

**Aspekte der Translationskontrolle in der *Drosophila*-
Spermatogenese: Charakterisierung regulatorischer Elemente**

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

vorgelegt von
Kay Schreiter
aus Lutherstadt Eisleben

Göttingen 2001

D 7

Referentin: Frau Prof. Dr. M. Schäfer

Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2002

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	11
2.1 Fliegenhaltung	11
2.2 Enzyme und Chemikalien	11
2.3 Lösungen und Medien	11
2.4 Bakterienstämme	13
2.5 Vektoren	14
2.6 Phagenbanken	14
2.7 DNA-Techniken	15
2.7.1 DNA-Plasmid Minipräparation	15
2.7.2 DNA-Plasmid Midipräparation	16
2.7.3 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen	16
2.7.4 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	17
2.7.5 Oligo-Klonierung	17
2.7.6 Klonierung von DNA-Fragmenten	18
2.7.7 PCR ("polymerase chain reaction")	19
2.7.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA	20
2.7.9 Markierung von DNA-Fragmenten mit DIG-dUTP	20
2.7.10 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	20
2.7.11 Transformation kompetenter Zellen	21
2.8 RNA-Techniken	22
2.8.1 poly(A) ⁺ -RNA-Isolierung	22
2.8.2 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembran und Hybridisierung mit RNA-Sonden (Northern-Hybridisierung)	23
2.8.3 <i>in vitro</i> -Transkription	24
2.8.4 <i>in vitro</i> -Transkription mit Biotin-16-UTP	26
2.8.5 5' Markierung von RNA-Oligonukleotiden (Endlabelling)	27
2.9 Gel-Elektrophorese	28
2.9.1 Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen	28
2.9.2 Auftrennung von RNA in denaturierenden Formaldehyd- Agarose-Gelen	29
2.9.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29

2.9.4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.9.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.10	Nachweis von Proteinen	33
2.11	Proteinextraktion	34
2.11.1	Proteinextrakt aus <i>Drosophila melanogaster</i> -Hodengewebe	34
2.11.2	Proteinextrakt aus <i>Drosophila melanogaster</i> -Abdomina	35
2.12	Bildung von Protein-RNA Komplexen und deren Analyse	36
2.12.1	EMSA ("electrophoretic mobility shift assay")	36
2.12.2	UV-Crosslinking	37
2.13	Ammoniumsulfatfällung	38
2.14	Affinitätsreinigung von Bindungsproteinen	40
2.15	Northwestern-Screening von cDNA-Expressions-Banken	42
2.16	Automatisches Subklonieren von rekombinanten Phagen	44
2.16.1	<i>in vivo</i> -Excision von λ -Zap II Phagen-Inserts	44
2.16.2	Automatisches Subklonieren durch <i>Cre</i> -vermittelte Plasmid-Excision	45
2.17	Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung	45
2.18	<i>C. elegans</i> -Kultur und RNAi-Experimente	47
2.18.1	<i>C. elegans</i> -Kultur	47
2.18.2	Synthese von doppelsträngiger RNA (dsRNA)	47
2.18.3	Injektion von dsRNA	48
2.18.4	RNA-Soaking und DAPI-Färbung	48
3.	Ergebnisse	50
3.1	<i>cis</i> -wirkende Kontrollelemente in der <i>don juan</i> -mRNA	50
3.1.1	Testesproteine binden spezifisch an ein 110 nt Fragment (+6/+115) der <i>don juan</i> -leader Sequenz	50
3.1.2	Die mit Proteinen interagierenden Elemente der mRNA befinden sich in einer kleinen Region von 60 nt vor dem Translationsstartcodon	54
3.1.3	Die beobachteten RNA-bindenden Aktivitäten sind testisspezifisch	57
3.1.4	Einfluß von polyA und polyU auf die Proteinbindung	58
3.1.5	TCE-ähnliche Sequenzen tragen nicht zur Translationsrepression der <i>don juan</i> -mRNA bei	59

3.1.6	Der <i>don juan</i> 5' UTR bildet eine stabile Sekundärstruktur aus	63
3.1.7	Ein 62 kDa Protein bindet spezifisch in der stem-loop Region +61/+85 des <i>don juan</i> -leaders	65
3.2	Identifizierung <i>trans</i> -wirkender Faktoren der <i>Mst87F</i> -mRNA	70
3.2.1	Ammoniumsulfatfällung	71
3.2.2	Screening von Expressionsbibliotheken	74
3.2.3	Das <i>Drosophila</i> La-Protein wird in der männlichen Keimbahn exprimiert und interagiert mit dem <i>Mst87F</i> -5/+47 <i>in vitro</i> -Transkript	76
3.2.4	p1687	81
3.2.5	p2587	82
3.2.6	Affinitätsreinigung von Komplexproteinen	84
3.3	Charakterisierung des RNAi-Phänotyps des potentiell RNA-bindenden Proteins Y53C12B.2 in <i>C. elegans</i>	87
3.3.1	Charakterisierung des Phagenklons yk109b10	89
3.3.2	dsRNA-Injektion in adulte Tiere- Analyse des RNAi-Phänotyps in der F1-Generation	90
3.3.2.1	Y53C12B.2	90
3.3.2.2	H27M09.4	93
3.3.3	Untersuchungen zur postembryonalen Funktion von Y53C12B.2	94
4.	Diskussion	97
4.1	Protein-RNA Interaktionen mit der <i>don juan</i> -mRNA	97
4.2	Bindet das La-Protein an die <i>Mst87F</i> -mRNA?	101
4.3	Das <i>C. elegans</i> -Protein Y53C12B.2 ist wie das <i>Drosophila</i> Homolog BBL-A essentiell für die Entwicklung der Keimzellen	104
5.	Zusammenfassung	109
6.	Literatur	111
7.	Anhang	132
7.1	<i>Drosophila</i> La-Gen	132
7.2	<i>C. elegans</i> cDNA yk109b10	133

Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cpm	counts per minute (Zählwerte pro Minute)
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	"electrophoretic mobility shift assay"
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
l	Liter
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
M	Molar
min	Minute
mm	Millimeter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	"messenger"-RNA
NBT	Nitroblautetrazoliumsalz
nm	Nanometer

nt	Nukleotid (e)
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
pfu	plaque forming units
PAA	Polyacrylamid
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBq	Tera Bequerel
TE	Tris/EDTA
TEMED	N, N, N', N'- Tetraethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	"transfer"-RNA
TTP	Thymidintriphosphat
u	"unit" (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
UTP	Uridintriphosphat
UTR	"untranslated region" (nicht-translatierter Bereich)
X-Phosphat	5-Bromo-4-chloro-indolyl-phosphat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Mit der weitgehenden Identifizierung der Genome verschiedener Organismen wird eine große Menge an Information auf DNA-Ebene zugänglich. Allein diese Information jedoch reicht nicht aus, um molekulare Mechanismen vollständig zu erkennen und zu verstehen. Ungeachtet der Bedeutung der bloßen Kenntnis der Erbinformation ist es von entscheidender Bedeutung, das Zusammenspiel der einzelnen Gene, die zeitliche und örtliche Kontrolle der Expression, zu untersuchen. Die Regulation erfolgt dabei auf Transkriptions- und Translationsebene. Wurde zunächst der Transkriptionsregulation eine entscheidende Rolle zugesprochen, rückt die Translationskontrolle immer mehr in den Vordergrund.

Der korrekte Ablauf aller Zellvorgänge und damit natürlich die Funktion der Zelle, werden durch die Regulation der Translation vermittelt. Die post-transkriptionelle Regulation erfüllt vielfältige Aufgaben angefangen vom sich entwickelnden Embryo, in der Keimbahn, in somatischen Zellen bis hin zur Entwicklung des Zentralnervensystems. Für die Festlegung der anterior-posterioren Achse in der *Drosophila*-Entwicklung z.B., besitzt die Translationsrepression in Verbindung mit der Lokalisierung der mRNAs eine wichtige Bedeutung. So wird u.a. die Translation der maternellen *caudal*-mRNA im anterioren Bereich des Embryos reprimiert. Für diese Repression ist das Bicoid-Protein notwendig, welches im 3' nicht-translatierten Bereich (3' UTR) der *caudal*-mRNA bindet (Dubnau & Struhl, 1996, Rivera-Pomar *et al.*, 1996). Ein anderes Beispiel ist die Translationsrepression der *LOX*-mRNA (15-lipoxygenase) in frühen Erythrozyten-Vorläuferzellen (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994; Ostareck *et al.*, 2001).

Die Initiation der Translation einer mRNA beginnt durch Bindung eines 43S Initiationskomplexes an die Cap-Struktur (m^7GpppN) am 5' Ende der mRNA. Dieser besteht aus der 40S ribosomalen Untereinheit, dem Cap-bindenden Komplex (bestehend aus den Initiationsfaktoren eIF4E, eIF4G und eIF4A), eIF3 und einem ternären Komplex (eIF2, Met-tRNA und GTP) (Zusammenfassung in LaFontaine & Tollervey, 2001). Bereits bei diesem Initiationsschritt wird die Translation in Eukaryoten beeinflusst (Preiss & Hentze, 1999). Die Initiationsfaktoren eIF4G und eIF4E interagieren z.B. mit dem poly(A)-bindenden

Protein (PABP) (Tarun & Sachs, 1996), welches an den poly(A)-Schwanz der mRNA bindet. Dadurch wird eine Zirkularisierung der mRNA bewirkt (Wells *et al.*, 1998) und ein positiver Effekt auf die Translation der mRNA ausgeübt (Preiss & Hentze, 1998). Negative Translationskontrolle beinhaltet meist Wechselwirkungen von Proteinen und Sequenzen des 5' UTR und/oder des 3' UTR der mRNA. Hierdurch kann z. B. die Assoziation des 43S Komplexes mit der mRNA zum 48S Komplex verhindert werden. Gut charakterisiert ist dies für den Fall der *ferritin* und *erythroid 5-aminolevulinat Synthase (eALAS)*-mRNA (Gray & Hentze, 1994; Muckenthaler *et al.*, 1998). Bei beiden mRNAs bindet ein Repressor Protein ("iron regulatory protein" IRP= IRP-BE=IRF) an eine "stem-loop" Struktur im 5' nicht-translatierten Bereich, dem "iron responsive element (IRE), (Aziz & Munro, 1987; Leibold & Munro, 1988) in Abhängigkeit von einer geringen Eisenkonzentration, wodurch die Translation verhindert wird (Gray *et al.*, 1993). Mutationen in den Initiationsfaktoren eIF4E und eIF4G fördern in der Hefe mRNA Deadenylierung und Decapping der mRNA (Schwartz & Parker, 1999). Die Verkürzung des poly(A)-Schwanzes ist oftmals der erste Schritt für den Abbau der mRNA (z.B. Dellavalle *et al.*, 1994). Eine Deadenylierung unterstützt die Inaktivierung der Translation durch Einfluß auf die Initiation der Translation (Sachs *et al.*, 1997). Andererseits hat eine neuerliche Polyadenylierung einen positiven Einfluß auf die Translation (siehe unten; Schäfer, 1992; Richter, 1995).

Aus diesen Ausführungen geht hervor, daß ein wesentlicher Bestandteil bei der Translationskontrolle Interaktionen zwischen RNA und Proteinen, aber auch das Zusammenspiel zwischen Protein-Protein- und RNA-Protein-Wechselwirkungen sind. Die meisten RNA-bindenden Proteine lassen sich in größere Familien einteilen. Charakteristisch für diese Familien sind RNA-bindende Domänen, welche hochkonserviert sind. Die drei Hauptklassen der eukaryotischen RNA-bindenden Domänen sind das "RNA recognition motif" (RRM), die doppelstrang-bindende Domäne (dsRBD) und die K-Homologie Domäne (KH; Perez-Canadillas & Varani, 2001).

Die größte und am besten charakterisierte Familie sind die RRM-Proteine. Die RNA-bindende Domäne enthält 90 - 100 Aminosäuren. Die meisten Proteine besitzen mehrere Kopien des RRM. Diese bilden eine β -Faltblattstruktur aus vier β -Faltblattsträngen, welche gegen zwei α -Helices angeordnet sind. Jedoch

existieren auch Variationen von diesem Grundtyp. So enthält das dritte RRM des polypyrimidin-tract-bindenden Proteins einen fünften β -Faltblattstrang in der zweiten Domäne (Conte *et al.*, 2000). Das *Drosophila* Sex lethal-Protein besitzt zwei RRMs. Sex lethal reguliert das alternative Spleißen und bindet an Uridinreiche Sequenzen in der *transformer* prä-mRNA. Interessanterweise sind beide RRMs an der RNA-Bindung beteiligt (Bell *et al.*, 1988; Handa *et al.*, 1999).

In einer weiteren Familie werden Proteine mit einer dsRBD zusammengefaßt (St. Johnston *et al.*, 1992; Fierro-Monti & Mathews, 2000). Diese binden ausschließlich doppelsträngige RNAs. Es findet keine Bindung mit doppelsträngiger DNA oder mit DNA-RNA-Hybriden statt. Die Bindung erfolgt sequenzspezifisch. Es wird davon ausgegangen, daß die Spezifität in einem biologischen Kontext durch unterschiedliche Konformationen der Domänen erreicht wird (Perez-Canadillas & Varani, 2001). Ein Beispiel ist das *Drosophila* Staufen-Protein. Es ist für die Lokalisierung von mRNAs z.B. während der Oogenese und der frühen Embryogenese notwendig (anteriore Lokalisierung der *bicoid*-mRNA, posteriore Lokalisierung der *oskar*-mRNA; St. Johnston *et al.*, 1991). Das Staufen-Protein bindet an einen RNA "hairpin" und zeigt dabei eine modifizierte Konformation im Gegensatz zum freien Protein (Ramos *et al.*, 2000).

Eine sehr weite Verbreitung besitzen auch RNA-bindende Proteine mit der KH-Domäne. Diese wurde zuerst im menschlichen hnRNP K-Protein gefunden (Siomi *et al.*, 1993a). Die KH-Domäne kommt häufig in vielen Kopien vor. Strukturell ähnelt die KH-Domäne der RRM- und der dsRBD-Domäne, obwohl die RNA-Bindung einem anderen Mechanismus unterliegt. Antiparallele β -Faltblätter sind gegen eine α -helikale Oberfläche gerichtet (Siomi *et al.*, 1993b; Musco *et al.*, 1996; Musco *et al.*, 1997; Lewis *et al.*, 1999). In einem Loop zwischen den Helices 1 und 2 befindet sich die Kernsequenz GXXG der KH-Domäne (X entspricht Lysin K, Arginin R oder Glycin G), welche zusammen mit einem weiteren Loop zwischen dem zweiten und dritten Strang der β -Faltblattstruktur für die RNA-Erkennung notwendig ist. KH-Proteine kommen in vielen funktionellen Zusammenhängen vor und sind auch in verschiedene genetisch bedingte Krankheiten involviert. Das menschliche RNA-bindende "fragile X mental retardation protein" (FMRP) besitzt zwei KH-Domänen (Gibson *et al.*, 1993). FMRP ist das Proteinprodukt von *FMR1*. Eine Mutation im *FMR1* ruft das Fragile X-Syndrom hervor, eine häufige Erkrankung, die eine vererbare geistige Behinderung hervorruft (Siomi *et al.*,

1993b). Im 5' UTR von *FMR1* fallen polymorphe CGG-Wiederholungen mit einer seltenen Bruchstelle auf dem X-Chromosom zusammen. FMRP kann die Translation durch Bindung an diese spezifische Sequenzen im 5' UTR der eigenen mRNA, aber auch anderer mRNAs reprimieren (Schaeffer *et al.*, 2001). Das *Drosophila* How-Protein, welches vom *held-out wings (how)*-Gen kodiert wird, besitzt eine einzelne KH-Domäne am carboxyterminalen Ende. Eine Isoform bindet an eine spezifische mRNA (*stripe*) und verhindert so den Export aus dem Zellkern (Nabel-Rosen *et al.*, 1999).

Weiterhin spielen zusätzliche RNA-bindende Domänen, wie z.B. die RGG-Box (Arginin-Glycin-Glycin) oder das Zink-Finger-Motiv, in Kombination mit den oben beschriebenen Domänen eine große Rolle (Zusammenfassung in Burd & Dreyfuss, 1994).

Die Beispiele zeigen, daß RNA-Protein Wechselwirkungen und ihr Einfluß auf die Translation an diversen zellulären Prozessen beteiligt sind. Vor allem in der Keimbahn ist eine Regulation der Translation notwendig. Die Spezifität der Wechselwirkungen wird auch hier oft durch *cis*-Elemente in den nicht-translatierten Bereichen der mRNAs vermittelt. Proteine binden an diese Sequenzen und koordinieren so die Repression und Aktivierung der Translation.

Während der Oogenese und der frühen Embryogenese vom Krallenfrosch *Xenopus laevis* unterliegt eine große Anzahl materneller mRNAs der Translationsrepression und -aktivierung. Einen großen Einfluß übt dabei die Verlängerung des poly(A)-Schwanzes aus. Nach dem Export aus dem Zellkern wird der poly(A)-Schwanz vieler mRNAs, welche vorerst nicht translatiert werden sollen, verkürzt. Durch eine sekundäre Polyadenylierung im Cytoplasma erfolgt dann die zeitlich kontrollierte Rekrutierung für die Translation. Dies kann einerseits durch den Prozeß der Polyadenylierung selbst oder aber durch den verlängerten poly(A)-Schwanz vermittelt werden. Die cytoplasmatische Polyadenylierung in *Xenopus* (und der Maus) erfordert zwei Elemente in dem 3' nicht-translatierten Bereich, das Polyadenylierungssignal AAUAAA und das weiter stromaufwärts gelegene Uridin-reiche cytoplasmatische Polyadenylierungselement (CPE, Konsensus: UUUUUUAU). Verschiedene Faktoren werden für die cytoplasmatische Polyadenylierung benötigt, so die poly(A)-Polymerase, der "cleavage and

polyadenylation specificity factor" (CPSF) und das CPE-bindende-Protein (CPEB). CPEB ist ein hoch konserviertes RNA-bindendes Protein und besitzt ein Zink-Finger Motiv. Es bindet spezifisch die CPEs verschiedener mRNAs, welche essentiell sind für die Oocyten-Reifung, so z.B. *c-mos* und *cyclin B1*. Dabei ist CPEB notwendig für die Polyadenylierung dieser mRNAs (Stebbins-Boaz *et al.*, 1996; Hake *et al.*, 1998). Eine der komplexen Interaktionen, an denen CPEB beteiligt ist, stellt die Stabilisierung der Bindung des CPSF an das Polyadenylierungssignal dar. CPSF rekrutiert dabei die poly(A)-Polymerase zum Ende der mRNA und ermöglicht die Polyadenylierung (Mendez *et al.*, 2000b; Zusammenfassung in Mendez & Richter, 2001). CPEBs oder CPEB-ähnliche Proteine finden sich in den meisten Vielzellern. Das *Drosophila*-Homolog wird vom Gen *orb* kodiert. Orb wird keimbahn-spezifisch exprimiert. Es konnten sowohl ovar-spezifische als auch testis-spezifische Transkripte nachgewiesen werden. Orb reguliert die Lokalisierung und Translation der *oskar* und *gurken*-mRNA und der *orb*-mRNA selbst (Christerson & McKearin, 1994; Chang *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 2001). Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurden vier CPEB Homologe beschrieben (Luitjens *et al.*, 2000). *Fog-1* zum Beispiel ist spezifisch in Keimzellen exprimiert. Hier reguliert es die Differenzierung der Keimzellen zu Spermien oder zu Oocyten (Jin *et al.*, 2001).

Eine Möglichkeit der Translationsregulation, die unabhängig von der Cap-Struktur und vom poly(A)-Schwanz ist, zeigen *in vitro*-Experimente mit der *Drosophila oskar*-mRNA. Diese besitzt im 3' nicht-translatierten Bereich Kontrollsequenzen, die "Bruno response elements" (BRE), an denen das Bruno-Protein bindet. Bruno wirkt als Translationsrepressor. Es wurde *in vitro* gezeigt, daß die BRE-vermittelte Translationsregulation weder einen poly(A)-Schwanz benötigt, noch Änderungen in der Länge des poly(A)-Schwanzes hervorruft. Auch zeigte die Inhibierung der Cap-abhängigen Translationsinitiation keinen Einfluß auf die Translationsregulation (Lie & Macdonald, 1999).

Die exakte Rolle RNA-bindender Proteine in der Spermatogenese konnte bisher nicht in dem Umfang wie für die Oogenese spezifiziert werden. Dennoch gibt es einige sehr gut untersuchte Beispiele.

Männliche Infertilität beim Menschen ist häufig durch Deletionen und Mutationen auf dem Y-Chromosom bedingt. Drei Regionen sind hier für die Spermatogenese

essentiell (Elliott & Cooke, 1997). Deletionen in diesen Bereichen führen zur Azoospermie, dem Fehlen von Spermien. Die Regionen wurden daher AZFa bis c (Azoospermie Faktor) genannt. Das erste isolierte Gen war das YRRM ("Y chromosome recognition motif"), welches in der AZFb Region lokalisiert ist (Ma *et al.*, 1993). Weitere Gene dieser Region wurden kloniert. Sie besitzen ein einzelnes RRM, welches auf eine Funktion im RNA-Metabolismus schließen läßt. Das Gen RBM ("RNA binding motif"), welches zur Familie der YRRM (oder RBMY) gehört, kodiert für ein Kernprotein, welches in Keimzellen während der Spermatogenese exprimiert wird (Elliott *et al.*, 1997). Es wurden Interaktionen von RBM mit Vertretern der SR-Familie von prä-mRNA Spleißfaktoren nachgewiesen, welche auch Einfluß auf die Wahl der Spleißstellen nehmen (Elliott *et al.*, 2000). Die RNA-bindende Domäne von RBM übt dabei Einfluß auf die Wahl der 5' Spleißstelle aus (Venables *et al.*, 2000). RBM kann demnach einen zellspezifischen Spleißfaktor für die Spermatogenese (in Spermatozyten) darstellen. Eine weitere Y-chromosomal kodierte menschliche Genfamilie ist DAZ. Auch hier tritt bei Deletion Azoospermie auf (Reijo *et al.*, 1995). Zusammen mit den autosomalen Homologen (z.B. in *Drosophila boule*) werden sie zu der großen Familie DAZ/DAZH/Boule-Proteine zusammengefaßt. Diese enthalten auch RRM-Domänen. Die Proteine haben eine entscheidende Rolle während der Spermatogenese, wenngleich ihre genaue Funktion noch nicht aufgeklärt ist. Auch hier ist eine hohe evolutive Konserviertheit sichtbar. Defekte im *Drosophila Boule* sind durch das *Xenopus*-Homolog DAZH komplementierbar. *Drosophila Boule* ist nur während der Spermatogenese exprimiert und für den Eintritt in die Meiose notwendig (Eberhart *et al.*, 1996).

In *Caenorhabditis elegans* ist der Beginn der Spermatogenese von der Translationsrepression der *tra-2*-mRNA abhängig. In dem 3' nicht-translatierten Bereich der *tra-2*-mRNA befinden sich zwei jeweils 28 Nukleotide enthaltene Sequenzelemente ("*direct repeat elements*", DREs oder TGEs; Jan *et al.*, 1997). An diese bindet spezifisch das GLD-1-Protein ("Germ line defective-1") und vermittelt so die Translationsrepression. GLD-1 ist keimbahnspezifisch und gehört zu den KH-Domäne RNA-bindenden Proteinen (Jan *et al.*, 1999).

Die Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* (zusammengefaßt in Fuller, 1993) bietet ein weiteres, ideales Modellsystem für die Untersuchung von Translationskontroll-Prozessen. Der Prozeß gliedert sich in zwei Phasen. Die Spermatogenese beginnt in der Hodenspitze dem sogenannten "hub". Hier teilt sich eine Stammzelle in eine neue verbleibende Stammzelle und in ein primäres Spermatogonium. Parallel dazu teilen sich zwei somatische Cysten-Vorläuferzellen in je eine Vorläuferzelle und eine Cystenzelle. Die beiden Cystenzellen umschließen das Spermatogonium. Im weiteren Verlauf der Spermatogenese teilen sie sich nicht mehr und bilden so die Cyste. Das neu gebildete Spermatogonium durchläuft vier mitotische Teilungen in der Cyste. Die nun entstandenen primären Spermatocyten sind durch ein starkes Zellwachstum und eine hohe Transkriptions- und Translationsaktivität gekennzeichnet (Gould-Somero & Holland, 1974). Die Cyste wandert dabei entlang des Hodenschlauches. Es folgen zwei meiotische Teilungen. Die entstehenden 64 haploiden Spermatischen eines Cystenverbandes sind aufgrund der unvollständigen Cytokinese während der Teilungen immer noch durch Cytoplasmabrücken miteinander verbunden. Mit dem Beginn der Meiose endet die Transkriptionsaktivität, während die Translation bis zum Ende der Spermatogenese anhält (Hennig, 1967; Brink, 1968, Abb.1). Alle Genprodukte, welche für den komplexen Prozeß der Spermienmorphogenese benötigt werden, müssen durch prämeiotische Transkription zur Verfügung gestellt werden. Viele Transkripte unterliegen somit der Translationskontrolle.

Für eine Reihe von Genen, welche in der Spermatogenese exprimiert werden, wurde gezeigt, daß sie der Translationsrepression unterliegen. Beispiele hierfür sind die *Drosophila Mst(3)CGP*-Genfamilie (Kuhn *et al.*, 1988, 1991; Schäfer *et al.*, 1990; Gigliotti *et al.*, 1997), das *janus B*-Gen (*janB*, Yanicostas and Lepesant, 1990) und das *don juan*-Gen (*dj*, Santel *et al.*, 1997). Für alle diese Gene wurde der Nachweis erbracht, daß der 5' nicht-translatierte Bereich für die Translationsrepression verantwortlich ist. Das *don juan*-Gen ist spezifisch im Testis exprimiert. Es kodiert für ein basisches Protein von 29 kDa. Es ist während der Chromatinkondensation in haploiden Kernen und danach in den Nebenkernen lokalisiert (Santel *et al.*, 1998). *Don juan*-Transkripte sind bis kurz vor dem Stadium der Individualisierung nachweisbar. Translation hingegen tritt nur in

Spermatidenstadien auf. Die *don juan*-mRNA unterliegt für mehrere Tage der Translationsrepression (Santel *et al.*, 1997).

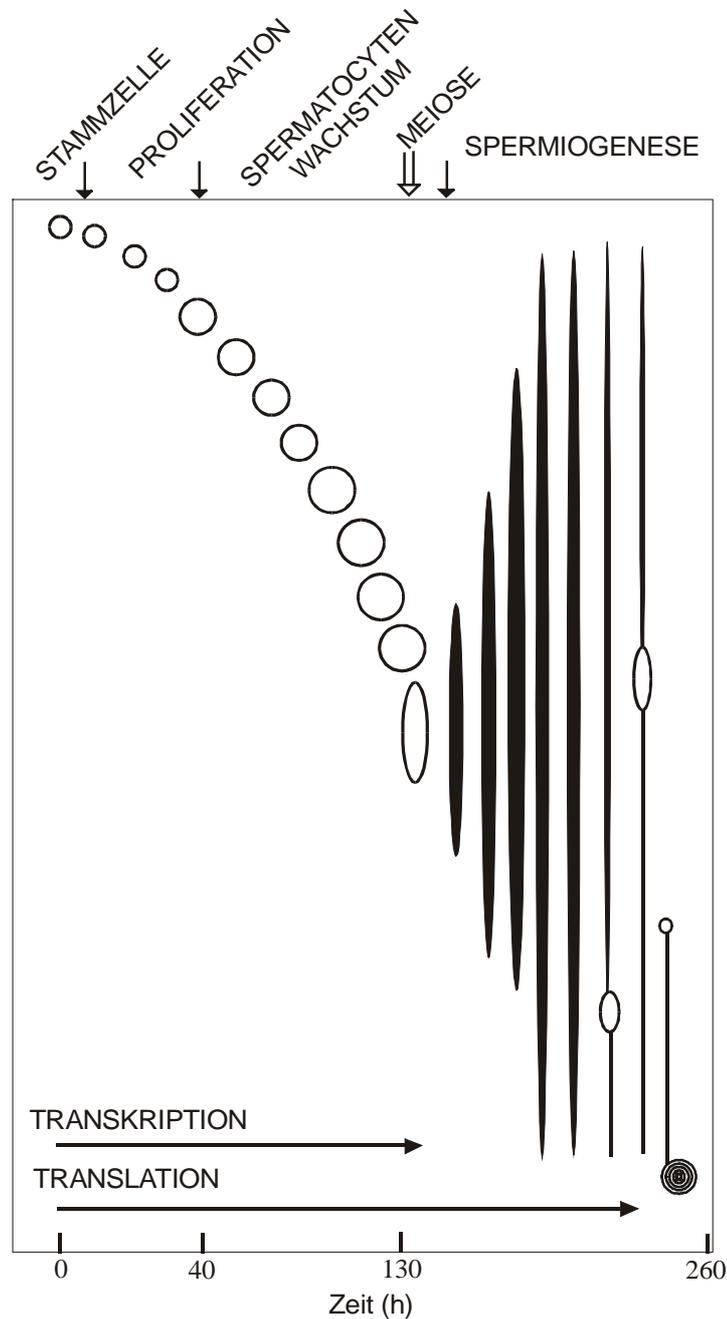


Abb. 1: Schematische Darstellung der zeitlichen Abläufe während der Spermatogenese von *Drosophila*. (verändert nach Lindsley & Tokuyasu, 1980).

Von großem Interesse ist eine nähere Charakterisierung dieser Translationskontrolle. Dabei soll geklärt werden, durch welchen Mechanismus die Translation der mRNA reprimiert wird. Ein wichtiger Schritt dazu ist die Identifizierung und Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen den nicht-

translatierten Bereichen der mRNAs und RNA-bindenden Proteinen und ihre Bedeutung für die Translationskontrolle. Die Untersuchung der Konserviertheit der Interaktionen, vor allem der beteiligten *cis*- und *trans*-wirkenden Faktoren, gibt Aufschluß in grundlegende Translationskontrollmechanismen.

Für die Mitglieder der *Mst(3)CGP*-Genfamilie wurde ein konserviertes Translationskontrollelement (TCE, "translational control element") identifiziert. Das TCE besteht aus 12 Nukleotiden und befindet sich im 5' UTR aller Gene. Es ist auch in der Position relativ zum Transkriptionsstart konserviert und ist notwendig für die Translationskontrolle (Schäfer *et al.*, 1990; Kempe *et al.*, 1993). Alle sieben Mitglieder der Genfamilie werden ausschließlich in der Keimbahn exprimiert. Sie kodieren für strukturelle Spermischwanzproteine. Charakteristisch ist ein Cystein-Glycin-Prolin (CGP)-Motiv (Kuhn *et al.*, 1991; Schäfer *et al.*, 1993).

Das am besten charakterisierte Gen dieser Familie ist *Mst87F*. Komplexe Protein-RNA Interaktionen konnten für das TCE der *Mst87F*-mRNA mit Testesproteinen nachgewiesen werden (Kempe *et al.*, 1993; Penningers, 1995; Schreiter, 1998). Es konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß Proteine, welche an ein *Mst87F in vitro*-Transkript binden, auch mit einem *Mst84Dd in vitro*-Transkript interagieren können (Schreiter, 1998).

TCE ähnliche Sequenzen wurden auch in anderen translationskontrollierten mRNAs gefunden (Schäfer *et al.*, 1995). Es stellt sich somit die Frage, ob die Sequenzähnlichkeit auch einen funktionalen Zusammenhang beinhaltet, das heißt ob der gleiche Regulationsmechanismus vielen Genen zugrunde liegt.

Ziel dieser Arbeit war es, Protein-RNA Interaktionen des *don juan* 5' nicht-translatierten Bereiches zu charakterisieren. Dies führt zu einem besseren Verständnis der Wirkungsweise der Translationskontrolle und die Bedeutung RNA-bindender Proteine in der Spermatogenese. Eine Eingrenzung der regulatorischen Sequenzen soll außerdem darüber Aufschluß geben, ob potentielle Repression vermittelnde Sequenzelemente vorhanden sind und ob eine Korrelation zur Regulation der *Mst87F*-mRNA besteht. Ein weiterer Schritt besteht in der Identifizierung von Kandidatengen, welche regulatorische RNA-bindende Proteine für das *Mst87F*-Gen kodieren.

Eine Mutation im *Drosophila*-Gen *bbl-a* führt zu einem sterilen Phänotyp (Cordes, 1999). Aufgrund der Expression im Testis und der RNA-bindenden Eigenschaften kann man eine Funktion in der Translationsregulation für BBL-A postulieren. Das

RNA-bindende Protein BBL-A besitzt hohe Homologie zu einem putativen *Caenorhabditis elegans*-Protein. Ziel war es, daß Modellsystem *C. elegans* zu nutzen, um mittels der dort etablierten RNAi-Methodik einen kompletten Funktionsverlust des Proteins herbeizuführen und damit konkrete Hinweise auf die Funktion des Proteins zu bekommen.

LB-Medium:

10	g	NaCl
10	g	Trypton (Pepton)
5	g	Hefeextrakt
ad 1000	ml	dH ₂ O

LB- Medium mit entsprechendem Antibiotikum:

LB-Medium mit 50-100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol, 30-60 µg/ml Kanamycin, 10-50 µg/ml Tetracyclin.

LB-Platten:

Zu 1000 ml LB - Medium (gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum) wurden 15 bis 20 g Agar gegeben.

1 x TBE:

89	mM	Tris/HCl, pH 8,3
89	mM	Borsäure
2	mM	EDTA

TE⁻⁴:

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

PBS:

7	mM	Na ₂ HPO ₄
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
136	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
pH	7,3	

PBT: PBS mit 0,1 % Triton X-100 (v/v) oder Tween 20 (v/v)

SM-Puffer:

1,45	g	NaCl
0,5	g	MgSO ₄
12,5	ml	1 M Tris/HCl, pH 7,5
0,01	%	Gelatine (w/v)
ad 250	ml	dH ₂ O

SSC:

	150	mM	NaCl
	15	mM	Na-citrat
	pH		7,4

Top-Agarose:

	1	g	Peptone
	0,5	g	Hefeextrakt
	0,5	g	NaCl
	0,6	g	Agarose
	ad 100	ml	dH ₂ O

2 x YT:

	16	g	Peptone
	10	g	Hefeextrakt
	5	g	NaCl
	15	g	Agar
	ad 1000	ml	dH ₂ O

2.4 Bakterienstämme, *Escherichia coli* (*E. coli*)

BI21(DE3)pLysE F⁻ ompT hsd S_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysE (cam^R)

BM25.8 supE thi Δ(lac-proAB) [F' traD36 proA⁺B⁺ lacI^q ZΔM15] λimm434 (kan^R) P1 (cam^R) hsdR (r_{k12}⁻ m_{k12}⁺)

DH5α sup E44 dlac U 169 (φ 80 lacZ Δ M15); (Hanahan, 1985)

LE392 sup E44 sup F58 hsd R514 gal K2 gal T22 met B1 trp R55 lac Y1; (Borck *et al.*, 1976; Murray *et al.*, 1977)

XL1-Blue MRF' Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, sup E44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F' proAB, lacφZΔM15, tn10(tet^r)]; (Jerpseth *et al.*, 1992)

ER1647	F ⁻ fhuA2 Δ(lacZ)r1 supE44 recD1014 trp31 mcrA1272::Tn10(tet ^R) his-1 rpsL104(str ^R) xyl7 mtl2 metB1 Δ(mcrC-mrr)102::Tn10(tet ^R) hsdS (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁻)
SOLR TM	e14 ⁻ (mcrA), Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, recB, recJ, umuC::Tn5(kan ^r), uvrC, lac, gyrA96, relA1, thi-1, endA1, λ ^R , [F' proAB, lacφZΔM15] SU ⁻ ; (Hay & Short, 1992)
Y1090	supF hsdR araD139 Δlon Δlac U169 rpsL trpC22::Tn10(tet ^R) pMC9

2.5 Vektoren

Blueskript SK (-/+) (Stratagene)

pGEM1 (Promega)

pGEM2 (Promega)

pGEM[®]-T (Promega)

pPCR-ScriptTM Amp SK(+) (Stratagene)

pSCREEN-1b(+), λSCREENTM-1 Vector (Novagen)

2.6 Phagenbanken

λ-ZAP II cDNA Bank aus adulten Oregon R (Stratagene)

λSCREEN-1 cDNA Bank aus poly(A)⁺RNA aus Hodengewebe Oregon R (siehe Ergebnisse 3.2)

2.7 DNA-Techniken

2.7.1 DNA-Plasmid Minipräparation

Analytische Mengen an Plasmid-DNA wurden nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gewonnen. Dazu wurden 2 ml LB-Amp-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden 1,5 ml 5 min bei 4500 rpm (Sorvall SS-34 Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I (Qiagen Resuspension Buffer mit RNase A) resuspendiert. Dann wurden 200 µl Lösung II zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 150 µl Lösung III (Neutralisierungslösung) und nach Mischen eine Inkubation von 5 min auf Eis. Dadurch wurden Proteine und genomische DNA gefällt, welche durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 12500 rpm (4°C) pelletiert wurden. Der Überstand wurde mit 450 µl Isopropanol vermischt, wodurch die Plasmid-DNA ausfiel. Diese wurde durch Zentrifugieren (10 min, 12500 rpm, 4°C) pelletiert, getrocknet und in 30 µl TE⁻⁴ aufgenommen. Die Kontrolle der Plasmid-DNA erfolgte durch spezifische Spaltung mit Restriktionsenzymen und Analyse in Agarose-Gelen.

Lösung I:

50	mM	Tris/HCl
10	mM	EDTA, pH 8
100	µg/ml	RNase A

Vor der Zugabe die RNase A in dH₂O lösen und zur Zerstörung von DNase 10 min auf 95°C erhitzt.

Lösung II:

0,2	M	NaOH
1	%	SDS (w/v)

Lösung III:

60	ml	5 M Kaliumacetat
11,5	ml	Essigsäure (100 %; v/v)
ad 100	ml	dH ₂ O

2.7.2 DNA-Plasmid Midipräparation

Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde der Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die DNA wurde aus 50 ml Kulturen gewonnen.

Zur Stammhaltung wurden vor der DNA-Extraktion Bakterienstocks angelegt. Eine zweifach konzentrierte Zellsuspension wurde 1:1 mit einer Glycerinlösung vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

<u>Glycerinlösung:</u>	65	% Glycerin (v/v)
	100	mM MgSO_4
	25	mM Tris/HCl, pH 8,0

2.7.3 Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarose-Gelen (Weichenhan, 1991)

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten und zur Isolierung von DNA-Fragmenten für eine anschließende Klonierung wurden diese in einem 1- bis 1,5 % - igen (w/v) Agarose-Gel aufgetrennt. Die Bande wurde sauber ausgeschnitten in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, welches eine zurechtgefaltete Filterpapiertüte enthielt. Im Boden des Eppendorfreaktionsgefäß befand sich ein kleines Loch. Dieses Eppendorfreaktionsgefäß wurde nun in ein weiteres gesteckt. Beide ineinandergesteckt wurden 1 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Agarose verbleibt im Filterpapier und die DNA in Lösung befindet sich im unteren Eppendorfreaktionsgefäß. Die DNA wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) gemischt und für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 96 %-igem Ethanol (v/v) für 15 min bei -80°C gefällt und dann 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen und nach dem Trocknen in einem geeigneten Puffer (TE^{-4} oder dH_2O) aufgenommen.

2.7.4 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Linearisierung von Plasmid-DNA für die *in vitro*-Transkription und zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut. Hierfür wurden je nach Enzym und Verwendungszweck 1-5 u des Enzyms pro 1 µg DNA bei 37°C für 1-2 h inkubiert. Der Reaktionspuffer wurde entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Zur Überprüfung des vollständigen Verdau wurde die gespaltene DNA parallel zum unverdauten Plasmid in einem Agarose-Gel (siehe 2.9.1) aufgetrennt. Nach erfolgreicher Spaltung erfolgte eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) Extraktion. Die DNA wurde gefällt, gewaschen und nach dem Trocknen in einem entsprechenden Puffer aufgenommen (siehe 2.7.3).

2.7.5 Oligo-Klonierung

Zur Klonierung kurzer DNA-Fragmente für die Analyse potentieller regulatorischer Elemente wurden synthetisierte zueinander komplementäre DNA-Oligonukleotide verwendet. Dabei konnten an die DNA-Oligonukleotide Schnittstellen für die zielgerichtete Klonierung gehängt werden.

Zuerst wurden die einzelsträngigen DNA-Oligonukleotide (Firma Roth) einzeln phosphoryliert (Synthese einer 5'-Phosphatgruppe):

0,5	µl	Oligo (500 ng)
1	µl	10x Buffer A (T4-PNK)
7	µl	dH ₂ O
1	µl	ATP (100 pmol/µl)
0,5	µl	T4-Polynukleotidkinase (10 u/µl)

Inkubation 30 min bei 37°C

Die jeweiligen komplementären DNA-Oligonukleotide wurden gemischt, für 5 min bei 65°C und anschließend für 10 min bei 37°C weiter inkubiert. Nach dem langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte eine Phenol-Chloroform-

Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) Extraktion und die Fällung der nun doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide. Das Pellet wurde direkt für die Ligation (über Nacht bei 18°C) in den vorher spezifisch gedauten, dephosphorylierten Vektor eingesetzt.

2.7.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

A) Klonierung von isolierter DNA und DNA-Oligonukleotiden:

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in dephosphorylierte Vektoren (Abspaltung der 5'-Phosphatgruppe), um einen Ringschluß zu verhindern und dadurch die Insertion des gewünschten DNA-Fragments mit intakter 5'-Phosphatgruppe an das intakte 3'-Hydroxylende des Vektors zu begünstigen. Hierzu wurde die entsprechend gedaute DNA mit 1 µl (20 u/µl) Alkalischer Phosphatase für 1 h bei 37°C inkubiert.

Zur Ligation wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:1 gemischt, 0,1 Volumen 10x Ligase Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (3 u/µl) zugegeben. Das Endvolumen wurde durch Auffüllen mit dH₂O erreicht. Die Ligation erfolgte je nach Anwendung für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C bzw. 18°C.

B) Klonierung von PCR-Produkten

Aus einem Gel isolierte PCR-Produkte wurden je nach verwendeter DNA-Polymerase in die Vektoren kloniert.

Bei Verwendung der *Taq*-Polymerase, welche an die Produktenden einen Adenosin-Rest hängt, wurden die Fragmente in den pGEM[®]-T mit dem Kit der Firma Promega kloniert.

Bei Verwendung der *Pfu*- oder *Pwo*-Polymerase, welche "blunt"- Enden synthetisieren, wurden die Produkte mit einem Kit der Firma Promega, in die *SrfI*-Schnittstelle des pPCR-Script[™] Amp SK(+)- Vektors kloniert.

2.7.7 PCR ("polymerase chain reaction") (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986; Mullis & Faloona, 1987)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine *in vitro*-Amplifizierung spezifischer DNA-Doppelstränge. Dabei synthetisiert eine DNA-Polymerase (*Taq*-, *Pfu*-, *Pwo*-Polymerase) in mehreren Zyklen viele Kopien eines kurzen DNA-Fragments, welches durch flankierende Oligonukleotid-Primer definiert ist.

Ein typischer Reaktionsansatz (am Beispiel eines Kits der Firma Qiagen) setzte sich wie folgt zusammen:

5	µl	10 x PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)
2	µl	Primer I (20 ng/µl)
2	µl	Primer II (20 ng/µl)
1	µl	dNTP-Mix (je 25 mM)
1	µl	„template“-DNA (20 ng/µl)
0,5	µl	Taq-Polymerase (5 u/µl; Qiagen)
ad 50	µl	dH ₂ O

Zur Vermeidung von Verdunstung wurde der Reaktionsansatz mit rotgefärbtem Wachs (Chill out 14, MJ Research, Inc., Biozym) überschichtet. Der Reaktionsansatz wurde auf 92°C erhitzt. Die Temperatur der Primerbindung wurde immer 2-10°C niedriger gewählt, als der berechnete Schmelzpunkt ($T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$, Itakura *et al.*, 1984; Sambrook *et al.*, 1989) des Primers. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen.

Primerbindung	60	s	48-65°C	(Annealing)
Verlängerungsreaktion	60	s	72°C	(Elongation)
Aufschmelzen der DNA	30	s	92°C	(Denaturierung)

Nach 30 Zyklen folgte eine Abschlußreaktion:

Primerbindung	60	s	48-65°C
Verlängerungsreaktion	10	min	72°C

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte durch Auftrennung in einem präparativen Agarose-Gel und anschließender Elution aus dem Gel (siehe 2.7.3). Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Roth synthetisiert.

2.7.8 Sequenzierung von Plasmid-DNA (nach Sanger *et al.*, 1977)

Zur Kontrolle korrekter Klonierungen wurden 1-2 µg Plasmid-DNA mit α -³²P-dATP nach der Didesoxy- bzw. "Kettenabbruch"-Methode sequenziert. Dies erfolgte nach Herstellerangaben mit einem Kit der Firma Pharmacia. Die Sequenzreaktionen wurden in vertikalen Polyacrylamid-Gelen (6 % PAA, w/v; 8 M Harnstoff w/v; 1xTBE) aufgetrennt. Nach Fixieren (10 min in 5 % Methanol, v/v; 5 % Essigsäure, v/v), Wässern und Trocknen des Geles wurde dieses gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Größere Fragmente wurden durch die Firma Genterprise (Mainz) sequenziert.

2.7.9 Markierung von DNA-Fragmenten mit DIG-dUTP

Die DNA-Fragmente wurden aus einem Agarose-Gel isoliert (siehe 2.7.3). Die Markierungsreaktion erfolgte mit einem Kit und nach dem Protokoll der Firma Boehringer.

2.7.10 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine 10 ml Über-Nacht-Kultur von *Escherichia coli* DH5 α -Zellen (*E. coli*) diene zum Animpfen von 200 ml LB-Medium. Nach Erreichen einer optischen Dichte OD₅₅₀ von 0,5 (entspricht 5×10^7 Zellen/ml) wurde die Kultur 10 min auf Eis abgekühlt und die Zellen anschließend bei 3000 rpm (4°C, Sorvall, GSA-Rotor) pelletiert. Das Pellet wurde in 1/3 Volumen RFI vorsichtig resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen wieder 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 1/15 des Ausgangsvolumens RFII aufgenommen. 200 µl Aliquots wurden auf vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

Die Transformationseffizienz wurde durch Transformation von 1 µl pUC18-Kontroll-Plasmid (0,1 ng/µl) in 100 µl kompetente Zellen überprüft und beträgt in der Regel 6×10^6 Kolonien/µg Plasmid-DNA.

RFI:

100	mM	RbCl
50	mM	MgCl ₂
30	mM	Kaliumacetat, pH 7,5
10	mM	CaCl ₂
15	%	Glycerin (v/v)
pH	5,8	(Essigsäure)

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

RFII:

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

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

2.7.11 Transformation kompetenter Zellen

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend zum Ligationsansatz (1-10 ng Plasmid-DNA) gegeben. Nach halbstündiger Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 60 bis 90 s bei 42°C im Wasserbad. Nach Abkühlung auf Eis wurde der Ansatz mit 800 µl LB-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Aliquots auf LB-Platten mit einem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.8 RNA-Techniken

2.8.1 poly(A)⁺-RNA-Isolierung

Die meisten mRNA's besitzen an ihrem 3' Ende einen poly(A)- Schwanz. Mit Hilfe von poly(dT)-beschichteten, magnetischen Partikeln (Firma Dynal oder Novagen) können diese mRNA's aus unterschiedlichen Geweben isoliert werden.

Zunächst wurden 200 µl der Partikelsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und zur Konzentration in einen magnetischen Halter gestellt. Nach 1 min wurde der Überstand entfernt, die Partikel mit 200 µl Lyse/Bindungspuffer gewaschen und wieder konzentriert.

Das Gewebe (Hoden, Ovar oder Karkassen) wurde mit einem Teflon-Pistill in 1 ml Lyse/Bindungspuffer zerrieben. Gewebereste wurden für 1 min bei 12000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand konnte nun mit den Partikeln vermischt werden, von welchen vorher der Lyse/Bindungspuffer entfernt wurde. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Während dieser Zeit hybridisieren die mRNA's an die oligo(dT)-Partikel. Die Partikel wurden für 5 min im magnetischen Halter konzentriert, der Überstand entfernt und die Partikel wurden zweimal mit 1 ml Waschpuffer mit LiDS und einmal mit 500 µl Waschpuffer gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgte durch Inkubation der Partikel mit 20 µl Elutionspuffer bei 65°C für 2 min. Die Partikel wurden im Magnethalter konzentriert und der Überstand mit der poly(A)-RNA in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

<u>Lyse/Bindungspuffer:</u>	100	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	500	mM	LiCl
	10	mM	EDTA
	1	%	LiDS (w/v)
	5	mM	DTT

Waschpuffer mit LiDS:

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

Elutionspuffer:

2	mM	EDTA, pH 7,5
---	----	--------------

2.8.2 Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembran und Hybridisierung mit RNA-Sonden (Northern-Hybridisierung)

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA (siehe 2.9.2) wurde diese auf Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham) übertragen. Dies ermöglicht die Hybridisierung mit spezifischen Sonden.

Der Transfer erfolgt durch Kapillarkräfte mit dem Pufferstrom. Hierzu wurden zwei Streifen mit Transferpuffer (20 x SSPE) getränktes Filterpapier auf eine Glasplatte gelegt. Die Enden des Filterpapiers liegen in einer Schale unter der Glasplatte, welche mit Transferpuffer gefüllt ist. Auf das Filterpapier wurde das Gel gelegt. Die nicht vom Gel bedeckten Bereiche wurden mit Parafilm abgedeckt. Auf das Gel wurden die zurechtgeschnittene Nylonmembran und dann drei weitere ebenfalls auf Gelgröße zurechtgeschnittene Filterpapiere gelegt. Hierauf kam ein Stapel saugfähiges Papier und ein Gewicht zur Beschwerung. Der Transfer erfolgte meist über Nacht. Eine kovalente Bindung der RNA an die Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung im Stratalinker (Stratagene, $1200 \mu\text{J}/\text{cm}^2 \times 100$).

20x SSPE:

3,6	M	NaCl
0,2	M	NaH ₂ PO ₄
20	mM	EDTA
pH	7,4	(NaOH)

Northern-Hybridisierung:

Alle Hybridisierungsschritte erfolgten in zylindrischen Glasröhren, welche in einem Hybridisierungssofen (Firma Biometra) bei 62°C kontinuierlich drehten.

Der erster Schritt war die Vorhybridisierung mit 10 ml Vorhybridisierungslösung für 1-2 h. Die Hybridisierung der RNA-Sonde (siehe 2.8.3) an die Membran erfolgte in 10 ml Hybridisierungslösung über Nacht. Es folgten zwei Waschschrte je 15 min mit 2 x SSPE, 0,2 % SDS (w/v) und ein Waschrst 15 min mit 0,1 x SSPE, 0,2 % SDS (w/v). Anschließend wurde die Membran leicht getrocknet und zur Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (gegebenenfalls mit Verstärkerfolie bei -80°C) exponiert.

Vorhybridisierungslösung: 500 mM NaPO_4 , pH 6,5
 7 % SDS (w/v)

1 M NaPO_4 , pH 6,5: 68,5 ml 1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 31,5 ml 1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Hybridisierungslösung: 50 % deionisiertes Formamid (v/v)
 5 x SSPE
 50 mM NaPO_4 , pH 6,5

2.8.3 *in vitro*-Transkription (Zinn *et al.*, 1983; Krieg & Melton, 1984; Melton *et al.*, 1984)

Herstellung radioaktiv markierter *in vitro*-Transkripte

Bei der Untersuchung von Protein-RNA Interaktionen in "*electrophoretic mobility shift assays*" (EMSA), in UV-Crosslinking Experimenten und beim "Northwestern-Screening" wurden radioaktiv markierte *in vitro*-Transkripte eingesetzt. Somit war es möglich die Transkripte und die Interaktionen durch Exposition gegen einen Röntgenfilm sichtbar zu machen. Als Matrize für eine *in vitro*-Transkription diente eine linearisierte Plasmid-DNA, welche ein entsprechendes Insert enthielt.

<u>Reaktionsansatz:</u>	1	µg	linearisierte Plasmid-DNA
	2	µl	10x Transkriptionspuffer
	2	µl	0,1 M DTE
	0,5	µl	RNase-Inhibitor (43 u/µl)
	3	µl	A,C,G-Mix, je 3,3 mM NTPs
	1	µl	200 µM UTP
	2	µl	RNA-Polymerase (T7 bzw. SP6, 20 u/µl)
	2	µl	α - ³² P-UTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
	ad 20	µl	DEPC-dH ₂ O

Die Reaktion wurde für 1,5 h bei 37°C oder bei 4°C durchgeführt. Eine Inkubation bei 4°C führt zu einer Verringerung der Menge an Transkripten, aber erhöht bei einigen Templates die Menge an Vollängentranskripten und ist somit ein qualitativer Vorteil (Krieg & Melton, 1987; Krieg, 1990). Das DNA-Template wurde durch Zugabe von 1 µl RNase freie RQ1-DNase (Promega, 1u/µl) und Inkubation für 15 min bei 37°C entfernt. Dem Ansatz wurden 300 µl 1 M Ammoniumacetat, 15 µl tRNA (10mg/ml) und 350 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugegeben und miteinander vermischt. Nach Zentrifugation wurde der wäßrige Überstand mit 3 Volumen 96 %-igem Ethanol (v/v) versehen. Die Fällung der RNA erfolgte für 15 min bei -80°C. Nach einem anschließenden Waschschrift wurde das Pellet nach dem Trocknen in DEPC-dH₂O oder für eine weitere Aufreinigung in einem Probenpuffer aufgenommen. Die Effizienz der Markierung wurde durch Messen der Cerenkov-Strahlung überprüft.

Bei einigen UV-Crosslinking Experimenten wurden Br-Uridin (BrU) substituierte *in vitro*-Transkripte verwendet (Gott *et al.*, 1991). Durch Einbau von 5-Bromo-Uridin 5'-Triphosphat Natrium (Sigma) werden unter UV-Licht spezifische, kovalente Bindungen zwischen der Nukleinsäure und den assoziierten Proteinen induziert. Der Reaktionsansatz erfolgte wie oben beschrieben, mit folgenden Anpassungen: CTP, GTP, BrUTP-Mix (je 5 mM), ATP (200 µM) und α -³²P-ATP (10 mCi/ml) zum autoradiographischen Nachweis. Bei der Synthese von nicht markierten *in vitro*-Transkripten wurde ein A, C, G, U- Nukleotidmix (je 5 mM) verwendet.

<u>10 x Transkriptionspuffer:</u>	400	mM Tris/HCl, pH 7,5
	50	mM NaCl
	30	mM MgCl ₂
	10	mM Spermidin

In EMSA-Experimenten ist es entscheidend, nur Vollängentranskripte einzusetzen. Daher wurden die Transkripte in einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel (siehe 2.9.3) aufgetrennt. Das Gel wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und 5 min gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die oberste Bande, welche die Vollängentranskripte repräsentiert, wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 360 µl Elutionspuffer überführt.

Die Elution erfolgte auf einem Drehrad über Nacht bei Raumtemperatur. Das Polyacrylamid wurde abzentrifugiert (10000 rpm, 5 min). Nach einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion wurde die RNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen 96 %-igem Ethanol (v/v) gefällt. Es folgte ein Waschschrift mit 70 %-igem Ethanol (v/v). Das RNA-Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen DEPC-dH₂O aufgenommen, um eine radioaktive Konzentration von 10⁴ bis 10⁶ cpm/µl zu erreichen.

<u>Elutionspuffer:</u>	0,1	% SDS (w/v)
	500	mM Ammoniumacetat
	10	mM Magnesiumacetat
	1	mM EDTA, pH 8,0

2.8.4 *in vitro*-Transkription mit Biotin-16-UTP

Für die Affinitätsreinigung von RNA-bindenden Proteinen wurden *in vitro*-Transkripte mit Biotin markiert, welches am UTP assoziiert ist. Biotin ist ein Makromolekül, welches mit hoher Affinität von Streptavidin gebunden wird. Das Protokoll wurde modifiziert von der Firma Boehringer übernommen.

<u>Reaktionsansatz:</u>	1	µg	linearisierte Plasmid-DNA
	2	µl	10 x Biotin-RNA-Labeling-Mix (mit Biotin-16-UTP)
	2	µl	10 x Transkriptionspuffer
	0,5	µl	RNase-Inhibitor (43 u/µl)
	2	µl	T7-RNA-Polymerase
	ad 20	µl	dH ₂ O

Die Reaktion erfolgte für 1,5 h bei 37°C, mit anschließendem DNA-Verdau durch 1 µl RQ1-DNase für 15 min bei 37°C. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0 auf Eis, wurde die RNA direkt gefällt, gewaschen und nach dem Trocknen in 20 µl DEPC-dH₂O aufgenommen.

2.8.5 5' Markierung von RNA-Oligonukleotiden (Endlabelling)

Für UV-Crosslink-Experimente wurden synthetisierte Oligoribonukleotide verwendet (von MWG synthetisiert) Zum Nachweis wurden diese durch Übertragung des γ -Phosphates von γ -³²P-ATP zum 5' OH-Ende der Oligoribonukleotide radioaktiv markiert.

RNA-Oligo (50pmol)	0,8	µl
10 x Buffer A (PNK)	2	µl
DEPC-dH ₂ O	20,2	µl
T4-Polynukleotidkinase (10 u/µl) (Fermentas)	1	µl
γ - ³² P-ATP (23 pmol/µl, 160µCi/µl)	1	µl

Die Reaktion wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der Nukleotide wurde der Ansatz anschließend 2 min bei 735 g durch eine MicroSpin™ G-25 Säule (Amersham Pharmacia Biotech) zentrifugiert.

2.9 Gel-Elektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen und Nukleinsäuren wurden unterschiedliche Systeme eingesetzt. Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte in Agarose-Gelsystemen oder in einem denaturierenden Polyacrylamidsystem. Die Auftrennung von Proteinen oder Protein-RNA Komplexen erfolgte in verschiedenen Polyacrylamidsystemen. Für Polyacrylamid-Gele wurde die vertikale Gelelektrophorese mit Glasplatten in einer der folgenden Abmessungen gewählt: 200 mm x 210 mm, 180 mm x 160 mm oder 100 mm x 75 mm.

Polyacrylamid-Stammlösungen wurden für 1 h mit Ionenaustauscher (AG[®] 501-X8 Mixed Resin, Bio-Rad) in einer Konzentration von 5 mg/100 ml unter Rühren deionisiert und durch einen Faltenfilter gefiltert.

2.9.1 Auftrennung von DNA in nativen Agarose-Gelen

Die Überprüfung der vollständigen, korrekten Spaltung von Plasmid-DNA und die Längenüberprüfung von PCR-Produkten wurde in horizontalen Agarose-Gelen durchgeführt. Je nach Länge der Fragmente wurden 0,7 bis 1,3 % - ige (w/v) Agarose Gele (MetaPhor[®] oder SeaKem LE) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid eingesetzt. Als Gel- und Laufpuffer diente 1 x TBE. Die Auftrennung der DNA wurde mittels UV-Licht ($\lambda=302$ nm) sichtbar gemacht und mit einer Dokumentationsanlage (Polaroid, Intas) gespeichert. Zur Größenbestimmung wurden parallel DNA-Standards aufgetrennt.

DNA-Standards:

Bakteriophage Lambda (λ)-DNA, *Hind*III gespalten (MBI Fermentas):

Fragmentlängen: 0,13 kb bis 23 kb

100 bp-Leiter (MBI Fermentas):

Fragmentlängen: 100 bp bis 3000 bp

1 kb-Leiter (MBI Fermentas):

Fragmentlängen: 250 bp bis 10000 bp

2.9.2 Auftrennung von RNA in denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelen

(nach Lehrach *et al.*, 1977; Carmichael, 1980, Kuhn *et al.*, 1991)

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1,5 % - igen (w/v) Agarose-Gelen (12 x 14 cm) unter denaturierenden Bedingungen. Für das Gel wurden 1,5 g Agarose in 85 ml dH₂O und 10 ml 10x MOPS in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf 50° bis 60°C wurden 5 ml 37 % - iges Formaldehyd (v/v) zugegeben und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: 9 µl RNA (2 µg poly(A)-RNA), 10 µl deionisiertes Formamid, 4 µl 37 %-iges Formaldehyd (v/v), 3 µl 10x MOPS-Puffer und 1 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) wurden vermischt und für 5 min bei 65°C erhitzt. Nach Zugabe von 3 µl RNA-Auftragspuffer (70 % Glycerin, v/v; 0,1 % Bromphenolblau, w/v, 0,1 % Xylencyanol, w/v) wurden die Proben aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 120 V für 2-3 h in 1x MOPS.

Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer auf Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham) mit 20x SSPE (siehe 2.8.2).

<u>10x MOPS-Puffer:</u>	200	mM	MOPS
	50	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA
	pH	7,0	

2.9.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Isolierung von Vollängentranskripten wurden diese in 15 % - igen (w/v) kontinuierlichen Gelen von 1 mm Stärke von kürzeren Transkripten getrennt.

Stammlösung 20 % Polyacrylamid (39:1, w/v)/ 8 M Harnstoff:

	19,5	g	Acrylamid
	0,5	g	N,N'-Methylenbisacrylamid
	48,5	g	Harnstoff
	ad 100	ml	dH ₂ O

<u>15 %- iges Polyacrylamid-Gel:</u>	37,5 ml Stammlösung (20 % PAA/ 8 M Harnstoff)
	5 ml 10 x TBE
	7,5 ml dH ₂ O
	85 μ l TEMED
	300 μ l 10 % APS (w/v)

Laufpuffer: 1 x TBE

Probenpuffer: 80 % Formamid (v/v)
0,1 % Xylencyanol (w/v)
0,1 % Bromphenolblau (w/v)
2 mM EDTA, pH 8,0

Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Sequenzgelapparaturen. Zuerst erfolgte eine Vorelektrophorese für 45 min bei 20 mA. Die Nukleinsäuren wurden mit 10 μ l Probenpuffer versetzt und 3 min in einem Wasserbad bei 95°C denaturiert. Nach sofortigem Abkühlen auf Eis konnten die Proben aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte für 3 h bei 25 mA.

2.9.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Konarska & Sharp, 1986)

Zur Analyse von Protein-RNA Wechselwirkungen wurden nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Gele wurden kontinuierlich gegossen.

Stammlösung 20 % Polyacrylamid (60:1,w/v):

	19,7 g Acrylamid
	0,3 g N,N'-Methylenbisacrylamid
ad 100	ml dH ₂ O

<u>4 %- iges Polyacrylamid-Gel:</u>	10	ml Stammlösung (20 % PAA)
	1,3	ml 10 x TBE
	5	ml 50 % Glycerin (v/v)
	34	ml dH ₂ O
	80	µl TEMED
	300	µl 10 % APS (w/v)

Laufpuffer: 0,25 x TBE

Probenpuffer: 70 % Glycerin (v/v)
0,25 x TBE
0,1 % Bromphenolblau (w/v)

Nach einer Vorelektrophorese von 45 min bei 25 mA und Probenauftrag erfolgte die Elektrophorese für 1,5 bis 2 h bei 25 mA.

2.9.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (modifiziert nach Laemmli, 1970)

Die Auftrennung von Proteinen und kovalent verbundenen Protein-RNA Komplexen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Wandergeschwindigkeit im elektrischen Feld aufgetrennt. Diese ist hier stark von der Masse der Proteine abhängig. Der Einfluß der Nettoladung der Proteine wird durch den Einsatz von Natriumdodecylsulfat (SDS)-Anionen herabgesetzt. SDS ist in der Lage, Polypeptidketten aufzufalten und die SDS-Anionen binden an die Hauptketten. Die so resultierende negative Ladung ist der Masse des Proteins annähernd proportional. Zusätzlich werden durch β -Mercaptoethanol Disulfidbrücken reduziert.

Trenngel (10 %):

- 15,6 ml Lösung A
- 21,2 ml dH₂O
- 9,3 ml Lösung B
- 466 µl 10 % SDS (w/v)

- 23,3 µl TEMED
- 156 µl 10 % APS (w/v)

Sammelgel (5 %):

- 0,8 ml Lösung A
- 3,6 ml dH₂O
- 0,5 ml Lösung C
- 50 µl 10 % SDS (w/v)

- 5 µl TEMED
- 17 µl 10 % APS (w/v)

Lösung A:

- 29,1 g Acrylamid
- 0,9 g N,N'-Methylenbisacrylamid
- ad 100 ml dH₂O

Lösung B: 1,88 M Tris/HCl, pH 8,8

Lösung C: 1,25 M Tris/HCl, pH 6,8

Elektrodenpuffer:

- 15,2 g Tris
- 72 g Glycin
- 5 g SDS
- ad 5000 ml dH₂O, pH 8,3, HCl

Probenpuffer:

- 2,5 ml Lösung C
- 1,0 g SDS
- 5,8 ml Glycerin
- 5,0 mg Bromphenolblau
- ad 50 ml dH₂O

Direkt vor dem Gebrauch wurde einem Volumen von 100 µl Probenpuffer 5 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Die Proben wurden mit dH₂O auf ein einheitliches Volumen gebracht, 1:1 mit Probenpuffer versetzt und für 3 min durch Kochen denaturiert. Nach schnellem Abkühlen auf Eis konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA (kleine Gele: 10 mA) im Sammelgel und bei 40 mA (kleine Gele: 20 mA) im Trenngel.

Protein-Standard:

Molekulargewichtsstandard *SDS-6H* (Sigma):

high range (in kDa): 29/ 45/ 66/ 97,4/ 116/ 205

wide range(in kDa): 6/ 14/ 20/ 24/ 29/ 36/ 45/ 55/ 66/ 84/ 97,4/ 116/ 205

2.10 Nachweis von Proteinen

Durch eine Coomassie-Färbung können Proteine in SDS-Polyacrylamid-Gelen sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden für 1-2 h in der Färbelösung geschwenkt. Das Entfärben erfolgt durch mehrmaliges Waschen mit Entfärbelösung.

Färbelösung:

45 % Methanol (v/v)

10 % Essigsäure (v/v)

0,2 % Coomassie[®] Brilliant Blue R250 (v/v)

Entfärber:

30 % Methanol (v/v)

7 % Essigsäure (v/v)

2.11 Proteinextraktion

Für verschiedene in dieser Arbeit durchgeführte Experimente war es notwendig, Proteingemische aus *Drosophila melanogaster*-Gewebe zu gewinnen. Die sehr zeitaufwendige Präparation von Hodengewebe ermöglicht es, Proteine anzureichern, welche in männlichen Keimzellen exprimiert werden. Eine schnellere Methode ist die Extraktion aus gesamten Abdomina.

Proteinextraktionspuffer (modifiziert nach Andino *et al.*, 1990):

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

Unmittelbar vor der Verwendung wurden Protease-Inhibitoren aus Stocklösungen zu den folgenden Endkonzentrationen hinzugegeben:

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

2.11.1 Proteinextrakt aus *Drosophila melanogaster*-Hodengewebe

(Kempe *et al.*, 1993; Kempe, 1995)

Die Hoden wurden einzeln in *Drosophila*-Ringer frei präpariert und sofort in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Proteinextraktionspuffer auf Eis überführt. Es wurden jeweils 150 Hoden in 50 µl Proteinextraktionspuffer gesammelt. Um eine Proteindegradation und einen Aktivitätsverlust zu vermeiden, wurde das Gewebe meist am gleichen Tag in Experimenten eingesetzt oder für möglichst kurze Zeit bei –80°C gelagert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte in einem mit Eiswasser gefüllten Ultraschallbad (Sonorex TK 30) für 15 min. Zellreste wurden durch Zentrifugieren (15 min, 4°C, 8000 rpm) pelletiert. Die Proteinkonzentration konnte

mit dem Bradford-Test (Bradford, 1976) bestimmt werden. Sie betrug im Durchschnitt 10-15 mg/ml.

Bradford-Reagenz: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250
in 50 ml 96 % - igem Ethanol (v/v) lösen
100 ml 85 % - ige Phosphorsäure (v/v)
zugeben
ad 1000 ml dH₂O

Die Lösung wurde filtriert.

Drosophila-Ringer: 184 mM NaCl
46 mM KCl
3 mM CaCl₂
10 mM Tris/HCl, pH 7,2

2.11.2 Proteinextrakt aus *Drosophila melanogaster*-Abdomina

Eine schnellere Möglichkeit einen Proteinextrakt zu gewinnen, welcher einen hohen Gehalt an Testesproteinen besitzt, ist die Isolierung von Abdomina.

Die Abdomina wurden mit der Pinzette oder dem Skalpell von Kopf und Thorax getrennt und sofort in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Proteinextraktionspuffer überführt. Je 900 Abdomina wurden in je 700 bis 900 µl Extraktionspuffer gesammelt. Diese wurden in flüssigen Stickstoff gefroren und gegebenenfalls bei -80°C gelagert. Der Aufschluß erfolgte durch Zermörsern mit einem Porzellan-Pistill in einem Porzellan-Mörser. Es wurde ständig mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Chitin- und Zellreste wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (15 min und 5 min) bei 8000 rpm und 4°C pelletiert.

2.12 Bildung von Protein-RNA Komplexen und deren Analyse

Zur Analyse von Protein-RNA Komplexen wurde die Methode des "electrophoretic mobility shift assays" (EMSA, (Konarska & Sharp, 1986)) und des UV-Crosslinks angewandt. Bei beiden Experimenten können radioaktiv markierte RNAs mit Proteinen in einem *in vitro*-Ansatz interagieren. Hierbei können die Bedingungen variiert werden. Durch Zugabe von Kompetitoren wird die Bindung an die radioaktiv markierte und somit nachweisbare RNA beeinflusst.

Für die Bindungsreaktion wurden nur Vollängentranskripte eingesetzt (siehe 2.8.3). Die Inkubation erfolgte in zwei Stufen. Im ersten Schritt wurden 30-50 µg Protein mit 10 u RNase-Inhibitor, gegebenenfalls Heparin (Endkonzentration 1,5 mg/ml), Hefe-tRNA (Endkonzentration 1,7 mg/ml) und Kompetitor-Transkripten im Bindungspuffer 10 min vorinkubiert. Dann wurden die radioaktiv markierten *in vitro*-Transkripte für 3 min bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt und zu den vorinkubierten Proteinen gegeben. Die Bindungsreaktion erfolgte für 20 min.

Bindungspuffer BpE (modifiziert nach Wisniewski & Schulze, 1994):

10	mM	Tris/HCl, pH 7,9
80	mM	NaCl
1	mM	MgCl ₂
8	%	Glycerin (v/v)

2.12.1 EMSA ("electrophoretic mobility shift assay")

Die Auftrennung der Protein-RNA Komplexe erfolgte in einer nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.9.4). Hierbei wird die freie ungebundene RNA durch ihr schnelleres Laufverhalten im Gel von den Komplexen getrennt. Die Komplexbildung verändert die Ladung und damit die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Weiterhin unterliegen die wesentlich größeren Komplexe dem Molekularsiebeffekt der Gelmatrix. Dies führt zu einer langsameren Bewegung durch das Gel. Es entsteht ein sogenannter "band-shift", der die Nukleinsäuren von den RNA-Protein Komplexen trennt. Es ist

unter nativen Bedingungen möglich, unterschiedliche Ausbildungen der Komplexe nachzuweisen.

Dem Bindungsansatz wurde 15 µl Probenpuffer zugesetzt und die Proben wurden auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf ein zurechtgeschnittenes Whatman Filterpapier transferiert, mit einem Stück dünner Plastikfolie abgedeckt und für eine Stunde bei 80°C unter Vakuum in einem Gelrockner getrocknet. Zum Nachweis der radioaktiv markierten Komplexe wurde dann ein Röntgenfilm für einige Stunden bis zu mehreren Tagen mit einer Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

2.12.2 UV-Crosslinking

Diese Experimente bieten eine Möglichkeit, direkte Interaktionen zwischen Proteinen und einer RNA nachzuweisen. Somit kann interagierenden Proteinen ein Molekulargewicht zugeordnet werden.

Nach der Bindungsreaktion wurden die Proben in die umgelegten Deckel der Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert. Somit ist eine bessere UV-Bestrahlung gewährleistet. Die Eppendorfreaktionsgefäße wurden nun in eine mit Eis gefüllte, oben offene Abschirmbox plaziert. Die UV-Bestrahlung erfolgte für 8 min in einem Stratalinker (Stratagene) bei einem Abstand von 2 bis 3 cm zwischen UV-Licht (254 nm) und Probe. Danach wurden die Eppendorfreaktionsgefäße vorsichtig geschlossen und kurz zentrifugiert. Es folgte ein RNase A (2 µl, 10 mg/ml) Verdau für 15 min bei 37°C, um nicht geschützte RNA abzuspalten. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer vermischt und für 3 min bei 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Ansätze in einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamid-Gel (w/v; siehe 2.9.5) aufgetrennt. Parallel wurde ein Proteinmarker aufgetragen, der nach der Elektrophorese vom Gel abgeschnitten und mit Coomassie gefärbt wurde. Das Gel wurde auf ein Whatman Filterpapier transferiert, getrocknet und gegen einen Röntgenfilm mit Verstärkerfolie bei -80°C exponiert.

2.13 Ammoniumsulfatfällung

Mit der Ammoniumsulfatfällung ist eine Fraktionierung von Proteinen möglich, welche in Abhängigkeit der Salzkonzentration präzipitieren.

Es wurden 900 mg *Drosophila melanogaster* oreR Männchen betäubt und in flüssigem Stickstoff zermörsert. Dazu wurden 10 ml Puffer A gegeben und 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Aliquot von 100µl genommen (entspricht A1). Zum Überstand wurde nach folgender Tabelle im 4°C Raum Ammoniumsulfat gegeben.

Tab.1: Menge und Endkonzentration von Ammoniumsulfat für 10 ml Lösung

<u>Ammoniumsulfat</u>	<u>Endkonzentration</u>
0,1 x 10,6= 1,06 g	20%
0,1 x 11,3= 1,13 g	40%
0,1 x 12,0= 1,20 g	60%
0,1 x 12,9= 1,29 g	80%

Die weitere Zugabe der entsprechende Menge Ammoniumsulfat erfolgte jeweils in einem Zeitraum von 20 min. Dies ermöglicht ein langsames Lösen des Ammoniumsulfats. Dann wurden 40 min auf einem Magnetrührer die Komplexe gefällt.

Nach der jeweiligen Fällung wird die Lösung 10 min bei 17000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 1,5 ml Puffer D gelöst. Der Überstand wird zur weiteren Fällung im 4°C-Raum verwendet.

Beim jeweiligen Prozentsatz an Ammoniumsulfat entstehen folgende Fraktionen:

Ausgangsproteinlysate (0%, w/v) A1

A2 20% (w/v)

A5 40% (w/v)

A6 60% (w/v)

A7 80% (w/v)

Der restliche Überstand ergab die Fraktion A8.

Das Pellet von der Aufarbeitung der Männchen wurde in 10 ml Puffer A aufgenommen (Kernisolierung). Dazu wurde 0,53 g Ammoniumsulfat (Endkonzentration: 0,4 M) gegeben. Die Lösung blieb 10 min auf Eis, in welchem die Kerne lysierten. Die Lösung wurde dann 30 min bei 3500 rpm 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde als A0 bezeichnet. Zum Überstand wurden 2,9 g (Endkonzentration: 50% w/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) Dies wurde eine Stunde im Eisbad gerührt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 17000 rpm 4°C. Das Pellet wurde in 1,5 ml Puffer D (entspricht Aliquot A3) aufgenommen. Vom Überstand wurde ein 1,5 ml Aliquot (entspricht: A4) entnommen.

A0	Pellet
A3	50% (w/v)
A4	Restüberstand

Alle Aliquots wurden über Nacht in 1l Puffer D (ohne PMSF) im 4°C-Raum dialysiert. Der Puffer wurde einmal gewechselt und die Dialyse wurde für weitere 4 h fortgeführt. Die Probe wurde sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Fraktionen konnten für SDS-PAGE, EMSA-Experimente und UV-Crosslink-Experimente verwendet werden.

Puffer A (Schlicker *et al.*, 1997):

10	mM HEPES, pH 7,9
	1,5 mM MgCl_2
10	mM KCl
	0,5 mM DTT

Puffer D:

20	mM HEPES, pH 7,9
100	mM KCl
	0,2 mM EDTA
	0,5 mM DTT
	0,5 mM PMSF
20	% Glycerin (v/v)

2.14 Affinitätsreinigung von Bindungsproteinen

Bei der Affinitätsreinigung werden Proteine durch spezifische Bindung an eine feste Matrix angereichert.

In dieser Arbeit wurden Dynabeads M-280 der Firma Dynal verwendet. Diese sind uniforme, paramagnetische Polystyrolkugeln, an die gereinigtes Streptavidin gebunden ist. Streptavidin besitzt vier identische Untereinheiten und hat ein Molekulargewicht von 66 kDa. Die Untereinheiten besitzen eine hohe Affinität für Biotin. Durch Markierung von *in vitro*-Transkripten mit Biotin (siehe 2.8.4) können diese an die Streptavidin assoziierten Dynabeads gebunden werden. Diese Bindung besitzt eine sehr hohe Stabilität. Durch Inkubation mit Testesproteinen und anschließender Abtrennung durch ein magnetisches Feld (Dynal MPC-Ständer, 1-2 min), können somit spezifisch an diese RNA bindende Proteine angereichert werden.

Die Dynabeads wurden entsprechend den Herstellerangaben (Dynal) für die RNA-Anwendung vorbehandelt. 3 mg (300 µl) Dynabeads wurden einmal mit B&W - Puffer gewaschen und in 300 µl B&W-Puffer resuspendiert. Danach wurde das gleiche Volumen an biotinylierten Transkripten (*Mst87F* -5/+47) zugegeben. Die Dynabeads-Konzentration betrug nun 5 mg/ml und die Salzkonzentration betrug 1 M. Es folgte eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad. Es folgten zwei Waschschrte mit 1 x B&W-Puffer (Salzkonzentration 1 M) und zwei Waschschrte mit BpE (siehe 2.12). Die Transkript-gekoppelten Dynabeads wurden dann mit dem Bindungsansatz, welcher Proteinextrakt aus Abdomina enthielt (siehe 2.11.2), vermischt.

<u>Bindungsansatz:</u>	3	mg	Dynabeads-RNA-gekoppelt
	750	µl	Proteinextrakt
	20	µl	Heparin (100 mg/ml)
	15	µl	tRNA (100 mg/ml)
	5	µl	RNase-Inhibitor (3 u/µl)
	5	µl	Pepstatin (1 µg/µl)
	5	µl	Leupeptin (1 µg/µl)
	5	µl	PMSF (100 mM Lösung)
	500	µl	BpE

Die Inkubation erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad. Danach wurde zweimal mit je 1 ml BpE gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch ansteigende Salzkonzentrationen (200 mM, 400 mM, 1600 mM NaCl). Es wurden jeweils 300 µl Elutionspuffer verwendet. Die Elutionsreihe wurde zweimal durchgeführt.

Zur Kontrolle wurde ein analoges Experiment durchgeführt, ohne RNA an die Dynabeads zu binden.

B&W-Puffer:

10	mM Tris/HCl, pH 7,5
1	mM EDTA
2	M NaCl

Elutionspuffer (modifiziert nach Gabrielsen & Huet, 1993):

10	mM Tris/HCl, pH 8,0
1	mM EDTA
10	% Glycerin (v/v)
0,01	% Triton-X-100 (v/v)

Zu diesem Puffer wurde NaCl zu einer Endkonzentration von 200 mM, 400 mM bzw. 1600 mM zugegeben.

Die so erhaltenen Fraktionen wurden mit dem Microdialyzer 500 (PIERCE) gegen 25 mM Tris/HCl, pH 7,5 für 2 h bei 4°C dialysiert. Der Dialysepuffer wurde dabei einmal gewechselt. Die Ausschlußgröße der Dialysemembran (PIERCE) betrug 8 kDa. Die dialysierten Fraktionen wurden gefriergetrocknet und in einem entsprechenden Puffer aufgenommen.

2.15 Northwestern-Screening von cDNA-Expressions-Banken

(modifiziert nach Sägesser *et al.*, 1997)

Für die Identifizierung einzelner RNA-bindender Proteine wurden cDNA-Expressions-Banken nach potentiellen Kandidaten durchmustert.

50 ml Über-Nacht-Kulturen der Wirtsbakterien (Y1090 oder BI21(DE3)pLysE) wurden 5 min bei 5000 rpm und 4°C pelletiert, in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und zu einer OD₆₀₀= 1 verdünnt.

Mehrere 600 µl Aliquots der Bakterienkultur wurden mit 20000-40000 pfu der Phagen für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden diese zu 8 ml vorgewärmter (48°C) Top-Agarose pipettiert und nach kurzem Vortexen sofort auf vorgewärmte (37°C) 2 x YT-Platten (12 x 12 cm) gegossen. Nach dem Aushärten der Agarose erfolgte eine Inkubation bei 37°C.

Zur Induktion der Expression wurden Nitrocellulose-Filter zurechtgeschnitten und für 30 min in 10 mM IPTG getränkt und anschließend getrocknet. Der Transfer auf Nitrocellulose erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen.

a) λ-ZAP II cDNA Bank aus adulten Oregon R (Stratagene):

Hier erfolgte die Inkubation zuerst für 1,5 h bei 37°C, dann für weitere 3 h bei 42°C. Nun wurden die getränkten Nitrocellulose-Filter auf die Platten gelegt und weiter über Nacht bei 37°C inkubiert.

b) cDNA Bank aus poly(A)⁺RNA aus Hodengewebe Oregon R (siehe Ergebnisse 3.2):

Hier erfolgte die erste Inkubation (Plaque-Bildung) für 6-7 h bei 37°C. Dann wurden die getränkten Nitrocellulose-Filter auf die Platten gelegt und weiter über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit den Filtern zusätzlich 4 h bei 37°C inkubiert.

Die Position der Filter auf den Platten wurde zur späteren Plaque-Erkennung durch "Nadelstiche" markiert.

Glasschalen wurden bei 180°C für 2-3 h gebacken, um RNasen zu zerstören. In ihnen wurden alle weiteren Schritte bei 4°C durchgeführt.

Die Filter wurden zuerst kurz auf Whatmann-Papier getrocknet. Dann erfolgte ein Spülschritt, wobei 100 ml SB-Buffer ausreichend für 16 Membranen (übereinander

gelegen) sind. Es folgten fünf weitere Waschschriffe, je 5 min, auf einem Schüttler, um Bakterien- und Agarose-Reste zu entfernen.

Es schloss sich die Prähybridisierung für 30 min mit 50 ml SB-Puffer und 0,1 mg/ml Blocking-RNA an. Dann wurden die radioaktiv markierten *in vitro*-Transkripte (0,5 bis 1×10^6 cpm/ml) zugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Anschließend folgten vier Waschschriffe je 5 min mit 100 ml SB-Puffer. Die Membranen wurden nun getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Positive Klone konnten mit einer Pipettenspitze aus den Agarplatten ausgestochen und in 500 μ l SM-Puffer gegeben werden. Durch einen Tropfen Chloroform wurden die restlichen Bakterien abgetötet. Die Elution der Phagen erfolgte durch Schütteln (45 min bis 4 h) bei Raumtemperatur. Die Phagen wurden für einen zweiten und dritten Screening-Schritt verwendet.

Blocking-RNA:

1 g Hefe RNA (RNA type VI, torula yeast, Sigma) wurde in 10 ml TE (pH 7,5) gelöst und mit 5 μ g Proteinase K 2 h bei 37°C inkubiert. Nach einer anschließenden Phenol-Chloroform Extraktion (1:1, v/v, pH 8,0) wurde die RNA mit 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol für 5 min bei -20°C gefällt. Nach Pelletierung (10 min, 2000 rpm, 4°C) und anschließendem Waschschriff wurde die RNA zu einer Konzentration von 50 mg/ml in DEPC-dH₂O aufgenommen.

<u>SB (single screening buffer):</u>	15	mM	Hepes, pH 7,9
	50	mM	KCl
	0,5	mM	DTT
	0,1	mM	MnCl ₂
	0,1	mM	ZnCl ₂
	0,1	mM	EDTA
	0,1	%	Ficoll (w/v)
	0,1	%	Polyvinyl-Pyrrolidon (w/v)
	0,01	%	Nonidet-P40 (v/v)

2.16 Automatisches Subklonieren von rekombinanten Phagen

Nach der Isolierung rekombinanter Phagen können diese durch *in vivo*-Excision in Plasmid-Subklone umgewandelt werden.

2.16.1 *in vivo*-Excision von λ -Zap II Phagen-Inserts (modifiziert nach Protokoll Stratagene)

Eine frische Über-Nacht-Kultur des *E. coli* Stammes LE392 diene zum Animpfen einer 50 ml Kultur. Nach sechsstündiger Inkubation bei 37°C und 220 rpm wurden die Zellen bei 4500 rpm und 4°C pelletiert und in 25 ml 10 mM MgCl₂ aufgenommen.

1 μ l des Phagenstocks (EST-Klon, cDNA Bank, Yuji Kohara, Mishima, Japan) wurden mit 250 μ l Bakteriensuspension 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend zu 3 ml LB gegeben. Die Lyse erfolgte über Nacht bei 37°C oder gegebenenfalls durch weitere Inkubation von 4 h bei 42°C.

Die Bakterienreste wurden 1 min bei 12500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, welcher die Lambda-Phagen enthält, wurde mit einem Tropfen Chloroform versetzt, um durch Vortexen restliche LE392 Zellen abzutöten.

Aus dem Überstand wurden 40 μ l mit 1 ml LB gemischt und hiervon 250 μ l für die Coinfektion mit 250 μ l XL1-Blue MRF' Zellen (aus frischen Kulturen in 10 mM MgSO₄) und 1 μ l ExAssist Helfer-Phagen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37°C. Es wurden 3 ml LB-Medium zugegeben und für 2,5 bis 3 h bei 37°C geschüttelt. Das Abtöten der Bakterien erfolgte dann für 20 min bei 65°C. Anschließend wurde die Kultur für 15 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Er enthält die pBluescript Phagemid verpackt als filamentöse Phagenpartikel. 300 μ l, 100 μ l bzw. 10 μ l dieser Phagensuspension wurden zur Infektion von je 200 μ l SOLR-Zellen (frische Kultur in 10 mM MgSO₄) verwendet. Die SOLR-Zellen enthalten keine Ampicillin-Resistenz Gene, unterdrücken die Replikation der Helfer-Phagen und sind resistent gegen eine Lambda-Phagen-Infektion. Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Aliquots des Ansatzes auf LB-AMP-Platten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die so erhaltenen Kolonien enthalten den pBluescript SK⁻ doppelsträngigen Phagemid mit dem cDNA-Insert.

2.16.2 Automatisches Subklonieren durch Cre-vermittelte Plasmid-Excision

(nach Protokoll Novagen)

Positive rekombinante Phagen, welche bei dem Durchsuchen der λ SCREEN-1 cDNA Bank isoliert wurden, können durch das *loxP-Cre* System subkloniert werden. Die Phagen enthalten komplette Plasmide, welche von zwei 34 bp *loxP*-Sequenzelementen aus dem Bakteriophagen P1 flankiert sind. Die Plasmide werden durch Infektion eines "hosts" (BM25.8), welcher die P1 *Cre* Rekombinase exprimiert, subkloniert. Die *Cre*-Rekombinase erkennt die *loxP*-"sites" und stellt die Plasmide durch "site"-spezifische Rekombination wieder her. Ein weiterer Vorteil des Systems ist das Fehlen einer T7 Expression ohne exogene T7 RNA-Polymerase. So können auch cDNAs, welche für toxische Proteine kodieren, isoliert werden.

100 μ l einer entsprechenden Phagen-Verdünnung wurden mit 100 μ l BM25.8 Zellen (aus einer frischen über Nacht Kultur in LB mit 10 mM $MgSO_4$, 0,2 % Maltose (w/v), 50 μ g/ml Kanamycin, 34 μ g/ml Chloramphenicol) für 30 min bei 37°C inkubiert. 100 μ l des Phagen-Zellen-Gemischs wurden direkt auf eine LB-Ampicillin (oder Carbenicillin, 50 μ g/ml)-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Effizienz betrug ungefähr 10 %. Nach einer DNA-Minipräparation (siehe 2.7.1) wurden die Plasmide für weitere Experimente in DH5 α -Zellen transformiert (siehe 2.7.11).

2.17 Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Drosophila melanogaster Hoden wurden in PBS präpariert und auf Eis in einem Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt. Die Fixierung erfolgte in 4 % Formaldehyd in PBS auf einem Drehrad. Es folgten zwei Spülschritte und ein 5-minütiger Waschschrift jeweils mit PBT. Die Organe wurden dann für 1 bis 4 min mit 50 μ g/ml Proteinase K in PBT inkubiert. Der Verdau wurde durch Waschen mit 2 mg/ml Glycin in PBT (2 x 1 min) abgestoppt. Nach erneutem Spülen mit PBT (2 x) wurde für 20 min mit 4 % Formaldehyd (v/v) in PBS nachfixiert. Das Fixans wurde durch Spülen (2 x), Waschen (5 min) und Spülen (1 x) mit PBT entfernt. Es folgte das langsame Überführen in Hybridisierungslösung durch

Spülen in 50 % Hybridisierungslösung in PBT (v/v; 250 µl) und zweimaliges Spülen in 100 % Hybridisierungslösung (v/v; 250 µl). Es schloß sich die Vorhybridisierung für 1 h bei 50°C in 500 µl Hybridisierungslösung (v/v) an.

Als Sonde diente eine DIG-markierte DNA-Sonde (siehe 2.7.9). Diese wurde in 30 µl Hybridisierungslösung für 10 min in kochendem Wasser denaturiert, auf Eis abgekühlt und gegen die Hybridisierungslösung auf den Organen ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50°C im Wasserbad. Die Sonde wurde dann entfernt und die Organe mit je 500 µl Hybridisierungslösung für 5 min und 15 min gewaschen. Die allmähliche Überführung in PBT erfolgte durch Waschen mit 70 %, 50 % und 30 % Hybridisierungslösung (v/v) in PBT je 5 min. Nach drei weiteren Waschschritten (5 min, 10 min, 15 min) wurden die Organe für 2 h in 500 µl Antikörperlösung (1:2000, präadsorbierte anti-digoxigenin Antikörper) inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe in PBT (5 min, 10 min, 15 min) und zwei Spülschritte in Färbepuffer. Die Färbung erfolgte bei 37°C für 30 min bis zu mehreren Stunden.

Zur Präadsorption des Antikörpers wurden 50 Organe für 20 min fixiert, mit PBT dreimal gespült, gewaschen (5 min), erneut gespült und für 2 h mit dem Antikörper (1:1000 in PBT) auf dem Drehrad inkubiert.

Hybridisierungslösung:

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

Färbepuffer:

100	mM	Tris/HCl, pH 9,5
100	mM	NaCl
50	mM	MgCl ₂
1	mM	Levamisol
0,1	%	Tween 20 (v/v)

Färbelösung:

4,5	µl	NBT
3,5	µl	X-Phosphat
ad 1	ml	Färbepuffer

2.18 *C. elegans*-Kultur und RNAi-Experimente

2.18.1 *C. elegans*-Kultur

Für eine phänotypische Charakterisierung wurden RNAi-Experimente mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* durchgeführt. Es wurde der *C. elegans*-Stamm CB1489: *him-8* (*e1489*) IV verwendet. Die Tiere wurden auf NGM-Platten ("Nematode Growth Medium") bei Raumtemperatur gehalten (Brenner, 1974).

Die Injektion und das Soaking wurden von Herrn Dr. E. Schulze (Göttingen) durchgeführt.

2.18.2 Synthese von doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Für die Injektion bei den RNAi-Experimenten (siehe 3.3.2) und für die RNA-soaking-Experimente (siehe 3.3.3) wurde doppelsträngige RNA *in vitro* synthetisiert. Die *in vitro*-Transkription erfolgte in Abänderung eines Protokolls der Firma Ambion. Als Template diente ein PCR-Produkt, dessen Primer am 5' -Ende den T7-Promoter enthielten. Die Hybridisierung der synthetisierten, einzelsträngigen, komplementären RNAs erfolgte cotranskriptionell.

<u>Transkriptionsansatz:</u>	4	µl DEPC-dH ₂ O
	2	µl 10 x Reaktionspuffer
	2	µl ATP (75 mM Stocklösung)
	2	µl CTP (75 mM Stocklösung)
	2	µl GTP (75 mM Stocklösung)
	2	µl UTP (75 mM Stocklösung)
	4	µl Template DNA (400 ng)
	2	µl T7- Enzymmix

Die Reaktion erfolgte für 4,5 h bei 37°C. Zur Entfernung des DNA templates wurde 1 µl RQ1DNase zugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 115 µl DEPC-dH₂O und 15 µl Ammoniumacetat-Mix (5 M Ammoniumacetat, 100 mM EDTA) abgestoppt. Es folgte eine Phenol-Chloroform-

Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) Extraktion im Volumenverhältnis 1:1. Die wäßrige Phase wurde erneut mit 1 Volumen Chloroform extrahiert, um Phenol-Reste zu entfernen. Die dsRNA wurde für 15 min bei -20°C mit 150 μl Isopropanol gefällt und für 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol (v/v) gewaschen und hochkonzentriert (4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in DEPC-dH₂O aufgenommen. Die Überprüfung der dsRNA erfolgte in einem 1 %-igen Agarose-Gel (w/v).

2.18.3 Injektion von dsRNA

Die Injektion der dsRNA erfolgte in adulte Hermaphroditen. Es wurde ins Cytoplasma des syncytialen Gonadenarms nach einem Standardprotokoll injiziert (Fire, 1986). Nach 12 Stunden wurden die injizierten Tiere auf frische Platten gesetzt. Die F1-Generation ab diesem Zeitpunkt wurde dann analysiert.

2.18.4 RNA-Soaking (Maeda *et al.*, 2001) und DAPI-Färbung

Zur Untersuchung des postembryonalen Phänotyps wurden L1 Larven in einer Lösung mit der dsRNA inkubiert.

10-20 Hermaphroditen wurden gesammelt und mit M9 gewaschen. Die Tiere wurden aufgeschnitten und die Embryonen gesammelt. Nach dem Transfer der Embryonen in M9 in ein Eppendorfreaktionsgefäß erfolgte die Inkubation bei 25°C über Nacht. Die geschlüpften L1 Larven wurden auf eine frische NGM-Platte ohne Bakterien transferiert. Nach einigen Minuten wurden die Tiere in eine PCR-Reaktionsgefäß mit 4 μl der dsRNA in 200 μl Soaking-Puffer überführt und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte der Transfer auf frische NGM-Platten mit Bakterien.

<u>M9:</u>	6	g	Na ₂ HPO ₄
	3	g	KH ₂ PO ₄
	5	g	NaCl
	0,25	g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	ad 1	l	H ₂ O

Soaking Puffer:

0,25 x M9 (ohne Mg ²⁺)
3 mM Spermidin (Sigma)
0,05 % Gelatine (w/v)

DAPI-Färbung (4',6-Diamidino-2-Phenylindol):

Die Tiere wurden auf einen Objektträger in M9 Puffer überführt. Es erfolgte die Zugabe von 150 ng/ml DAPI-Lösung in Ethanol. Nach einer 30- minütigen Inkubation wurden die Tiere in M9 Puffer für 15 min rehydriert. Darauf folgte die mikroskopische Analyse.

3. Ergebnisse

3.1 *cis*-wirkende Kontrollelemente in der *don juan*-mRNA

In der Spermatogenese von *Drosophila* unterliegen viele Gene der Translationskontrolle. Ein testisspezifisch exprimiertes Gen ist *don juan* (*dj*). Die *don juan*-mRNA unterliegt der Translationsrepression bis nach der Meiose und zwar bis zum Stadium der elongierten Spermatiden (Santel *et al.*, 1997). Diese Translationsrepression wird durch Sequenzen im 117 nt langen 5' nicht-translatierten Bereich vermittelt, wie durch Transformationsexperimente mit Fusionsgenen zwischen *don juan* (+11/+114) und *lacZ* gezeigt wurde (Blümer *et al.*, im Druck). Dies legt nahe, daß genau dieses Segment mit regulatorischen Proteinen interagiert und so die Translation der *don juan*-mRNA steuert.

Die Charakterisierung möglicher Protein-RNA Interaktionen und die Identifizierung der beteiligten Proteine soll die Möglichkeit eröffnen, den zugrundeliegenden Mechanismus der Translationsrepression und nachfolgend auch der Translationsaktivierung zu studieren. Dieses Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl (Philipps-Universität Marburg) durchgeführt, um sich einander ergänzende *in vitro*- und *in vivo*-Daten zu erhalten. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf Protein-RNA Interaktionen *in vitro*. Zwei etablierte Methoden zur Untersuchung von Protein-RNA Wechselwirkungen sind "*electrophoretic mobility shift assays*" (EMSA) und UV-Crosslinking-Experimente. Mittels dieser Methoden wurden Protein-Interaktionen mit der *don juan*-mRNA charakterisiert.

3.1.1 Testesproteine binden spezifisch an ein 110 nt Fragment (+6/+115) der *don juan*-leader Sequenz

Da sich gezeigt hatte, daß durch den 5' UTR des *don juan*-leaders die Translationsrepression der *don juan*-mRNA vermittelt wird, wurde diese Region auf Protein-RNA Interaktionen getestet.

Der *dj*-Klon wurde freundlicherweise von N. Blümer (Marburg) zur Verfügung gestellt. Zunächst wurde die Sequenz +6 bis +115 relativ zum Transkriptionsstart

der *don juan*-mRNA mittels der Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I in den pGEM2 Vektor kloniert. Dieser Klon enthält somit 110 nt des 117 nt langen *dj*-leaders.

Durch Linearisierung mit *Bam*HI und Synthese mit der T7 RNA-Polymerase resultiert ein aus 149 nt bestehendes *in vitro*-Transkript, welches in EMSA Experimenten eingesetzt werden kann.

```

T7+1
5' GGGAGACCCAAGCUUGGGCUGCAGGUCGACUCUAG
   (+6)
   AGAUCUCAGAUUCAGUUUAGAUCUGAUUCCACAGACAAAUAGUCUCCAGCUGUGGUU
                                     (+115)
   UUUUCAAAAUUCUUUGUAAAACUUUUGGUACAAAUUUAAAAUUUUUCUCG
   GAUC 3'

```

Abb. 2: Nukleotidsequenz des *don juan* +6/+115 *in vitro*-Transkriptes

Plasmid-Sequenzen sind kursiv dargestellt. T7+1 bezeichnet den Transkriptionsstart der T7 Polymerase. In Klammern sind die Positionen relativ zum Transkriptionsstart der *don juan*-mRNA dargestellt. Die *Pvu*II-Schnittstelle ist fett gedruckt.

Für die unspezifische Kompetition wurden *in vitro*-Transkripte mit der Polylinker-Region des pGEM2 Vektors synthetisiert.

A) pGEM2-, *Eco*RI, T7 RNA-Polymerase, 55 nt:

```

+1
5' GGGAGACCCAAGCUUGGGCUGCAGGUCGACUCUAGAGGAUCCCCGGGCGAGCUCG 3'

```

B) pGEM2, *Hind*III, SP6 RNA-Polymerase, 59 nt:

```

+1
5' GAAUACACGGAAUUCGAGCUCGCCCGGGGAUCCUCUAGAGUCGACCUGCAGCCCAA
   GCU 3'

```

Abb. 3: Nukleotidsequenz der pGEM2 Kompetitor *in vitro*-Transkripte (Kontrolle)

Der Transkriptionsstart ist mit +1 gekennzeichnet.

Nach der Bindungsreaktion mit Testesproteinen und anschließender Auftrennung in einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel sind fünf Komplexe zu erkennen (Abb. 4: Spur 2). Diese sind nach steigender Mobilität mit A, B, C, D und E bezeichnet. Komplexe B, C und D enthalten die höchsten Transkriptmengen. Komplex A zeigt eine sehr geringe Intensität. Komplex E ist nur wenig vom freien ungebundenen Transkript getrennt, welches eine Bewertung erschwert.

Das unterschiedliche Laufverhalten der Komplexe kann einerseits darauf hindeuten, daß verschiedene Komplexe in dieser Region der RNA gebildet werden oder andererseits darauf, daß ein Komplex unterschiedliche Konformationen annehmen kann. Die Komplexe können auch aus einer Mehrzahl an Proteinen zusammengesetzt sein, die teilweise nicht alle gebunden haben und Intermediate ausbilden.

Zur Beurteilung der Spezifität der beobachteten Protein-RNA Interaktionen wurden der Bindungsreaktion verschiedene nicht markierte *in vitro*-Transkripte als Kompetitor zugefügt (Abb. 4). Im Experiment werden erst die Kompetitortranskripte zugegeben, so daß die Ausbildung der radioaktiv markierten Komplexe nur durch Verdrängung und Auflösung der Proteinbindung an nicht markierter, spezifisch oder unspezifisch gebundener RNA ermöglicht wird.

Durch die Zugabe von unspezifischen Kompetitor aus der Polylinker-Region des Vektors wurde die Komplexbildung nicht beeinflusst. Alle Komplexe konnten weiterhin in der gleichen relativen Intensität beobachtet werden, selbst bei einem 160-fachen Kompetitorüberschuß (Abb. 4: Spur 6 bis 8). Die Komplexbildung resultiert also nicht aus Wechselwirkung von Testesproteinen mit der Vektorsequenz.

Wurde nicht markiertes Transkript der gleichen *dj*-leader Sequenz als Kompetitor verwendet, ist die Komplexbildung mehr oder weniger stark beeinträchtigt (Abb. 4: Spur 3 bis 5). Die Ausbildung der Komplexe C und E wird durch die Zugabe spezifischen Kompetitors am stärksten beeinflusst. Komplex E war bereits nach der Zugabe von 10-fachem Kompetitorüberschuß nicht mehr nachweisbar, C war deutlich schwächer ausgeprägt. Komplex B zeigte bei 10-fachen Kompetitorüberschuß eine deutliche Reduktion und war bei 40-fachen Überschuß des nicht markierten *don juan in vitro*-Transkriptes (+6/+115) kaum noch nachweisbar. Die Komplexe A und D zeigten erst bei 40-fachen Überschuß eine geringere Ausprägung im Wettbewerbsexperiment und bilden sich nach 160-fachem Kompetitorüberschuß kaum noch aus. Die Kompetierbarkeit aller Komplexe mit dem gleichen unmarkierten *don juan in vitro*-Transkript zeigt, daß alle Komplexe durch eine spezifische Wechselwirkung von Komponenten aus dem Testesproteinextrakt mit dem +6/+115 *in vitro*-Transkript resultieren.

Die Komplexe wurden durch steigende Kompetitorzugabe in der Reihenfolge E, C und B, D und A in ihrer Intensität reduziert. Da im Experiment die unmarkierten Transkripte zuerst zugegeben wurden, muß ein Komplex, der bei einer geringen Zugabe von unmarkiertem spezifischen Kompetitor bereits verschwindet, auf einer besonders starken Bindung zu dieser spezifischen Sequenz beruhen. Damit ist Komplex E derjenige mit der höchsten, und die Komplexe A und D diejenigen mit den schwächsten Affinitäten.

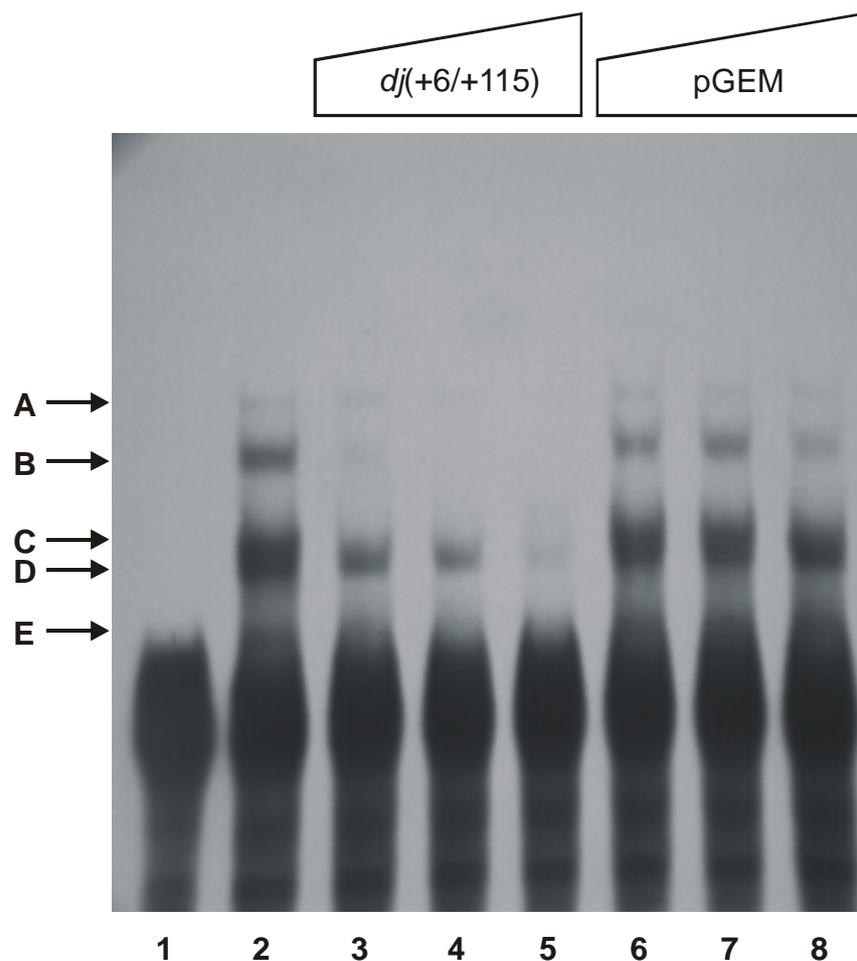


Abb. 4: Ausbildung spezifischer Protein-RNA Komplexe zwischen dem *don juan* +6/+115 *in vitro*-Transkript und Testesproteinextrakt

Testesproteinextrakt wurde mit radioaktiv markiertem *in vitro*-Transkript der *don juan*-leader Region +6 bis +115 inkubiert. Neben dem freien ungebundenen Transkript (Spur 1) ist die Ausbildung von Protein-RNA Komplexen mit Pfeilen gekennzeichnet (Spur 2 bis 8). Für Konkurrenzexperimente wurde das gleiche nicht markierte *in vitro*-Transkript (Spur 3 bis 5, 10-, 40-, 160-facher Überschuß) oder entsprechend ein unspezifisches pGEM2-Transkript (Spur 6 bis 8) vor der Bindungsreaktion mit dem radioaktiv markierten *in vitro*-Transkript zugegeben. Exposition 72 h bei -80°C .

3.1.2 Die mit Proteinen interagierenden Elemente der mRNA befinden sich in einer kleinen Region von 60 nt vor dem Translationsstartcodon

Bisher beschriebene *cis*-agierende regulatorische Elemente, welche an der Translationskontrolle beteiligt sind, sind wesentlich kürzer als die getestete 110 nt Region. Daher sollte es möglich sein, in dieser Region das Element oder die Elemente einzugrenzen, welche hinreichend für die Kontrolle der entscheidenden Protein-RNA Interaktionen sind. Hierfür wurde die *don juan*-Region mittels der internen *PvuII* Schnittstelle (siehe Abb. 2) in zwei Teile getrennt. Das erste Fragment umfaßt die Sequenz +6 bis +55 des *dj*-leaders (5' Fragment, *XbaI/PvuII*, 50 nt), und das zweite Fragment umfaßt die Sequenz +56 bis +115 des leaders (3' Fragment, *PvuII/BamHI*, 60 nt). Beide wurden in den Vektor pGEM2 (*HincII/XbaI* bzw. *HincII/BamHI*) subkloniert.

Das +6/+55 Fragment wurde mit *HindIII* linearisiert und ein 105 nt *in vitro*-Transkript mit der SP6 RNA Polymerase hergestellt. Nach der Linearisierung mit *EcoRI* und *in vitro*-Transkription mit der T7 RNA Polymerase resultiert ein 109 nt umfassendes *in vitro*-Transkript für das 3' Fragment.

5' Fragment +6/+55

```

SP6+1
5'  GAAATACACGGAATTTCGAGCUCGCCCGGGGAUCCUCUAG
    (+6)                                (+55)
    AGAUCUCAGAUUCAGUUUAGAUCUGAUUCCACAGACAAAUAGUCUCCAG
    GACCUGCAGCCCAAGCU 3'

```

3' Fragment +56/+115

```

T7+1
5'  GGGAGACCCAAGCUUGGGCUGCAGGUC
    (+56)
    CUGUGGUUUUUUCAAAAUUCUUUGUAAAACUUUUGGUACAAAUUUAAAAUUUUUCU
    (+115)
    CG GAUCCCCGGGCGAGCUCGAAUU 3'

```

Abb. 5: Nukleotidsequenz des *don juan* +6/+55 (5' Fragment) und des +56/+115 (3' Fragment) *in vitro*-Transkriptes

Plasmid-Sequenzen sind kursiv dargestellt. Die Transkriptionsstartpunkte der Polymerasen sind mit +1 gekennzeichnet. In Klammern sind die Positionen relativ zum Transkriptionsstart der *don juan*-mRNA dargestellt.

Wurde das 5' Fragment des *don juan*-leaders in EMSA Experimenten eingesetzt, konnten nur zwei sehr schnell laufende Banden im Gel beobachtet werden (Abb. 6: Spur 2-7). Diese werden als unspezifisch gewertet, da sie selbst bei einem 200-fachen Kompetitorüberschuß nicht mit dem gleichen unmarkierten *in vitro*-Transkript (Abb. 6: Spur 2-4 bzw. 5-7) kompetiert werden konnten. Auffälligerweise erhöht sich die Intensität dieser Banden mit der Menge an zugefügtem Kompetitor.

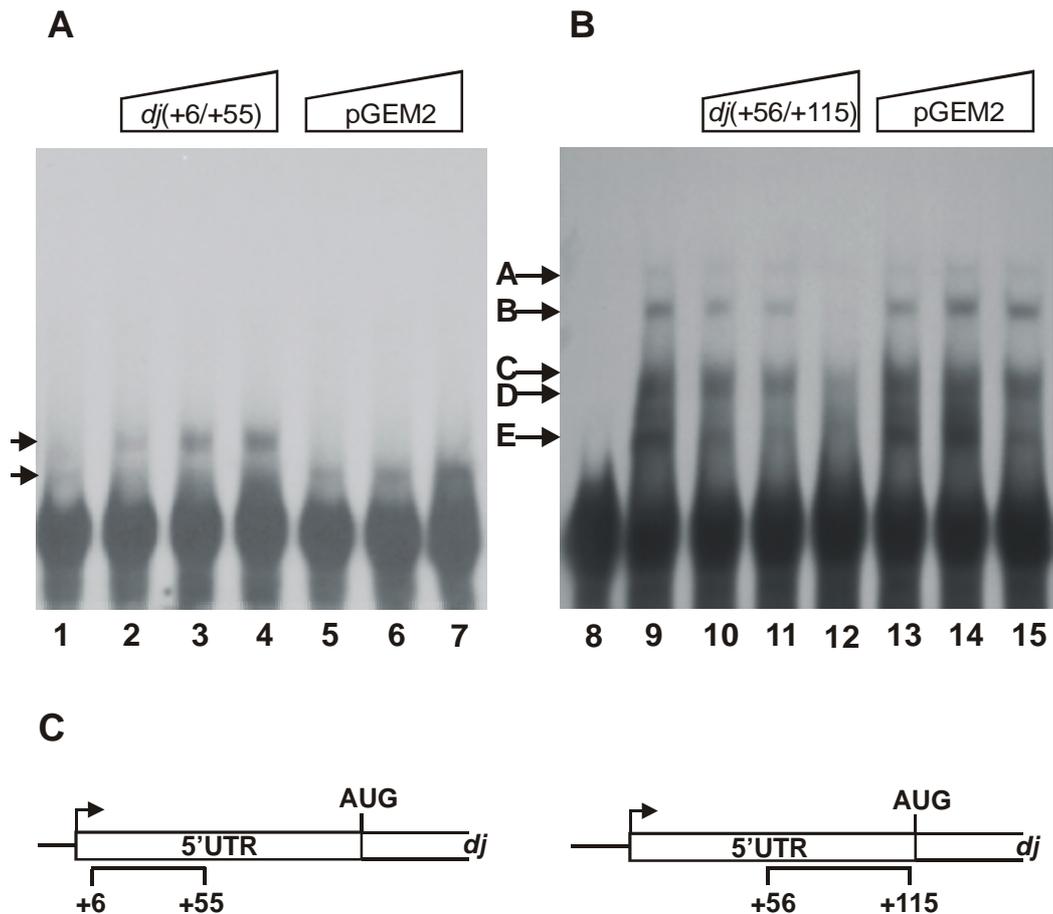


Abb. 6: Ein Fragment von 60 nt vor dem Translationsstart des *don juan*-Gens ist ausreichend für eine spezifische Komplexbildung

A) Testesproteinextrakt wurde mit radioaktiv markierten *in vitro*-Transkripten der ersten 50 nt (5' Fragment) des *dj*-leaders inkubiert. Zwei unspezifische Komplexe wurden gebildet (Pfeile), welche nicht mit dem gleichen unmarkierten *in vitro*-Transkript bei einem 20-, 80- oder 200-fachen Überschuß kompetiert werden können (Spur 2 bis 4).

B) Neben dem freien Transkript (Spur 8) ist der gleiche Ansatz für die 60 nt vor dem AUG (3' Fragment) dargestellt. Die Komplexe A bis E wurden ausgebildet. Die Konkurrenz erfolgte mit dem gleichen unmarkierten (Spur 10 bis 12; 20-, 80- oder 200-facher Überschuß) oder einem unspezifischen unmarkierten Kompetitor (Spur 13 bis 15; 20-, 80- oder 200-facher Überschuß). Die Menge an Kompetitortranskript ist schematisch über dem Gel dargestellt.

C) Schematische Darstellung der verwendeten Regionen des *don juan*-leaders.

Demgegenüber kommt es bei Verwendung des 3' Fragments des *dj*-leaders zur Ausbildung der bereits beschriebenen fünf Komplexe A bis E (Abb. 6: Spur 9). Komplex E ist hier als eindeutige Bande zu erkennen. Dies liegt daran, daß das hier verwendete kürzere *in vitro*-Transkript eine bessere Trennung von ungebundenem Transkript und Komplex E gewährleistet.

Die Bildung der Komplexe ist spezifisch, wie für den gesamten leader beobachtet. Die Zugabe von nicht markiertem *in vitro*-Transkript des 3' Fragmentes reduziert die Ausbildung der radioaktiv markierten Komplexe in abgestufter Weise (Abb. 6: Spur 10 bis 12).

Eine Übereinstimmung besteht ebenfalls darin, daß der auf die Komplexe A und D ausgeübte Effekt am schwächsten ist. Die Intensität des Komplexes A verringerte sich bei einem 200-fachen Kompetitorüberschuß kaum. Komplex B wurde im Vergleich zum +6/+115 *in vitro*-Transkript erst mit einem höheren Kompetitorüberschuß reduziert. Dies zeigte sich auch bei den Komplexen C und E. Die Zugabe unspezifischen Kompetitors zeigt keinen Einfluß auf die Komplexbildung (Abb. 6: Spur 13 bis 15).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß alle Sequenzen, welche für die Komplexbildung im leader der *dj*-mRNA notwendig sind, in den 60 nt vor dem Translationsstartcodon liegen. Diese Aussage wird zusätzlich durch Kompetitionsexperimente unterstützt, in welchen unmarkierte *in vitro*-Transkripte des 5' Fragmentes die Komplexbildung mit dem gesamten leader in keiner Weise beeinflussen (ohne Abbildung).

Die Ausbildung mehrerer Komplexe legt nahe, daß mehr als ein Protein mit der RNA interagiert. Wie schon in 3.1.1 erwähnt, kann dies einerseits aufgrund unterschiedlicher Interaktionen, andererseits aber auch aufgrund der unterschiedlichen Ausprägung ein und desselben Komplexes geschehen.

Die Daten wurden mit den analogen Konstrukten *in vivo* überprüft (Blümer *et al.*, im Druck). In Fusionsgenen zwischen *don juan* (+11/+114) und *lacZ* wurde das 5' Fragment (+11 bis +54) oder das 3' Fragment (+54 bis +114) deletiert. Beim Verlust des 5' Fragmentes ist nach Transformation nur postmeiotische

β -Galaktosidase Aktivität nachweisbar. Beim Verlust des 3' Fragmentes hingegen tritt auch in prämeiotischen Zellstadien β -Galaktosidase Aktivität auf.

Die 60 Nukleotide im 3' Fragment des 5' nicht-translatierten Bereiches sind somit für eine prämeiotische Translationsrepression der *don juan*-mRNA verantwortlich.

3.1.3 Die beobachteten RNA-bindenden Aktivitäten sind testisspezifisch

Translationskontrollphänomene sind nicht nur auf die männliche Keimbahn beschränkt. Daher ergibt sich die Frage, ob die Komplexbildung auch mit Proteinen aus anderen Geweben zu beobachten ist. Das wichtigste zu testende Gewebe ist dabei das Ovar, in welchem während der Entwicklung weiblicher Keimzellen extensive posttranskriptionelle Kontrollphänomene beschrieben sind (Seydoux, 1996; Hake & Richter, 1997).

Es wurde ein Proteinextrakt aus dem Ovar auf identischem Weg wie für den Testesproteinextrakt beschrieben, hergestellt und für "*mobility shift*" Experimente eingesetzt. Bei Verwendung des 3' Fragmentes vom leader als radioaktiv markiertes *in vitro*-Transkript konnte keine Komplexbildung beobachtet werden (Abb. 7: Spur 4). Daher ist es unwahrscheinlich, daß RNA-bindende Proteine, welche in Regulationsphänomenen während der Oogenese eine entscheidende Rolle spielen, an der Translationsrepression der *don juan*-mRNA beteiligt sind. Wurde hingegen das gesamte 110 nt Fragment als radioaktiv markiertes *in vitro*-Transkript in einer Bindungsreaktion mit Ovarproteinextrakt eingesetzt, konnte eine schwächere, aber definierte RNA-Bindungsaktivität beobachtet werden. Es wurden zwei neue Komplexe ausgebildet, welche im nativen Gel eine langsamere Laufgeschwindigkeit besitzen als die meisten mit Testesproteinen beobachteten Komplexe (Abb. 7: Vergleiche Spur 2 und 3). Dies zeigt, daß die interagierenden Komponenten sich von denen aus dem Testesgewebe unterscheiden. Da diese zwei Komplexe nur mit dem gesamten *don juan*-leader ausgebildet wurden und nicht mit dem 3' Fragment, muß die Wechselwirkung der Ovarproteine mit dem 5' Fragment des leaders erfolgen und deutet auf andere *cis*-agierende Elemente oder RNA-bindende Proteine aus dem Ovar hin. Eine biologische Relevanz ist allerdings nur dann abzuleiten, wenn gleiche Interaktionen stattfinden würden.

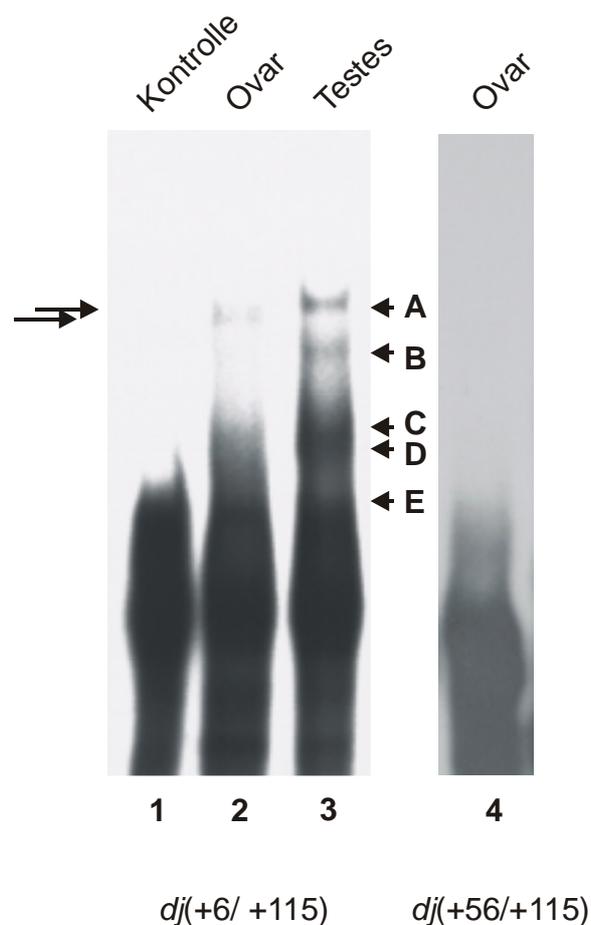


Abb. 7: Protein-RNA Interaktionen von Ovarproteinextrakt

Ovarproteinextrakt wurde mit radioaktiv markierten Transkripten inkubiert. Protein-RNA Interaktionen mit dem 110 nt Fragment des leaders sind neben dem freien Transkript (Spur 1) in Spur 2 dargestellt (Pfeile). Die Bindungsreaktion mit Testesproteinextrakt wurde hiermit verglichen (Spur 3). Zwischen Ovarproteinextrakt und dem 3' Fragment des *don juan*-leaders erfolgte keine Komplexbildung (Spur 4).

3.1.4 Einfluß von polyA und polyU auf die Proteinbindung

Der leader des *don juan* Gens enthält sehr AT reiche Sequenzen. Die beobachteten Bindungsaktivitäten könnten daher von Proteinen stammen, welche an polyA- oder polyU-Sequenzen binden (Nietfeld *et al.*, 1990; Burd *et al.*, 1991; Navaratnam *et al.*, 1995; Kühn & Pieler, 1996; Deardorff & Sachs, 1997).

Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden Konkurrenzexperimente mit polyU- oder polyA- Oligoribonukleotiden und dem 3' Fragment des leaders durchgeführt. Die Mehrzahl der beobachteten Komplexe bleibt auch bei einem

200-fachen Kompetitorüberschuß erhalten. Ein schwacher Effekt ließ sich in beiden Fällen lediglich auf Komplex B beobachten. Auf Komplex E dagegen hatte ausschließlich eine Kompetition mit polyA einen Einfluß (ohne Abbildung). Dies zeigt, daß die Nukleotide zumindest an einigen Bindungsaktivitäten beteiligt sind, die Komplexbildung aber nicht ausschließlich von dieser Sequenzcharakteristik abhängt.

3.1.5 TCE-ähnliche Sequenzen tragen nicht zur Translationsrepression der *don juan*-mRNA bei

Die Translationskontrolle während der Spermatogenese von *Drosophila* wurde bisher am besten für die mRNAs der *Mst(3)CGP*-Genfamilie charakterisiert. Sie besitzen im 5' nicht-translatierten Bereich das Translationskontrollelement (TCE), welches, z.B. im Fall des Gens *Mst87F*, Translationsrepression vermittelt und an Protein-RNA Wechselwirkungen beteiligt ist (Kuhn *et al.*, 1988; Schäfer *et al.*, 1990; Kempe *et al.*, 1993).

Vergleicht man die TCE-Sequenz mit 5' nicht-translatierten Bereichen weiterer mRNAs, welche der Translationsrepression in frühen Stadien der Spermatogenese unterliegen, so sind ähnliche Sequenzen vorhanden. Dies läßt eine generelle Kontrolle über TCE-artige Elemente vermuten.

Für die *don juan*-mRNA sind Ähnlichkeiten zwischen dem TCE und zwei Blöcke in dem 5' UTR an Position +90 bis 101 (Identität in neun von zwölf Nukleotiden) bzw. an Position +98 bis +109 (Identität in acht von zwölf Nukleotiden) zu erkennen (Abb. 8). Diese Ähnlichkeit bezieht sich auch auf ein Cytosin an der fünften Position des TCEs, welches in allen Mitgliedern der *Mst(3)CGP*-Genfamilie konserviert ist. Eine Mutation dieses Nukleotids in Verbindung mit der Mutation eines zweiten Nukleotids (Position 7) führt zum kompletten Verlust der Translationskontrolle (Schäfer *et al.*, 1990). Dies legt die Vermutung nahe, daß diese Sequenzähnlichkeiten auch funktionelle Relevanz besitzen. Die Blöcke befinden sich im 3' Fragment des *don juan*-leaders, welcher Wechselwirkungen mit Proteinen eingeht.

```

+28
Mst87F ACATCAAAATTT

+90      +98
dj      GGTACAAATTTAAAAATTT

+28      +43      +62
janB    GCACTAAACCTTTTCGGATCTAAATTAATCAGTTTGTACACAAATT

```

Abb. 8: Vergleich möglicher TCE Elemente in den 5' UTRs

Das *don juan* Sequenzelement +90 bis +109 zeigt Homologien zum Translationskontrollelement TCE der *Mst(3)CGP*-Genfamilie. Das am besten charakterisierte Gen dieser Familie ist *Mst87F*. Auch zum Gen *janusB* besteht eine Sequenzähnlichkeit. Rot sind identische Nukleotide eines potentiellen TCE's (blau hinterlegt) im Vergleich zu *Mst87F* dargestellt.

Sollte ein funktionaler Zusammenhang zwischen dem TCE der *Mst(3)CGP* Genfamilie und dem *don juan* Sequenzelement +90 bis +109 bestehen, ist davon auszugehen, daß gleiche Proteinfaktoren an die jeweiligen mRNAs binden. Um dies zu testen, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Wie in 3.1.1 beschrieben, läßt sich die Komplexbildung zwischen dem *don juan* +6/+115 *in vitro*-Transkript und Testesproteinen spezifisch durch ein nicht markiertes *dj in vitro*-Transkript kompetieren (Abb. 9: Spur 3 und 4). Vor der Bindungsreaktion mit dem radioaktiv markierten *don juan in vitro*-Transkript wurde nun nicht markiertes *Mst87F* -5/+47 (Sequenz siehe Abb. 16) zugegeben. Auch bei der Konkurrenz ist die Ausbildung der typischen Komplexe sichtbar (Abb. 9: Spur 5 und 6). Eine Verringerung der Intensität der Komplexbanden B, C und E läßt sich erkennen (Abb. 9: Spur 5 und 6). Im Vergleich zur Konkurrenz mit dem gleichen Überschuß an *don juan* Transkript ist dies jedoch in deutlich geringerem Maße der Fall. Komplex E ist bei einem geringen *don juan* Kompetitorüberschuß (10- bis 130-fach) nicht mehr nachweisbar. Eine schwache Verringerung der Intensität dieses Komplexes bei der Konkurrenz mit dem nicht markierten *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript tritt erst bei einem 260-fachen Überschuß auf (Abb. 9: Spur 6). Komplex B und Komplex C lassen sich ebenfalls erst bei einem 260-fachen Kompetitorüberschuß beeinflussen. Die Komplexe A und D zeigen überhaupt keine Veränderung der Ausbildung bei Zugabe des nicht markierten *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript. Die Komplexbildung erfolgt daher mit einer wesentlich höheren Affinität mit der *don juan*-mRNA als mit der *Mst87F*-mRNA.

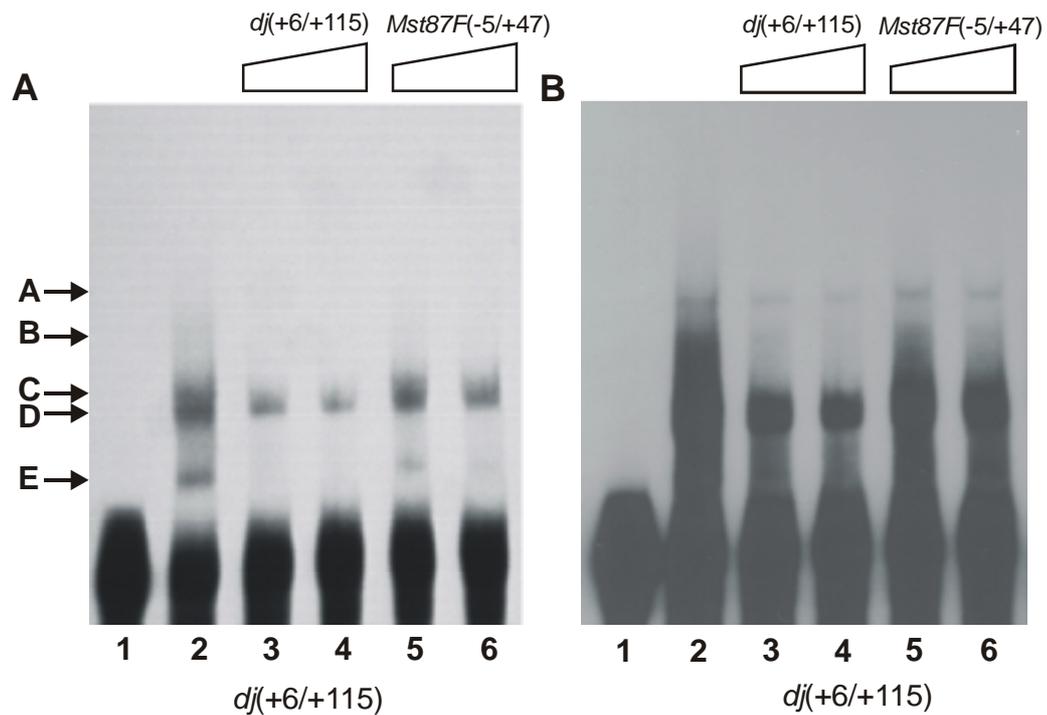


Abb. 9: Konkurrenz der Komplexbildung im *don juan*-leader mit dem *Mst87F* *in vitro*-Transkript

Testisproteinextrakt wurde mit radioaktiv markiertem *in vitro*-Transkript der *don juan*-leader Region +6 bis +115 inkubiert. Neben dem freien Transkript (Spur 1) ist die Ausbildung von Protein-RNA Komplexen mit Pfeilen gekennzeichnet (Spur 2). Konkurrenzexperimente wurden mit dem gleichen nicht markierten *in vitro*-Transkript (Spur 3 und 4, 130- und 260-facher Überschuß) oder entsprechend mit dem *Mst87F*-5/+47 *in vitro*-Transkript (Spur 5 und 6, 130- und 260-facher Überschuß) durchgeführt. A und B zeigen das gleiche Gel mit unterschiedlichen Expositionszeiten (A: Exposition 17 h bei -80°C ; B: Exposition 72 h bei -80°C).

Um eine Bedeutung der TCE Sequenzen im Fall des *don juan* 5' UTR sicher ausschließen zu können, wurde dieser Bereich gezielt verändert und getestet. Zwei Nukleotidaustausche (Position +94, C zu A; Position +96, A zu C) beeinträchtigten die Komplexbildung des *don juan*-leaders mit Testesproteinen in einem EMSA-Experiment in keiner Weise (ohne Abbildung), im Gegensatz zu den Beobachtungen für das TCE der *Mst87F*-mRNA. Die Klonierung der verwendeten Konstrukte erfolgte durch Hybridisierung von DNA-Einzelstrang Oligonukleotiden (siehe Abschnitt 2.7.5) und anschließender Ligation in die *XbaI/HindIII* Schnittstelle des pGEM2 Vektors. In einem weiteren Experiment wurden beide möglichen TCEs deletiert. Der *don juan*-Anteil beträgt dabei 39 nt von Position +56 bis +115, wobei die Nukleotide +89 bis +109 intern deletiert sind.

Nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* und Verwendung der T7 RNA-Polymerase entsteht folgendes *in vitro*-Transkript:

```

5 ` GGGAGACCCAAGCU
   (+56)                                     (+115)
   CUGUGGUUUUUUCAAAAUUCUUUGUAAAACUUUΔUUCUCG
   CUAGUGAUCCCCGGGCGAGCUCGAAUU 3 `

```

Abb. 10: Nukleotidsequenz des *don juan* +56/+115 Delta +89/+109 *in vitro*-Transkriptes

Plasmid-Sequenzen sind kursiv dargestellt. In Klammern sind die Positionen relativ zum Transkriptionsstart der *don juan*-mRNA gezeigt. Die Position der Deletion ist gekennzeichnet (Δ).

Wird dieses radioaktiv markierte *in vitro*-Transkript in EMSA Experimenten mit Testesproteinextrakt eingesetzt, resultiert nur ein Komplex (Abb. 11: Spur 2). Dieser hat eine ähnliche Wanderungsgeschwindigkeit wie der C, D Komplex und ist nur bei langen Expositionszeiten darzustellen. Dies zeigt, daß im Fall der Deletion des möglichen TCEs, ebenfalls eine Komplexbildung möglich ist. Die Interaktionen sind bei weitem nicht so komplex, wie bei Verwendung des kompletten leaders oder des 3' Fragmentes des leaders allein. Die stabile Ausbildung der gesamten Interaktionen erscheint somit abhängig von einem größeren Sequenz-Zusammenhang zu sein.

Es wurde der Nachweis erbracht, daß eine Proteinbindung an den vorderen Abschnitt des 3' Fragmentes erfolgt, nämlich im Bereich +56 bis +88. Die Ausbildung der anderen Komplexe erfolgt wahrscheinlich über weitere Protein-Protein-Interaktionen.

Die parallel in der Arbeitsgruppe von R. Renkawitz-Pohl (Marburg) durchgeführten Transformationsexperimente mit entsprechenden Genfusionen belegen, daß die Deletion dieses TCE-ähnlichen Bereiches die Translationskontrolle nicht beeinflussen. Somit kann eine Funktion des TCE ausgeschlossen werden, und ein völlig anderes Element muß die Bindung der regulatorischen Proteine vermitteln.

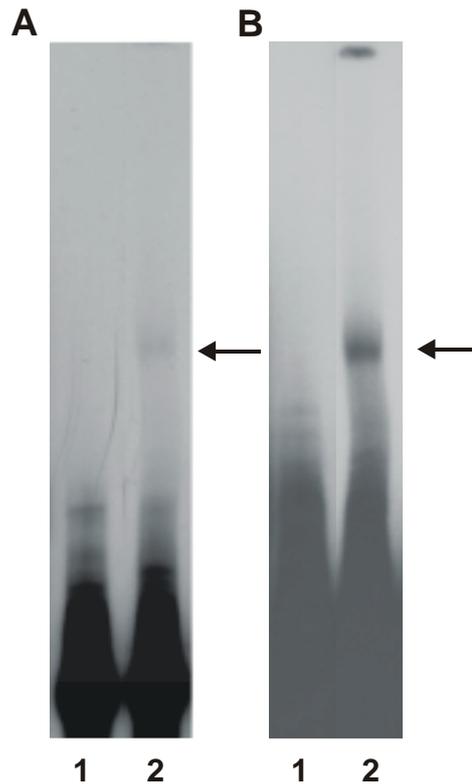


Abb. 11: Komplexbildung in der +56/+88 Region des *don juan*-leaders

Testesproteinextrakt wurde mit einem radioaktiv markierten *in vitro*-Transkript des 3' Fragmentes der *don juan*-leader Sequenz inkubiert, in welchem die Region +89 bis +109 deletiert ist. Neben dem freien Transkript (Spur 1) ist die Ausbildung eines einzelnen Komplexes (Spur 2, Pfeil) zu erkennen. A und B zeigen das gleiche Gel mit unterschiedlichen Expositionszeiten (A: Exposition 17 h bei -80°C ; B Exposition 192 h bei -80°C).

3.1.6 Der *don juan* 5' UTR bildet eine stabile Sekundärstruktur aus

Neben einer sequenzspezifischen Bindung von Proteinen an RNAs ist auch eine strukturabhängige Bindung weit verbreitet. Die meisten RNAs bilden definierte Sekundärstrukturen aus und ermöglichen so eine spezifische Proteinbindung. Dies wurde sehr gut untersucht im Fall des IRE ("*iron response element*") der *Ferritin*-mRNA (z.B. Theil, 1993) und wurde auch für das *Drosophila* RNA-bindende Protein B52 (Shi *et al.*, 1997) nachgewiesen. In der Säugerspermatogenese auftretende Translationskontrollmechanismen erfordern auch zum Teil die Ausbildung von Sekundärstrukturen in den mRNAs, die dieser Kontrolle unterliegen (z.B. Schlicker *et al.*, 1997). Da eine initiale Proteinbindung an die *don juan*-mRNA nicht von einer TCE-Homologie abhängig ist (siehe oben), wurde untersucht, ob der 5' UTR in der Lage ist, eine Sekundärstruktur auszubilden. In

einer computergestützten Analyse zeigte sich, daß eine stabile Sekundärstruktur über den gesamten *don juan*-leader ausgebildet werden kann. Innerhalb der funktional relevanten leader Sequenz besteht diese aus einer hairpin ("Haarnadel") bzw. stem-loop Struktur mit einem terminalen und zwei internen loops (Abb. 12).

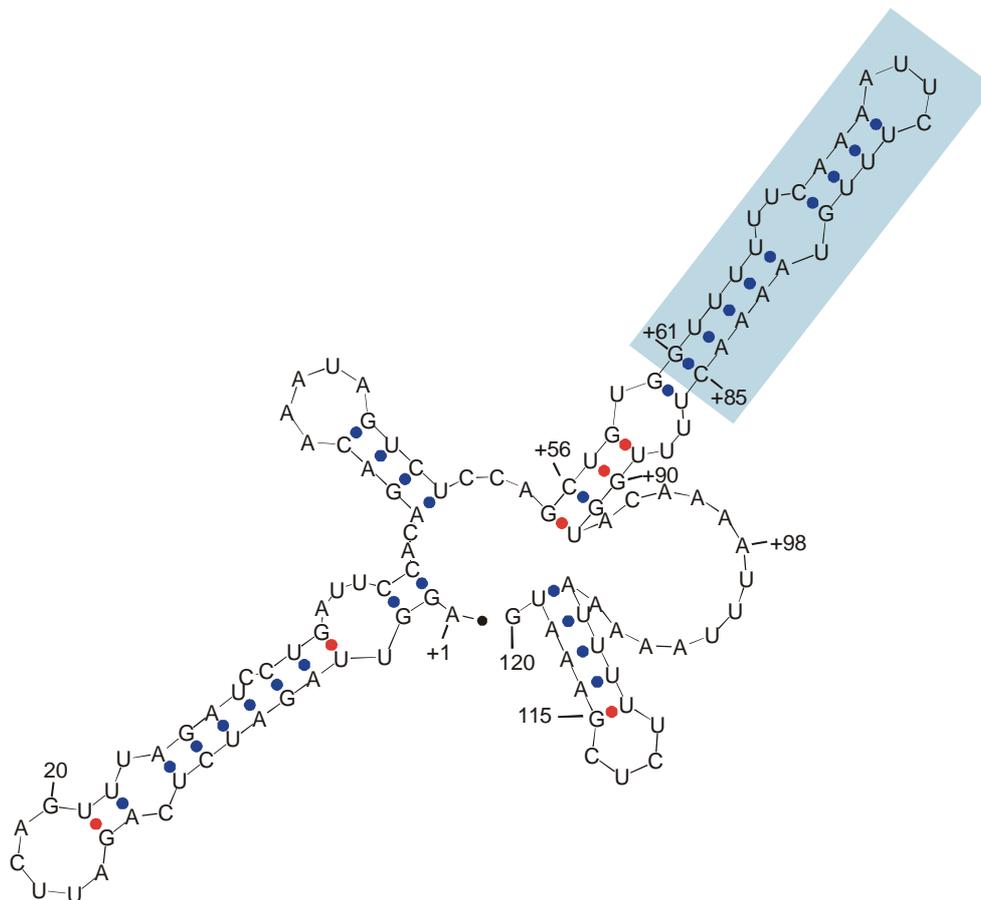


Abb. 12: Sekundärstruktur des *don juan* 5' UTR

Die Sekundärstruktur des kompletten *don juan*-leaders wurde mit dem Computer-Programm mfold 2.3 (Jaeger *et al.*, 1989; Walter *et al.*, 1994; Zuker *et al.*, 1999) berechnet. Für die Berechnung wurde der Temperaturparameter von 24°C festgelegt, da dies die Inkubationstemperatur bei der Komplexbildung ist und den Zuchtbedingungen der Fliegen entspricht. Die stem-loop Struktur beginnt an der Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *PvuII*, welche für die Aufteilung des *don juan*-leaders verwendet wurde. Das Oligonucleotid, welches für das UV-Crosslinking Experiment (siehe 3.1.7) verwendet wurde, ist blau hinterlegt. Die Zahlen definieren die Nucleotidposition in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt.

Diese hairpin-Struktur wird sowohl im Sequenzkontext des gesamten leaders vorhergesagt, als auch bei Verwendung des 3' Fragmentes allein. Der stem-loop befindet sich in der Region des leaders, welcher essentiell ist für die

Translationsrepression *in vivo* (Blümer *et al.*, im Druck) sowie für die Interaktion mit potentiellen regulatorischen Proteinen.

3.1.7 Ein 62 kDa Protein bindet spezifisch in der stem-loop Region +61/+85 des *don juan*-leaders

Zur weiteren Eingrenzung des Bereiches, in welchem für die Translationsrepression relevante Protein-RNA Interaktionen stattfinden und zur Klärung, ob eine Proteinbindung in der stem-loop Struktur erfolgt, wurden zwei Oligoribonukleotide synthetisiert (MWG). Das erste Oligoribonukleotid besteht aus den 25 zentralen Nukleotiden der stem-loop Struktur +61 bis +85 (Abb. 12). In dieser Sequenz befindet sich ein interner loop bestehend aus 3 Uridin Basen. Bei dem zweiten Oligoribonukleotid wurden diese Nukleotide deletiert. Durch diese Deletion bleibt die stem-loop Struktur erhalten, lediglich der interne loop fehlt (Abb. 14). Diese Oligoribonukleotide wurden für Wettbewerbsversuche eingesetzt. Auch hier erfolgte die Zugabe des Kompetitors vor der Bindungsreaktion mit dem radioaktiv markierten *in vitro*-Transkript. Die Abbildung 13 zeigt die Konkurrenz der Komplexbildung mit dem 3' Fragment des *don juan*-leaders. Die Komplexe B, C und E bilden sich nach Zugabe von Wildtyp Oligoribonukleotid deutlich schwächer aus. Die Ausbildung des Komplexes D ist nur nach der Zugabe hoher Konzentrationen der Wildtyp Sequenz schwach betroffen. Das mutierte Oligoribonukleotid zeigte dagegen nur einen sehr geringen Einfluß auf die Komplexbildung von B und C. Die Ausbildung des Komplexes A war weder in dem einen noch in dem anderen Fall der Konkurrenz beeinträchtigt. Wurde der komplette *don juan*-leader als markiertes *in vitro*-Transkript verwendet, konnte eine ähnliche Situation beobachtet werden (Abb. 13 B). Der Effekt der Konkurrenz ist jedoch stärker ausgeprägt. Hier läßt sich auch Komplex E mit beiden Oligoribonukleotiden konkurrieren. Das mutierte Oligoribonukleotid zeigt einen geringen (im Fall der Komplexe B und C) oder gar keinen (Komplex D) Einfluß auf die Komplexbildung. In dieser Konstellation lassen sich Komplex A und Komplex D selbst mit einem 200-fachen Überschuß der Sequenz +61/+85 nicht konkurrieren. Dies deutet daraufhin, daß in diesen beiden Fällen die zur Komplexbildung führenden Interaktionen außerhalb der Region +61/+85 liegen. Die Beeinträchtigung der anderen Komplexe beweist, daß Proteine an die Sequenz +61/+85 spezifisch

binden. Dabei ist die korrekte Sequenz und gegebenenfalls eine sich bildende Sekundärstruktur erforderlich, wie die sehr stark abgeschwächte Konkurrenz mit dem mutierten Oligoribonukleotid zeigt. Somit bestätigt sich die Reihenfolge der Beeinträchtigungen und damit die unterschiedliche Affinität aus den vorangegangenen Experimenten (siehe 3.1.1 und 3.1.2).

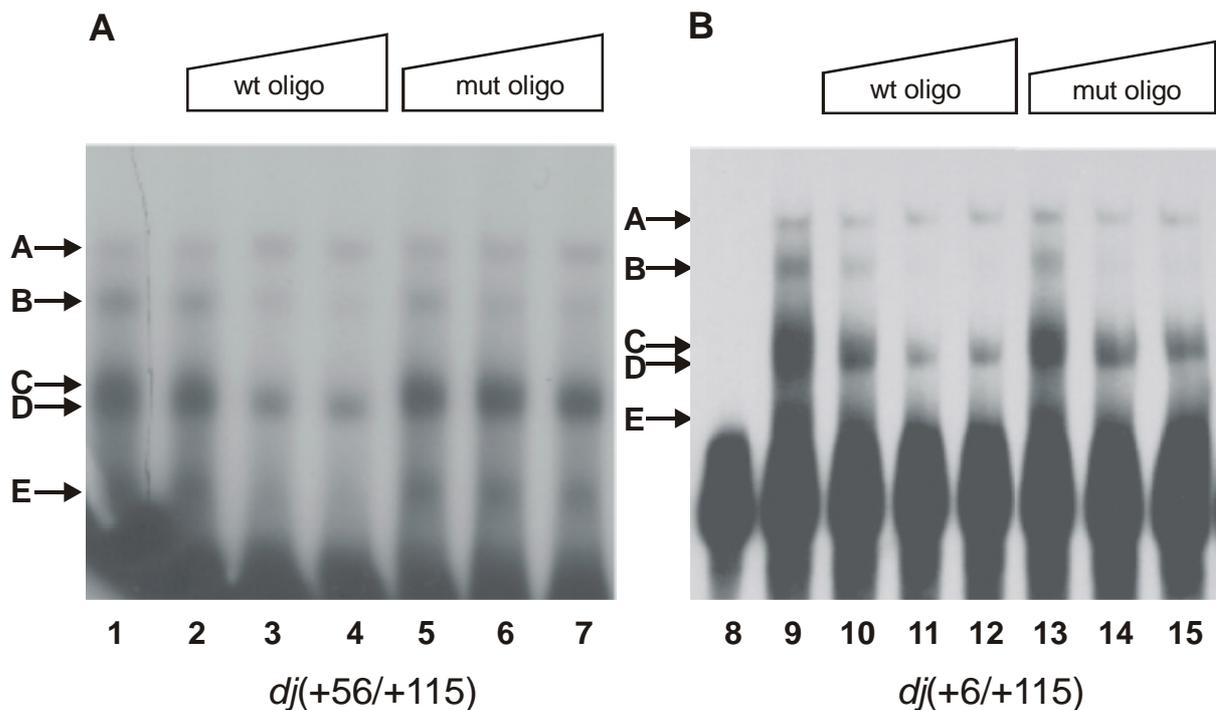


Abb. 13: EMSA mit dem *dj* +56/+115 *in vitro*-Transkript bzw. mit dem *dj* +6/+115

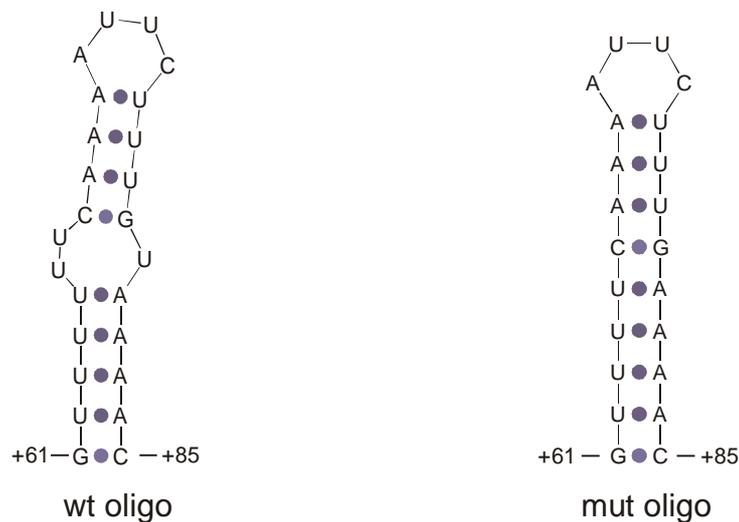
***in vitro*-Transkript und die jeweilige Konkurrenz mit Oligoribonukleotiden aus der stem-loop Region**

Testesproteinextrakt wurde mit radioaktiv markiertem *in vitro*-Transkript des 3' Fragmentes der *don juan*-leader Region +56 bis +115 (A) bzw. mit dem kompletten 110 nt Fragment der *don juan*-leader Region +6/+115 (B) inkubiert. Spur 8 zeigt das freie *in vitro*-Transkript. Die Ausbildung von Protein-RNA Komplexen ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Konkurrenzexperimente wurden mit dem nicht markierten Wildtyp-Oligoribonukleotid (Spuren 2 bis 4 in (A), Spuren 10 bis 12 in (B), jeweils 10-, 100-, 200-facher Überschuß) oder entsprechend mit dem mutierten Oligoribonukleotid (Spuren 5 bis 7 in (A) und Spuren 13 bis 15 in (B)) durchgeführt.

Für die Identifizierung erster Interaktionspartner wurden UV-Crosslinking-Experimente durchgeführt. Bei Verwendung der +6/+115 *in vitro*-Transkripte entstanden drei Gruppen von Banden im Molekulargewichtsbereich von 70 - 90 kDa, 55 - 65 kDa und 40 - 50 kDa. Die größte Gruppe zeigte eine hohe

Sensitivität gegenüber der Zugabe von Heparin. Heparin hatte auch einen geringen Einfluß auf die Ausbildung der mittleren Gruppe.

Die Zugabe von tRNA reduzierte die Ausbildung der Banden von 40 - 50 kDa (ohne Abbildung). Die mittlere Gruppe zeigte die stabilste Ausprägung. Sie besteht aus einem Banden-Triplet.



wt(+61/+85)

5' -GUUUUUUCAAAAUUCUUUGUAAAAC-3'

mut (+61/+85, ΔU66, ΔU67, ΔU80)

5' -GUUUUCAAAAUUCUUUGUAAAAC-3'

Abb. 14: Sequenz und berechnete Sekundärstruktur der verwendeten Oligoribonukleotide

Beide Oligoribonukleotide umfassen die Sequenz +61 bis +85 des *don juan*-leaders. In der mutierten Sequenz sind die Nucleotide +66, +67 und +80 deletiert (siehe auch Abb. 12).

Verwendet man die zentralen 25 Nucleotide der stem-loop Struktur als radioaktiv markiertes Oligoribonukleotid in UV-Crosslinking-Experimenten, ist ein ähnliches Bandenmuster zu erkennen. Auch hier ist ein Triplet um 60 kDa auffällig (Abb. 15). Die zwei schneller laufenden Banden des Triplets sind bereits ohne RNase Behandlung zu beobachten (Abb. 15: Spur 2). Die größte Bande wurde erst nach RNase Behandlung erkennbar. Die Zugabe von unmarkierten Kompetitor-Oligoribonukleotiden beeinflusst nur die Ausbildung der obersten größten Bande des Triplets. Diese Bande zeigt ein relatives Molekulargewicht von 62 kDa. Demnach bindet ein einzelnes Protein mit dem Molekulargewicht von 62 kDa und

muß somit in einer sequenz- oder strukurspezifischen Interaktion mit diesem Segment des *don juan*-leaders stehen. Dabei wird zur Vereinfachung außer acht gelassen, daß die gebundene RNA natürlich zu dem ermittelten Molekulargewicht beiträgt (max. 7,5 kDa).

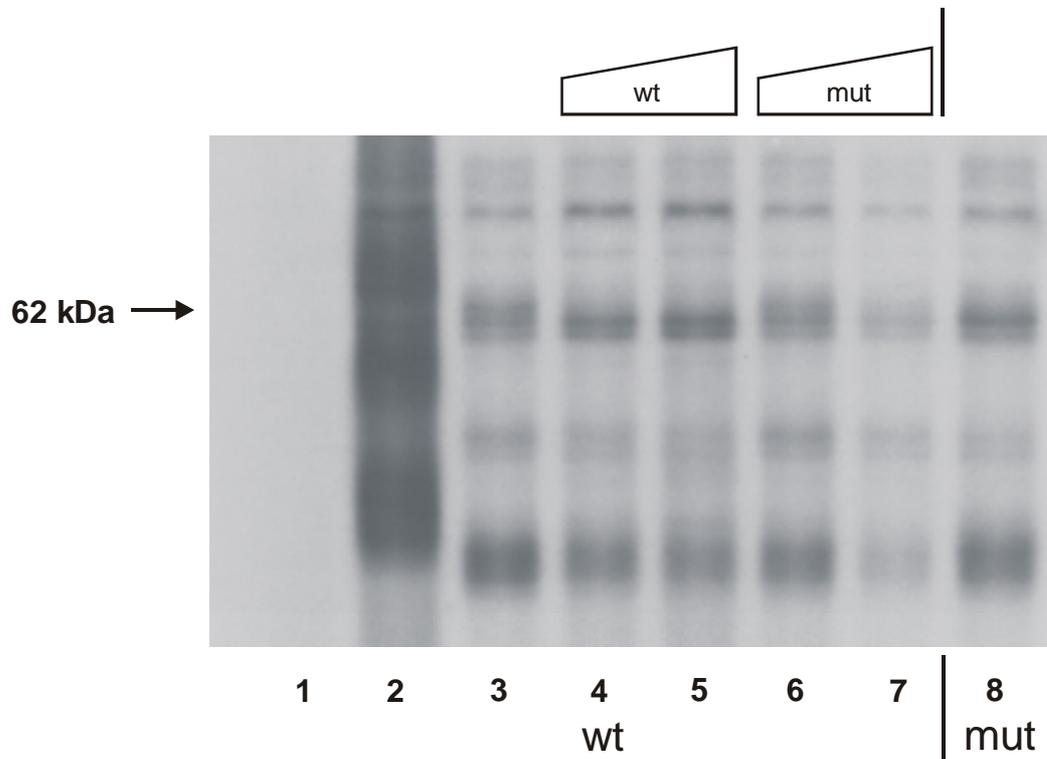


Abb. 15: Ein 62 kDa Protein bindet in der regulatorisch relevanten stem-loop Struktur des *don juan*-leaders

Testesproteinextrakt wurde mit radioaktiv markierten Oligoribonukleotiden (Wildtyp-Sequenz in den Spuren 1 bis 7, mutierte Sequenz in Spur 8, siehe Abb. 14) inkubiert, mit UV-Licht bestrahlt und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Steigende Konkretorkonzentration (120-fach, 1200-fach) ist jeweils für die nicht markierte Wildtyp Sequenz (wt) bzw. für die unmarkierte mutierte Sequenz (mut) über dem Gel angedeutet. Die einzige Proteinbande, welche spezifisch kompetiert werden kann, ist mit ihrem berechneten relativen Molekulargewicht und einem Pfeil gekennzeichnet.

Um eine Eingrenzung der für die Proteinbindung notwendigen relevanten Nukleotide zu erreichen, wurde das mutierte Oligoribonukleotid für die oben beschriebenen UV-Crosslinking-Experimente verwendet. Durch die Deletion ist die Ausbildung des stem-loops nicht betroffen. Lediglich der interne loop bildet sich nicht mehr aus (Abb. 14). Bei der Verwendung dieses Oligoribonukleotids als unmarkierter Konkretor ist die Fähigkeit zur Konkurrenz um die Bindung des

62 kDa Proteins stark reduziert (Abb. 15: Vergleiche Spur 4, 5 mit 6, 7). Während ein 120-facher Überschuß des Wildtyp Oligoribonukleotids die Ausbildung der radioaktiv markierten 62 kDa Bande vollständig verhindert, muß im Falle der mutierten Sequenz eine zehnfach höhere Menge für den gleichen Effekt eingesetzt werden. Wird ein radioaktiv markiertes mutiertes Oligoribonukleotid direkt in UV-Crosslinking-Experimenten eingesetzt, bilden sich nur die zwei schneller laufenden Proteinbanden der Dreiergruppe aus (Abb. 15: Spur 8).

Somit konnte der Nachweis erbracht werden, daß ein Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 62 kDa im Sequenzelement +61/+85 des *don juan*-leaders spezifisch bindet. Die Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur in dieser Region stützt die Hypothese, daß es sich hierbei um eine strukturspezifische Bindung handelt.

Da der Bereich +55 bis +89 des *don juan* 5' nicht-translatierten Bereiches in Transformationsexperimenten Translationsrepression vermittelt (Blümer *et al.*, im Druck), könnte es sich bei dem beobachteten Protein um ein Repressorprotein handeln.

3.2 Identifizierung *trans*-wirkender Faktoren der *Mst87F*-mRNA

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, daß regulatorische Proteine an die *don juan*-mRNA binden. Die Bindung erfolgt dabei an ein kurzes Sequenz-Fragment, möglicherweise aufgrund einer ausgeprägten Sekundärstruktur. Ein bereits charakterisiertes Sequenzelement, welches Translationskontrolle vermittelt, ist das TCE ("translational control element") der *Mst(3)CGP*-Genfamilie von *Drosophila melanogaster*, zu dem auch Teile der *don juan*-mRNA Übereinstimmung zeigen. Ein Mitglied der *Mst(3)CGP* Genfamilie ist das Gen *Mst87F* (Kuhn *et al.*, 1988, 1991; Schäfer *et al.*, 1993). Das TCE der *Mst87F*-mRNA, zeigt komplexe Interaktionen mit Testesproteinextrakten (Kempe *et al.*, 1993; Penninggers, 1995; Schreiter, 1998). Für das Verständnis regulatorischer Mechanismen ist es von entscheidender Bedeutung, die beteiligten Faktoren (*trans*- und *cis*- wirkende Faktoren) zu identifizieren und zu charakterisieren. Um potentielle Bindungspartner für das TCE zu identifizieren, wurden mehrere Alternativen getestet, die im folgenden dargestellt sind.

In allen Ansätzen wurden *in vitro*-Transkripte aus dem 5' nicht-translatierten Bereich von *Mst87F* eingesetzt. Als Template für die *in vitro*-Transkription stand der Klon p3839, der *Mst87F*-Sequenzen von -5 bis +201 enthält (Kuhn, 1988), zur Verfügung. Nach Linearisierung mit *MaeI* und Transkription mit der T7 RNA-Polymerase resultiert folgendes *in vitro*-Transkript:

```
5' GGGAGACCGGAAUUCGG
    (+1)
    GUAUCAUUAUUUAUUUGUCCUUUCGGCCUGAACACAUCAAAAUUUGUCGUCUA 3'
```

Abb. 16: *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript

Die Sequenz beginnt am Transkriptionsstart der T7-Polymerase. Plasmid-Sequenzen sind kursiv dargestellt. Die Sequenz des TCEs ist fett gedruckt. Der Transkriptionsstart des *Mst87F* Gens ist mit (+1) bezeichnet.

Das *in vitro*-Transkript enthält die *Mst87F*-Sequenz von -5 bis +47. Obwohl auch kürzere RNA-Fragmente zur Komplexbildung fähig sind, wurde eine höhere Bindungsaffinität beobachtet, wenn angrenzende Sequenzen um das TCE vorhanden waren (Kempe *et al.*, 1993; Kempe 1995).

3.2.1 Ammoniumsulfatfällung

Für eine Fraktionierung von Proteinen ist die differentielle Präzipitation durch Ammoniumsulfat geeignet. Diese Methode wurde verwendet, um verschiedene Proteine in den Fraktionen zu konzentrieren.

Nach der Aufarbeitung der *Drosophila*-Männchen wurden sowohl Proteinfractionen aus dem Überstand als auch aus dem wieder gelösten Pellet gewonnen.

Tab.2: Übersicht über die gewonnenen Proteinfractionen

<u>Überstand</u>		<u>Pellet</u>	
<u>Fraktion</u>	<u>(NH₄)₂SO₄</u>	<u>Fraktion</u>	<u>(NH₄)₂SO₄</u>
A1	Ausgangslysat	A7	Pellet
A2	20 %	A8	50 %
A3	40 %	A9	Restüberstand
A4	60 %		
A5	80 %		
A6	Restüberstand		

Nach der Ammoniumsulfatfällung wurde die Proteinzusammensetzung in einer SDS-PAGE analysiert (nicht gezeigt). In allen Fraktionen ist ein komplexes Bandenmuster zu erkennen. Die meisten Proteine präzipitieren bei 60 % (NH₄)₂SO₄ bzw. bei 50 % (NH₄)₂SO₄.

Um nachzuweisen, in welcher Fraktion RNA-bindende Aktivitäten konzentriert sind, wurden die dialysierten Fraktionen aus der Ammoniumsulfatfällung für "mobility shift" Experimente mit dem *Mst87F -5/+47 in vitro*-Transkript eingesetzt. Eine Komplexbildung tritt mit Proteinen aus den Fraktionen A3, A4 und A5 auf (Abb. 17: Spuren 3 bis 5). Außerdem ist eine sehr schwache Bande im Ausgangslysat A1 zu erkennen (Abb. 17: Spur 8). Die Intensität der Komplexbildung ist mit Proteinen aus der Fraktion A4 am höchsten. Bei längerer Exposition ist auch eine verschwommene Bande mit etwas geringerer Mobilität in der Fraktion A2 und im Restüberstand A6 ausgebildet (Abb. 17: Spur 2 und 6). Bei den Fraktionen, welche durch die Aufarbeitung des Pellets entstanden sind, ist auf der gleichen Laufhöhe wie bei den Fraktionen A3 bis A5 ein "mobility shift"

sichtbar. Dieser ist am stärksten in der A8 Fraktion ausgeprägt (Abb. 17: Spur 9). Hier trennt sich die Bande in zwei Mobilitäten. Bei längerer Exposition erscheint eine weitere Bande mit geringerer Mobilität im Gel. Im Restüberstand A9 sind drei bis vier äußerst schwache, diffuse, schnell laufende Banden ohne Relation zu den anderen beobachteten Banden zu erkennen.

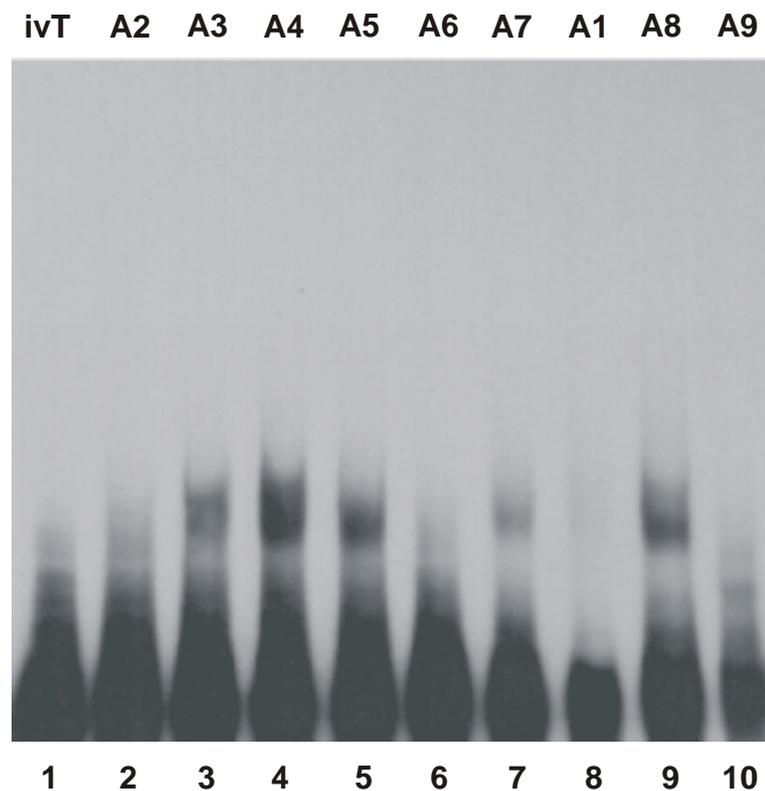


Abb.17: EMSA mit Proteinen aus der Ammoniumsulfatfällung und dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript

10 μ l der Fraktionen wurden mit dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript inkubiert (siehe 2.12). Die Fraktionen sind über den Spuren angegeben. Spur 1: *In vitro*-Transkript ohne Protein inkubiert. Die intensivste Bindung findet mit Proteinen statt, welche bei einer Konzentration von 50 % bis 60 % Ammoniumsulfat präzipitieren. Für die Bezeichnung der Fraktionen siehe Tabelle 2.

Das Ergebnis korreliert mit dem Bandenmuster aus dem SDS-Gel. Hier sind die meisten Banden in den Fraktionen A4 (60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und A8 (50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). In diesen ist der intensivste "*mobility shift*" zu erkennen. Die Komplexbildung muß von Proteinen vermittelt werden, die am häufigsten in diesen beiden Fraktionen enthalten sind, also bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 50 bis 60 % bevorzugt präzipitieren. Es ist aber nicht möglich, diese Proteine quantitativ bei einer bestimmten Ammoniumsulfatkonzentration zu fällen, wie die

Komplexbildung in den anderen Fraktionen zeigt. Es ist auch möglich, daß verschiedene Proteine aus den jeweiligen Fraktionen die Komplexbildung hervorrufen.

Zum Nachweis einer direkten Wechselwirkung des *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkriptes mit spezifisch bindenden Proteinen aus den Fraktionen, wurden UV-Crosslinking Experimente durchgeführt.

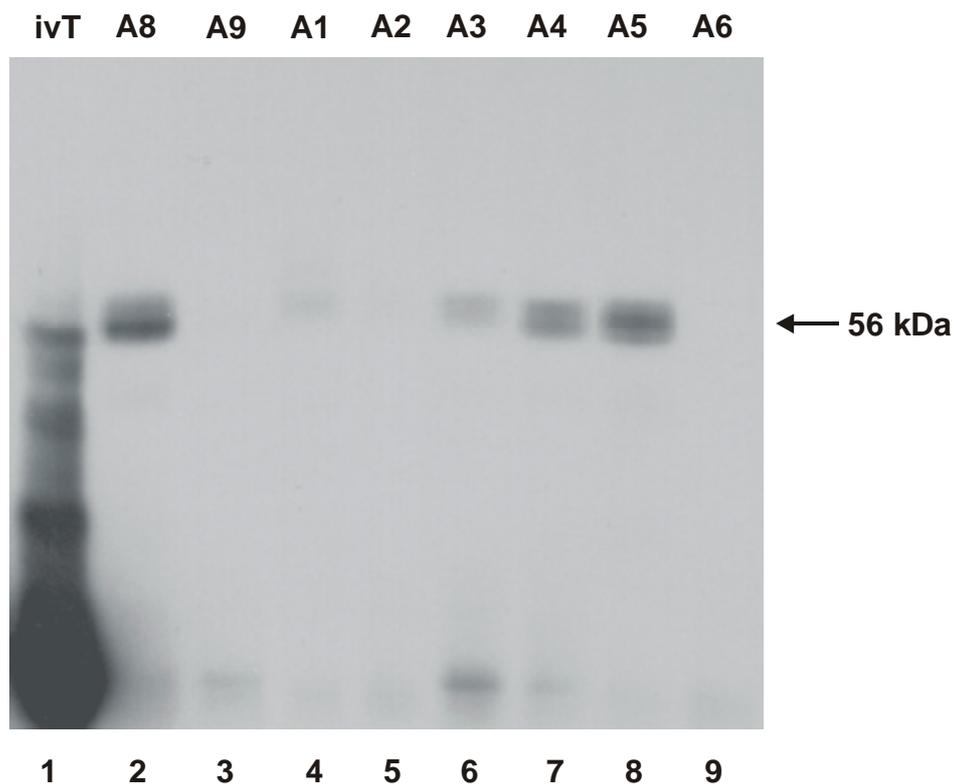


Abb. 18: UV-Crosslinking zwischen Proteinen aus der Ammoniumsulfatfällung und dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript

20 µl der Fraktionen wurden mit dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript inkubiert (siehe 2.12) und nach UV-Bestrahlung und RNaseA-Verdau in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Spur 1: *In vitro*-Transkript ohne Inkubation mit Protein. Es wurde keine RNase-Behandlung durchgeführt.. Eine Bande bei 56 kDa ist in den Fraktionen der Proteine, die zwischen 40 % bis 80 % Ammoniumsulfatkonzentration präzipitieren, nachweisbar. Für die Bezeichnung der Fraktionen siehe Tabelle 2.

Eine radioaktiv markierte Bande tritt bei der Inkubation mit den Fraktionen A8, A1, A3, A4 und A5 auf (Abb. 18: Pfeil). Wie bei den EMSA ist eine hohe Bindungsaktivität in den Fraktionen zwischen 40 % und 80 % erkennbar. Die Bande besitzt ein Molekulargewicht von 56 kDa. Damit konnte gezeigt werden,

daß ein Protein von 56 kDa mit dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript interagiert. Das entspricht den UV-Crosslinking- Ergebnissen von Kempe (1995) an Gesamtproteinextrakt. Ein Versuch der Isolierung einer RNA-bindenden Aktivität mittels Fraktionierung durch Ammoniumsulfatfällung ist aber nicht sinnvoll, da analog zu den EMSA-Experimenten, eine spezifische Anreicherung nicht erfolgte.

3.2.2 Screening von Expressionsbibliotheken

Sowohl in Northwestern-Experimenten als auch in Fraktionierungsexperimenten konnte nachgewiesen werden, daß Proteinfractionen und einzelne Proteine allein mit dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript interagieren (Schreiter, 1998). Es sollte also möglich sein, exprimierte Proteine einzelner Klone auf ihre RNA-Bindungsfähigkeit zu testen. Eine Identifizierung solcher Faktoren sollte mit dem Durchsuchen von Expressionsbibliotheken erfolgen.

Als Expressionsbibliothek stand eine λ gt 11 cDNA-Bank adulter Fliegen von *Drosophila melanogaster* (Canton S; oligo(dT)-primed, in *EcoRI*) zur Verfügung. Die exprimierten rekombinanten Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert. Der Nachweis positiver Klone erfolgte durch eine Bindungsreaktion mit radioaktiv markiertem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript. Potentielle positive Kandidaten wurden weiteren Bindungsexperimenten unterworfen. Nach den Screening-Runden blieb nur ein Klon positiv. Zur Isolierung des Inserts wurden PCR-Reaktionen direkt auf den isolierten Phagen mit den Primern λ gt 11 forward und λ gt 11 reverse durchgeführt. Es resultierte letztlich ein einzelnes PCR-Produkt von 1,2 kb Länge. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-T Vektor kloniert. Die Sequenzierung ergab, daß es sich bei dem Insert um die cDNA der *Drosophila LamRNA* handelt. Eine nähere Charakterisierung des Inserts erfolgt unter 3.2.3. Weitere positive Klone in dem ersten Durchsuchen bestätigten sich in folgenden Isolierungsrunden nicht.

Ausgehend von der Hypothese, daß die gesuchten Kandidaten sehr stark im Testis exprimiert werden, ist es sinnvoll, eine cDNA Bank von *Drosophila melanogaster* Hoden zu durchsuchen. Die Häufigkeitsverteilung in der cDNA-Bank entspricht der Häufigkeit, in welcher die bestimmten mRNAs in der Gesamt-mRNA vorkommen. Außerdem ist somit im Screening-Experiment schon gewährleistet,

daß die Kandidaten im Hoden exprimiert werden. Die cDNA-Bank wurde mit einem Kit der Firma Novagen (OrientExpress™ Random cDNA Library Construction System) konstruiert. 200 *Drosophila melanogaster* Oregon R Hoden wurden sauber präpariert und deren poly(A)⁺RNA isoliert (siehe 2.8.1). Die cDNA Synthese erfolgte mit *Hind*III Random Primer, so daß die entstehenden cDNAs eine *Eco*RI Schnittstelle am 5' und eine *Hind*III Schnittstelle am 3' Ende besaßen. Dadurch war eine gerichtete Ligation in die *Eco*RI/ *Hind*III Arme des λ SCREEN-1 Phagen möglich.

Das Durchsuchen erfolgte wiederum mit dem radioaktiv markierten *Mst*87F -5/+47 *in vitro*-Transkript (siehe 2.15 b). Es konnten 15 Phagen isoliert werden, die nach ihrer Reihenfolge und den Isolierungsrunden bezeichnet wurden. Die cDNAs wurden mit den Primern S-Tag und T7-Terminator vom Phagen λ SCREEN durch PCR amplifiziert. Die Produkte wurden auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die meisten PCR-Produkte wiesen eine Größe zwischen 750 bp und 1000 bp auf. Um identische cDNAs auszuschließen, wurden Southern-Blots (Southern, 1975) durchgeführt. Als Sonde diente das gereinigte (*Xho*I, *Eco*RV gedaute), radioaktiv markierte PCR-Produkt des Phagen 7.1.1, dessen Produktgröße am häufigsten auftrat. Nach dem Ausschluß der kreuzhybridisierenden Produkte kamen nur noch folgende 5 Phagen als Kandidaten für weitere Analysen in Frage (4.2.2-1; 6.3.2.-2; 9.1.2.-2; 7.1.1-2; 9.1.2-1).

Die cDNAs wurden durch Cre-vermittelte Plasmid Excision subkloniert (siehe 2.16.2). Die so erhaltenen Plasmide wurden mit den pSCREEN-1b(+)-Primern T7-Terminator und S-Tag ansequenziert und nach möglichen Homologien zu bekannten Genen per Datenbankanalysen hin untersucht (Tabelle 3). Zur weiteren Charakterisierung wurden die Klone 16 (Phage 6.3.2-2) und 25 (Phage 9.1.1.-2) gewählt. Diese werden nachfolgend als p1687 bzw. p2587 bezeichnet.

Tab. 3: Isolierte Klone und die aus einer Datenbanksuche ermittelten Homologien

<u>Phage</u>	<u>Sequenzierungsprimer</u>	<u>NCBI-Blast</u>
4.2.2-1 (mini 2)	S-Tag, T7 terminator	DNA Topoisomerase Typ II, <i>D. mel.</i>
6.3.2.-2 (16)	S-Tag, T7 terminator	Homologie zu Mms19
9.1.2.-2 (25)	S-Tag	nur kurzer Bereich homolog zu einer ATPase (Mensch)
7.1.1-2 (13)	S-Tag, T7 terminator	<i>D. mel.</i> 16S ribosomale RNA Gen (mitochondrial)
9.1.2-1 (5, 4)	S-Tag	<i>D. mel.</i> Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase-1 Gen

3.2.3 Das *Drosophila* La-Protein wird in der männlichen Keimbahn exprimiert und interagiert mit dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript

Patienten mit diversen rheumatologischen Autoimmunkrankheiten produzieren Antikörper gegen bestimmte Proteine, wie z.B. das La/SSB-Autoantigen. Das *Drosophila* La-Protein besitzt die RNA-bindenden Domänen RNP1 ("ribonucleoprotein") und RNP2. Es konnten DNA- und RNA- bindende Eigenschaften nachgewiesen werden (Bai *et al.*, 1994). Whole-mount *in situ*-Hybridisierungen an Embryonen und Ovarien zeigten, daß die *La*-mRNA nicht in allen Zellen und Entwicklungsstadien nachweisbar ist. Dies deutet auf eine mehr spezialisierte Rolle des *Drosophila* La-Proteins hin. Eine mögliche Funktion in der Spermatogenese wird im folgenden untersucht.

Die cDNA, welche aus dem Northwestern-Experiment isoliert wurde, enthält 1077 Basenpaare. Die Sequenz kodiert für einen offenen Leserahmen von 352 Aminosäuren und besitzt einen 5' nicht-translatierten Bereich von 20 bp. Das 3' Ende enthält kein Stoppsignal. Daher ist davon auszugehen, daß die cDNA an beiden Enden nicht vollständig ist. Der Sequenzvergleich mit der Datenbank (BDGP) ergab, daß es sich um das Gen *La* von *Drosophila melanogaster* handelt.

In Northern-Hybridisierungen an poly(A)⁺RNA aus Wildtyp-Tieren konnte eine einzelne Bande bei 1,5 kb in Ovarien, Karkassen und erstmals auch im Testis

nachgewiesen werden. Dabei ist die Verteilung der mRNA sehr gleichmäßig, d. h. es läßt sich keine besondere Ansammlung in irgendeinem Gewebe feststellen (Abb. 19).

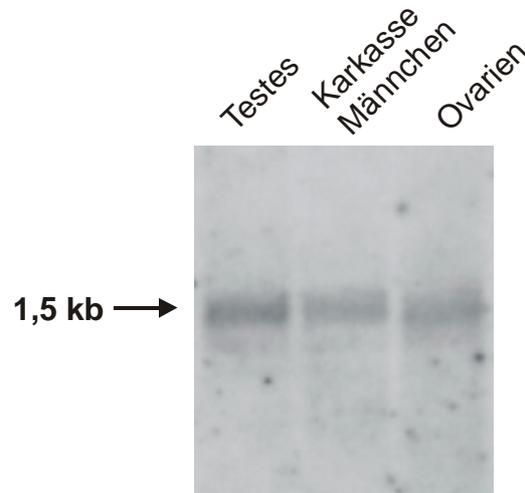


Abb. 19: Northern-Hybridisierung zur Expression von La

Es wird ein Transkript von 1,5 kb im Ovar, in männlichen Karkassen und im Testis nachgewiesen. Als Sonde diente ein Gegenstrang-Transkript der La cDNA in pGEM-T.

Zur Untersuchung des räumlichen Expressionsmusters wurden whole mount *in situ* Hybridisierungen an adulten *Drosophila melanogaster* w¹¹¹⁸ Hoden durchgeführt. Als Sonde diente die klonierte La cDNA. Die Hodenspitze, welche die Spermatogonien enthält, ist komplett frei von Färbung (Abb. 20A: Pfeilspitze). Eine deutliche Färbung hingegen ist in der Innenwand der ersten Windung des Hodenschlauchs zu erkennen (Abb. 20: Pfeil). Hier befinden sich primäre Spermatocyten. Außerdem ist eine geringere Färbung an der Außenwand, an der sich in diesem Fall Spermatocyten befinden, nachweisbar (Abb. 20: Pfeil). Die Expression erfolgt somit zu einem relativ späten Stadium vor der Meiose. Eine schwächere aber reproduzierbare Färbung ist im Hodenlumen sichtbar. Diese könnte durch die andersartige Verteilung in elongierenden Stadien, aber dennoch persistierenden mRNA zustande kommen. Die voll elongierten Stadien sind frei von Färbung (Abb. 20: Doppelpfeil).



Abb. 20: Whole mount *in situ* Hybridisierung zur Analyse der Expression von La

Die Hybridisierung erfolgte auf w1118 Hoden. Dargestellt sind zwei Hodenschläuche (A und B). Es ist eine Expression ab den Stadien der primären Spermatozyten (Pfeil) nachweisbar. Die Hodenspitze ist frei von einer Färbung (Pfeilspitze). Voll elongierte Stadien sind ebenfalls frei von Färbung (Doppelpfeil). Die Hybridisierung erfolgte mit einer DIG-markierten Sonde der cDNA von La.

Aufgrund des Expressionsmusters ist eine Beteiligung des La-Proteins an der Translationskontrolle während der Spermatogenese möglich. Zur Überprüfung wurden Bindungsstudien durchgeführt.

Hierfür wurde die La cDNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pSCREEN kloniert. Als Template diente der Ausgangsklon (La cDNA in pGEM-T).

Tab. 4: Primer zur Amplifizierung der La cDNA für ein Expressionskonstrukt

<u>Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenz</u>
LAe-down	5' AGAATTCAATGGCCGAAGTTGCTGAAAC 3'
LAe-up	5' AAACGTTTATGGCCTTGTCGATGAACTC 3'

Das PCR-Produkt wurde in die *SrfI*-Schnittstelle des pPCR-Script Vektors ligiert. Das Insert wurde mit *EcoRI* und *NotI* aus diesem Vektor wieder herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pSCREEN kloniert. Die Expression des Fusionsproteins erfolgte mit dem TnT[®] *in vitro*-Transkriptions/Translations-Kit in einem Retikulocytenlysat. Nach der Expression resultiert ein Fusionsprotein von 697 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 75 kDa. Dieses enthält die ersten 352 Aminosäuren des La Proteins (insgesamt 390 Aminosäuren, Bai *et al.*, 1994). Dabei sind beide RNA bindenden Motive RNP1 (F193 bis F101) und RNP2 (A151 bis F156) und der Leucin-Zipper (L96 bis L117) enthalten. Die Protein-Bindung an das *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript wurde in einem EMSA analysiert. Als Kontrolle diente das Lysat ohne Plasmid (Abb. 21: Spur 2). Es bilden sich vier Komplexe aus, wobei zwei spezifisch nur beim Vorhandensein des La-Fusionsproteins entstehen (Abb. 21: Spur 3, Pfeile). Aufgrund des hohen Molekulargewichtes des Fusions-proteins muß die obere Bande den spezifischen Protein-RNA Komplex darstellen. Der schneller laufende Komplex kann durch Bindung an Degradationsprodukte erklärt werden. Der Anteil des pSCREEN-Vektors am Fusionsprotein trägt nicht zu einer unspezifischen Protein-RNA Wechselwirkung bei. Analoge Experimente mit einem Expressionsklon eines völlig andersartigen Proteins zeigen keine Komplexbildung (M.Gerharz, persönliche Mitteilung). Damit ist der Nachweis erbracht, daß das La-Protein mit dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript interagiert.

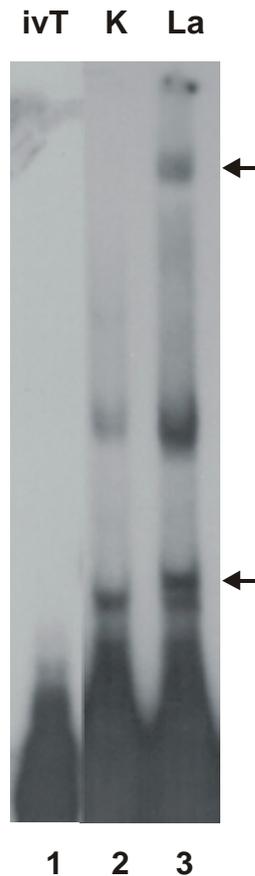


Abb. 21: Protein-RNA Bindungsreaktion des *Mst87F* –5/+47 *in vitro*-Transkriptes mit dem La-Fusionsprotein aus einem Retikulocytenlysate

Spur 1 zeigt das freie *Mst87F* –5/+47 *in vitro*-Transkript. Spur 2: Bindungsreaktion des *Mst87F* –5/+47 *in vitro*-Transkriptes mit Retikulocytenlysate, ohne zugesetztes Plasmid. In einem *in vitro*-Transkriptions/Translationssystem wurde das La-Fusionsprotein synthetisiert. Als Template diente die La cDNA im pSCREEN-Vektor. 5 µl des Proteingemisches wurden mit dem radioaktiv markierten *in vitro*-Transkript inkubiert (Spur 3). Das La-Fusionsprotein bildet zwei spezifische Komplexe mit der RNA (Pfeile).

3.2.4 p1687

Bei dem Durchmusteren der Hoden cDNA Bank konnte der Klon p1687 identifiziert werden (Vergleiche 3.2.2). Die Größe der cDNA wurde zuerst durch PCR mit den flankierenden Plasmid-Primern des pSCREEN-Vektors (S-Tag und T7-Terminator) bestimmt. Sie beträgt 2,5 kb. Zur Überprüfung, ob die cDNA die vollständige Transkriptions-einheit des Gens enthält und ob das Gen ausschließlich im Testis exprimiert wird, wurden Northern-Experimente durchgeführt. Hierzu wurde ein *Hind*III Fragment der cDNA in den pBS (KS) Vektor kloniert. Mit einem T3-

Transkript konnte eine Bande bei 3,2 kb im Testis, in den männlichen Karkassen und im Ovar nachgewiesen werden (Abb. 22). Es ist eine starke Anreicherung im Testis deutlich. Die Stärke des Ovar-Signals kann auf eine erhöhte RNA-Menge im Gel zurückgeführt werden. Im Ovar ist ein weiteres schwaches Signale bei 2 kb sichtbar (Abb. 22).

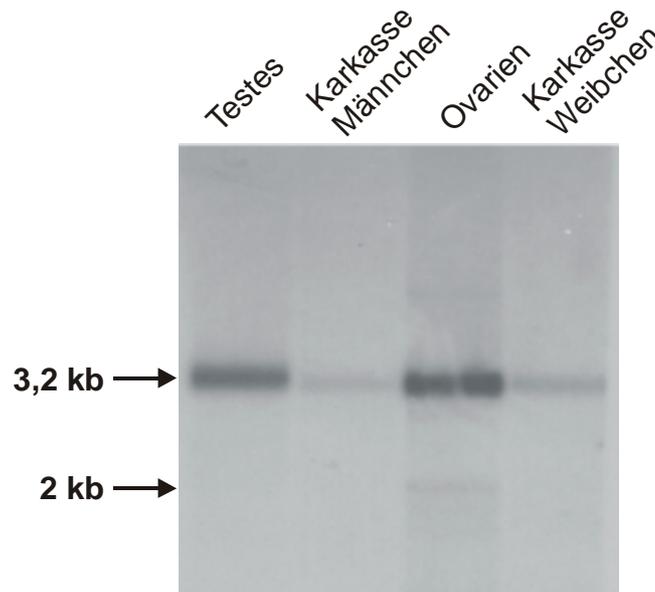


Abb. 22: Northern-Hybridisierung zur Expression von p1687

Ein 3,2 kb Transkript ist in allen Geweben des Wildtyps nachweisbar. Als Sonde diente ein Gegenstrang-Transkript des *Hind*III-Fragments der p1687 cDNA.

Die Sequenzierung ergab eine cDNA von 2282 Basenpaaren. Diese ergibt einen offenen Leserahmen von 713 Aminosäuren. Da die cDNA im Vergleich zum Northern-Signal zu klein ist, ist davon auszugehen, daß nicht die vollständige cDNA der mRNA in dem Klon enthalten ist. Der Datenbankvergleich (BDGP; Adams *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2000) zeigte, daß die Sequenz eine 100 %-ige Identität zum vorhergesagten *mms19*-Gen und zum 5' EST (Expressed Sequence Tag) GH06271 von *Drosophila* besitzt. Diese mRNA enthält im 5' Bereich 764 bp mehr, was die Differenz des p1687 zur Northern-Hybridisierung erklärt. In der p1687 cDNA ist hingegen der 3' UTR 114 bp länger. Damit muß die komplette mRNA mindestens 3046 Nukleotide umfassen. *Drosophila mms19* ist ortholog zu den Genen von Maus und Mensch (Queimado *et al.*, 2001). Das *mms19*-Gen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kodiert für ein Polypeptid, welches für die

"Nucleotide excision repair" und die RNA Polymerase II Transkription notwendig ist (Lauder *et al.*, 1996, Lombaerts *et al.*, 1997). Eine hohe Sequenzähnlichkeit in unterschiedlichen Organismen wurde auf Aminosäure-Ebene im C-terminalen Bereich beschrieben. Diese besteht aus vier Wiederholungen eines "HEAT repeats". Die ausgebildete Tertiärstruktur ist am Zusammenhalt von Untereinheiten in Proteinkomplexen beteiligt (Cingolani *et al.*, 1999). Ein Sequenzvergleich zeigte auch, daß das *Drosophila* Protein im C-terminalen Bereich mehrere Wiederholungen eines Leucin-Motifs besitzt und somit zur Familie der LRM-Proteine ("*leucin rich motif*") gehört. Diese sind an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt.

Der offene Leserahmen im kodierten cDNA-Anteil des Fusionproteins weist nach 9 Aminosäuren (SLRAQWYWP) ein Stop auf. Das Insert befindet sich also nicht im offenen Leserahmen des Vektors. Dies resultiert aus der Tatsache, daß sich bei der Synthese einer cDNA-Bank statistisch nur ein Drittel der Inserts im Leserahmen des Vektors befinden. Damit kann hier weder ein *Drosophila* Protein exprimiert werden, noch kann damit eine sinnvolle RNA-Bindung erfolgen. Eine Bindung im Screening-Experiment muß somit ein Artefakt sein.

3.2.5 p2587

Ein weiterer Klon wurde bei dem Durchsuchen der Testes cDNA Bank identifiziert.

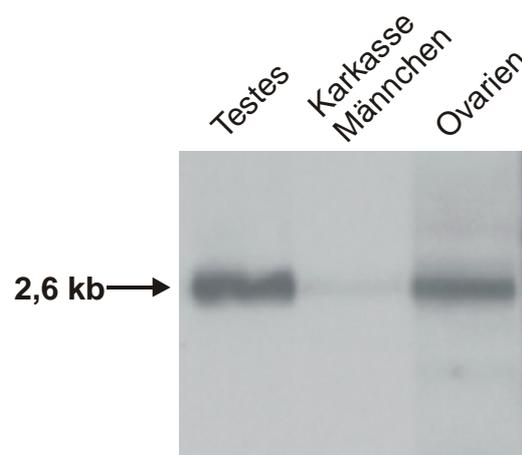


Abb. 23: Northern-Hybridisierung zur Expression von p2587

Ein 2,6 kb Transkript ist in allen Geweben des Wildtyps nachweisbar. Als Sonde diente ein Gegenstrang-Transkript der p2587 cDNA in pBS.

Die cDNA wurde aus dem pSCREEN-Vektor amplifiziert und in den *EcoRI/HindIII* geschnittenen pBS (KS) Vektor kloniert und sequenziert. Die cDNA besteht aus 838 Nukleotiden. Ein T7 *in vitro*-Transkript zeigt ein Signal bei 2,6 kb im Testis, in den männlichen Karkassen und im Ovar (Abb. 23). Die Datenbanksuche (BDGP) ergab eine Homologie mit dem vorhergesagten Gen CG5075, jedoch in 3' - 5' Orientierung. Der zugehörige EST Klon AT15546 beginnt 7 Basenpaare vom 3' Ende der p2587 cDNA. CG5075 zeigt Signaturen einer ATP-Synthase und scheint paralog zur ATPase Untereinheit A (vha68-2). Aufgrund der gegenläufigen Orientierung im pSCREEN-Vektor ist eine Beteiligung der ATP-Synthase an der Bindung an dem *Mst87F -5/+47 in vitro*-Transkript sicher nicht zu erwarten. Die gegenläufige Orientierung enthält einen kurzen 53 Aminosäuren umfassenden Leserahmen, der von der p2587 cDNA kodiert wird. Dieser ergibt folgende Sequenz (komplettes Fusionsprotein im pSCREEN-Vektor: 386 Aminosäuren):

YAMFLGREGVSMPLGTYMELVSSLMDLNGRWIPSKMLPMMPPGNSTESGFPVW

Eine Datenbankrecherche ergab keinen Hinweis auf ein bisher bekanntes oder beschriebenes Protein oder auf ein RNA-bindendes Sequenzmotiv in diesem Bereich.

Bei der bakteriellen Überexpression in BI21(DE3)pLysE Zellen ist ein Protein von 50 kDa durch 1 mM IPTG induzierbar. Das Optimum der heterologen Expression liegt bei 3,5 stündiger Inkubation nach der Induktion (Abb. 24A). Die Bakterienpellets wurden in 25 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl resuspendiert, für 15 min bei 30°C mit 10 µg/ml Lysozym inkubiert, für 10 mal 4 s sonifiziert (MS72-Spitze, Sonorex) und anschließend für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das so erhaltene Proteingemisch wurde für EMSA mit dem *Mst87F -5/+47 in vitro*-Transkript eingesetzt. Im Gegensatz zu den Kontrollen (Abb. 24 B: Spur 2 und 4) bildete sich ein zusätzlicher Komplex bei dem Proteingemisch des p2587 Klonen aus (Abb. 24 B: Spur 3). Somit finden Interaktionen zwischen dem Fusionsprotein und dem *in vitro*-Transkript statt.

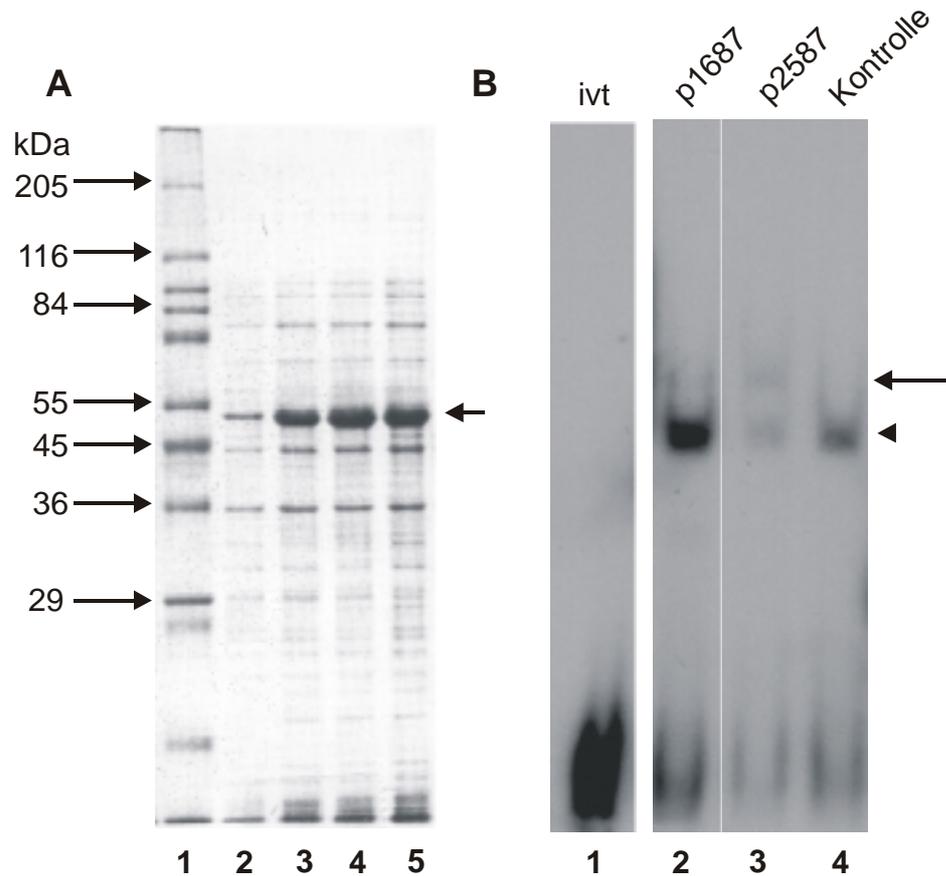


Abb.24: Bakterielle Überexpression des p2587 Fusionsproteins und EMSA mit dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript

A) 8 %-ige SDS-PAGE. Aufgetragen sind jeweils 20 μ l einer 50 ml Bakterien-Kultur. Spur 1: Marker. Spur 2 vor der IPTG-Induktion (1 mM). Spuren 3-5: 1,25, 2,5 und 3,5 h nach der Induktion. Ein Protein von 50 kDa lässt sich durch IPTG induzieren (Pfeil).

B) EMSA mit den aufgearbeiteten Proteinen. Die Bindungsreaktion mit dem *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript erfolgte wie unter 2.12 beschrieben. Es wurden jeweils 5 μ l Proteingemisch verwendet. Spur 1: *In vitro*-Transkript. Spur 2: Bindungsreaktion mit dem Klon p1687, der praktisch nur den pSCREEN-Anteil (siehe 3.2.4) exprimiert. Spur 3: Bindungsreaktion mit dem p2587 Klon. 50 % der Intensität der bakterienspezifischen Bande (Pfeilspitze) "shiftet" zu einem langsamer laufenden Komplex (Pfeil). Spur 4: Bindungsreaktion mit Proteinen aus den BI21(DE3) Zellen ohne Plasmid (Negativkontrolle).

3.2.6 Affinitätsreinigung von Komplexproteinen

Zur Isolierung von TCE - bindenden Proteinen oder Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen wurde eine Affinitätsanreicherung durchgeführt. Es wurden Proteinextrakte aus 3480 Abdomina von *Drosophila*-Männchen aufgearbeitet und an biotinylierte *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkripte gebunden (siehe 2.11.2, 2.14). Die *in vitro*-Transkripte sind an Streptavidin-gekoppelte Dynabeads gebunden und

ermöglichen so eine Isolierung der Proteine. Bisher wurde schon nachgewiesen, daß die meisten der an ein *Mst87F* $-5/+47$ *in vitro*-Transkript bindenden Proteine bereits bei einer Salzkonzentration (NaCl) von 400 mM eluiert (Schreiter, 1998). Für eine bessere Abstufung wurde ein zusätzlicher Elutionsschritt mit 200 mM NaCl gewählt. Die eluierten Fraktionen wurden in einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis der Auftrennung. Bei der Elution mit 200 mM und 400 mM NaCl tritt ein ähnliches Bandenmuster von 6 bis 10 Proteinbanden auf (Spur 6 und 7). Die prominentesten Banden 505, 850 und 865 wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Bande 505 läuft bei 50 kDa und entspricht damit der Größenordnung eines der komplexbildenden Proteine, welches an das *Mst87F* $-5/+47$ *in vitro*-Transkript bindet (Kempe *et al.*, 1993; Kempe, 1995; Schreiter, 1998).

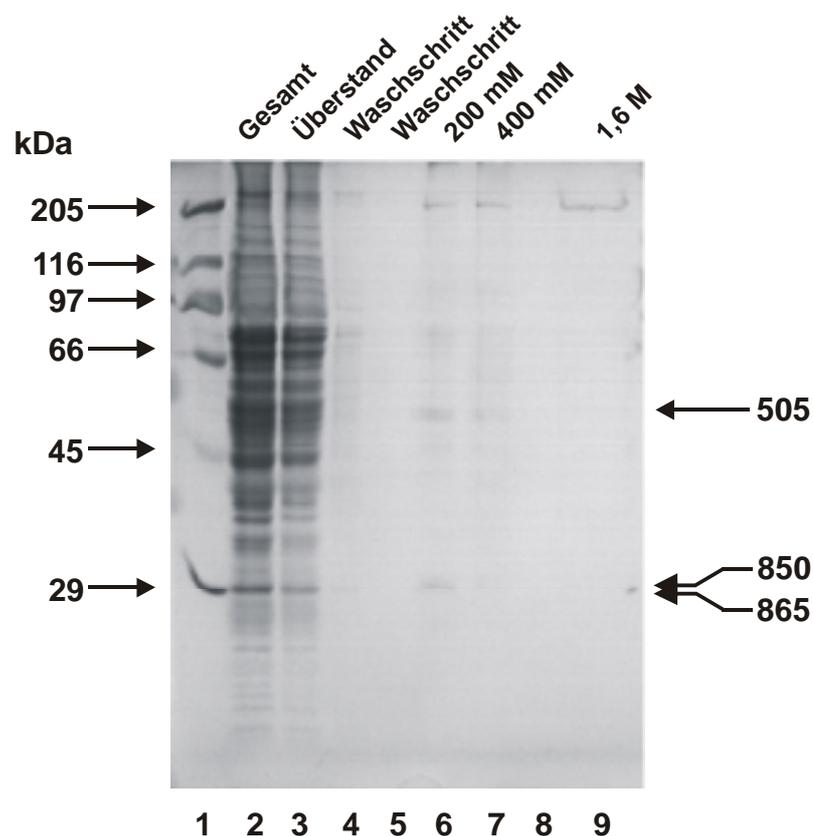


Abb. 25: SDS-PAGE der Fraktionen aus der Affinitätsanreicherung von Proteinen mit dem *Mst87F* $-5/+47$ *in vitro*-Transkript

In Spur 2 ist 1/100 des Proteingemisches aus Abdomina aufgetragen. In Spur 3 ist 1/50 des Restüberstandes und in den Spuren 4 und 5 je 1/50 der Waschschritte aufgetragen. Die eluierten Fraktionen (Spur 6, 7 und 9) wurden nach Dialyse und Gefriertrocknung komplett aufgetragen. Spur 8 ist frei. Die ausgeschnittenen Proteinbanden sind mit Pfeilen markiert.

Die Banden 850 bzw. 865 laufen bei 30 bzw. 28 kDa. Die 28 kDa Bande könnte ebenfalls mit einer schon beschriebenen Bande übereinstimmen (Kempe *et al.*, 1993; Kempe 1995).

Tab. 5: Isolierte Proteinbanden und ihre ermittelten Peptidsequenzen.

Leu (L) und Ile (I) können im MS aufgrund ihrer identischen Masse nicht unterschieden werden. Lys (K) und Gln (Q) können wegen ihrer ähnlichen Massen manchmal nicht eindeutig zugeordnet werden. Daher steht ein + für L oder I und ein & für K oder Q.

<u>Gelbande</u>	<u>Peptid-Sequenz</u>	<u>Homologie</u>
505	SAE+SN++EER, TSEQA++DT+A&	ATP-Synthase, Bellwether
865	Y+EN&EDFESSG&&	?
850	R+YY+PSR	?
pE570	++E+PYR, F++AGNAC++SGVS	Serpin-serin Protease Inhibitor

Das *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript bildet mit Testesproteinextrakt in "mobility shift" Experimenten drei Komplexe aus, wobei der am langsamsten laufende Komplex A der stabilste ist. In einem präparativen EMSA wurde dieser Komplex ausgeschnitten und die beteiligten Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Vergleiche auch Schreiter 1998). Die prominenteste Bande bei 37 kDa, pE570, wurde isoliert und ebenfalls mittels Massenspektrometrie analysiert.

Für die Proteinbande 505 wurden zwei Peptide ermittelt. Beide repräsentieren die Alpha-Kette der ATP-Synthase, welche von dem Gen *bellwether* (*blw*) kodiert wird (Castrillon *et al.*, 1993; Talamillo *et al.*, 1998). Das Enzym ist eine Komponente der Mitochondrien. Eine Beteiligung an der Regulation von *Mst87F* ist unwahrscheinlich.

Bei der Datenbankanalyse konnte für die Proteinbanden 865 und 850 keine relevanten Sequenzähnlichkeiten weder auf Aminosäure-Ebene noch auf Nukleotid-Ebene ermittelt werden.

Für die Proteinbande pE570 konnten zwei Peptide identifiziert werden. Das Peptid IIELPYR repräsentiert Serpin-2. Die Funktion wurde als potentieller Serin Protease Inhibitor beschrieben (Han *et al.*, 2000). Eine Beteiligung an Translationskontrollphänomenen ist somit unwahrscheinlich.

3.3 Charakterisierung des RNAi-Phänotyps des potentiell RNA-bindenden Proteins Y53C12B.2 in *C. elegans*

Eine wichtige Information bei der Charakterisierung RNA-bindender Proteine ist der Phänotyp, welcher entsteht, wenn die Wirkung des Gens bzw. des Genprodukts im Organismus komplett unterbunden ist.

Im Rahmen des *Drosophila* Genom Projektes wurden u. a. mittels P-Element-Mutagenese Linien erzeugt, die durch Integration des P-Elements *placW* in das X-Chromosom männliche Sterilität hervorrufen (Dr. U. Schäfer, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen). Die molekulare Analyse der Linie ms(1)bbl-a ergab, daß das P-Element in den 5' nicht-translatierten Bereich des Gens *bbl-a* integriert wurde, welches für ein potentielles RNA-bindendes Protein mit einer KH-Domäne kodiert (Cordes, 1999). Hemizygoten Männchen besitzen keine Keimzellen in den Hodenschläuchen. Die Hodenschläuche sind stark verkleinert und die Männchen sind steril. Die Integration des P-Elements in den 5' nicht-translatierten Bereich nimmt zwar Einfluß auf die Transkriptionsregulation, führt aber nicht zu einem Null-Allel. Das Gen kodiert für ein Protein von 240 Aminosäuren.

Ein Aminosäure-Sequenzvergleich zeigt die hohe Konserviertheit des BBL-A-Proteins im Vergleich zu möglichen homologen Proteinen (Abb. 26). Die Homologie erstreckt sich über einen großen Teil der Proteine (Aminosäuren 60 bis 239 des BBL-A Proteins). Die höchste Identität besteht dabei im Bereich der KH-Domäne im C-terminalen Ende und schließt auch die zentrale Sequenz GXXG (X entspricht Lysin K, Arginin R oder Glycin G; siehe auch Cordes, 1999) ein. Ein Datenbankvergleich zeigt, daß die Proteine zu keiner bisher beschriebenen KH-Domänen Familie gehören und somit eine neue Familie darstellen.

Für eine erste Charakterisierung des Null-Phänotyps von *bbl-a* wurde die Untersuchung des RNAi-Phänotyps (RNAi- "RNA mediated interference") des homologen Gens Y53C12B.2 in *Caenorhabditis elegans* gewählt. Durch Injektion doppelsträngiger RNA (dsRNA) des zu untersuchenden Gens, wird die Funktion des Gens post-transkriptionell Sequenz-spezifisch unterdrückt (Fire *et al.*, 1998; Fire, 1999; Sharp, 2001). Die dsRNA wird in der Zelle in kleine 21- und 22-Nukleotide enthaltene RNAs gespalten, welche die mRNA-Degradation bewirken (Hammond *et al.*, 2000; Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001).

Abb. 26:

1 50
D.m. BBl-AMEAEENIRADAFEPAKRATKRGAS
S.c. Yor145cpMVAPTALKKATVTPVSGDGGSSRIIGINNTESIDEDDDDDVLLDDSDNNTAK
C.e. Y53C12B2 MATSSSAFDDDELPMEEGMPELLDDEDVPSLPSLLEQLNLDTPAKGDEFKLVKRKRKSGNA
H.s. XP050313
H.s. LOC56902MESEMETSARAEEGFTQVTRKGGRRRAK
M.m. 1810003METQSTGTEDGFTPVTHRGRRRAK
M.m. put.
A.t. unkn.

61
D.m. BBl-A GGGQ.QDVEMQVDEATGIEGQVLGSSR..ASAPPKAKRA...RSELRKVSVPPhRYSSLK
S.c. Yor145cp EEVEGEEGSRKTHEskTvvvDDQgkPrFTsAsktQgNKI...kFESRkIMVPhRMtPLR
C.e. Y53C12B2 IDVVMEDVsqVDEdatatADdStgPK..SSkRTKq..V...kGESrvVvPhkHRYtPLk
H.s. XP050313MDT~~EE~~ARPAKRPV~~F~~PPLCGDGLLSGKE~~ET~~RKI~~V~~PhANRYtPLk
H.s. LOC56902 RQAEQLSAAGEGGDAGRMDT~~EE~~ARPAKRPV~~F~~PPLCGDGLLSGKE~~ET~~RKI~~V~~PhANRYtPLk
M.m. 1810003 RQAEQSSAAGQDGEAGRMDT~~EE~~ARPAKRPV~~F~~PPLSGDQLLTGKE~~ET~~RKI~~V~~PhGNRYtPLk
M.m. put.MEKPD~~AW~~TRRRRGRRRGR..~~F~~PPLSGVQLLIGKE~~ET~~RKI~~V~~PhGNRYtPLk
A.t. unkn.MAESTQMEVETATEGTvPLPPkPT~~F~~KPLKAHEMSDGKvQ~~F~~RKI~~V~~PhPNRYsPLk

121
D.m. BBl-A EHWK~~I~~F~~T~~P~~I~~V~~E~~H~~M~~K~~L~~Q~~I~~R~~F~~N~~M~~K~~A~~R~~Q~~V~~E~~L~~R~~V~~G~~P~~E~~.TPDIANLQ~~R~~G~~A~~D~~F~~V~~R~~A~~F~~L~~C~~G~~F~~E~~V~~D~~D~~
S.c. Yor145cp NSWTK~~I~~Y~~P~~PL~~V~~E~~H~~L~~K~~L~~Q~~V~~R~~M~~N~~L~~K~~T~~K~~S~~V~~E~~L~~R~~T~~N~~P~~K~~F~~T~~T~~D~~P~~G~~A~~L~~Q~~K~~G~~A~~D~~F~~I~~K~~A~~F~~T~~I~~G~~F~~D~~L~~D~~
C.e. Y53C12B2 DN~~W~~N~~I~~F~~T~~P~~I~~V~~K~~N~~L~~G~~L~~Q~~V~~R~~F~~N~~L~~K~~K~~R~~Q~~V~~E~~I~~R~~.NPVDRED~~T~~TDL~~Q~~K~~A~~T~~D~~F~~V~~R~~A~~F~~I~~L~~G~~F~~E~~V~~N~~D
H.s. XP050313 EN~~W~~M~~K~~I~~F~~T~~P~~I~~V~~E~~H~~L~~G~~L~~Q~~I~~R~~F~~N~~L~~K~~S~~R~~N~~V~~E~~I~~R~~T~~C.~~K~~E~~T~~K~~D~~V~~S~~A~~L~~T~~K~~A~~A~~D~~F~~V~~K~~A~~F~~I~~L~~G~~F~~Q~~V~~E~~D~~
H.s. LOC56902 EN~~W~~M~~K~~I~~F~~T~~P~~I~~V~~E~~H~~L~~G~~L~~Q~~I~~R~~F~~N~~L~~K~~S~~R~~N~~V~~E~~I~~R~~T~~C.~~K~~E~~T~~K~~D~~V~~S~~A~~L~~T~~K~~A~~A~~D~~F~~V~~K~~A~~F~~I~~L~~G~~F~~Q~~V~~E~~D~~
M.m. 1810003 EN~~W~~M~~K~~I~~F~~T~~P~~I~~V~~E~~H~~L~~G~~L~~Q~~I~~R~~F~~N~~L~~K~~S~~R~~N~~V~~E~~I~~R~~T~~C.~~K~~D~~T~~K~~D~~V~~S~~A~~L~~T~~K~~A~~A~~D~~F~~V~~K~~A~~F~~V~~L~~G~~F~~Q~~V~~E~~D~~
M.m. put. EN~~W~~M~~K~~I~~F~~T~~P~~I~~V~~E~~H~~L~~G~~F~~Q~~I~~R~~F~~N~~L~~K~~S~~R~~N~~V~~E~~I~~R~~I~~C.~~K~~D~~T~~K~~V~~S~~A~~L~~T~~K~~A~~A~~D~~F~~V~~K~~A~~F~~V~~F~~G~~Q~~V~~E~~D~~
A.t. unkn. KAWLD~~I~~Y~~T~~P~~I~~Y~~D~~Q~~M~~K~~V~~D~~I~~R~~M~~N~~L~~K~~A~~R~~K~~V~~E~~L~~K~~T~~R~~.AD~~T~~P~~D~~I~~S~~N~~L~~Q~~S~~A~~D~~F~~V~~H~~A~~F~~M~~I~~G~~F~~D~~I~~P~~D

181
D.m. BBl-A ALALIRL~~D~~DLF~~V~~ES~~F~~E~~I~~K~~D~~V~~K~~.TLRGD~~H~~LSRAIGRLAGKCGRTK~~F~~T~~I~~ENV~~I~~K~~T~~R~~I~~V~~I~~AD~~S~~
S.c. Yor145cp SIALLR~~L~~DDLY~~I~~ET~~F~~E~~V~~K~~D~~V~~K~~.TLTGD~~H~~LSRAIGRIA~~G~~K~~D~~G~~K~~T~~K~~F~~A~~I~~E~~N~~A~~T~~F~~R~~I~~V~~I~~AD~~S~~
C.e. Y53C12B2 AIALIRL~~D~~DHLF~~L~~ET~~F~~E~~V~~AD~~V~~K~~H~~SLKGD~~H~~VSRAIGRIA~~G~~K~~D~~G~~R~~T~~K~~L~~V~~I~~E~~N~~T~~I~~K~~T~~R~~I~~V~~V~~A~~N~~T~~
H.s. XP050313 ALALIRL~~D~~DLF~~L~~ES~~F~~E~~I~~T~~D~~V~~K~~.PLKGD~~H~~LSRAIGRIA~~G~~K~~C~~G~~K~~T~~K~~F~~T~~I~~E~~N~~V~~I~~F~~R~~I~~V~~L~~AD~~V~~
H.s. LOC56902 ALALIRL~~D~~DLF~~L~~ES~~F~~E~~I~~T~~D~~V~~K~~.PLKGD~~H~~LSRAIGRIA~~G~~K~~C~~G~~K~~T~~K~~F~~T~~I~~E~~N~~V~~I~~F~~R~~I~~V~~L~~AD~~V~~
M.m. 1810003 ALALIRL~~D~~DLF~~L~~ES~~F~~E~~I~~T~~D~~V~~K~~.PLKGD~~H~~LSRAIGRIA~~G~~K~~C~~G~~K~~T~~K~~F~~T~~I~~E~~N~~V~~I~~F~~R~~I~~V~~L~~AD~~V~~
M.m. put. AFALIRL~~D~~DLF~~L~~EFF~~E~~I~~T~~D~~V~~K. PLKGD~~H~~LSRAIGRIS~~G~~K~~C~~G~~K~~T~~K~~F~~T~~I~~E~~N~~V~~I~~F~~R~~I~~V~~L~~AD~~V~~
A.t. unkn. AISLLR~~M~~DEL~~I~~Y~~V~~ES~~F~~E~~I~~K~~D~~V~~K~~.TLKGE~~H~~LSRAIGRLS~~G~~K~~C~~G~~K~~T~~K~~F~~A~~I~~E~~N~~S~~I~~K~~T~~R~~I~~V~~I~~A~~D~~T~~

241
D.m. BBl-A KIHILGSY~~Q~~NI~~Q~~L~~A~~RR~~A~~V~~C~~N~~L~~I~~L~~GSPP~~S~~K~~V~~YGNLRAVASRLSERM.....
S.c. Yor145cp KIHILGG~~F~~THIR~~M~~ARE~~S~~V~~V~~SLILGSPP~~G~~K~~V~~YGNLRTVASRLKERY.....
C.e. Y53C12B2 KIHILGAY~~Q~~NL~~K~~L~~A~~R~~N~~A~~V~~C~~S~~LILGSN~~P~~S~~K~~V~~Y~~GS~~L~~R~~N~~M~~A~~S~~R~~G~~A~~E~~R~~L.....
H.s. XP050313 KVHILGSF~~Q~~NI~~K~~M~~A~~R~~T~~A~~I~~C~~N~~L~~I~~LGN~~P~~PS~~K~~V~~Y~~GNIRAVASRSADRF.....
H.s. LOC56902 KVHILGSF~~Q~~NI~~K~~M~~A~~R~~T~~A~~I~~C~~N~~L~~I~~LGN~~P~~PS~~K~~V~~Y~~GNIRAVASRSADRF.....
M.m. 1810003 HVHILGSF~~Q~~NI~~K~~M~~A~~R~~T~~A~~I~~C~~N~~L~~I~~LGN~~P~~PS~~K~~V~~Y~~GNIRAVASRSADRF.....
M.m. put. HVHILGSF~~Q~~NI~~K~~M~~T~~R~~T~~A~~I~~C~~N~~L~~I~~LGN~~P~~PS~~K~~V~~Y~~GNIPSCGQ~~I~~SRTVLIFHEPLRCSHK~~T~~M~~G~~
A.t. unkn. RIHILGAF~~S~~NI~~K~~V~~A~~R~~S~~SL~~C~~SLIM~~G~~SPAG~~K~~V~~Y~~SKLRSV~~A~~R~~L~~NE.....

301 320
D.m. BBl-A
S.c. Yor145cp
C.e. Y53C12B2
H.s. XP050313
H.s. LOC56902
M.m. 1810003
M.m. put. RISQPLRAQVSSQLSARAKA
A.t. unkn.

Abb. 26: Aminosäure-Sequenzvergleich zwischen dem Drosophila BBL-A Protein und homologen Proteinen

Identische Aminosäuren sind mit roten Blöcken unterlegt. Ähnliche Aminosäuren sind hellrot dargestellt. In Klammern ist die Kernsequenz (GXXG) der KH-Domäne gezeigt. *D.m.*= *Drosophila melanogaster*, *S.c.*= *Saccharomyces cerevisiae*, *C.e.*= *Caenorhabditis elegans*, *H.s.*= *Homo sapiens*, *M.m.*= *Mus musculus*, *A.t.*= *Arabidopsis thaliana*, put.= putatives Protein, unkn.= unbekanntes Protein. Das Alignment wurde mit dem Programm Multalin version 5.4.1 (Corpet, 1988) durchgeführt.

Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. E. Schulze (Göttingen) realisiert, der u.a. die Injektionen durchführte und die Fotoaufnahmen erstellte.

3.3.1 Charakterisierung des Phagenklons yk109b10

Der Phagenklon yk109b10, welcher die cDNA-Sequenz des homologen Gens von *bb1-a* enthalten sollte, wurde freundlicherweise von Dr. Yuji Kohara (Japan) zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde durch *in vivo*-Excision isoliert (in pBluescript SK⁻, siehe 2.16.1). Nach vollständiger Sequenzierung der cDNA stellte sich heraus, daß das Insert (1981 bp) aus zwei ligierten cDNA-Fragmenten zusammengesetzt ist. Das erste Fragment entspricht der kodierenden Sequenz für das Gen Y53C12B.2, welches homolog zu dem *bb1-a* Gen ist. Es enthält den vollständigen offenen Leserahmen von 277 Aminosäuren (831 bp), einen 5' UTR von 13 Basenpaaren, einen 3' UTR von 91 Basenpaaren und einen poly(A)-Schwanz von 23 Basenpaaren. In der *C. elegans* Datenbank ACeDB (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) ist die ungespleißte DNA mit 3495 bp beschrieben. Das Gen besitzt sieben Exons. Das zweite cDNA-Fragment entspricht der Sequenz des vorhergesagten Gens H27M09.4. Die cDNA hat eine Länge von 1010 Basenpaaren. Nach einem Datenbankvergleich stellte sich heraus, daß die Sequenz nicht den vollständigen offenen Leserahmen enthält, sondern daß 20 Basenpaare im 5' Bereich fehlen. Der 3' UTR besteht aus 61 Basenpaaren mit einem poly(A)-Signal und einem poly(A)-Schwanz von 17 Basenpaaren. In der Aminosäuresequenz sind 15 GP (Glycin, Prolin) Wiederholungen. Dies ist ein Kennzeichen für den "Collagen triple helix repeat" (Pfam family PF01391). Daher ist davon auszugehen, daß es sich um ein Collagen ähnliches Protein handelt. Zur Kontrolle wurden auch mit dsRNA des Gens H27M09.4 RNAi-Experimente durchgeführt.

Die cDNAs wurden durch die Wahl der entsprechenden Primer getrennt und amplifiziert (siehe Tab. 6 und Abb. 27). Die Synthese der doppelsträngigen RNA, entsprechend für jeweils einen Teil, erfolgte direkt mit dem PCR-Produkt als Vorlage.

Tab. 6: Primer zur Amplifizierung

<u>Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenz Y53C12B.2</u>
esmg67	5' CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGCCCTCACT AAAGGGA 3'
KHT7	5' TAATACGACTCACTATAGGGCTTCGGCACGAGCTAGTCT 3'
<u>Bezeichnung</u>	<u>Primer-Sequenz H27M09.4</u>
T7 Promoter	5' CGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
COLT7	5' TAATACGACTCACTATAGGGCCTGGTTTCTGTATGATGC 3'

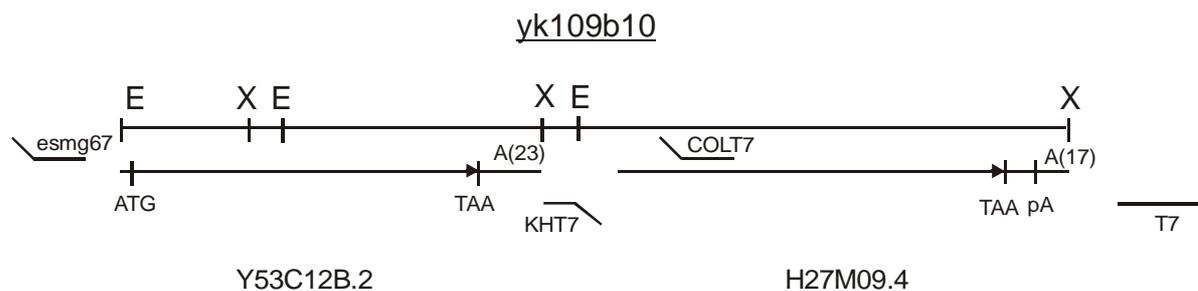


Abb. 27: Karte der cDNA yk109b10

Die Lage der cDNAs Y53C12B.2 und H27M09.4 mit ihren Start- und Stoppsignalen ist dargestellt. Die Länge des poly(A)-Schwanzes (A(23) und A(17)) sowie das poly(A)-Signal (pA) sind gekennzeichnet. Die Lage der PCR-Primer ist schematisch dargestellt. Einzelne Schnittstellen sind angegeben (E...*Eco*RI; X...*Xho*I). Sequenz siehe Anhang.

3.3.2 dsRNA Injektion in adulte Tiere - Analyse des RNAi-Phänotyps in der F1- Generation

3.3.2.1 Y53C12B.2

Der Primer esmg67 (Dr. E. Schulze) besteht nachfolgend aus dem T7 Promoter und dem T3 Primer und bindet an den T3 Promoter des pBluescript SK⁻. Der KHT7 Primer besitzt ebenfalls den T7 Promoter und bindet direkt hinter dem poly(A)-Schwanz des KH-Gens in der yk109b10 cDNA. Als PCR-Template diente

diese cDNA im pBS SK⁻ (siehe Abb. 27). Das PCR-Produkt (1099 bp) wurde nach Auftrennung in einem Agarose-Gel für die Transkription aufgereinigt (siehe 2.7.3). Die Transkription beider Stränge erfolgte gleichzeitig mit der T7 RNA-Polymerase. Die Hybridisierung zur doppelsträngigen RNA erfolgte dabei cotranskriptionell (siehe 2.18.2).

Werden adulte Hermaphroditen mit dsRNA injiziert, so wird der RNAi-Effekt in den meisten Fällen an die F1 Generation weitergegeben. Dabei kann der Effekt auf die maternellen mRNAs und der Effekt in der F1-Generation mit Beginn der Embryogenese untersucht werden. RNAi führt dabei im besten Fall zur kompletten Stilllegung des Gens.

Die Injektion erfolgte in adulte Hermaphroditen des *C. elegans*-Stammes CB1489. In diesem Stamm treten männliche Tiere mit einer erhöhten Frequenz auf. Zwölf Stunden nach der Injektion wurden die Tiere auf neue Platten gesetzt. Somit war gewährleistet, daß schon entwickelte Embryonen ohne dsRNA-Einfluß abgelegt wurden. Tiere aus dem Ablagezeitraum von 12 - 24 Stunden nach der Injektion wurden weiter beobachtet.

Insgesamt erfolgte die Charakterisierung von 20 Tieren. Es wurden zwei tote Embryonen gefunden. 15 Tiere (75 %) entwickelten sich bis zu einem frühen Larvalstadium. Die Larven waren insgesamt zu dick. Dabei war eine Einlagerung von Fettkügelchen zu beobachten, welches normalerweise in der Hypodermis der Dauerlarve geschieht. Abbildung 28 zeigt eine entsprechende Larve. Das Tier ist ungefähr 300 µm lang. Es kann sich daher um ein früheres Larvalstadium L1 oder L2 handeln. Hier sind deutlich 9 Zellkerne in der Gonadenanlage zu erkennen (Abb. 28: A und C, Pfeil). Im Wildtyp sind normalerweise in frühen Larvalstadien nur zwei Keimbahnzellen ausgebildet. Die Entwicklung der Gonade scheint also in den Tieren weiterzugehen. Die Entwicklung der im Larvalstadium arretierten 15 Larven (s.o.) wurde sehr langsam fortgeführt, jedoch nur in einem Fall nach drei Tagen bis zum adulten Hermaphroditen. Die normale Entwicklungszeit im Wildtyp beträgt 35,5 Stunden (bei 25°C) von der L1 Larve bis zum adulten Tier. Zwei weitere Tiere zeigten eine normale, aber ebenfalls verlangsamte Entwicklung zum fertilen Hermaphroditen.

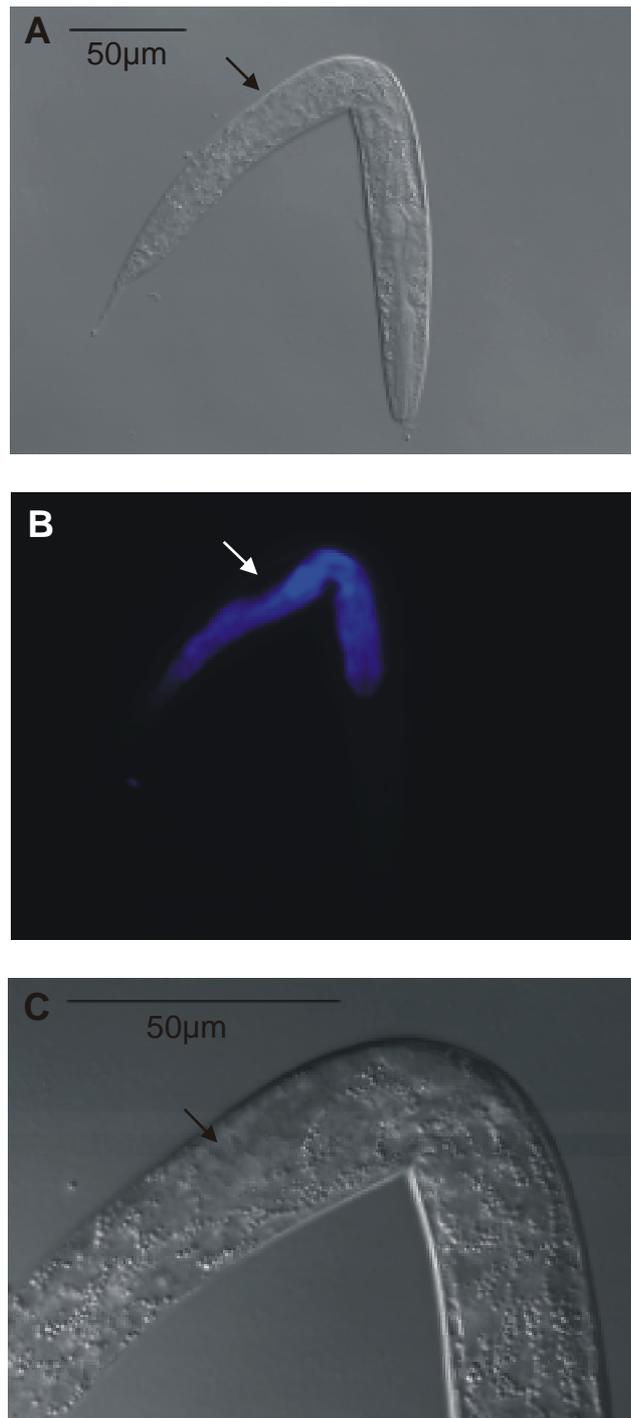


Abb. 28: Phänotyp der F1-Generation nach Injektion von dsRNA-Y53C12B.2

A, B und C zeigen die gleiche Larve, in C mit einer höheren Vergrößerung (siehe Maßstab). Die Larven zeigen eine stark verlangsamte Entwicklung. Die Gonaden entwickeln sich schneller weiter (A und C, Pfeil). B zeigt die blaue Autofluoreszenz des Darmes. Die Gonaden zeigen keine Autofluoreszenz (Pfeil). A und C wurden mittels Nomarski-Optik analysiert.

Ein Tier entwickelte sich normal zum fertilen Hermaphroditen, zeigte aber einen Vulva-Defekt. Die Nachkommen entwickelten sich in der Gonade weiter, konnten

jedoch nicht durch die Vulva abgelegt werden, welches dem Phänotyp Egl ("egg laying defective") entspricht (Abb. 29).

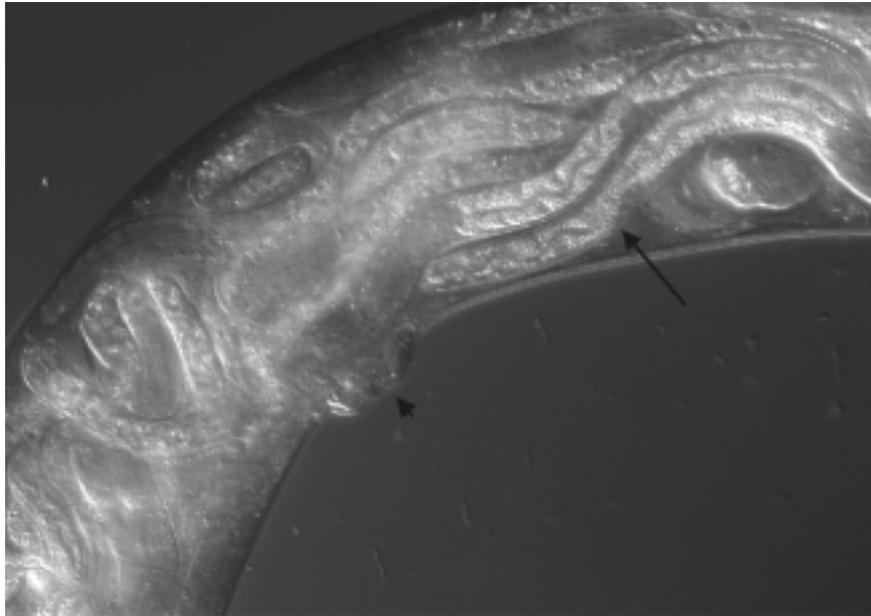


Abb. 29: Egl-Phänotyp nach Injektion von dsRNA-Y53C12B.2

Ein Tier entwickelte sich zum fertilen adulten Hermaphroditen mit dem Egl-Phänotyp. Die Vulva (Pfeilspitze) ist nach außen gestülpt und zeigt keine Öffnung, so daß sich die Larven (Pfeil) im Tier entwickeln, jedoch nicht das Elterntier verlassen können.

90% aller Nachkommen entwickeln sich nicht bis zum adulten Hermaphroditen. Daher ist keine Aussage über den Keimbahnphänotyp möglich. Die Entwicklung ist allgemein verlangsamt. Für die meisten Larven resultiert ein "semiarrest". Die RNAi vermittelte Stilllegung des Y53C12B.2 -Gens in *C. elegans* führt somit zu einer starken Beeinflussung der Larvalentwicklung.

3.3.2.2 H27M09.4

Das zweite cDNA-Fragment im Phagen yk109b10 korreliert mit dem vorhergesagten Gen H27M09.4. Als Template für die Synthese der dsRNA wurde wie oben beschrieben ein PCR-Produkt (951 bp) mit der yk109b10 cDNA als Vorlage synthetisiert (siehe Abb. 27). Der COLT7 Primer liegt in der kodierenden Sequenz des Gens. Die Transkription erfolgte mit der T7 RNA-Polymerase.

Die Injektion und die Analyse der Tiere erfolgte wie oben beschrieben. Es wurden 11 Tiere charakterisiert. Die post-transkriptionelle Ausschaltung des Collagen-

ähnlichen Genes H27M09.4 führte bei 7 Tieren zu einem sehr starken "dumpy"-Dpy-Phänotyp. Bei diesen Tieren war der anteriore Bereich extrem geschwollen. Drei von diesen Tieren entwickelten sich in einem Larvenstadium nicht weiter ("L1 arrested"). Es wurden drei tote Embryonen beobachtet. Nur ein Tier entwickelte sich normal.

3.3.3 Untersuchungen zur postembryonalen Funktion von Y53C12B.2

Um Auswirkungen der post-transkriptionellen Stilllegung des Y53C12B.2-Gens auf die postembryonale Entwicklung zu untersuchen, wurden RNA-soaking Experimente durchgeführt. Dies sollte auch Aufschluß über die Entwicklung der Keimzellen geben. Dabei wurden L1 Larven 24 Stunden in einer Lösung mit der Y53C12B.2 - dsRNA gehalten.

Es wurde wieder eine stark verzögerte Entwicklung beobachtet. Zwei Tiere sind als L2/L3 Larven gestorben. Für die Entwicklung bis zum Hermaphroditen wurden 5 bis 7 Tage benötigt, statt der 2 Tage im Wildtyp (9 Tiere beobachtet). Die Männchen entwickelten sich deutlich schneller, benötigten aber auch 4 Tage. Die Hermaphroditen waren steril. Es gab nach 7 Tagen von 9 Tieren keinen einzigen Nachkommen. Oogenese und Spermatogenese waren selten. Die Tiere zeigten Probleme in der Keimzellproliferation und -differenzierung. Die Gonadenarme enthielten anstelle der üblichen 1500 fast keine Keimzellen (Abb. 30). Dieses entspricht dem Phänotyp GIp ("*germ-line proliferation defective*", Austin & Kimble, 1987). Die Gonadenarme zeigten die normale U-förmige Anordnung (Abb. 30 C). Sie waren jedoch aufgrund des Fehlens von Keimzellen im Vergleich zum Wildtyp stark zusammengefallen (Abb. 30 A, C und D, Pfeil). In der DAPI-Färbung waren nur wenige Zellkerne in den Gonaden sichtbar (Abb. 30 B). Die sich dennoch entwickelnden Oocyten wurden nicht befruchtet und zeigten eine anormale Anordnung (Abb. 31 B).

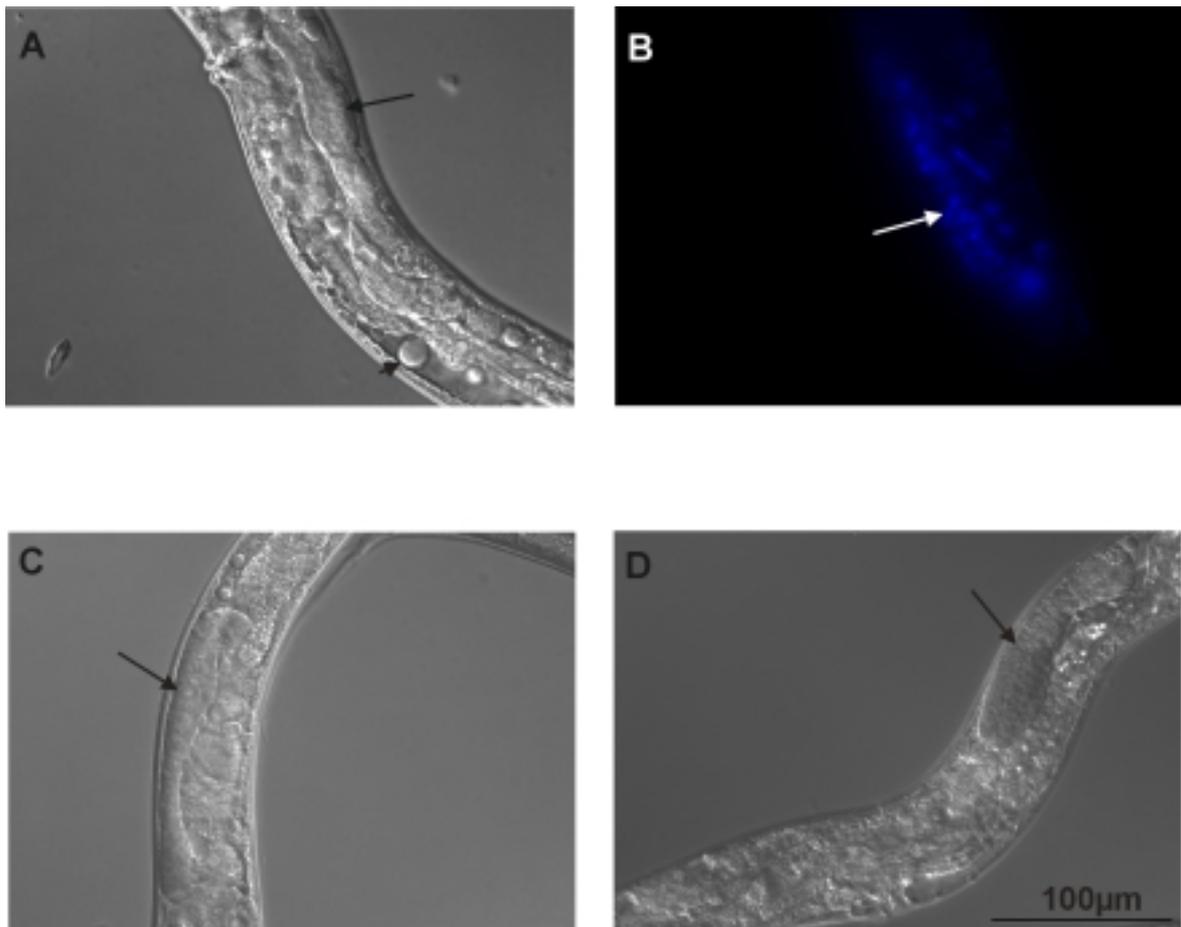


Abb. 30: Phänotyp nach dsRNA Soaking-Y53C12B.2

Abgebildet sind drei Tiere (A, C und D) nach 24 h Einwirkung der dsRNA. Die Gonadenarme (Pfeil, A, C und D) enthalten nur wenige Keimzellen. Die Schärfeebene in A liegt auf dem distalen Gonadenarm. In B sind die Zellkerne des gleichen Tieres wie in A mittels DAPI-Färbung dargestellt. Im Bereich der Gonade (Pfeil) sind nur somatische Zellkerne und fast keine Keimzellkerne sichtbar. Die Schärfeebene in B liegt hier auf dem proximalen Gonadenarm. In einigen Tieren sind große Fettkugeln eingelagert (Abb. A, Pfeilspitze). A, C und D wurden mittels Nomarski-Optik analysiert. Alle Bilder haben den gleichen Größenmaßstab.

Bei einigen Tieren war ein weiterer Phänotyp zu beobachten. Neben den leeren Gonadenarmen, war eine anormale Ausbildung der Vulva zu erkennen (Abb. 31). Es bildete sich Vulva-Gewebe aus, welches jedoch nicht die normale Vulva-Struktur einnahm. Es kam zu einer Ausstülpung der Vulva. Dieser Phänotyp korreliert mit *pvl* Mutanten ("*protruding vulva*", Eisenmann & Kim, 2000), in denen unterschiedliche Defekte zu einer morphologischen Veränderung der aus 22 Zellen bestehenden Vulvaformation führen. Nicht alle Tiere besaßen diesen

Phänotyp. Ein Grund dafür könnte die Konzentrationsabhängigkeit des RNAi-Effektes sein.

Wie bei dem Injektionsexperiment war auch hier wieder die Einlagerung großer Fettkugeln zu beobachten (Abb. 31 A, Doppelpfeil).

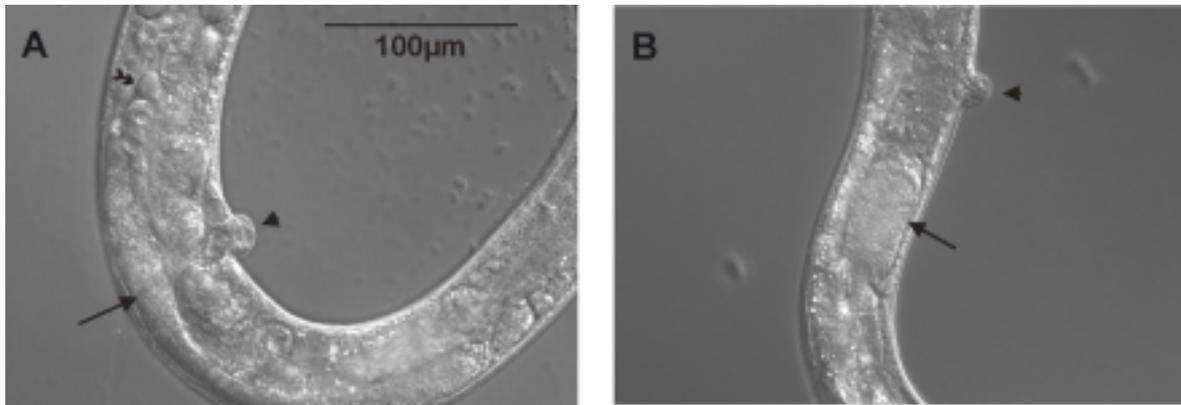


Abb. 31: Pvl-Phänotyp nach dsRNA Soaking-Y53C12B.2

Die Tiere zeigen eine Ausstülpung der Vulva (Pfeilspitze). Die Gonadenarme sind durch Pfeile gekennzeichnet. In B sind Oocyten zu erkennen (Pfeil). Der Doppelpfeil zeigt auf eingelagerte Fettkugeln. Die Tiere wurden mittels Nomarski-Optik analysiert. Die Bilder haben den gleichen Größenmaßstab.

Eine postembryonale Stilllegung des Gens Y53C12B.2 führt zu einer sterilen Keimbahn. Die Gonaden, welche somatischen Ursprungs sind, entwickeln sich weitgehend normal. Der beobachtete Phänotyp ist dem der mutanten *Drosophila bbl-a* Männchen sehr ähnlich. Dies führt zu der Hypothese, daß die Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene zwischen dem *Caenorhabditis elegans*-Protein Y53C12B.2 und dem *Drosophila melanogaster*-Protein BBL-A auch eine gleichartige Funktion beinhaltet.

4. Diskussion

4.1 Protein-RNA Interaktionen mit der *don juan*-mRNA

EMSA Experimente zeigen, daß fünf spezifische Protein-RNA Komplexe mit dem 3' Fragment der *don juan* 5' nicht-translatierten Region gebildet werden. Dabei besitzen die beteiligten Proteine unterschiedliche Bindungsaffinitäten, wie an der verschiedenen Beeinflussung durch Kompetition erkennbar wird. Die beobachteten "bandshifts" können aus unterschiedlichen Konformationen bzw. Ausbildungsstadien ein und desselben regulatorischen Komplexes resultieren. Die Ausbildung der Komplexe kann aber auch auf mehrere Interaktionen im 5' nicht-translatierten Bereich deuten. Einzelne Sequenzelemente könnten dann an unterschiedlichen regulatorischen Vorgängen beteiligt sein.

Beim Vergleich der entscheidenden Region mit anderen spermatocyten-spezifischen mRNAs, welche der Translationskontrolle unterliegen, sind in der *don juan*-mRNA zwei Sequenzelemente mit Ähnlichkeit zum *Mst87F* TCE ("translational control element") erkennbar. Kompetitionsexperimente zeigten jedoch, daß *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkripte nicht in gleichem Maße wie die *don juan*-mRNA in der Lage sind, um die Proteinbindung mit einem radioaktiv markierten *don juan in vitro*-Transkript (+6/+115) zu kompetieren. Deletions-Analysen und *in vitro* Mutagenese-Experimente zeigten weiterhin, daß die *don juan*-mRNA nicht durch die TCE ähnliche Region translationsreprimiert wird (Blümer *et al.*, im Druck). Beide ähnlichen Sequenzelemente befinden sich im 3' Fragment des *don juan* 5' UTR. Für diesen konnte nachgewiesen werden, daß er mit Proteinen interagiert. Die Ausübung einer gleichen Funktion wie das TCE ist aber ausgeschlossen. Wurde der vordere Bereich +56/+88 des 3' Fragmentes für "mobility shift" Experimente eingesetzt, ist nur noch ein Komplex zu beobachten. Die Ausbildung eines einzelnen Komplexes läßt die Interpretation offen, ob das komplexere Bandenmuster des gesamten 3' Fragmentes aus unterschiedlichen Interaktionen oder aber aus der unterschiedlichen Ausprägung eines Komplexes entsteht. *In vivo*-Experimente mit lacZ Fusionen zeigen, daß diese Interaktion mit der Translationskontrolle der *don juan*-mRNA korreliert (Blümer *et al.*, im Druck). Die am weitesten 5' gelegenen Sequenzen des 3' Fragmentes vermitteln somit die Repression der Translation und interagieren mit Testesproteinen. Die weitaus

komplexeren Interaktionen des gesamten 3' Fragmentes deuten auf weitere regulatorische Elemente hin, die sich in diesem Fragment der RNA befinden könnten. So konnte auch gezeigt werden, daß dieser Bereich für die mRNA-Stabilität verantwortlich ist (Blümer *et al.*, im Druck). Eine weitere Interaktion könnte den Aktivierungsschritt zur Beendigung der Repression betreffen. Eine Trennung der Regulation der Repression und Aktivierung der Translation für die *don juan*-mRNA ist durchaus möglich.

In der Säugerspermatogenese wird diese Trennung für die *protamin-1*-mRNA diskutiert. Protamine ersetzen die Histone in männlichen Keimzellen während der Kondensation im Kern. Sie werden in runden Spermatisden transkribiert und die RNA wird als mRNP im Cytoplasma für 2-8 Tage bis zur Translation in elongierten Spermatisden gespeichert (Kleene *et al.*, 1984). Die Translationskontrolle ist von mehreren *cis*-agierenden Elementen im 3' nicht-translatierten Bereich abhängig (Braun *et al.*, 1989; Braun, 1990). Sowohl die am weitesten 3' gelegenen 62 Nukleotide als auch die am weitesten 5' gelegenen 37 Nukleotide des 3' nicht-translatierten Bereiches sind unabhängig voneinander essentiell für die Translationsrepression (Braun, 1990; Fajardo *et al.*, 1997). An den 3' nicht-translatierten Bereich binden mehrere Proteine. Das testisspezifisch exprimierte cytoplasmatische *Protamin-1* RNA-bindende Protein (Prbp) z. B. ist ein Translationsrepressor der Maus *protamin-1*-mRNA. Prbp unterdrückt die Translation durch Bindung an eine "stem-loop" Sekundärstruktur der am weitesten 3' gelegenen 62 Nukleotide des 3' UTR (Lee *et al.*, 1996). Weiterhin bindet ein Y-box Protein (Gu *et al.*, 1998), das "testis-brain RNA-binding protein" TB-RBP (Kwon & Hecht, 1993) und eine sequenzspezifische RNA-bindende Aktivität von 48/50 kDa (Fajardo *et al.*, 1994). Letztere wurden als die Y-Box Proteine MSY2 und MSY4 identifiziert (Davies *et al.*, 2000). Auch die 48/50 kDa Proteine reprimieren die Translation der *protamin-1*-mRNA. Diese binden jedoch an eine 22 Nukleotide umfassende Region innerhalb der am weitesten 5' gelegenen 37 Nukleotide des 3' nicht-translatierten Bereiches. Die gleiche Region ist aber nicht ausreichend für eine Aktivierung der Translation (Fajardo *et al.*, 1997). Ein möglicher Kandidat für diese Translationsaktivierung ist das "spermatid perinuclear RNA-binding protein" (SPNR, Schumacher *et al.*, 1995), welches mit Mikrotubuli in Spermatisden assoziiert ist (Schumacher *et al.*, 1998). Das SPNR besitzt zwei dsRBD, kann an den 3' nicht-translatierten Bereich der *protamin-1*-

mRNA binden und tritt zeitlich mit der Aktivierung der Translation der *protamin-1*-mRNA auf. Für die *protamin-1*-mRNA sind also zwei separate Regionen an der Translationsrepression beteiligt, und eine weitere Region ist für die Aktivierung der Translation notwendig. Die Trennung von Repression und Aktivierung der Translation erfolgt demnach nicht nur durch unterschiedliche *cis*-Elemente im 3' UTR, sondern auch durch unterschiedliche RNA-bindende Proteine.

Die Spermatogenese ist nicht das einzige Beispiel, in der das Zusammenwirken unterschiedlicher *cis*- und *trans*-wirkender Faktoren essentiell für die zeitliche Abfolge der Translation ist. Ein Beispiel ist die Rolle der cytoplasmatischen Polyadenylierungselemente (CPEs) und des CPE-bindenden Proteins (CPEB) in der Oocytenreifung von *Xenopus laevis*. Beide sind sowohl an der Repression als auch an der Aktivierung der Translation materneller mRNAs beteiligt. In *Xenopus* bindet das CPEB an die CPEs in dem 3' nicht-translatierten Bereich materneller mRNAs, so z. B. der *cyclin B1* und der *c-mos*-mRNA (Hake & Richter, 1994; Stebbins-Boaz *et al.*, 1996; Hake *et al.*, 1998). Eine Funktion in der Translationsrepression wird durch Bindung des CPEB an Maskin realisiert. Im Komplex mit CPEB interagiert Maskin nun mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4E. Dadurch wird die Translation der mRNA temporär unterdrückt (Stebbins-Boaz *et al.*, 1999). Für eine Repression sind jedoch nicht die CPEs allein ausreichend. Für die *cyclin B1*-mRNA konnte nachgewiesen werden, daß angrenzende und die CPEs überlappende Sequenzelemente des 3' nicht-translatierten Bereiches ebenfalls notwendig sind. Die Aufhebung der Repression ist in diesem Fall mit einer Polyadenylierung verbunden (Barkoff *et al.*, 2000). Die Aufhebung der indirekten Translationsrepression durch CPEB, welches an die CPEs gebunden ist, erfordert eine post-translationelle Modifikation des Proteins durch Phosphorylierung (Mendez *et al.*, 2000a). Dies scheint zur Lösung der Proteinbindung zwischen Maskin und eIF4E zu führen. Die Phosphorylierung von CPEB ist dabei für die Polyadenylierung und Translation der *c-mos*-mRNA erforderlich.

Im Gegensatz zur *protamin-1*-mRNA wird die Repression und die Aktivierung der Translation in diesem Fall durch Proteinbindung an die gleichen Elemente, die CPEs, vermittelt.

Ob auch im Fall der *don juan*-mRNA das gleiche Element für die Translationsrepression und -aktivierung in der Spermatogenese notwendig ist, muß in weiteren

Experimente getestet werden. Obwohl die Transformationsexperimente zeigen, daß beide Schritte durch die kurze definierte Region im 3' Fragment des *don juan*-leaders kontrollierbar sind, könnten dennoch zwei getrennte Elemente vorhanden sein.

In vielen Fällen wird die Erkennung spezifischer Regionen in der RNA durch die Ausbildung spezifischer Sekundärstrukturen vermittelt.

Bei der Analyse des 5' nicht-translatierten Bereiches der *don juan*-mRNA mit dem MFOLD Computer Programm (Jaeger *et al.*, 1989; Zuker *et al.*, 1999) ergab sich die Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur im ersten Abschnitt des 3' Fragmentes, welcher spezifisch Testesproteine bindet. Diese Struktur, welche aus einem "hairpin" mit einem terminalen und zwei internen "loops" besteht, wird sowohl im Sequenzkontext des 3' Fragmentes als auch in dem des gesamten 5' nicht-translatierten Bereichs ausgebildet.

Wurde dieser „stem-loop“ ausbildende Bereich (+56/+88) für Bindungsexperimente eingesetzt, konnte eine Proteinbindung festgestellt werden. Es findet somit eine Wechselwirkung von Proteinen mit der "stem-loop" Struktur statt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der interagierenden Proteine wurden UV-Crosslinking Experimente mit einem 25 nt-Segment durchgeführt, welches den "hairpin" mit einem internen "loop" enthält. Die einzige stabile und spezifische Interaktion erfolgte mit einem Protein von etwa 62 kDa. Nach Deletion des internen "loops" findet nur noch eine schwache Wechselwirkung der RNA mit dem 62 kDa Protein statt. Dies stützt die Interpretation, daß die RNA-Erkennung von der Sekundärstruktur abhängt. Weitere Deletionsanalysen sind notwendig, um den konkreten Bereich der Sekundärstruktur zu ermitteln, der für die Erkennung notwendig ist.

Für das *Drosophila* RNA-bindende Protein B52 wurde gezeigt, daß es RNAs bindet, in denen die zur Bindung notwendige Consensus-Sequenz (ein Doppel-Hexamer) einen "loop" und den Teil eines "stems" einer "hairpin-loop"-Sekundärstruktur bildet (Shi *et al.*, 1997). Genau diese Struktur ist das Ziel der B52 Interaktion. Die Translationskontrolle in der Säugerspermatogenese erfordert ebenfalls in einigen Fällen die Ausbildung von Sekundärstrukturen in den regulierten mRNAs. Ein 47 kDa Protein bindet spezifisch an ein 8 nt Motiv in dem

3' UTR der *transitions protein-2*-mRNA (Schlicker *et al.*, 1997). Dieses Motiv ist essentieller Bestandteil einer "stem-loop" Sekundärstruktur.

Die Tatsache, daß nur ein Protein beim UV-crosslinking identifiziert werden konnte, eröffnet die Möglichkeit, daß zusätzliche Proteinkomponenten für die Translationskontrolle durch Protein-Protein Wechselwirkungen rekrutiert werden. Ein gut charakterisiertes Beispiel für eine sukzessive Komplexbildung ist die Translationsrepression der *hunchback*-mRNA in der frühen Embryogenese von *Drosophila*. In einem ersten Schritt bindet Pumilio an die NRE's ("nanos response elements") im 3' UTR der *hunchback*-mRNA und ermöglicht so die Rekrutierung von Nanos durch Protein-Protein- und Protein-RNA Wechselwirkungen (Wharton *et al.*, 1998). An den so entstandenen Protein-RNA Komplex bindet dann das Protein "Brain tumor" (Brat). Die Ausbildung des gesamten Komplexes ist hier für die *hunchback* Regulation notwendig (Sonoda & Wharton, 1999, 2001; Goodwin, 2001).

4.2 Bindet das La-Protein an die *Mst87F*-mRNA?

Für die Identifizierung RNA-bindender Proteine, welche an der Translationskontrolle der *Mst87F*-mRNA beteiligt sind, wurden Expressionsbibliotheken mit einer "Northwestern-Screening" Methode durchsucht. Es konnten drei Klone isoliert werden, deren Proteinprodukte nach IPTG-Induktion mit dem *Mst87F*-5/+47 *in vitro*-Transkript interagieren. Für den Klon p1687 wurde gezeigt, daß kein biologisch relevantes Fusionsprotein exprimiert wird. Ein Fusionsprotein des Klons p2587 zeigt eine RNA-Bindung, jedoch besteht der Leserahmen der cDNA nur aus 53 Aminosäuren. Diese konnten aber keinem Protein oder Proteinmotiv zugeordnet werden.

Der dritte positive Klon enthält die Transkriptionseinheit des *La*-Gens. Es konnte gezeigt werden, daß das Gen im Testis exprimiert wird. Whole mount *in situ*-Hybridisierungen belegen, daß die Expression in späten Stadien vor der Meiose beginnt. *Mst87F* wird in primären Spermatozyten exprimiert, aber erst in vollständig elongierten Spermatozyten translatiert (Kuhn *et al.*, 1988; Schäfer *et al.*, 1990). Dies läßt die Interpretation zu, daß das La-Protein zu einem Zeitpunkt vorhanden ist, in dem es an die *Mst87F*-mRNA binden könnte, um dessen

Translation zu verhindern. Ein in dieser Arbeit konstruiertes Fusionsprotein enthält die ersten 352 Aminosäuren des La-Proteins. In diesem Teil sind die RNA-bindenden Domänen RNP1 und RNP2 enthalten. Das Fusionsprotein ist in der Lage, an das *Mst87F* -5/+47 *in vitro*-Transkript zu binden. Sowohl das zeitliche Auftreten der *La*-mRNA, als auch die RNA-bindenden Eigenschaften deuten daraufhin, daß das La-Protein mit der *Mst87F*-mRNA interagiert.

Das La/SSB-Protein wurde bisher in verschiedenen funktionellen Zusammenhängen beschrieben. Es ist eines derjenigen Antigene, gegen welche (Auto-)Antikörper bei menschlichen rheumatologischen Autoimmun-Krankheiten, wie beispielsweise "systemic lupus erythematosus" (SLE) und dem Sjogren's Syndrom gebildet werden (Mattioli & Reichlin, 1974).

La bindet z.B. an das 3' Ende von RNA Polymerase III Transkripten ("small nuclear RNA", snRNA). Dabei bindet La an ein Uridin-Triplet. In diesem Zusammenhang wird die Funktion des La-Proteins als Chaperon bei der Prozessierung und dem Transport von Polymerase III Vorläufer-Transkripten diskutiert (Zusammenfassung in Maraia, 2001). Das La-Protein hat aber auch eine Funktion in der Regulation der Translation. Es bindet spezifisch an die TAR-Sequenzen der HIV-1-mRNA, welche in den ersten 111 nt der mRNA lokalisiert sind. In einem Retikulozytenlysat wird durch die Bindung des La-Proteins an ein Reporterkonstrukt mit TAR-Sequenzen, die TAR-vermittelte Translationsinhibierung aufgehoben (Chang *et al.*, 1994; Svitkin *et al.*, 1994).

In Vertebraten besitzen viele mRNAs eine Pyrimidin-reiche Sequenz im 5' nicht-translatierten Bereich ("5' terminal oligopyrimidine sequence", TOP). TOP-Gene kodieren vor allem für ribosomale und andere Proteine, welche an der Translation beteiligt sind (Zusammenfassung in Amaldi & Pierandrei-Amaldi, 1997). Das La-Protein bindet an die terminale 5' Oligopyrimidin-Sequenz von TOP-mRNAs *in vitro* (Pellizzoni *et al.*, 1996). Zusätzlich zeigt es einen positiven Effekt auf die Translation *in vivo* (Crosio *et al.*, 2000). Es wird vermutet, daß das La-Protein hier einem Translationsrepressor entgegenwirkt. Dieser Repressor ist das "cellular nucleic acid binding protein" (CNBP, Pellizzoni *et al.*, 1997), welches stromabwärts der 5' TOP-Sequenz im 5' UTR bindet. Im Gegensatz hierzu inhibiert rekombinantes La-Protein die Translation des zur Klasse der TOP-mRNAs gehörenden menschlichen Translations-Elongations-Faktor 1A (EF1A) in einem Reporterkonstrukt (Zhu *et al.*, 2001).

An der Translationsinitiation beginnend von internen Ribosomenbindungsstellen ("internal ribosome entry sites" IRES) ist das La-Protein ebenfalls beteiligt (Ali & Siddiqui, 1997). IRES kommen unter anderem in einigen zellulären mRNAs mit einem sehr langen 5' nicht-translatierten Bereich vor. Hier kann die Translationsinitiation Cap-unabhängig durch die IRES ablaufen.

Das *Drosophila* La-Protein zeigt hohe Sequenzähnlichkeiten zum menschlichen La/SSB (Bai *et al.*, 1994). Es besitzt neben den RNA-bindenden Domänen ein Leuzin-Zipper-Motiv, welches auf Protein-Protein Interaktionen deutet.

Bai *et al.* (1994) zeigten, daß sich nach einer anfänglichen ubiquitären Expression im Embryo ein distinktes Muster ergibt, daß das viscerale Mesoderm, die Gonaden, den Darm und die Speicheldrüsen umfaßt. Weiterhin wird La nicht in allen Ovar-Geweben exprimiert. Hieraus läßt sich eine wesentlich speziellere Rolle während der *Drosophila*-Entwicklung ableiten. Eine genetische Charakterisierung zeigte, daß La eine essentielle Funktion u. a. während der Larvalentwicklung und während der embryonalen Mitteldarm-Morphogenese besitzt. Einen embryonalen Mitteldarm-Phänotyp zeigt auch Ultrabithorax (*Ubx*), ein homeotisches Gen, welches eine IRES besitzt. Eine indirekte Translationskontrolle durch La könnte die Beeinflussung der IRES-vermittelten Translation darstellen. Eine weitere Funktion des La-Proteins wird in der Stabilisierung der *Ubx*-mRNA als molekulares Chaperon diskutiert (Bai & Tolia, 2000).

Diese Beispiele zeigen sehr deutlich, daß das La-Protein an mehreren unterschiedlichen post-transkriptionellen Prozessen beteiligt ist. La besitzt dabei häufiger die Eigenschaften eines Translationsaktivators als die eines Repressors, oder es vermittelt mRNA-Stabilität. In Bezug auf die relativ späte Expression des *La*-Gens in der Spermatogenese von *Drosophila* scheint eine Beteiligung an der Repression der Translation möglich. Es liegt auch die Vermutung nahe, daß die *La*-mRNA selbst unter dem Einfluß der Translationsrepression steht. Sollte das Protein erst später translatiert werden, kann es sehr gut an der Aktivierung der Translation z.B. der *Mst87F*-mRNA beteiligt sein. Ob La selbst unter Translationskontrolle in der Spermatogenese steht kann durch weitere *in vivo*-Experimente mit Fusionsgenen ermittelt werden. Ein nächster Schritt muß auch darin bestehen, die Lokalisierung des La-Proteins mit einem Antikörper zu ermitteln.

Das errechnete Molekulargewicht des La-Proteins beträgt 45 kDa. In vorangegangenen Experimenten wurden, nach Isolierung aus präparativen EMSA,

Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Schreiter, 1998). Es konnten vier Proteine nachgewiesen werden, wovon ein Protein ein Molekulargewicht von 45 kDa aufwies. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die mögliche Beteiligung des La-Proteins an der Regulation der *Mst87F*-mRNA. Auch hier kann ein La-Antikörper in Bindungsexperimenten Aufschluß über eine direkte Beteiligung des La-Proteins an der Regulation der *Mst87F*-mRNA geben.

4.3 Das *C. elegans*-Protein Y53C12B.2 ist wie das *Drosophila* Homolog BBL-A essentiell für die Entwicklung der Keimzellen

Das *Caenorhabditis elegans*-Protein Y53C12B.2 wurde aufgrund seiner hohen Homologie zum potentiell RNA-bindenden Protein BBL-A von *Drosophila melanogaster* gewählt. Mittels der RNAi-Technik wurden die Auswirkungen der posttranskriptionellen Stilllegung des Gens untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß Y53C12B.2 sowohl für die embryonale als auch für die postembryonale Entwicklung notwendig ist. Die postembryonale Reduktion des Y53C12B.2-Proteins zeigt vor allem in der Keimzellentwicklung starke Defekte. Die untersuchten Tiere besaßen in den Gonadenarmen nur wenige Keimzellkerne und waren steril. Die Gonade hingegen entwickelte sich weitgehend normal. Dieses Erscheinungsbild entspricht dem "germ-line proliferation defective" (Glp) – Phänotyp. Mutation in *glp-1* führen zu einer Verringerung der Keimzellproliferation, so daß z.B. nur vier Keimzellen ausgebildet werden (Austin & Kimble, 1987). Die Keimzellproliferation wird kontrolliert durch ein Signal von der distalen Tip-Zelle (DTC) in der somatischen Gonade an die sich teilenden Keimzellen. GLP-1 ist ein Mitglied der Notch-Familie von Transmembran-Rezeptoren, so daß ein Signalweg essentiell für die Keimzellproliferation ist (Zusammenfassung in Seydoux & Schedl, 2001). Die korrekte zeitliche und räumliche Expression von *glp-1* wird auf dem Translationsniveau kontrolliert (Evans *et al.*, 1994). Die *glp-1*-mRNA zeigt in Embryonen und in der Keimbahn eine ubiquitäre Verteilung. In der Keimbahn ist das GLP-1 Protein nur in der distalen mitotischen Region nachweisbar, wo es als Rezeptor für induktive Signale der DTC dienen kann (Crittenden *et al.*, 1994). Im Embryo ist ebenfalls nur eine örtliche Verteilung des GLP-1 Proteins nachweisbar

(Evans *et al.*, 1994). Die Translationsregulation wird dabei durch Sequenzen im 3' nicht-translatierten Bereich vermittelt. Diese Sequenzen sind konserviert durch Vergleich mit dem *Caenorhabditis briggsae glp-1*. *C. briggsae* besitzt eine evolutive Distanz von 40 Millionen Jahren zu *C. elegans*. (Rudel & Kimble, 2001). Eine nähere Charakterisierung der trans-wirkenden Faktoren erfolgte bisher nicht. Es wird aber deutlich, daß für die korrekte Proliferation der Keimzellen nicht nur die Signalwege entscheidend sind, sondern auch Entscheidungen in der Translationsregulation. Das Y53C12B.2-Protein besitzt eine KH-Domäne, welche ein RNA-bindendes Motiv enthält. Daher ist eine Funktion in der Translationsregulation vorherzusagen. Ziele dieser Kontrolle sind aufgrund des RNAi-Phänotyps unausweichlich Gene, welche die Keimzell-proliferation und Differenzierung beeinflussen, so z.B. die *glp*-Gene.

Interessanterweise entspricht der Y53C12B.2-RNAi-Phänotyp in hohem Maße dem Phänotyp von *Drosophila* Männchen mit einer Mutation im homologen Gen *bbl-a*. Auch diese besitzen keine Keimbahnzellen im Hodenschlauch (Cordes, 1999). Dies deutet auf eine evolutiv konservierte Funktion zwischen den Arten. Auch im Menschen, in der Maus, in der Hefe und in *Arabidopsis thaliana* konnten Proteine mit einer hohen Homologie vor allem im Bereich der KH-Domäne gefunden werden (siehe 3.3, Abb. 26; siehe auch Cordes, 1999). Aufgrund von Datenbankvergleichen kann ausgeschlossen werden, daß sie zu einer bisher bekannten Familie der KH-Domänen-Proteine gehören. Geringe Ähnlichkeiten bestehen zu den den IgFII mRNA-bindenden Proteinen. Es ist daher anzunehmen, daß BBL-A und die Homologen eine neue Familie darstellen. Eine sehr gut untersuchte Familie von KH-Domänen-Proteinen ist die STAR-Familie ("signal transduction and activation of RNA"; Zusammenfassung in Vernet & Artzt, 1997). Sie besitzen neben der RNA-bindenden Domäne eine STAR-Domäne, welche in Signaltransduktionswegen beteiligt ist. Mitglieder dieser Familie sind die *Drosophila* Quaking-Proteine (z.B. "Held out wings" How) und das "Germ line defective-1 mutation" (GLD-1)-Protein von *C. elegans*. GLD-1 wird keimbahn-spezifisch exprimiert und vermittelt Translationsrepression der *tra-2* mRNA durch Bindung an den 3' nicht-translatierten Bereich (Jan *et al.*, 1997, 1999). An der Translationsrepression ist das FOG-2-Protein beteiligt, für das GLD-1 als Kofaktor dient. Dabei wird ein ternärer FOG-2/GLD-1/*tra-2*-3' UTR-Komplex postuliert,

welcher die Translationskontrolle vermittelt (Clifford *et al.*, 2000). Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß GLD-1 nicht nur eine mRNA als Zielsequenz besitzt. Lee & Schedl (2001) identifizierten 14 Ziel-RNAs, welche einen RNAi-Phänotyp im Embryo oder in der Keimbahnentwicklung ausprägen. Für die "*rme-2*" *yolk receptor* mRNA konnten sie eine direkte Beteiligung von GLD-1 an der Translationsrepression nachweisen. Diese 14 Ziel-RNAs enthalten jedoch kein gemeinsames Sequenzelement, was darauf deutet, daß GLD-1 an unterschiedlichen Regulationswegen beteiligt ist. Es ist aber auch eine Bindung an eine gemeinsame Sekundärstruktur denkbar, so daß der Bindungsmechanismus vorerst offenbleibt.

Dieses Beispiel zeigt das hohe Potential RNA-bindender Proteine in der Translationsregulation während der Keimbahnentwicklung von *C. elegans*.

Da auch das Y53C12B.2-Protein wie das GLD-1-Protein zu den KH-Domänen-Proteinen gehört, unterstützt dies die Annahme, daß das Y53C12B.2-Protein an der Translationskontrolle beteiligt ist. Eine genauere Funktion ist jedoch erst durch weitere Experimente zu belegen. Die hohe Homologie zu dem *Drosophila* BBL-A-Protein und die Übereinstimmung in den mutanten Phänotypen läßt auf die gleiche Funktion schließen. Der Beweis einer funktionalen Homologie wurde zum Beispiel für das *mag-1* ("*mago nashi*") Gen erbracht. Kloniert man die *C. elegans mag-1* cDNA in ein Expressionskonstrukt mit dem *Drosophila mag-1* Promoter und integriert dieses mittels P-Element vermittelter Keimbahntransformation in die Fliege, so ist es in der Lage den *mago nashi* "loss-of-function" Phänotyp abzuschwächen (Newmark *et al.*, 1997).

Bei einigen Tieren war auch der Phänotyp "Protruding vulva" (Pvl) ausgebildet. Dieser wurde ebenfalls nach postembryonaler Einwirkung der dsRNA des Y53C12B.2-Gens ausgebildet. Die Vulva entwickelt sich aus den Nachkommen von drei der sechs Vulva-Vorläufer-Zellen (VPC, "vulval precursor cells") aus der Vulva-Äquivalenz-Gruppe (Sternberg & Horvitz, 1986). Die Zellteilungen und -differenzierungen gehen dabei von mehreren Signalen der somatischen Gonade aus (Zusammenfassung in Greenwald 1997; Kornfeld 1997). Das initiale Signal geht dabei von der "anchor cell" in der somatischen Gonade im späten L2 und frühen L3 Stadium aus. Dieses Signal wird durch den RAS-Signalweg vermittelt.

Die induzierte Zelle selbst sendet nun ein laterales Signal an die beiden benachbarten Zellen (Sternberg 1988; Sternberg & Horvitz, 1989; Simske & Kim, 1995). Dieses laterale Signal wirkt durch den Notch-Signalweg. Beide Signalwege sind evolutiv hoch konserviert. Nach drei Zellteilungen entstehen insgesamt 22 Zellen. Acht Zellen davon bilden die Mitte der sich entwickelnden Vulva und jeweils sieben Zellen bilden die Seiten (Sulston & Horvitz, 1977; Sternberg & Horvitz, 1986).

Die meisten bisher beschriebenen Gene, welche die Vulvaformation beeinträchtigen (Zusammenfassung in Greenwald 1997; Kornfeld 1997) resultieren in den Phänotypen "multivulva" (Muv) und "vulvaless" (Vul). Ein Phänotyp, welcher die Struktur der Vulva beeinflusst, wurde mit "defective eversion of the vulva" (Evl) von Seydoux *et al.* (1993) charakterisiert. Während der Vulva-Eversion wird ein Durchgang vom Uterus durch die Vulva angelegt.

Ein erster genetischer Screen zur Identifizierung eines neuen Phänotyps, dem "protruding vulva" Pvl-Phänotyp wurde von Eisenmann & Kim (2000) beschrieben. Die meisten der beschriebenen Mutanten besitzen auch den "egg laying defective" (Egl)-Phänotyp. Es konnte auch gezeigt werden, daß das *C. elegans bar-1*, welches das homologe Protein der Vertebraten β -catenin und *Drosophila* Armadillo kodiert, ebenfalls einen Pvl-Phänotyp besitzt (Eisenmann *et al.*, 1998). Diese Proteine sind an der Signaltransduktion im wingless/Wnt-Signalweg beteiligt. Die identifizierten Pvl-Mutanten beeinflussen alle Stadien der Vulva-Entwicklung.

Für die genaue Klärung der Ursache, die zur Ausbildung des Pvl- Phänotyps bei den RNAi-Experimenten mit dsRNA von Y53C12B.2 führen, ist eine detailliertere Betrachtung notwendig. Da sich die somatische Gonade normal entwickelt, ist davon auszugehen, daß das initiale Signal der "anchor cell" nicht betroffen ist. Aufgrund der Tatsache, daß viele Vorgänge bei der Vulva-Entwicklung von Signaltransduktionswegen abhängen, läge es nahe, für Y53C12B.2 auch eine solche Funktion zu postulieren. Es gibt bisher aber keinen Hinweis, daß Y53C12B.2 an einem dieser Wege beteiligt ist.

Der ausgeprägte RNAi-Phänotyp wurde auch in Feeding-Experimenten bestätigt. Diese Experimente ermöglichen nun, eine hohe Anzahl an Tieren zu charakterisieren und für weitere Experimente zu verwenden. Da eine hohe

Übereinstimmung zum Phänotyp von Gld-1- und vor allem von Glp-1-Mutanten auftrat, muß in weiteren Experimenten geklärt werden, ob das Y53C12B.2-Protein an den gleichen Regulationsmechanismen beteiligt ist. Interessanterweise besitzen *C. briggsae glp-1-RNAi* Tiere neben dem Keimbahn-Phänotyp auch den Pvl-Phänotyp, welches für *C. elegans* nicht der Fall ist (Austin & Kimble, 1987, Rudel & Kimble, 2001). Hier muß eine mögliche Rolle des Y53C12B.2-Proteins in *C. elegans* untersucht werden.

Die hohe Übereinstimmung der Phänotypen eröffnet die Möglichkeit der Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf das *Drosophila*-Modellsystem und die Klärung der Funktion des BBL-A-Proteins in der Spermatogenese von *Drosophila*. Nicht zuletzt ist die Charakterisierung der RNA-bindenden Eigenschaften sowohl des *C. elegans*-Proteins als auch des *Drosophila* BBL-A-Proteins notwendig. Die Identifizierung der Zielsequenzen muß Aufschluß über die Funktion der Proteine geben.

5. Zusammenfassung

Protein-RNA Wechselwirkungen sind entscheidend für die Expressionskontrolle auf Translationsebene, die während der Keimzellentwicklung vieler Organismen beobachtet wird. Ziel dieser Arbeit war es, im Modellsystem *Drosophila*-Spermatogenese solche Interaktionen zu charakterisieren und näher zu spezifizieren. Dieses Ziel wurde in drei verschiedenen Aspekten verfolgt:

- Die Eingrenzung *cis*-regulatorischer Sequenzelemente bei einem neuen Spermatogenese Gen.
- Ansätze zur Identifizierung der *trans*-aktiven Komponenten bei dem gut untersuchten Beispiel *Mst87F*.
- Analyse von RNAi-Effekten in *Caenorhabditis*, die aus dem Verlust einer potentiell RNA-bindenden Aktivität resultieren, welche in *Drosophila* zu Sterilität führt.

Das Gen *don juan* wird in männlichen Keimzellen exprimiert und die mRNA unterliegt der Translationsrepression bis zum Stadium der elongierten Spermatiden. Diese wird durch den 117 Nukleotide umfassenden 5' nicht-translatierten Bereich vermittelt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß ein 60 Nukleotide-Fragment (+56/+115, 3' Fragment) aus dem 5' UTR mit Testesproteinen interagiert. Dabei werden in "Electrophoretic mobility shift assays" fünf Komplexe mit unterschiedlicher Stabilität ausgebildet. Die Ausbildung der Komplexe ist gewebespezifisch. Mit Ovarproteinextrakt entstehen diese nicht. Der eingegrenzte Bereich der mRNA bildet eine stabile Sekundärstruktur in Form eines stem-loops mit einem terminalen und zwei internen loops aus. In UV-Crosslinking-Experimenten bindet ein 62 kDa Protein innerhalb der stem-loop Struktur (+61 bis +85). Die Notwendigkeit der Region +55 bis +89 für die Repression der Translation *in vivo* wurde parallel in der Arbeitsgruppe von R. Renkawitz-Pohl nachgewiesen. Die Bindung nur eines Proteins in der stem-loop Region im Vergleich zum komplexen Bandenmusters der EMSA-Experimente eröffnet die Möglichkeit der Existenz weiterer regulatorischer Sequenzelemente im 3' Fragment, welche mit Testesproteinen interagieren. Eine hohe Sequenzähnlichkeit dieser Region besteht mit dem TCE ("translational control element") der *Drosophila Mst(3)CGP*-Genfamilie, welches Translationskontrolle während der

Spermatogenese vermittelt. Diesem Bereich kommt jedoch keine Bedeutung bei der *don juan*-Regulation zu.

In zweiten Teil wurden mögliche Kandidaten RNA-bindender Proteine identifiziert, welche an das TCE der *Mst87F*-mRNA binden. In einem "Northwestern-Screening"-Experiment wurde das *Drosophila* La-Protein isoliert. Dieses konnte bisher in verschiedenen Zusammenhängen des RNA-Metabolismus beschrieben werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß das *Drosophila* La-Protein in einem zeitlich begrenzten Rahmen während der Spermatogenese exprimiert wird. Die Expression erfolgt in späten prämeiotischen Stadien. Eine Funktion an der Regulation der *Mst87F*-mRNA, dessen Transkription in primären Spermatocyten erfolgt, ist wahrscheinlich. Ein La-Fusionsprotein aus einem Retikuloctytenlysat kann an ein TCE enthaltenes *in vitro*-Transkript binden. Dies bestärkt die Aussage, daß das La-Protein mit dem 5' UTR der *Mst87F*-mRNA assoziiert ist.

Hemizygote Männchen der *Drosophila melanogaster* Linie *ms(1)bb1-a* enthalten keine Keimbahnzellen in den Hodenschläuchen und sind steril. Jedoch existiert kein Nullallel. Das BBL-A-Protein ist evolutiv hoch konserviert und gehört zu einer neuen Familie von KH-Domänen-Proteinen. Um einen Null-Phänotyp zu charakterisieren, wurden RNAi-Experimente mit dem *C. elegans* Homolog Y53C12B.2 durchgeführt. Die Reduktion des Y53C12B.2-Proteins führt zu einem starken postembryonalen Phänotyp. Neben einem Vulva-Defekt ist die Keimzellproliferation und -differenzierung massiv gestört. Die Gonadenarmen enthalten fast keine Keimzellen. Die Tiere sind steril. Die Übereinstimmung der mutanten Phänotypen lassen auf eine funktionelle Homologie beider Proteine schließen. Dies eröffnet die Möglichkeit der Charakterisierung einer neuen Familie RNA-bindender KH-Domänen-Proteine. In einem Modellsystem gewonnene Erkenntnisse können so für die Charakterisierung in einem weiteren angewandt werden.

6. Literatur

Adams, M. D. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.

Ali, N. & Siddiqui, A. (1997). The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2249-2254.

Amaldi, F. & Pierandrei-Amaldi, P. (1997). Cytoplasmic fate of eukaryotic mRNA. In Jeanteur, P. (ed.). *Cytoplasmic fate of eukaryotic mRNA*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp. 1-17.

Andino, R., Rieckhof, G. E. & Baltimore, D. (1990). A functional ribonucleoprotein complex forms around the 5' end of poliovirus RNA. *Cell* **63**: 369-380.

Austin, J. & Kimble, J. (1987). *glp-1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* **51**: 589-599.

Aziz, N. & Munro, H. N. (1987). Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 8478-8482.

Bai, C., Li, Z. & Tolia, P. P. (1994). Developmental characterization of a *Drosophila* RNA-binding protein homologous to the human systemic lupus erythematosus-associated La/SS-B autoantigen. *Mol. Cell. Biol.* **14(8)**: 5123-5129.

Bai, C. & Tolia, P.P. (2000). Genetic analysis of a La homolog in *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Acids Res.* **28**: 1078-1084.

Barkoff, A. F., Dickson, K. S., Gray, N. K. & Wickens, M. (2000). Translational control of *cyclin B1* mRNA during meiotic maturation: coordinated repression and cytoplasmic polyadenylation. *Dev. Biol.* **220**: 97-109.

Bell, L. R., Maine, E. M., Schedl, P. & Cline, T. W. (1988). *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. *Cell* **55**: 1037-1046.

Blümer, N., Schreiter, K., Hempel, L., Santel, A., Hollmann, M., Schäfer, M. A. & Renkawitz-Pohl, R. (2001). A new translational repression element and unusual transcriptional control regulate expression of *don juan* during *Drosophila* spermatogenesis. *Mech. Dev.* im Druck.

Borck, K., Beggs, J. D., Brammar, W. J., Hopkins, A. S. & Murray, N. E. (1976). The construction *in vitro* of transducing derivatives of phage lambda. *Mol. Gen. Genet.* **146**: 199-207.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Braun, R. E., Peschon, J. J., Behringer, R. R., Brinster, R. L. & Palmiter, R. D. (1989). Protamine 3'–untranslated sequences regulate temporal translational control and subcellular localization of growth hormone in spermatids of transgenic mice. *Genes Dev.* **3**: 793-802.

Braun, R. E. (1990). Temporal translational regulation of the *protamine 1* gene during mouse spermatogenesis. *Enzyme* **44**: 120-128.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.

Brink, N. G. (1968). Protein synthesis during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Res.* **5**:192-194

Burd, C., Matunis, E. & Dreyfuss, G. (1991). The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly (A)-binding protein have different RNA binding activities. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3419-3424.

Burd, C. G. & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**: 615-621.

Carmichael, G. G. (1980). Molecular weight determination of RNA by gel electrophoresis. *Electrophoresis* **5**: 376-379.

Castrillon, D. H., Gönczy, P., Alexander, S. Rawson, R., Eberhart, C. G., Viswanathan, S., DiNardo, S. & Wassermann, 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.

Chang, Y. N., Kenan, D. J., Keene, J. D., Gatignol, A. & Jeang, K. T. (1994). Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *J. Virol.* **68**: 7008-720.

Chang, J. S., Tan, L. & Schedl, P. (1999). The *Drosophila* CPEB homolog, Orb, is required for oskar protein expression in oocytes. *Dev. Biol.* **215**: 91-106.

Christerson, L. B. & McKearin, D. M. (1994). Orb is required for anteroposterior and dorsoventral patterning during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* **8**: 614-628.

Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. & Muller, C. W. (1999). Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α . *Nature* **399**: 221-229.

Clifford, R., Lee, M.-H., Nayak, S., Ohmachi, M., Giorgini, F. & Schedl, T. (2000). FOG-2, a novel F-box containing protein, associates with the GLD-1 RNA binding protein and directs male sex determination in the *C. elegans* hermaphrodite germline. *Development* **127**: 5265-5276.

Conte, M. R., Grüne, T., Ghuman, J., Kelly, G., Ladas, A., Matthews, S. & Curry, S. (2000). Structure of tandem RNA recognition motifs from polypyrimidine tract binding protein reveals novel features of the RRM fold. *EMBO J.* **19**: 3132-3141.

Cordes, R. (1999). Molekulargenetische Untersuchungen zur männlichen Keimzellentwicklung von *Drosophila melanogaster*. Dissertation. Georg-August-Universität zu Göttingen.

Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**: 10881-10890.

Crittenden, S., Troemel, E., Evans, T. & Kimble, J. (1994). GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germline. *Development* **120**: 2901-2911.

Crosio, C., Boyl, P. P., Loreni, F., Pierandrei-Amaldi, P. & Amaldi, F. (2000). La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* **28**: 2927-2934.

Davies, H. G., Giorgini, F., Fajardo, M. A. & Braun, R. E. (2000). A sequence-specific RNA binding complex expressed in murine germ cells contains MSY2 and MSY4. *Dev. Biol.* **221**: 87-100.

Deardorff, J. & Sachs, A. (1997). Differential effects of aromatic and charged residue substitutions in the RNA binding domains of the yeast poly(A)-binding protein. *J. Mol. Biol.* **269**: 67-81.

Dellavalle, R. P., Petersen, R. & Lindquist, S. (1994). Preferential deadenylation of Hsp70 mRNA plays a key role in regulating Hsp70 expression in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3646-3659.

Dubnau, J. & Struhl, G. (1996). RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature* **379**: 694-699.

Eberhardt, C. G., Maines, J. Z. & Wassermann, S. A. (1996). Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human *Deleted in Azoospermia*. *Nature* **381**: 783-785.

Eisenmann, D. M., Maloof, J. N., Simske, J. S., Kenyon, C. & Kim, K. S. (1998). The beta-catenin homolog BAR-1 and LET-60 Ras coordinately regulate the Hox gene *lin-39* during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *Development* **125**: 3667-3680.

Eisenmann, D. M. & Kim, K. S. (2000). Protruding vulva mutants identify novel loci and wnt signaling factors that function during *Caenorhabditis elegans* vulva development. *Genetics* **156**: 1097-1116.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**: 188-200.

Elliott, D. J. & Cooke, H. J. (1997). The molecular genetics of male infertility. *BioEssays* **19**: 801-809.

Elliott, D. J., Millar, M. R., Oghene, K., Ross, A., Kiesewetter, F., Pryor, J., McIntyre, M., Hargreave, T. B., Saunders, P. T., Vogt, P. H., Chandley, A. C. & Cooke, H. (1997). Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3848-3853.

Elliott, D. J., Bourgeois, C. F., Klink, A., Stevenin, J. & Cooke, H. J. (2000). A mammalian germ cell-specific RNA-binding protein interacts with ubiquitously expressed proteins involved in splice site selection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**: 5717-5722.

Evans, T. C., Crittenden, S. L., Kodyianni, V. & Kimble, J. (1994). Translational control of maternal *glp-1* mRNA establishes an asymmetry in the *C. elegans* embryo. *Cell* **77**: 183-194.

Fajardo, M. A., Butner, K. A., Lee, K. & Braun, R. E. (1994). Germ cell-specific proteins interact with the 3' untranslated regions of *Prm-1* and *Prm-2* mRNA. *Dev. Biol.* **166**: 643-653.

Fajardo, M. A., Haugen, H. S., Clegg, C. H. & Braun, R. E. (1997). Separate elements in the 3' untranslated region of the mouse *protamine 1* mRNA regulate translational repression und activation during murine spermatogenesis. *Dev. Biol.* **191**: 42-52.

Fierro-Monti, I. & Mathews, M.B. (2000). Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 241-246.

Fire, A. (1986). Integrative transformation of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **5**: 2673-2680.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., k., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

Fire, A. (1999). RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* **15**: 358-363.

Fuller, M. T. (1993). Spermatogenesis. In Bate, M. & Martinez Arias, A. (Hrsg.): The development of *Drosophila melanogaster*. S. 71-147. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Gabrielsen, O. S. & Huet, J. (1993). Magnetic DNA affinity purification of yeast transcription factor. *Methods Enzymol.* **218**: 508-525.

Gibson, T. J., Rice, P. M., Thompson, J. D. & Heringa, J. (1993). KH domains within the FMR1 sequence suggest that fragile X syndrome stems from a defect in RNA metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 331-333.

Gigliotti, S., Balz, V., Malva, C. & Schäfer, M. A. (1997). Organisation of regulatory elements in two closely spaced *Drosophila* genes with common expression characteristics. *Mech. Dev.* **68**: 101-113.

Goodwin, E. B. (2001). Translational repression: Not just a Puf of smoke. *Curr. Biol.* **11**: R607-R609.

Gott, J. M., Willis, M. C., Koch, T. H. & Uhlenbeck, O. C. (1991). A specific UV-induced RNA-protein cross-link using 5-Bromouridine-substituted RNA. *Biochem.* **30**: 6290- 6295.

Gould-Somero, M. & Holland, L. (1974). The timing of RNA synthesis for spermiogenesis in organ cultures of *Drosophila melanogaster* testes. *Wilh. Roux' Arch.* **174**: 133-148.

Gray, N. K., Quick, S., Goossen, B., Constable, A. Hirling, H., Kuhn, L. C. & Hentze, M. W. (1993). Recombinant iron-regulatory factor functions as an iron-responsive-element-binding protein, a translational repressor and an aconitase. A functional assay for translational repression and direct demonstration of the iron switch. *Eur. J. Biochem.* **218**: 657-667.

Gray, N. K. & Hentze, M. W. (1994). Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *EMBO J.* **13**: 3882-3891.

Greenwald, I. (1997). Development of the vulva, pp. 519-541 in *C. elegans* II, edited by D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer & J. R. Priess. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Gu, W., Tekur, S., Reinbold, R., Eppig, J. J., Choi, Y. C., Zheng, J. Z., Murray, M. T. & Hecht, N. B. (1998). Mammalian male and female germ cells express a germ cell-specific Y-box protein, MSY2. *Biol. Reprod.* **59**: 1266-1274.

Hake, L. E. & Richter, J. D. (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmatic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* **79**: 617-627.

Hake, L. E. & Richter, J. D. (1997). Translational regulation of maternal RNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1332**: M31-M38.

Hake, L. E., Mendez, R. & Richter, J. D. (1998). Specificity of RNA binding by CPEB: Requirement for RNA recognition motifs and a novel zinc finger. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 685-693.

Hammond, S. M., Bernstein, E. Beach, D. & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**: 293-296.

Han, J.-H., Zhang, H.-J., Min, G.-S., Kemler, D. & Hashimoto, C. (2000). A novel *Drosophila* serpin that inhibits serine proteases. *FEBS Letters*. **486**: 194-198.

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.

Handa, N., Nureki, O., Kurimoto, K., Kim, I., Sakamoto, H., Shimura, Y., Muto, Y & Yokohama, S. (1999). Structural basis for recognition of the *tra* mRNA precursor by the sex-lethal protein. *Nature* **398**: 579-585.

Hay, B. & Short, J. M. (1992). XL1-Blue Helper phage and SOLR-cells for λ -FIX II Excision. *Stratagies* **5**: 16-18.

Hennig, W. (1967). Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Lampenbürsten-Y-Chromosoms in der Spermatogenese von *Drosophila*. *Chromosoma* **22**: 294-357.

Itakura, K., Rossi, J. J. & Wallace, R. B. (1984). Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* **53**: 323.

Jaeger, J. A., Turner, D. H. & Zuker, M. (1989). Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7706-7710.

Jan, E., Yoon, J. W., Walterhouse, D., Iannaccone, P. & Goodwin, E. B. (1997). Conservation of the *C. elegans tra-2* 3' UTR translational control. *EMBO J.* **16**: 6301-6313.

Jan, E., Motzny, C. K., Graves, L. E. & Goodwin, E. B. (1999). The STAR protein, GLD 1, is a translational regulator of sexual identity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **18**: 258-269.

Jerpseth, B., Greener, A., Short, J. M., Viola, J. & Kretz, P. L. (1992). XL1-Blue-MRF⁻ *E. coli* cells: MCR⁻, MCRa⁻, MCRb⁻, MCTf⁻, MRR⁻ and HsdR⁻ derivatives of XL1-Blue cells. *Strategies* **5**: 81-83.

Jin, S.-W., Kimble, J. & Ellis, R. E. (2001). Regulation of cell fate in *Caenorhabditis elegans* by a novel cytoplasmic polyadenylation element binding protein. *Dev. Biol.* **229**: 537-553.

Kempe, E., Muhs, B. & Schäfer, M. (1993). Gene regulation in *Drosophila* spermatogenesis: analysis of protein binding at the translational control element TCE. *Dev. Genet.* **14**: 449-459.

Kempe, E. (1995). Translationskontrolle während der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*: Untersuchungen zu Protein-RNA-Wechselwirkungen. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Kleene, K. C., Distel, R. J. & Hecht, N. B. (1984). Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* **105**: 71-79.

Konarska, M. M. & Sharp, P. A. (1986). Electrophoretic separation of complexes involved in the splicing of precursors to mRNAs. *Cell* **46**: 845-855.

Kornfeld, K. (1997). Vulva development in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet.* **13**: 55-61.

Krieg, P. A. & Melton, D. A. (1984). Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs. *Nucl. Acids Res.* **21**: 7057-7070.

Krieg, P. A. & Melton, D. A. (1987). *In vitro* synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* **155**: 397-415.

Krieg, P. A. (1990). Improved synthesis of full-length RNA probe at reduced incubation temperatures. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6463.

Kuhn, R., Schäfer, U. & Schäfer, M. (1988). Cis-acting regions sufficient for spermatocyte-specific transcriptional and spermatid-specific translational control of the *Drosophila melanogaster* gene *mst(3)gl-9*. *EMBO J.* **7**: 447-454.

Kuhn, R., Kuhn, C., Börsch, D., Glätzer, K. H., Schäfer, U. & Schäfer, M. (1991). A cluster of four genes selectively expressed in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Mech. Dev.* **35**: 143-151.

Kühn, U. & Pieler, T. (1996). Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J. Mol. Biol.* **256**: 20-30.

Kwon, Y. K. & Hecht, N. B. (1993). Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation. *Mol Cell. Biol.* **13**: 6547-6557.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

LaFontaine, D. L. & Tollervey, D. (2001). The function and synthesis of ribosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**: 514-520.

Lauder, S., Bankmann, M., Guzder, S., N. Sung, P., Prakash, L. & Prakash, S. (1996). Dual requirement for the yeast MMS19 gene in DNA repair and RNA polymerase II transcription. *Mol. Cell Biol.* **16**: 6783-6793.

Lee, K., Fajardo, M.A. & Braun, R. E. (1996). A testis cytoplasmic RNA-binding protein that has the properties of a translational repressor. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3023-3034.

Lee, M.-H. & Schedl, T. (2001). Identification of *in vivo* mRNA targets of GLD-1, a maxi-KH motif containing protein required for *C. elegans* germ cell development. *Genes Dev.* **15**: 2408-2420.

Leibold, E. A. & Munro, H. N. (1988). Cytoplasmic protein binds to highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2171-2175.

Lehrrach, H., Diamond, D., Wosney, J. M. & Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions. A critical examination. *Biochemistry* **16**: 4743-4751.

Lewis, H. A., Chen, H., Edo, C., Buckanovich, R. J., Yang, Y. Y. L., Musunuru, K., Zhong, R., Darnell, R. B. & Burley, S. K. (1999). Crystal structures of Nova-1 and Nova-2 K-homology RNA-binding domains. *Structures* **7**: 191-203.

Lie, Y. S. & Macdonald, P. M. (1999). Translational regulation of oskar mRNA occurs independent of the cap and poly(A) tail in *Drosophila* ovarian extracts. *Development* **126**: 4989-4996.

Lindsley, D. L. & Tokuyasu, K. T. (1980). In Ashburner, M. & Wright, T.R.F. (eds.); *The Genetics and Biology of Drosophila*. Vol. 2d, pp.225-294, Academic Press, London.

Lombaerts, M., Tijsterman, M., Verhage, R. A. & Brouwer, J. (1997). *Saccharomyces cerevisiae mms19* mutants are deficient in transcription-coupled and global nucleotide excision repair. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3974-3979.

Luitjens, C., Gallegos, M., Kraemer., B., Kimble, J. & Wickens, M. (2000). CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes Dev.* **14**: 2596-2609.

Ma, K., Inglis, J. D., Sharkey, A., Bickmore, W. A., Hill, R. E., Prosser, E. J., Speed, R. M., Thomson, E. J., Jobling, M., Taylor, K., Wolfe, J., Cooke, H. J., Hargreave, T. B. & Chandley, A. C. (1993). A Y-chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* **75**: 1287-1295.

Maeda, I., Kohara, Y., Yamamoto, M. & Sugimoto, A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr. Biol.* **11**: 171-176.

Mattioli, M. & Reichlin, M. (1974). Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* **17**: 421-429.

Maraia, R. J. (2001). La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase III transcripts. *J. Cell. Biol.* **153**: F13-F17.

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. *Nucl. Acids Res.* **12**: 7035-7056.

Mendez, R., Hake, L. E., Andresson, T., Littlepage, L. E., Rudermann, J. V. & Richter, J.- D. (2000a). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* **404**: 302-307.

Mendez, R., Murthy, K. G., Ryan, K., Manley, J. L. & Richter, J.- D. (2000b). Phosphorylation of CPEB by EG2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol. Cell* **6**: 1253-1259.

Mendez, R. & Richter, J. D. (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **2**: 521-529.

Muckenthaler, M., Gray, N. K. & Hentze, M. W. (1998). IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol. Cell* **2**: 383-388.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.

Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.

Murray, N. E., Brammar, W. J. & Murray, K. (1977). Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* **150**: 53-58.

Musco, G., Stier, G. Joseph, C., Castiglione Morelli, M. A., Nilges, M., Gibson, T. J. & Pastore, A. (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insight into the fragile X syndrome. *Cell* **85**: 237-245.

Musco, G., Kharrat, A., Stier, G., Fraternali, F., Gibson, T. J., Nilges, M. & Pastore, A. (1997). The solution structure of the first KH domain of FMR1, the protein responsible for the fragile X syndrome. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 712-716.

Nabel-Rosen, H., Dorevitch, N., Reuveny, A. & Volk, T. (1999). The balance between two isoforms of the *Drosophila* RNA-binding protein How controls tendon cell differentiation. *Mol. Cell.* **4**: 573-584

Navaratnam, N., Bhattacharya, S., Fujino, T., Patel, D., Jarmuz, A. L. & Scott, J. (1995). Evolutionary origins of apoB mRNA editing: catalysis by a cytidine deaminase that has acquired a novel RNA-binding motif at its active site. *Cell* **81**: 187-195.

Newmark, P. A., Mohr, S. E., Gong, L. & Boswell, R. E. (1997). *mago nashi* mediates the posterior follicle cell-to-oocyte signal to organize axis formation in *Drosophila*. *Development* **124**: 3197-3207.

Nietfeld, W., Mentzel, H. & Pieler, T. (1990). The *Xenopus laevis* poly(A) binding protein is composed of multiple functionally independent RNA binding domains. *EMBO J.* **9**: 3699-3705.

Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Standart, N. & Thiele, B. J. (1994). Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequences in the 3' untranslated region. *EMBO J.* **13**: 1476-1481.

Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I. N. & Hentze, M. W. (2001). Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: the 3' UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* **104**: 281-290.

Pellizzoni, L., Cardinali, B., Lin-Marq, N., Mercanti, D. & Pierandrei-Amaldi, P. (1996). A *Xenopus laevis* homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs *in vitro*: implication of a protein factor in complex formation. *J. Mol. Biol.* **259**: 904-915.

Pellizzoni, L., Lotti, F., Maras, B. & Pierandrei-Amaldi, P. (1997). Cellular nucleic acids binding protein binds a conserved region of the 5' UTR of *Xenopus laevis* ribosomal protein mRNAs. *J. Mol. Biol.* **267**: 264-275.

Penninggers, A. (1995). Translationskontrolle während der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster*. Charakterisierung spezifischer Protein-RNA-Wechselwirkungen. Diplomarbeit. Georg-August-Universität zu Göttingen.

Perez-Canadillas, J.-M. & Varani, G. (2001). Recent advances in RNA-protein recognition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**: 53-58.

Preiss, T. & Hentze, M. W. (1998). Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail promoted translation in yeast. *Nature* **392**: 516-520.

Preiss, T. & Hentze, M. W. (1999). From factors to mechanism: translation and translational control in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 515-521.

Queimado, L., Rao, M., Schultz, R. A., Kooi, E. V., Aravind, L., Nardo, T., Stefanini, M. & Friedberg, E. C. (2001). Cloning the human and mouse MMS19 genes and functional complementation of a yeast mms19 deletion mutant. *Nucl. Acids Res.* **29**: 1884-1891.

Ramos, A., Grunert, S., Adams, J. Micklem, D., Proktor, M., Bycroft, M., St Johnston, D. & Varani, G. (2000). RNA recognition by a staufen double-stranded RNA binding domain. *EMBO J.* **19**: 997-1009.

Reijo, R., Lee, T. Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L. G., Rosenberg, M., Rozen, S., Jaffe, T., Straus, D., Hovatta, O. et al. (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y-chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat. Genet.* **10**: 383-393.

Richter, J. D. (1995). Dynamics of poly (A) addition and removal during development. In: Translational control; Hershey, J. W. B., Matthews, M. B. & Sonenborg, N. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 481-503.

Rivera-Pomar, R., Niessing, D., Schmidt-Ott, U., Gehring, W. J. & Jäckle, H. (1996). RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature* **379**: 746-749.

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.

Rudel, D. & Kimble, J. (2001). Conservation of *glp-1* regulation and function in nematodes. *Genetics* **157**: 639-654.

Sachs, A. B., Sarnow, P. & Hentze, M. W. (1997). Tarting at the beginning, middle and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* **89**: 831-8838.

Sägesser, R., Martinez, E., Tsagris, M. & Tabler, M. (1997). Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA expression library. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3816-3822.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

Santel, A., Winhauer, T., Blümer, N. & Renkawitz-Pohl, R. (1997). The *Drosophila don juan (dj)* gene encodes a novel sperm specific protein component characterized by an unusual domain of a repetitive amino acid motif. *Mech. Dev.* **64**: 19-30.

Santel, A., Blümer, N., Kämpfer, M. & Renkawitz-Pohl. (1998). Flagellar mitochondrial association of the male-specific Don Juan protein in *Drosophila* spermatozoa. *J. Cell Sci.* **111**: 3299-3309.

Schaeffer, C., Bardoni, B., Mandel, J. L., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Moine, H. (2001). The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J.* **20**: 4803-4813.

Schäfer, M., Kuhn, R., Bosse, F., Schäfer, U. (1990). A conserved element in the leader mediates post-meiotic translation as well as cytoplasmic polyadenylation of a *Drosophila* spermatocyte mRNA. *EMBO J.* **9**: 4519-4525.

Schäfer, M. (1992). Das poly(A)-Ende der mRNA. Seine Rolle in der Genexpression. *Biologie in unserer Zeit* **22**: 39-44.

Schäfer, M., Börsch, D., Hülster, A. & Schäfer, U. (1993). Expression of a gene duplication encoding conserved sperm tail proteins is translationally regulated in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1708-1718.

Schäfer, M., Nayernia, K., Engel, W. & Schäfer, U. (1995). Translational control in spermatogenesis. *Dev. Biol.* **172**: 344-352.

Schlicker, M., Reim, K., Schlüter, G. & Engel, W. (1997). Specific binding of a 47-kilodalton protein to the 3' untranslated region of rat transition protein 2 messenger ribonucleic acid. *Biol. Reprod.* **56**: 697-706.

Schreiter, K. (1998). Identifizierung RNA-bindender Proteine, welche die Expression einer Genfamilie in der Spermatogenese von *Drosophila* kontrollieren. Diplomarbeit. Georg-August-Universität zu Göttingen.

Schumacher, J. M., Lee, K., Edelhoff, S. & Braun, R. E. (1995). Spnr, a murine RNA-binding protein that is localized to cytoplasmic microtubules. *J. Cell Biol.* **129**: 1023-1032.

Schumacher, J. M., Artzt, K. & Braun, R. E. (1998). Spermatid perinuclear ribonucleic acid-binding protein binds microtubules *in vitro* and associates with abnormal manchettes *in vivo* in mice. *Biol. Reprod.* **59**: 69-76.

Schwartz, D. C. & Parker, R. (1999). Mutation in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 5247-5256.

Seydoux, G., Savage, C. & Greenwald, I. (1993). Isolation and characterization of mutations causing abnormal eversion of the vulva in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **157**: 423-436.

Seydoux, G. (1996). Mechanisms of translational control in early development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**: 555-561.

Seydoux, G. & Schedl, T. (2001). The germline in *C. elegans*: origins, proliferation, and silencing. *Int. Rev. Cytol.* **203**: 139-185.

Sharp, P. A. (2001). RNA interference 2001. *Genes Dev.* **15**: 485-490.

Shi, H., Hoffman, B.E. & Lis, J.T. (1997). A specific RNA hairpin loop structure binds the RNA recognition motifs of the *Drosophila* SR protein B52. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2649-2657.

Simske, J. S. & Kim, S. K. (1995). Sequential signalling during *Caenorhabditis elegans* vulval induction. *Nature* **375**: 142-146.

Siomi, H., Matunis, M. J., Michael, W., M. & Dreyfuss, G. (1993a). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucl. Acids Res.* **21**: 1193-1198.

Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L. & Dreyfuss, G. (1993b). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* **74**: 291-298.

Sonoda, J. & Wharton, R.P. (1999). Recruitment of Nanos to *hunchback* mRNA by Pumilio. *Genes Dev.* **13**: 2704-2712.

Sonoda, J. & Wharton, R.P. (2001). *Drosophila* brain tumor is a translational repressor. *Genes Dev.* **15**: 762-773.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-507.

Stebbins-Boaz, B., Hake, L. E. & Richter, J. D. (1996). CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of *cyclin*, *Cdk2* and *c-mos* mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *EMBO J.* **15**: 2582-2592.

Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C. H., Mendez, R. & Richter, J. D. (1999). Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol. Cell* **4**: 1017-1027.

Sternberg, P. W. (1988). Lateral inhibition during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **335**: 551-554.

Sternberg, P. & Horvitz, H. (1986). Pattern formation during vulval development in *C. elegans*. *Cell* **44**: 761-772.

Sternberg, P. & Horvitz, H. (1989). The combined action of two intercellular signaling pathways specifies three cell fates during vulval induction in *C. elegans*. *Cell* **58**: 679-693.

St. Johnston, D., Beuchle, D. & Nüsslein-Volhard, C. (1991). *staufer*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**: 51-63.

St. Johnston, D., Brown, N. H., Gall, J. G. & Jantsch, M. (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 10979-10983.

Sulston, J. & Horvitz, H. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**: 110-156.

Svitkin, Y. V., Pause, A. & Sonnenberg, N. (1994). La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J. Virol.* **68**: 7001-7007.

Talamillo, A., Chisholm, A. A., Garesse, R. & Jacobs, H. T. (1998). Expression of the nuclear gene encoding mitochondrial ATP synthase subunit alpha in early development of *Drosophila* and sea urchin. *Mol. Biol. Rep.* **25**: 87-94.

Tan, L., Chang, J. S., Costa, A. & Schedl, P. (2001). An autoregulatory feedback loop directs the localized expression of the *Drosophila* CPEB protein Orb in the developing oocyte. *Development* **128**: 1159-1169.

Tarun, S. Z. & Sachs, A. B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **15**: 7168-7177.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018.

Theil, E.C. (1993). The IRE (iron regulatory element) family: structures which regulate mRNA translation or stability. *BioFactors* **4**: 87-93.

Venables, J., Elliot, D. J., Makarova, O. V., Makarov, E. M., Cooke, H. J. & Eperon, I. C.(2000). RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2beta and affect splicing. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 685-694.

Vernet, C., & Artzt, K. (1997). STAR, agene family involved in signal transduction and activation of RNA. *Trends Genet.* **13**: 479-484.

Walter, A. E., Turner, D. H., Kim, J., Lyttle, M. H., Muller, P., Mathews, D. H. & Zuker, M. (1994). Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9218-9222.

Weichenhan, D. (1991). Fast recovery of DNA from agarose gels by centrifugation through blotting paper. *Trends Genet.* **7**: 109.

Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D. & Sachs, A. B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* **2**: 135-140.

Wharton, R. P., Sonoda, J., Lee, T., Patterson M. & Murata Y. (1998). The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator. *Mol Cell*. **1**: 863-872.

Wisniewski, J. R. & Schulze, E. (1994). High affinity interaction of dipteran high mobility group (HMG) proteins 1 with DNA is modulated by COOH-terminal regions flanking the HMG box domain. *J. Biol. Chem.* **269**: 10713-10719.

Yanicostas, C. & Lepesant, J.A. (1990). Transcriptional and translational *cis*-regulatory sequences of the spermatocyte-specific *Drosophila janusB* gene are located in the 3' exonic region of the overlapping *janusA* gene. *Mol. Gen. Genet.* **224**: 450-458.

Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. & Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21-23 nucleotide intervals. *Cell* **101**: 25-33.

Zhu, J., Hayakawa, A., Kakegawa, T. & Kaspar, R. L. (2001). Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1521**: 19-29.

Zinn, K. R., Dimaio, D., Maniatis, T. (1983). Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human β -interferon gene. *Cell* **34**: 865-879.

Zuker, M., Mathews, D. H. & Turner, D. H. (1999). Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: A Practical Guide In: *RNA Biochemistry and Biotechnology*. 11-43, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, (eds.), NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers.

7. Anhang

7.1 *Drosophila* La-Gen

Im Folgenden ist die cDNA-Sequenz und die Sequenz des Fusionsproteins im pSCREEN-Vektor dargestellt (Beschreibung siehe 3.2.3).

LA-cDNA-Sequenz:

GCGAAATTTTCACAGCTAAA ATG GCCGAAGTTGCTGAAACCCCGAGTGTG	50
GAAGCCCAGGAAGAGGTAGCACAGCCCGCCGAGGCGCAGGTGCTGGAGGC	100
GAAGAACGGCGACGCCAAGAAGGACCCGGCTCCCGCAGCAGAGGAAGCCG	150
CTGGCGGCTTCACCAAACAGGAGCGCGCCATAATCCGGCAGGTAGAGTAC	200
TACTTCGGCGATGCCAATCTGAATCGGGACAAGTTTCTGCGCGAGCAGAT	250
CGGCAAGAACGAGGACGGCTGGGTGCCCTGTGCGTGTCTGTTACCTTCA	300
AGAGATTGGCCTCCCTGTCCACGGACTTATCCGAGATCGTGGCTGCCCTG	350
AACAAATCCGAGGAGGGCCTCGTGGAGATTAGCGAAGACAAACTCAGCCT	400
GCGTCGCCATCCGGAGCGTCCCATTCAGAGCACAAACGAAGAGCGGCGCA	450
AGGAGATCCAGGAGCGGACCGCATAACGCAAGGGCTTCCCCCTAGATTCG	500
CAGATTAGCGAACTGCTCGACTTTACTGCCAACTACGACAAAGTGGTCAA	550
CCTGACCATGCGCAACAGCTATGACAAGCCACCAAGTCGTACAAGTTCA	600
AGGGCAGCATCTTCCTTACTTTTCGAGACCAAGGACCAGGCAAAGGCCTTC	650
CTCGAACAGGAGAAGATCGTTTATAAGGAGCGCGAGCTGCTGCGTAAATG	700
GCAGGTGGACTACCTTAAGGAGAAGCAGGAGGAATACGCCCAGAAGAACG	750
AGAAGCGCAAAAACAAAAGGAGGCCAAGCCTGAGCCTGCCTTCGAGCTG	800
CCCAAGAACGCCATTGTTGTCTTCGAGGGCGCTCCGGAGACATCTAGCCG	850
CGAGGAAATTCGCGAACGCTTCGAGAAGATCAAGGACTTCGAGGTGGCCT	900
ACATTGAGTTCGCCAAGGGCGAAACCAAGGGCTCTGTGCGGCTGACGGAG	950
GCCGATGCGGCCGAAAAGTACATTGCCAAGGTGGAGGAAGGCAAGCTCAA	1000
GTTCAACGATGAGGTCTCCCTGTGCTGCGAAAGGCCACCGAGGAGGAGG	1050
AGAAGGAGTTCATCGACAAGGCCATAG	1077

La-Fusionsprotein im pSCREEN-Vektor:

Der Beginn und das Ende des La-Protein-Anteils sind fett gedruckt.

MASMTGGQQM	GTNQKGQVVA	AGDKLALFLK	VFGGEVLTAF	ARTSVTTSRH	50
MVRSISSGKS	AQFPVLGRTQ	AAYLAPGENL	DDKRKDIKHT	EKVITIDGLL	100
TADVLIYDIE	DAMNHYDVRS	EYTSQLGESL	AMAADGAVLA	EIAGLCNVES	150
KYENIEGLG	TATVIETTQN	KAALTDQVAL	GKEIIAALTK	ARAALTKNYV	200
PAADRVFYCD	PDSYSAILAA	LMPNAANYAA	LIDPEKGSIR	NVMGFVVEV	250
PHLTAGGAGT	AREGGGGSD	MHHHHHHSSG	LVPRGSGMKE	TAAAKFERQH	300
MDSPDLHLGD	TIEYQDLGTD	DDDKAMAISD	PNS MAEVAET	PSVEAQEEVA	350
QPAEAQVLEA	KNGDAKKDPA	PAAEEAAGGF	TKQERAIIRQ	VEYYFGDANL	400
NRDKFLREQI	GKNEDGWVPL	SVLVTFKRLA	SLSTDLESEIV	AALNKSEEGE	450
VEISEDKLSL	RRHPERPIPE	HNEERRXEIQ	ERTAYAKGFP	LDSQISELLD	500
FAANYDKVVN	LTMRNSYDKP	TKSYKFKGSI	FLTFETKDQA	KAFLEQEKIV	550
YKERELLRWK	QVDYLKEKQE	EYAQKNEKRK	NKKEAKPEPA	FELPKNAIVV	600
FEGAPETSSR	EEIRERFEKI	KDFEVAYIEF	AKGETKGSVR	LTEADAAEKY	650
IAKVEEGKLG	FNDEVSLSLR	KATEEEEEKEF	IDKAI IN WAL	AAALEPG	697

7.2 *C. elegans* cDNA yk109b10

Im Folgenden ist die Sequenz der cDNA yk109b10 gezeigt (Beschreibung siehe 3.3.1). Start- und Stopcodon von Y53C12B.2 sind unterstrichen.

```

GGCACGAGGAAACATATGGCCACTAGCAGCTCCGCTTTCGACGATGAGCTCC      50
CAATGGAGGAAGGAATGCCGGAACCTTCTCGATGACGAGGATGTCCCAAGC      100
ACACTTCCATCACTTCTCGAGCAAAATTTGGACACTGCTCCAAAGGGGGA      150
TGAATTCAAATTTGGTAAAACGTAAGAGAAAGTCTGGAAATGCGATTGACG      200
TCGTTCATGGAAGACGTATCACAAGTCGACGAAGACGCCACCGCAGACACT      250
GCAGATGACTCCACTGGACCAAAATCGTCGAAACGTACAAAAGGAGTGAA      300
AGGAGAGTCTCGTGTAGTTCCGGTACCAAAGCATCGTTATACACCTCTCA      350
AGGATAACTGGGTCAACATTTTTCACACCGATCGTCAAAAATTTGGGACTA      400
CAGGTGCGTTTTCAACTTGAAGAAGCGACAAGTCGAGATTAGAAATCCAGT      450
GGATCGAGAAGACACTACAGATTTGCAAAAGGCCACAGACTTTGTTCCGGG      500
CATTCAATTCTCGGTTTTGAAGTCAATGACGCTATTGCTCTTATTTCGACTT      550
GATCACCTGTTTTTTGGAGACTTTTTGAGGTCGCAGATGTGAAACACTCGCT      600
GAAGGGCGATCATGTGAGCCGTGCCATCGGACGTATTGCAGGAAAAGACG      650
GACGTACCAAACCTGGTCATTGAGAACAACAACCAAGACGAGAATTGTTGTC      700
GCCAACACCAAATTCACATCCTTGGAGCCTATCAGAACTTGAAACTCGC      750
CAGAAATGCTGTTTTGCAGTTTGATTCTAGGTTTCGAACCCATCAAAGTGT      800
ACGGAAGTCTTCGCAACATGGCATCGCGTGGAGCAGAACGTCTCTAATCA      850
ACAATTACATTTTTTTCTGGCTTTTTTTTTkGGTTTTTGTTCATCGtATTCTT      900
GGTCGtTTCTTTTTTaaaaAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCGAGACTAGC      950
TCGTGCCGAATTCGGCACGAGTTGCCACGCTCGtCGTATTGCCATCGCAG      1000
CAATTATTGTCTCAACATGTGCTGTTGTGAGCTCATTGGTTGCTCTTCCA      1050
ATGATCTACAATATGGTTATCAGTATTCAAAGTGAAATCTCTCAGGAAAC      1100
TGGTTTCTGTATGATGCGTTCCCGTGACATGCTTGTTAACATGTATTCAA      1150
CTGCTGGAAAGAGTGGATATCGTGCAAAGCGTGCTTGGCAATTCGGATCA      1200
TGGGTTCAAGATTCTGGAGTCGGAGGTGGAGCCGGTGGATACGGTAGTG      1250
ACCAGCTGATAGTGGATATGGTGCACAAGGAACCAACAATGGATATGGAC      1300
CAGTTGTTAATGCTGAACCAGAACCACAATGTTGTACATGCCAACAAGGA      1350
AAGGCTGGACCACCAGGACCACCAGGAGATGATGGAAAGGACGGAAATGA      1400
TGGATCAGCTGGAAATGATGCTAAGAATGGAAAGGATGGAGGTGTTGGRC      1450
CATCTGATGGACTTCAATCTGAACCATGCATGATCTGCCACCAGGTGCA      1500
CAAGGACTTGGAGGTGCTCCAGGAGCCAAGGGACCACAAGGACCACGTGG      1550
ATCACCAGGACTTTCCGGTGTTGATGGAAGACGTGGAGAGCCAGGTATGT      1600
CTGGACCAGCTGGAACCTCAAGGAGAACCAGGACCACAAGGACCACCAGGA      1650
AAGAAGGGAGATGATGGAAGAGTTATTAATGTCAATGGACCACCAGGAGC      1700
CGGAGGAGCCCCAGGACCACAAGGACGCAAGGGAGAACGTGGACCAAAGG      1750
GAGTTCCAGGATCAGTTCATCCAGGAGTTCAAGGACCAACTGGAGATCAA      1800
GGAAGAAAAGGAAGAGCTGGAAGAAAGGGAGAACTGGAGGACAAGGACC      1850
AATTGGATCAAAGGGACCAAATGGAGATTGCTTCCATTGCCCAACTCCAA      1900
GAACTCCACCAGGCTATTAATTTCTCGTGGATTCTGTGTTATTTCAATAA      1950
ATTATTATTTATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA      1981

```

Aminosäuresequenz des Proteins Y53C12B.2:

MATSSSAFDD	ELPMEEGMPE	LLDDEDVPST	LPSLLEQNLD	TAPKGDEFKL	50
VKRKRKSGNA	IDVVMEDVSQ	VDE DATADTA	DDSTGPKSSK	RTKGVKGESR	100
VVPVPKHRYT	PLKDNWVNIF	TPIVKNLGLQ	VRFNLKKRQV	EIRNPVDRED	150
TTDLQKATDF	VRAFILGFEV	NDAIALIRLD	HLFLETFEVA	DVKHSLKGDH	200
VSRAIGRIAG	KDGRTKLVIE	NTTKTRIVVA	NTKIHILGAY	QNLKLARNAV	250
CSLILGSNPS	KVYGSLRNMA	SRGAERL			277

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. M. Schäfer. Sie ermöglichte mir, an diesem interessanten Thema zu arbeiten und trug wesentlich, nicht zuletzt durch ihre ständige Diskussionsbereitschaft, zum Gelingen der Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. R. Hardeland möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats danken.

Für die gelungene Zusammenarbeit am *don juan*-Projekt bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl, Nicole Blümer und Leonie Hempel aus Marburg. Bei der Durchführung und Diskussion der *C. elegans* –Experimente stand mir Dr. E. Schulze (Göttingen) jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Bei meinen Mitstreitern im Labor möchte ich mich ebenfalls bedanken: Ute Renner, Tanja Zeuch, Nicole Schleinschok, Dr. Martin Hollmann, Dr. Ralf Cordes, Dr. Ralf Schwanbeck und Dr. Anita Jung.

Für ihre Hilfsbereitschaft und lustige Stunden möchte ich mich bei Dr. Carsten Raasch, Ute Luginbühl, Konstanze Krapf, Stephan Fröde, Stefan Pabst und Enrico Müller danken.

Ein besonderer lieber Dank gilt meiner Mutter, die sehr verständnisvoll und geduldig mich über die vielen Jahre des Studiums unterstützt hat.

Lebenslauf

Name: Kay Schreiter
Geburtsdatum: 16.03.1972
Geburtsort: Lutherstadt Eisleben

Schul- und
Berufsbildung: 1978-1988 Polytechnische Oberschule

1988 (September)- 1991 (Juni) Berufsausbildung mit Abitur,
Abschluß als Facharbeiter für BMSR-Technik (Betriebs-, Meß-,
Steuerungs- und Regelungstechnik); Allgemeine
Hochschulreife

Grundwehrdienst: 1991 (Juli)- 1992 (Juni)

Studium: 1992 (Oktober) Beginn des Studiums im Diplomstudiengang
Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen

1994 Vordiplom

1996 Mündliche Diplomprüfung (Entwicklungsbiologie,
Zoologie, Physikalische Chemie)

1996 (November)-1998 (August) Diplomarbeit: „Identifizierung
RNA-bindender Proteine, welche die Expression einer Gen-
familie in der Spermatogenese von Drosophila kontrollieren“
angefertigt im III. Zoologischen Institut-Entwicklungsbiologie,
Abt.: "Molekulare Entwicklungs-genetik" bei Frau Prof. Dr.
M. Schäfer

1998 (September) Beginn des Promotionsstudium an der
Universität Göttingen in der Abtl. "Molekulare Entwick-lungs-
genetik" bei Frau Prof. M. Schäfer

1999 (April)-2000 (Sept.) Stipendiat im Graduiertenkolleg
„Molekulare Genetik der Entwicklung“

seit Oktober 2000 Wissenschaftlicher Angestellter an der
Universität Gh Kassel im FG Zoologie-Entwicklungsbiologie bei
Frau Prof. Mireille Schäfer