Rubin G.M. (1986): Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* 44: 7-9.
- Latterich M., Fröhlich K.U. & Schekman R. (1995): Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* 82: 885-893.
- Lee C., Levin A. & Branton D. (1987): Copper staining: A five-minute protein stain for sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 166: 308-312.
- Leppard K.N., Totty N., Waterfield M., Harlow E., Jenkins J. & Crawford L. (1983): Purification and partial amino acid sequence analysis of the cellular tumour antigen, p53, from mouse SV-40-transformed cells. *EMBO J.* 2: 1993-1999.

- Lindsley D.L. & Zimm G.G. (1992): Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Lindsley D.L. & Tokuyasu K.T. (1980): Spermatogenesis. In Ashburner M. & Wright T.R.F. (Hrsg.): Genetics and biology of *Drosophila*. 2. Aufl., Band 2D, S. 225-294. Academic Press, New York.
- Mayer A. (1999): Intracellular membrane fusion: SNAREs only? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 447-452.
- Melton D.A., Krieg P.A., Rebagliati M.R., Maniatis T., Zinn K. & Green M.R. (1984): Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 12: 7035-7055.
- Misura K.M.S., May A.P. & Weis W.I. (2000): Protein-protein interactions in intracellular membrane fusion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 662-670.
- Montell C., Jones K., Hafen E. & Rubin G. (1985): Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* 230 (4729): 1040-1043.
- Nishimura Y., Hayashi M., Inada H. & Tanaka T. (1999): Molecular cloning and characterization of mammalian homologues of vesicle-associated membrane protein-associated (VAMP-associated) proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254: 21-26.
- O'Hare K. & Rubin G.M. (1983): Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* 34: 25-35.
- O'Kane C.J. & Gehring W.J. (1987): Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 24: 9123-9127.

- O'Neil M.T. & Belote J.M. (1992): Interspecific comparison of the transformer gene of *Drosophila* reveals an unusually high degree of evolutionary divergence. *Genetics* 131: 113-128.
- Pelham H.R.B. & Munro S. (1993): Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell* 75: 603-605.
- Peter A., Schöttler P., Werner M., Beinert N., Dowe G., Burkert P., Mourkioti F., Denzer L., He Y., Deak P., Benos P.V., Gatt M.K., Murphy L., Harris D., Barrell B., Ferraz C., Vidal S., Brun C., Demaille J., Cadieu E. *et al.* (2002): Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. *EMBO Rep.* 3: 34-38.
- Pirotta V. (1988): Vectors for P-mediated transformation in *Drosophila*. In Rodriguez R.L. & Denhardt D.L. (Hrsg.): *Vectors, a survey of molecular cloning vectors and their uses*. S. 437-456. Butterworths, Boston.
- Proudfoot N.J. & Brownlee G.G. (1976): 3' non-coding region sequences in eucaryotic messenger RNA. *Nature* 263: 211-214.
- Rasmusson K., Serr M., Gepner J., Gibbon I. & Hays T.S. (1994): A family of Dynein genes in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell* 5: 45-55.
- Rayner J.C. & Pelham H.R.B. (1997): Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *EMBO J.* 16: 1832-1841.
- Roberts T.M. & Stewart M. (1995): Nematode sperm locomotion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 13-17.
- Roberts T.M. & Stewart M. (1997): Nematode sperm: amoeboid movement without actin. *Trends Cell Biol.* 7: 368-373.

- Robertson H.M., Preston C.R., Phillis R.W., Johnson-Schiltz D.M., Benz W.K. & Engels W.R. (1988): A stable genomic source of P-element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118: 461-470.
- Rothman J.E. (1994): Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372: 55-62.
- Rubin G.M. & Spradling A.C. (1982): Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*: 218: 348-353.
- Rubin G.M., Hong L., Brokstein P., Evans-Holm M., Frise E., Stapleton M. & Harvey D.A. (2000): A *Drosophila* complementary DNA resource. *Science* 287: 2222-2224.
- Rudenko G.N., Rommens C.M.T., Nijkamp H.J.J. & Hille, J. (1993): Supported PCR: An efficient procedure to amplify sequences flanking a known DNA segment. *Plant Mol. Biol.* 21: 723-728.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Schmid K.J. & Tautz D. (1997): A screen for fast evolving genes from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9746-9750.
- Schmidt A., Hollmann M. & Schäfer U. (1996): A newly identified Minute, *M(2)32D*, encodes the ribosomal protein L9 in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genetics* 251: 381-387.
- Scott A.L., Dinman J., Sussman D.J. & Ward S. (1989): Major sperm protein and actin genes in free-living and parasitic nematodes. *Parasitology* 98: 471-478.
- Sentry J.W. & Kaiser K. (1994): Application of inverse PCR to site selected mutagenesis of *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 22: 3429-3430.

- Skehel P.A., Fabian-Fine R. & Kandel E.R. (2000): Mouse VAP33 is associated with the endoplasmic reticulum and microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1101-1106.
- Skehel P.A., Martin K.C., Kandel E.R. & Bartsch D. (1995): A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science* 269: 1580-1583.
- Skehel J.J. & Wiley D.C. (1998): Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* 95: 871-874.
- Soussan L., Burakov D., Daniels M.P., Toister-Achituv M., Porat A., Yarden Y. & Elazar Z. (1999): ERG30, a VAP-33-related protein, functions in protein transport mediated by COPI Vesicles. *J. Cell Biol.* 146: 301-311.
- Southern E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-507.
- Spradling A.C. & Rubin G.M. (1982): Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218: 341-347.
- Stewart M., King K.L. & Roberts T.M. (1994): The motile major sperm protein (MSP) of *Ascaris suum* forms filaments constructed from two helical subfilaments. *J. Mol. Biol.* 242: 60-71.
- Tates A.D. (1971): Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: An electron microscope study. Dissertation, Rijksuniversiteit, Leiden.
- Tautz D. & Pfeiffle C. (1989): A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98: 81-85.

- Teasdale R.D. & Jackson M.R. (1996): Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 27-54.
- Tokuyasu K.T. (1974 a): Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. III. Relation between axoneme and mitochondrial derivatives. *Exp. Cell. Res.* 84: 239-250.
- Tokuyasu K.T. (1974 b): Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. II. Nuclear transformation. *J. Ultrastruct. Res.* 48: 284-303.
- Tokuyasu K.T., Peacock W.J. & Hardy, R.W. (1977): Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VII. Effects of Segregation Distorter (SD) chromosome. *J. Ultrastr. Res.* 58: 96-107.
- Vollenweider F., Kappeler F., Itin C. & Hauri H.P. (1998): Mistargeting of the lectin ERGIC-53 to the endoplasmatic reticulum of HeLa cells impairs the secretion of a lysosomal enzyme. *J. Cell Biol.* 142: 377-389.
- Weichenhan D. (1991): Fast recovery of DNA from agarose gels by centrifugation through blotting paper. *Trends Genet.* 7: 109.
- Weimbs T., Low S.H., Chapin S.J., Mostov K.E. & Bucher P. (1997): A conserved domain is present in different families of vesicular fusion proteins: A new superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3046-3051.
- Weir M.L., Klip A. & Trimble W.S. (1998): Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem. J.* 333: 247-251.
- Weir M.L., Xie H., Klip A. & Trimble W.S. (2001): VAP-A binds promiscuously to both v- and tSNAREs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 616-621.

Wolfner M.F. (1997): Tokens of love: function and regulation of *Drosophila* male accessory gland products. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 172-192.

Zhang L., Ashendel C.L., Becker G.W. & Moore D.J. (1994): Isolation and characterization of the principal ATPase associated with transitional endoplasmic reticulum of rat liver. *J. Cell Biol.* 127: 1871-1883.

## VII. Anhang

### 7.1 Genomisches *ClaI-SacI*-Fragment aus Klon 33

Relevante Schnittstellen und mögliche Polyadenylierungssignale sind unterstrichen, Primer durch Kursivdruck gekennzeichnet. Das erste und letzte Nukleotid der jeweiligen *farinelli*-cDNA ist fett gedruckt. Die P-Element-Insertionsstelle befindet sich vor Nukleotid 883.

*5' fus primer* →

```

ATCGATTTTCGATTTTCGAAAAACCCATCATCGCACACCGTGAGATTAATAC    50 ClaI
GATGCCTACACTCAGCATCCGCCGTCTCGACAACCAACATTCATTGTTAT    100
TTATTACCAAGCAAGCAACAAAAAAGAAAGAAAGCAATCAAAGCAAAT    150
AGCGATACCAATAAACGTGTATATAATTGCATAAATCGAAAGAGTCCTGT    200
CAAACATTTTTTTAATTTGTATCTTACCCATACCTCCTCCCCTCGAAACA    250
GCAACGAAATGGAGGACGAGGAACTTTCGGGCATCATTCTGTCCAAGGCC    300
ACCTCCCCCAATGCCGGGCGCATGATATTTTGGTAAATGATGGACCATCC    350
CCCACCTGACACACATTCAGTCACACAAACGTATCGAATTTTTGTAAATA    400
TTTAATAAAACAAAAACAAATAAAACGAACGATCTGAAACTCGAAATCA    450
TGTTGTTATCTAAACATCTTGAACCTTACAAATACAAAAACTACAATTTG    500
CAAAAGTTCTAAAAAGTTTTTGAACATTATTTAAAGACAGGTTTGTATAT    550 DraI
AATTTATGAAATTAGCCTAAAATATAGCTTTTAAAGACATTCCTTTAAGCA    600
ACATAAGCTAATAGCTGCAATCTATAATAGTGATGCTGCGCATATGACTT    650
TCAAACCGACCAGTGTGTCCACACCAGAAAAGTTGAATTCATACGAAAT    700 EcoRI
CAAGCAATATGTGAACTCAATTCAGCCCTGAAATGGAAAGTTTCACATTC    750

```

cDNA 2

```

CTTTTTCTGTCATTTGCACACTACGGCATTGTCAGGGAACGTGTTCATTTGG    800 KpnI

```

cDNA 14

```

TACCACATTTTTTCATATATTGGTCATAATCGGTTCCAGTTCATATCGCT    850
TCCGATTTTTTGA AAAATAAAAAGGTACAAATATTCCAATATGTCCGACA    900

```

**M S D N**

← *MH3.3*

cDNA 22

```

ATACCGAGAGCAAACCTTGCCTAGACCCGTGCGATGTGATCGTCTTTGAG    950

```

**T E S K L A L D P C D V I V F E**

```

GGACCATTCAACCGCTCGGTGAGCAGGAAGCTAGTCATCAAGAACACCAG    1000

```

**G P F N R S V S R K L V I K N T S**

TAAGACCCAGCGAATGGCCTTCAAGATGAAGACCACCACTCCAAAACTTT 1050  
 K T Q R M A F K M K T T T P K L F  
 TTTATGTACGCCCAACATCGGTGTCTTGGGGCCCGAGCAGAAGGTCAGC 1100  
 Y V R P N I G V L G P E Q K V S  
 GTTGACATATTCATGCAGCCAATTCTGCAGGAGCAGATAAAGAAGCGTCA 1150 *Pst*I  
 V D I F M Q P I L Q E Q I K K R H  
 TAAGTTCCTTCTCCTGGCCGCCGAGGTGACTGGTGACATAAGCGATGTGC 1200  
 K F L L L A A E V T G D I S D V Q  
 AGGAGTTTTGGAAGATGCAGAACCCGAATGAAACTCGGGAAACCAAGATC 1250  
 E F W K M Q N P N E T R E T K I  
 AAATGTGAGCTAGTCCCTTCGAAGGAGGACGATTTCCGTCAGGCGGGAGG 1300  
 K C E L V P S K E D D F R Q A G G  
 TTCAGCTGTAATATCCACGGACAACAAGGACGGAGAGGTCCATTTTGATG 1350 *Pvu*II  
 S A V I S T D N K D G E V H F D A  
 CCCAGGAAGTCAGTGAGCCAATGGCCAAGTTGCTCAAGCAAGTCAGCATG 1400  
 Q E V S E P M A K L L K Q V S M  
 CTGGAGGACGAGCATATGGCCCTCACAGACCAGATCGACGGCTTGCGTGA 1450  
 L E D E H M A L T D Q I D G L R D  
 CCAGGCGATTGGGCGCACTTTCTTCTACATGGCCGCCATAGTAATCATT 1500  
 Q A I G R T F F Y M A A I V I I I  
 TACTGTCCGCTGTCGCAGGCGCCTATTATGGCAAGACTCGTTTGTA AATT 1550  
 L S A V A G A Y Y G K T R L  
 CCTTATCATGGCAGTTTTTAGAACATAAGGCAGTAAATTGCACCGAAATT 1600  
 cDNA 14  
 GTACGAAAATTATTTGTCAATAAAGGACATTTTGGTTGCATATTCTATTT 1650  
 cDNA2  
 TGAGATAGATAATTAGTTTATGCTTGTATACCAATAAATGCGTAAGATGT 1700  
 cDNA22  
 TATATTCTCACTTTACTAGAAGTAAATAAGTTTAAAATAGGAAATGTCGA 1750 *Dra*I  
 ATAAAAATAAATTTTTTCAAACAATTTAAAATGCTTTTTTCTATTTTAC 1800  
 TTTATGAAGAGACAAAAAGTAAACTTATTA AATTTCTGTGAATAACACG 1850  
 TCAAGTTTGATCCAACCTTCTACAGGCAAGGCGTATAGGTGTATAGCACTT 1900  
 GCTAAAATTTAGA AACTTCTTTTTTCAATTCCCGCCAAGACGGGACCACCTG 1950  
 TCTAGGCCAGTGCTGTGAAGCGCGCGTGGCCACAGAGCTC 1990 *Sac*I

## 7.2 Sequenz von cDNA LD20208

Relevante Schnittstellen sind unterstrichen. Das erste und letzte Nukleotid jedes Exons ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die untranslatierten Regionen sind durch Kursivdruck gekennzeichnet.

```

AAGTAAAACGAAACAGGCATAAAAACAGCAGCAGTTTTCTTGATATATTT 50
      E1 E2
GGCTAAAAAACGCAAACCCAAACAGCCAGCAAGAACAACAATAGCTGGGC 100
AAAAACAGGACGCACAAAAAATAAAATTAAAACGATAAGAGGCGAAAAGC 150
GGAGAGAGTGAAATTCTCGGCAGCAACAACGACAAGAACAACACCAGGAG 200
CAGCAGCAACAACAACAACAAAAGCCAGCCGCCACAATGAGCAAATCACT 250
      E2
CTTTGATCTTCCGTTGACCATTGAACCAGAACATGAGTTGCGTTTTGTGG 300
      E3
GTCCCTTCACCCGACCCGTTGTCACAATCATGACTCTGCGCAACAACCTCG 350
GCTCTGCCTCTGGTCTTCAAGATCAAGACAACCGCCCCGAAACGCTACTG 400
CGTACGTCCAAACATCGGCAAGATAATTCCCTTTCGATCAACCCAGGTGG 450
      E3 E4
AGATCTGCCTTCAGCCATTCGTCTACGATCAGCAGGAGAAGAACAAGCAC 500 BglIII
AAGTTCATGGTGCAGAGCGTCCTGGCACCCATGGATGCTGATCTAAGCGA 550 NcoI
      E4 E5
TTTAAATAAATTGTGGAAGGATCTGGAGCCCGAGCAGCTGATGGACGCCA 600
AACTGAAGTGCGTTTTTCGAGATGCCACCGCTGAGGCAAATGCTGAGAAC 650
ACCAGCGGTGGTGGTGCCGTTGGCGGCGGAACCGGAGCTGCCGGAGGCGG 700
AAGCGCGGGTGCCAATACTAGCTCAGCCAGCGCTGAGGCGCTCGAGAGCA 750
      E5 E6
AGCCGAAGCTCTCCAGCGAGGATAAGTTAAGCCATCCAATTTGCTCGAA 800
ACGTCTGAGAGTCTGGACTTGCTGTCCGGAGAGATCAAAGCGCTGCGTGA 850
      E6 E7
ATGCAACATTGAATTGCGAAGAGAGAATCTTCACTTGAAGGATCAAATCA 900
CACGTTTCCGGAGCTCGCCGGCCGTCAAACAGGTGAATGAGCCCTATGCC 950 SacI
CCAGTCCTGGCTGAGAAGCAGATTCCGGTCTTTTACATTGCAGTTGCCAT 1000
TGCTGCGGCCATCGTTAGCCTCCTGCTGGGCAAATTTCTTTCTCTGAATGC 1050
CATAAACGAACGCCAGCAACATGCTACATGCAACGTGCAGCAACAGTAAC 1100
AGCAAGAACAGCGGCAACACCATCATAACAGCAACACAACAACAAAAGCA 1150
AAAGCAGCAGCAGCAGCAACTAACAATAGCAACAACAACGAAAGAAG 1200

```

AACAGCAGCAGCAGGAGCATTAAAATAAATTTAATTGGCAGAAGAAACAA 1250  
 ACCACAGAGACGAATGTAAAGCTGACTAAACCGGGGACCGTATACATTTA 1300  
 AACGGTTGTATTGAAAATCAAAAATAATCATTGTTTGTAGCGAAACAAG 1350  
 TATCGCTCAGAATAGTATGGATTATGATGTGAGAAATATTGTTTGGTTCC 1400  
 AACATATTGCTCAAAGACAGATTGGCAGTTCTTGTTTTAATACGAATCT 1450  
 TAACGAGACTTAAGTGTAAGCATTTCGAAACAATTTAAGCTGTATTGAC 1500  
 GCTTCGTGATTTCAACCAAAAATATTTAAGTTTTTGCAAGATCTCGCTT 1550 *Bgl*III  
 GAATTAGTCGCAACCGGACTTTGAGTAATAAGAACATTTGGGCCCTATGA 1600  
 AATCCCTCACATCATAATCAATACTTAAAAAAAAGAAAACATAACGAATG 1650  
 ATTACTTTTGGTACCTGGGCTAAACAAAACAAAAAATAAAAAA 1696

### 7.3 Sequenz von cDNA GH11023

Relevante Schnittstellen sind unterstrichen. Das erste und letzte Nukleotid jedes Exons ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die untranslatierten Regionen sind durch Kursivdruck gekennzeichnet.

CAAGGCGTATAGGTGTATAGCACTTGCTAAAATTTAGAACTTCTTTTTCA 50  
 ATTCCCGCCAAGACGGGACCACCTGTCTAGGCCAGTGCTGTGAAGCGCGC 100  
 GTGGCCACAGAGCTCGGCAACCCGTCAGCCGTGCGAAAGCGAATGTGGTG 150 *Sac*I  
 AAGAAAAAAAAAACAGCGAAATACACACGTATTTTGCAGCGAAATTAAAT 200  
AGAATTCCTGCTAAGGGGTATAAGGACACTTGAAGGATGTCTGCGCGAAT 250 *Eco*RI  
 GCTGAAGAAGCTGCAGGGCGACGCTGACAAGCTGGCGCCACCGCCCGATG 300  
 ACGAGGACTGCGAGGAGCTGAGCGACAATGATGAACTGGAGGACAGCGAT 350

**E1 E2**

ATGCAACGCTATCGAAAATCACACCTTAATCCATTCGATTT**GCT**CAATCA 400  
 AGCCGGTTTGTAGTCTCTCGGAGAGTGAGTTCAAAGAAGATGACAATGAAA 450  
 CGGAGCATCCGTCTGCTGCCCTGCCCAATGCTACTGCCAGTGCGGCCAAA 500  
 AAGAAGAAAAAGAAGCGCAAGAAGAAGGCCAAGTCCAGTGGGAATCACAT 550  
 CAGCAGCGAAGATAACGAGCGTCAGGATAAGTACTTTGAGAAGGTGGATC 600  
 CGCTCCTTGGCAAGGTCTACGATGCGGTGCCAGACAGTCGGCGAAACAG 650  
 TTGGTATCGGCTGCCACCGGGACTACTGCCACCAAGAACTGCTGGCCGT 700  
 AGAGCTACGGCACCTGAATCCACAGAACGAGATGCGTTCGCACTTTTGGCA 750

**E2 E3**

AGCGGGTGGTAAAAGTGG**AA**ACCAAGCGTGGCAGGCAGAAGCCCACGCTG 800  
 AAGTCCACCTATATGGTGACCGCAAGGATTCGTGGCCGGCACTGACTAA 850  
 AAACACCATCACGATGAAGCTGCTGCCCGCCCCAGACTCTCCATCGGTGT 900  
 CCTCCAAGTCTATCACAGATAATGGAGCGGACGTTCAATGGTTTGCCTTT 950

GAGCATAGCCAATACTACCAGGGAGTGCAGCAAATGTTCCCTTTCTGCTCT 1000  
 CGAGCGCATTGACTCGGAATTTCTGATCACACTTATCAAACGCTGCCCT 1050  
 ATCATGTGCGACTCCTTGGTTCAACTCAGCGAAGTATGCAAGATGACCGAA 1100  
 GACTTTTCCCTTGGCCTCCGAACTGCTTGAGCGCGCCCTTCTCCTTCTGGA 1150  
 ATCGTCGCTGCACATCAACTTCAGTTTGACGTCGGGCAACTGCCGACTGG 1200  
 ACTACCGGAGACAGGAAAACCGATCCTTCTACATCGTGCTGTTCAAGCAC 1250  
 GCGCAGTACCTGGAGGAACGAGCTTGCAGCCGCACCGCCTTCGAGATCTC 1300  
 CAAACTGCTCCTGAGTCTTCAGCCAGACACAGATCCTCCTTGCCATGATTC 1350  
 TAGTGATTGACTACTATGCCTTGCGCAGCAAGCAGTTTGAATGGTTGGTA 1400  
 GAGTTCTATGAAAAGTATAACGCCGCGAGGAACCTCAATCAGCTGCCCAA 1450  
 TATGGCCTACTCGTATGCTTTGGCTCTACACACGCTCTATGGCGCTTGTG 1500  
 AACGCTCTAACCAGGCACTGCAATACGCCCTACTAATGTTCCCGGGTGT 1550  
 TTACGTCCCTCTTTTGGACGAGATGTCGGTGCAAACGGACAAGAGGGTCT 1600

**E3 E4**

GGCCTCATCGTACTTCTTTGCAGATGTGTCGGGCA**AT**CAATCGCCCGCC 1650  
 TGCACCAGCTGGTGTGCCCTGTATGTGTGCCGTGCAAGAGTCGTTTGGCGT 1700  
 CAGAACGAGGTGCTACCCTGGTTGGAATCCAACGTGAACATAGTGTTAGA 1750  
 TCGCATTGAGAGTAAGGATCCCCTGGTTAATGAGTACAAGGAGAAGCGAT 1800  
 CACTGCGATATAGTGGAACACCACCAAGGCCATTCTTCGACATGTCATA 1850  
 CTCTCCGATTACAAGGAGAAAGTTCCACTGGCGGTCTTCGTGTCCAAGGA 1900  
 GAAGCAAGCCATTATGACCTATGATCCACTGCCGCCACCGAACAGCGTCA 1950

**E4 E5**

ACTGCTATCATCG**GA**AAATCTTCGTCAAGCAGCAGCCCCACAACGAACAC 2000  
 GAACAATTCTGTGTCAATGTTCTTTCAATCGCTCTTGCCCTTCGTTTAACA 2050  
 TTAACAACCTAGCTGCAAATGCTCAGCTACAAGAAGGAGCAGCACCAGCA 2100  
 GCAGGTGCGGGAGCAGCTGCAGGCGATGCTAACATTGAAGTGGGCATTGA 2150 *Pst*I

**E5 E6**

ACAAGGAGCTGCCGGCGTAGCTGGCGAAGGAGAAG**GA**AGCTGGTTTGCAGC 2200  
 AGTCATTAACGCTAATGATGGACGCGATGCGAGACTTCCTGCAAACTTC 2250  
 CGGATTGCAGAGCACTTGCCTTCGCCGAAACGGCGGCGGCACAATCCAC 2300  
 GAGCAGCAACGACGAGGAGGAGGGCTCCAGTGACTACATTGACTAGTCAG 2350  
 TTTGTCAATTACGCGAGGTAACGAAGTTGTTTCGGATTTCTAGCTCGGGA 2400  
 CATGTTTTTTGGAAACCACCTTTTGCTATTTTCTCAGCTTAGCGACACCG 2450  
 TCACAAAATTTATATATAACAATACATAGAGCAATTTGAACAC 2491

## **Anmerkungen**

Ich danke Frau Prof. Dr. Mireille Schäfer für die Themenstellung und ihr großes Engagement bei der Betreuung, die von steter Diskussions- und Hilfsbereitschaft geprägt war.

Herrn Prof. Dr. Hardeland danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop wurden durch die freundliche Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Maniak von der Universität Kassel ermöglicht.

Unter den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schäfer Universität Göttingen/Kassel möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Martin Hollmann für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft und seine wertvollen Anregungen bedanken. Mein Dank gilt ebenso Nicole Schleinschok, Kay Schreiter, Holger Starck und Tanja Zeuch für die kollegiale Unterstützung und das gute Arbeitsklima.

Auf unterschiedlichste Weise haben außerdem Alexandra Hartmann, Ute Luginbühl, Frank Neumeyer, Ralf Templin sowie Bernhard, Ulrich, Beate, Georg und Renate Renner zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. An dieser Stelle: Herzlichen Dank!

# Lebenslauf

Name:	Ute Renner
Geburtsdatum:	15. November 1971
Geburtsort:	Bad Lauterberg
Schulausbildung:	
1978-1982	Grundschule Bad Sachsa
1982-1991	Pädagogium Bad Sachsa
Juni 1991	Abitur
Hochschulausbildung:	
Oktober 1991 - April 1998	Biologiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen
Mai 1996 - April 1998	Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Thema „Untersuchung der Verteilung der High-Mobility-Group-Proteine HMGD und HMGZ von <i>Drosophila melanogaster</i> während der Embryogenese“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. R. Wisniewski im III. Zoologischen Institut-Entwicklungsbiologie
seit Mai 1998	Promotion am III. Zoologischen Institut-Entwicklungsbiologie der Georg-August-Universität Göttingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. A. Schäfer, Abteilung Molekulare Entwicklungs-genetik
seit Oktober 2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. A. Schäfer an der Universität Kassel, FG Zoologie-Entwicklungsbiologie